

TESIS DE LA UNIVERSIDAD
DE ZARAGOZA

2024

4

Pablo Iruzubieta Agudo

El Cilio Primario: de la Neurogénesis al Cáncer

Director/es

Junquera Escribano, María Concepción
Monzón Garcés, Marta

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

ISSN 2254-7606



Prensas de la Universidad
Universidad Zaragoza



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

**EL CILIO PRIMARIO: DE LA NEUROGÉNESIS AL
CÁNCER**

Autor

Pablo Iruzubieta Agudo

Director/es

**Junquera Escribano, María Concepción
Monzón Garcés, Marta**

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado**

2021

EL CILIO PRIMARIO: DE LA NEUROGÉNESIS AL CÁNCER.

Tesis doctoral presentada por Pablo Iruzubieta Agudo para optar al grado de Doctor en
Medicina por la Universidad de Zaragoza.

Directoras:

Dra. María Concepción Junquera Escribano

Dra. Marta Monzón Garcés

Imagen de cubierta: Transporte intraflagelar en cilio primario. Célula tumoral de un GIST. Autores: *Junquera, Iruzubieta*.

“Ante el científico está el Universo entero apenas explorado, [...], y, en fin, el organismo humano, ofreciéndonos en cada célula una incógnita y en cada latido un tema de profunda meditación”.

Santiago Ramón y Cajal.

Reglas y consejos sobre la investigación biológica. Los tónicos de la Voluntad.

“La medicina no acaba en el hospital, como a menudo se cree, sino que allí no hace más que comenzar. Es en el laboratorio donde se buscan las explicaciones de la vida en el estado fisiológico y patológico”.

Claude Bernard.

Introducción al estudio de la medicina experimental.



**Universidad
Zaragoza**

D^a. Concepción Junquera Escribano y **D^a. Marta Monzón Garcés**, Catedrática y Profesora Titular del Departamento de Anatomía e Histología humanas de la Universidad de Zaragoza

INFORMAN:

Que D. Pablo Iruzubieta Agudo ha realizado bajo nuestra dirección los trabajos correspondientes a su tesis doctoral titulada **“El cilio primario: de la neurogénesis al cáncer”**, que se corresponde con el plan de investigación aprobado por la Comisión de Doctorado y cumple con los requisitos exigidos por la legislación vigente para optar al grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza, por lo que autorizamos su presentación para que pueda ser defendida ante el tribunal correspondiente.

Zaragoza, a 9 de Abril de 2021

Fdo.: Concepción Junquera

Fdo: Marta Monzón

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por ser ejemplo de trabajo constante y esfuerzo, por su apoyo continuo. Por entender mis ausencias y aceptar mis locuras y mi ritmo de vida. A mi hermano, quien provocó mi primer contacto con las ciencias de la vida. Porque sin vosotros yo no sería yo, ni estaría aquí.

A mis directoras de tesis. Ha llovido desde aquellas primeras clases de Biología en las que comprendí que la salud y la enfermedad son el reflejo del funcionamiento celular. Concha, durante todos estos años has sido mucho más que una profesora o una directora, has sido mentora y guía, enseñándome los entresijos de la biología celular y la importancia del cariño en todo proyecto o investigación que se lleve a cabo. Marta, siempre ahí, siendo un apoyo continuo cuando un experimento no salía, ayudando en todo, por todo lo que he aprendido de ti, especialmente, el tesón aragonés.

A los buenos amigos, por compartir conmigo mis desvaríos diarios y fomentarlos.

A toda la gente con la que me he cruzado en este camino y que me ha permitido vivir esta experiencia increíble.

¡Gracias!

NOTA INTRODUCTORIA

Esta tesis supone un compendio de cuatro artículos publicados o aceptados para su publicación con una misma línea argumental: la presencia e implicación del cilio primario en diferentes tipos de tejidos y procesos.

A continuación citamos las referencias de cada uno de estos trabajos:

- 1) Supporting evidence of human ENS adult neurogenesis: presence of primary cilia and adult neurogenesis markers. Iruzubieta P, Cantarero I, Monzón M, Lahoz M, Junquera C. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2020 Nov 25. doi: 10.1007/s10571-020-01017-8.
- 2) Hedgehog signalling pathway activation in Gastrointestinal Stromal Tumours is mediated by primary cilia. Iruzubieta P, Monzón M, Castiella T, Ramírez T, Junquera C. *Gastric Cancer*. 2020 Jan;23(1):64-72. doi: 10.1007/s10120-019-00984-2.
- 3) Stromal cells of giant cell tumor of bone show primary cilia. Castiella T*, Iruzubieta P*, Monleón E, Cardiel MJ, Gómez-Vallejo J, Monzón M, Junquera C. * First co-authors. *Microscopy Research and Technique*. *In Press*.
- 4) Primary cilia presence and implications in bladder cancer progression and invasiveness. Iruzubieta P, Castiella T, Monleón E, Berga C, Muñoz G, Junquera C. *Histochemistry and Cell Biology*. 2021 May;155(5):547-560. doi: 10.1007/s00418-021-01965-2

RESUMEN

El cilio primario es una nanoestructura que protuye hacia el exterior celular, constituída por un cuerpo basal, originado a partir de un centriolo, un axonema compuesto por un esqueleto de microtúbulos y una membrana ciliar que lo recubre. Su estructura hace de él un nodo de comunicación entre el medio extracelular (con el que se comunica a través de receptores y canales ubicados en la membrana ciliar) y el intracelular. Se ha relacionado con importantes funciones de las células eucariotas como el ciclo celular, la señalización química y mecánica, el metabolismo celular, los procesos de diferenciación o la migración. Su implicación en la diferenciación y proliferación celular lo han relacionado con procesos como la neurogénesis adulta del Sistema Nervioso Central o con el Cáncer, aunque aún no se comprenden sus funciones exactas.

En el transcurso de esta tesis hemos analizado la presencia y relaciones de esta estructura en diferentes procesos celulares tanto a nivel fisiológico como patológico. Así, se han estudiado las implicaciones del cilio primario en la neurogénesis del Sistema Nervioso Entérico apuntando a una población de células que presentan cilio primario (las Células Intersticiales de Cajal) como posibles células progenitoras neurales en el intestino adulto. Por otra parte, se ha analizado la presencia del cilio primario en tumores mesenquimales (Tumores del Estroma Gastrointestinal y Tumor de Células Gigantes del hueso) y epiteliales (Carcinoma Urotelial) y se ha relacionado con importantes elementos del proceso tumoral, como las vías de señalización, la proliferación o la invasión de tejidos próximos. De esta manera se ha confirmado la presencia de cilio primario en todos los tipos tumorales estudiados, así como la expresión de la vía Hedgehog, mediada por el cilio, y se ha relacionado, en el caso de Carcinoma Urotelial, con procesos de Transición Epitelio Mesenquimal, fundamentales para la invasión tumoral de tejidos vecinos y a distancia.

En definitiva, como fruto de los resultados de esta tesis, proponemos que la presencia del cilio primario supondría una característica fundamental en poblaciones celulares con unas características muy específicas, sugestivas de células madre tanto en situaciones fisiológicas como patológicas; en las que esta estructura mediaría importantes funciones como su proliferación, su diferenciación o los procesos de migración. Todas estas características harían del cilio primario una importante diana para controlar y regular el comportamiento de las células madre.

ABSTRACT

The primary cilium is a nanostructure which protrudes to the extracellular medium. It consists of a basal body originated from a centriole, an axoneme composed by a microtubule skeleton and a ciliary membrane which envelopes the axoneme. Its structure makes it a communication hub between the extracellular (through receptors and channels located in the ciliary membrane) and the intracellular media. It has been related to important eukaryotic cellular functions such as cell cycle regulation, chemical and mechanical signaling, cellular metabolism, differentiation processes or migration. Its implications in differentiation and proliferation have connected primary cilia with processes like Central Nervous System adult neurogenesis or Cancer, although its exact functions remains elusive.

This PhD Project tries to analyse the presence and relations of primary cilia with cellular processes both in physiology and pathology. On the one hand, we have studied the implications of the primary cilium in Enteric Nervous System neurogenesis, pointing out a specific population of ciliated cells (the Interstitial Cells of Cajal) as potential neural progenitor cells in adult intestine. On the other hand, primary cilia presence in mesenchymal (Gastrointestinal Stroma Tumors and Giant Cell Tumor of Bone) and epithelial (Bladder Cancer) tumors has been showed and they have been related to tumoral processes like signaling pathways, proliferation or neighbor tissues invasion. Hence, the presence of primary cilia and the activation of the cilia-dependent Hedgehog pathway has been confirmed in the tumors studied and, in Bladder Cancer, they have been related to Epithelial-Mesenchymal Transition, which is a fundamental clue in epithelial tumor invasion and metastasis.

To sum up, based on our results, we suggest that primary cilia presence would suppose a fundamental feature in specific cell populations, which are suggestive of stem cells both in healthy and tumoral tissues. Primary cilia would mediate important functions in these cells such as cell proliferation, differentiation or migration. All these elements would make the primary cilium an important target for regulating stem cells.

ÍNDICE

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	1
-----------------------------------	----------

MARCO TEÓRICO	11
----------------------------	-----------

1. CILIO PRIMARIO. GENERALIDADES	13
1.1. Introducción, recuerdo evolutivo y clasificación de los cilios	13
1.2. Estructura del cilio primario	15
1.3. Ciliogénesis.....	16
1.4. Transporte y dinámica ciliar	18
a) Transporte de vesículas al cilio.	
b) La zona de transición.	
c) El transporte intraflagelar.	
1.5. Funciones del cilio primario como antena sensorial.....	23
a) Cilio primario y mecanotransducción.	
b) Cilio primario y quimiotransducción. Vías de señalización cilio-dependientes.	
c) Cilio primario y campo eléctrico.	
1.6. Relaciones del cilio primario con las funciones celulares	29
a) Cilio primario y ciclo celular. Ensamblaje y desensamblaje ciliar.	
b) Cilio primario y células madre. Auto-renovación y diferenciación.	
c) Cilio primario y citoesqueleto. Polaridad y migración.	
d) Cilio primario, sistema ubiquitina-proteasoma y autofagia-lisosoma. Proteostasis y renovación.	
e) Cilio primario y metabolismo.	
1.7. Funciones órgano-específicas del cilio primario. Ciliopatías	41
2. CILIO PRIMARIO Y NEUROGÉNESIS	43
2.1. El sistema nervioso entérico.....	43
a) Estructura, funciones y componentes.	
b) Embriogénesis del sistema nervioso entérico.	
c) Neurogénesis entérica adulta.	
2.2. Cilio primario en la neurogénesis embrionaria.....	49
2.3. Cilio primario en la neurogénesis adulta.....	50
a) Cilio primario en la neurogénesis adulta de la zona subventricular.	
b) Cilio primario en la neurogénesis adulta de la zona subgranular.	
3. CILIO PRIMARIO Y CÁNCER	56

3.1. Rasgos generales del papel del cilio primario en el cáncer	57
a) Aumento de la proliferación. Ciclo celular.	
b) Vías de señalización cilio-dependientes y cáncer.	
c) Cilio primario y células madre tumorales.	
d) Migración y metástasis. Transición epitelio-mesenquimal y cilio.	
e) Cilio primario en la relación tumor-microambiente. Angiogénesis.	
f) Metabolismo tumoral y cilio primario.	
g) Cilio primario y apoptosis, daño del ADN y resistencia a quimioterápicos.	
3.2. Descripción de la presencia/aumento o disminución de los cilios primarios en función del tipo específico de cáncer	69

OBJETIVOS 71

1. OBJETIVOS GENERALES	73
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	73

RESULTADOS..... 75

1. CAPÍTULO I: “SUPPORTING EVIDENCE OF HUMAN ENTERIC NERVOUS SYSTEM ADULT NEUROGENESIS: PRESENCE OF PRIMARY CILIA AND ADULT NEUROGENESIS MARKERS”. Iruzubieta, P., Cantarero, I., Monzón, M., Lahoz, M. and Junquera, C. Cell. Mol. Neurobiol. (2020). doi:10.1007/s10571-020-01017-8 (FI 5,046) Q2 Neuroscience, Q2 Cell Biology ...	77
2. CAPÍTULO II: “HEDGEHOG SIGNALING PATHWAY ACTIVATION IN GASTROINTESTINAL STROMAL TUMOURS IS MEDIATED BY PRIMARY CILIA”. Iruzubieta, P., Monzón, M., Castiella, T., Ramírez, T. and Junquera, C. Gastric Cancer (2019). doi:10.1007/s10120-019-00984-2. (FI 7,37) Q1 Oncology, Q1 Gastroenterology&Hepatology.....	87
3. CAPÍTULO III: “STROMAL CELLS OF GIANT CELL TUMOUR OF BONE SHOW PRIMARY CILIA” Castiella T*, Iruzubieta P*, Monleón E, Cardiel MJ, Gómez-Vallejo J, Monzón M, Junquera C. * First co-authors. Microscopy Research and Technique. 2021. FI 2,769 Q1 Anatomy & Histology, Q2 Microscopy, Q2 Biology	97
4. CAPÍTULO IV: “PRIMARY CILIA PRESENCE AND IMPLICATIONS IN BLADDER CANCER PROGRESSION AND INVASIVENESS” Iruzubieta P, Castiella T, Monleón E, Berga C, Muñoz G, Junquera C. Journal: Histochemistry and Cell Biology. 2021. FI 4,304. Q1 Microscopy Q3 Cell Biology (2019).....	123

DISCUSIÓN..... 137

1. EL CILIO PRIMARIO Y LA NEUROGÉNESIS ENTÉRICA	139
---	-----

1.1. El cilio primario en la neurogénesis embrionaria del sistema nervioso entérico.....	139
1.2. El cilio primario en la neurogénesis adulta entérica: de las células intersticiales de Cajal a las neuronas, pasando por la glía.....	140
2. EL CILIO PRIMARIO EN PROCESOS TUMORALES.....	144
2.1. Tumor del estroma gastrointestinal.....	144
2.2. Tumor de células gigantes óseo.....	145
2.3. Carcinoma urotelial de vejiga.....	146
2.4. Glioma de bajo grado.....	147
2.5. Discusión conjunta.....	147
3. EL CILIO PRIMARIO COMO ELEMENTO FUNDAMENTAL DE LAS CÉLULAS MADRE FISIOLÓGICAS Y TUMORALES.....	151
 CONCLUSIONES.....	 153
 REFERENCIAS.....	 157
 ANEXOS.....	 183
1. OTRAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN RELACIONADAS CON EL CILIO PRIMARIO.....	185
2. ROLE OF PRIMARY CILIA IN ENTERIC NERVOUS SYSTEM DEVELOPMENT. Informe de la estancia realizada en “ <i>l’Institute de Biologie de l’École Normale Supérieure</i> ” de París en el laboratorio de la Dra. Nathalie Spassky.....	195
3. PRIMARY CILIA AND SPHEROSOMES BIOGENESIS IN LOW GRADE GLIOMA. Comunicación al VIII International Congress of Histology and Tissue Engineering en septiembre 2019, Murcia, España.....	207
4. CARTA DE ACEPTACIÓN DEL TRABAJO PENDIENTE DE PUBLICACIÓN.....	211
5. FACTOR DE IMPACTO DE LAS PUBLICACIONES QUE COMPONEN ESTA TESIS Y ÁREAS TEMÁTICAS.....	213

**LISTA DE
ABREVIATURAS**

4EBP1: *Eukaryotic Binding Protein 1*

5-HT₄: Receptor de 5-Hidroxi-Triptamina (Serotonina)

ADAM10: *A Disintegrin and Metalloprotease*

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

Akt: *Protein Kinase B*

AMPK: *Adenosin MonoPhosphate Kinase*

ANO1: *Anoctamin1*

APC: *Adenomatous Polyposis Coli*

Arl13b: *ADP Ribosylation Factor Like GTPase 13B*

Arl6: *ADP Ribosylation Factor-Like Protein 6*

ARN: Ácido Ribonucleico

Ascl1: *Achaete-Scute homolog1*

ATG16L: *Autophagy Related 16 Like 1*

ATR: *Ataxia Telangiectasia and RAD3-related*

BBS4: *Bardet Biedl Syndrome 4*

BBSoma : *Bardet-Biedl Syndrome-oma*

BCL2: *B-Cell Lymphoma 2*

BLBP: *Brain Lipid Binding Protein*

BMP4: *Bone Morphogenetic Protein 4*

BrdU: Bromodesoxi-Uridina

CAF: *Cancer-Associated Fibroblasts* o Fibroblastos Asociados al Cáncer

CAMK: *Calcium/Calmodulin Kinase*

CBFA1: *Core-binding factor subunit alpha-1* (equivalente a Runx2)

CCNB1: *CyclinB1*

CCND1-2: *CyclinD1-2*

CCNE: *CyclinE*

- CD__**: *Cluster of Differentiation* (lleva asociado un número).
- CDC25B**: *Cell Division Cycle 25B*
- CDK5**: *Cyclin Dependent Kinase 5* o Kinasa Dependiente de Ciclinas 5
- CDO**: *Cell adhesion-associated oncogene regulated*
- Cep164**: *Centrosomal Protein of 164 KDa*
- Cep290**: *Centrosomal protein of 290 kDa*
- Cep97**: *Centrosomal protein of 97kDa*
- CFLAR**: *CASP8 And FADD Like Apoptosis Regulator*
- CK1**: *Casein Kinase 1*
- CP110**: *Centriolar coiled-coil protein of 110 KDa*
- CSL**: *CBF1–Suppressor of Hairless–LAG1*
- DCX**: *Doublecortin* o Doblecortina
- DDL1-3**: *Delta-Like Ligand 1-3*
- Dhh**: *Desert Hedgehog*
- Disp**: *Dispatched*
- Dlx2**: *Distal-Less Homeobox 2*
- Dvl**: *Dishevelled*
- EDNRB**: *Endothelin Receptor type B* o Receptor de la Endotelina de tipo B
- EG_{SMP}**: *Submucous plexus enteric glia* glía entérica del plexo submucoso
- EG_{MP}**: *Myenteric plexus enteric glia* glía entérica del plexo mientérico
- EG_{Mucosa}**: *Mucosa enteric glia* glía entérica de la mucosa
- EG_{IM}**: *Intramuscular enteric glia* glía entérica intramuscular
- EGF**: *Epithelial Growth Factor* o Factor de Crecimiento Epitelial
- EHD**: *EPS15 homology (EH) domain-containing proteins*
- eIF4E**: *eukaryotic Initiation Factor 4E*
- ELCS**: *Nuclear envelope-limited chromatin sheets*
- EMT**: *Epithelial-Mesenchymal Transition* o Transición epitelio-mesenquimal

ERK: *Extracellular signal-Regulated Kinase*

ESCRT: *Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*

EVC: *Ellis-van Creveld Syndrome protein*

Fbw7: *F-Box And WD Repeat Domain Containing 7*

FGF: *Fibroblast Growth Factor* o Factor de Crecimiento de Fibroblastos

FGFR: *Fibroblast Growth Factor Receptor* o Receptor del Factor de Crecimiento de Fibroblastos

FOXC2: *Forkhead Box C2*

FOXF1: *Forkhead Box F1*

FOXL1: *Forkhead Box L1*

FOXM1: *Forkhead M1*

FST: *Follistatin*

GABA: *Gamma-Aminobutyric Acid* o ácido gamma-aminobutírico

GDNF: *Glia Derived Neurotrophic Factor* o Factor Neurotrófico Derivado de la Glia

GEF: *Guanine Exchange Factor* o Factor Intercambiador de Guanina

GFAP: *Glial Fibrillary Acidic Protein* o Proteína GlioFibrilar Ácida

GIST: *GastroIntestinal Stroma Tumour* o Tumor del Estroma GastroIntestinal

GLAST: *Glutamate Aspartate Transporter*

Gli: *Glioma-Associated Oncogen*

GPCR: *G-protein couple Receptor* o Receptor asociado a proteínas G

GREM1: *Gremlin 1*

GRK2: *G Protein-Coupled Receptor Kinase 2*

GSK3 β : Glicógeno Sintasa Kinasa 3 β

Gsx2: *Genetic-Screened Homeobox 2*

GTP: *Guanosine triphosphate* o Guanosina Tri-Fosfato

HDAC: *Hystone Deacetylase*

Hh: *Hedgehog*

HHIP: *Hh interacting protein*

HIF α : *Hypoxia Induced Factor α* Factor Inducido por Hipoxia α

HSPG: *Heparan Sulphate Proteglycan* o Proteglicano Heparán-Sulfato

ICC: *Interstitial Cell of Cajal* o Células Intersticial de Cajal

IFT20: *Intraflagellar Transport 20*

IFT-A: *Intraflagellar Transport A*

IFT-B: *Intraflagellar Transport B*

IGF: *Insuline-Like Growth Factor* o Factor de Crecimiento Similar a Insulina

Ihh: *Indian Hedgehog*

I κ B: Inhibidores κ B

JAG2: *Jagged Canonical Notch Ligand 2*

JNK: *c-Jun N-terminal Kinases*

Kif24: *Kinesin Family Member 24*

Kif2A: *Kinesin Family Member 2A*

Kif3A: *Kinesin Family Member 3A*

LATS1/2: *Large Tumor Supressor 1 y 2*

LGR5: *Leucine Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor 5*

LKB: *Liver Kinase B*

LRP: *Low density lipoprotein Related Protein*

MAM: *Mastemind*

MEK: *Mitogen-activated protein kinase kinase*

MIB1: *Mindbomb E3 ubiquitin-protein ligase*

miRNA: *micro Ribonucleoid Acid*

MKS: *Mekel Syndrome related proteins*

MOB1A/B: *Mps One Binder Kinase Activator-Like 1A/B*

MST1/2: *Mammalian STE20-like protein kinase 1 y 2*

mTOR: *mammalian Target Of Rapamycin*

MTORC 1-2: *Complejo mTOR 1-2*

MVB: *Multivesicular bodies* o cuerpos multivesiculares

Nde1: *NudE Neurodevelopment Protein 1*

Nek2: *NIMA -Never In Mitosis A- Related Kinase 2*

NeuN: *Neuronal Nuclear Antigen* Antígeno Nuclear Neuronal

NF-κB: *Nuclear Factor κB*

NICD: *Notch IntraCellular Domain* o Dominio intracelular de Notch

NPHP: Nefrocistina

OCT4: *Octamer-binding Transcription Factor4*

OFD1: *Oral-Facial-Digital Síndrome1*

PAR: *Partitioning Defective*

Pax3: *Paired Box 3*

PC1-2: Policistina 1-2

PCM1 *Pericentriolar Material 1*

PDAC: *Pancreas Ductal Adenocarcinoma* o Adenocarcinoma Ductal de Páncreas

PDGF: *Platelet-Derived Growth Factor* o Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas

PDGFRA: *Platelet-Derived Growth Factor Receptor A*

PDK1: *Phosphoinositide-Dependent protein Kinase 1*

PET: *Positron Emission Tomography* o Tomografía por Emisión de Positrones

PGP 9.5: *Protein Gene Product 9.5*

Phox2b: *Paired Like Homeobox 2B*

PI3K: Fosfatidil Inositol 3 Kinasa

PIP2: Fosfatidil Inositol 3,4 bifosfato

PIP3: Fosfatidil Inositol 3,4,5 trifosfato

PKA: Proteína Kinasa A

PKC: Proteína Kinasa C

PLP1: *Proteolipid protein 1*

POMC: Proopiomelanocortina

PRDM1: (*PR/SET Domain 14*)

PRX: *periaxin*

PSA-NCAM: *Polysialylated Neural-Cell-Adhesion Molecule* o Molécula Polisializada de Adhesión a Células Neuronales

Ptch: *Patched*

PTEN: *Phosphatase And Tensin Homolog*

PTH: *Parathyroid Hormone* u Hormona Paratiroidea

PTH LH: *Parathyroid Hormone Like Hormone* u Hormona relacionada con la Hormona Paratiroidea

RANKL: *Receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand*

RB: *Retinoblastoma associated*

RGL: *Radial Glia-Like* o Similar a Glía Radial

Rheb: *Ras homolog enriched in brain*

RMS: *Rostral Migratory Stream* o tracto migratorio rostral

ROR2: *Receptor Tyrosin kinase-like Orphan Receptor 2*

RPGRIP1: *Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator Interacting Protein Ligand 1*

Runx2: *Runt-related transcription factor 2*(equivalente a CBFA1)

S6K: *ribosomal protein S6 kinasa*

SAV1: *Salvador 1*

SCUBE2: *Signal peptide, CUB domain and EGF like domain containing 2*

Shh: *Sonic Hedgehog*

Smo: *Smoothed*

SNAI1: *Snail Family Transcriptional Repressor 1*

SNC: Sistema Nervioso Central

SNE: Sistema Nervioso Entérico

SNP: Sistema Nervioso Periférico

Sox10: *SRY-Box Transcription Factor 10*

Sox2: *SRY-Box Transcription Factor 2*

SUFU: *Suppressor of fused homolog*

TAZ: *Transcriptional coactivator with a PDZ-binding domain*

TCF/LEF: *T-cell transcription factor /lymphoid enhancer-binding factor 1*

TEAD: *TEA domain family members*

TGFβ: *Transforming Growth Factor β*

TLR: *Toll-Like Receptors*

TMEM67: *Transmembrane protein 67*

TNFα: *Tumor Necrosis Factor α* o *Factor de Necrosis Tumoral α*

TRCP: *Beta-Transducin Repeat Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase*

TSC: *Tuberous Sclerosis Complex*

t-SNARE: *target-Soluble NSF-N-ethylmaleimide-sensitive factor- Attachment ProteinReceptor*

Tuj1: *Clase III de β-tubulina específica de neuronas*

UPS: *Ubiquitin Proteasome System* o *Sistema Ubiquitina Proteasoma*

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor* o *Factor de Crecimiento Endotelial Vascular*

VENT: *Ventral Emigrating Neural Tube cells* o *células migratorias del tubo neural ventral*

VHL: *vonHippel Lindau protein*

v-SNARE: *vesicle-Soluble NSF-N-ethylmaleimide-sensitive factor- Attachment ProteinREceptor*

Wnt: *Wingless-related integration site.*

YAP: *Yes Associated Protein*

ZEB1-2: *Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1-2*

ZSG: *Zona Subgranular*

ZSV: *Zona Subventricular*

**MARCO
TEÓRICO**

1. CILIO PRIMARIO. GENERALIDADES.

1.1. INTRODUCCIÓN, RECUERDO EVOLUTIVO Y CLASIFICACIÓN DE LOS CILIOS.

Los cilios son estructuras que protruyen al exterior de las células eucariotas en forma de un axonema compuesto por nueve dobletes de microtúbulos periféricos cubiertos por una membrana ciliar. Estas estructuras poseen un origen evolutivo diferente al de los *flagella* del dominio Bacteria o los *archaella* del dominio Archaea, produciéndose un interesante ejemplo de evolución convergente (Khan and Scholey, 2018) por el que diferentes organismos desarrollan estructuras similares de forma paralela sin que tengan un antecedente común. Así, el origen evolutivo de los cilios se ha señalado en el Último Ancestro Común Eucariota, de donde proceden todas las células eucariotas existentes (Satir et al., 2008). Se ha propuesto que el cilio primigenio podría proceder bien de la adquisición de una nueva función del centro organizador de microtúbulos hacia una nueva estructura o bien de la incorporación de un virus con una morfología similar a la de los centriolos (Satir et al., 2008). Por otra parte, parece que las funciones sensoriales, a través de la concentración de proteínas específicas en la membrana ciliar, antecedieron a las capacidades motoras de los cilios (Satir et al., 2008).

En las células de mamíferos se han descrito cuatro tipos principales de cilios según posean o no un par central de microtúbulos y brazos de dineína que permitan su motilidad (Bernabé-Rubio and Alonso, 2017) (**Tabla 1, Fig. 1.1**):

- Estructura 9+2 con motilidad: cilios móviles de diferentes epitelios (respiratorio, trompas de Falopio, endimario, etc.) y flagelo de los espermatozoides.
- Estructura 9+2 sin motilidad: cilios de las neuronas sensoriales olfativas y kinocilio de las células ciliadas del oído interno (Falk et al., 2015).
- Estructura 9+0 con motilidad: cilio nodal de las células nodales que determinan la asimetría izquierda-derecha del organismo.
- Estructura 9+0 sin motilidad: cilio primario, presente en gran variedad de células y relacionado con múltiples funciones sensoriales, de señalización celular, proliferación y diferenciación.

Tabla 1. Clasificación de los tipos de cilios en células de mamíferos.

	Estructura 9+2	Estructura 9+0
Motilidad	Cilios móviles de epitelios, flagelos	Cilio nodal
No motilidad	Kinocilio del oído interno, cilios neuronas olfativas	Cilio primario

En esta tesis nos hemos centrado en el cilio primario y sus implicaciones en procesos de diferenciación y proliferación celular tanto a nivel fisiológico (neurogénesis entérica) como patológico (diferentes tipos de cáncer).

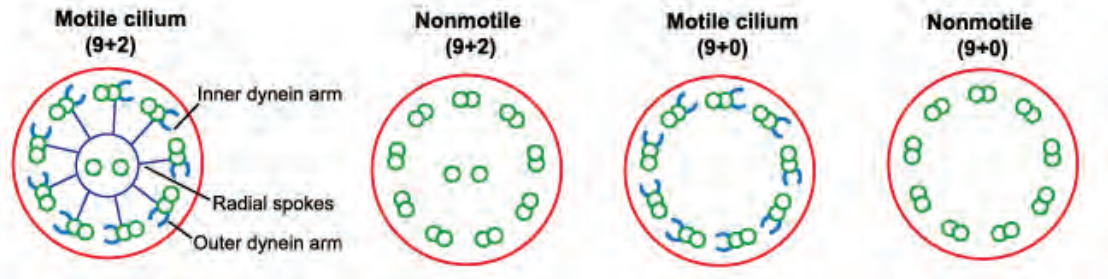


Fig 1.1. Cortes transversales de los diferentes tipos de cilios. En la imagen se pueden observar las características de los cuatro tipos de cilios descritos en las células de mamíferos: 9+2 móvil, 9+2 no móvil, 9+0 móvil y 9+0 no móvil. Modificado de Bernabé-Rubio and Alonso 2017.

El cilio primario fue descrito por primera vez por Zimmerman en 1898, si bien fue Sorokin (Sorokin, 1968) quien lo denominó por primera vez cilio primario en referencia a que era el primero en aparecer en la diferenciación celular del pulmón (frente a los cilios móviles del epitelio pulmonar, que aparecen posteriormente) (**Tabla 1.1**). Aunque inicialmente se planteó que el cilio primario podría ser un mero vestigio celular, posteriormente se ha demostrado su importancia fundamental en diferentes procesos celulares como el ciclo celular, la autofagia, la polaridad celular y su participación en diferentes vías de señalización químicas y mecánicas (Satir et al., 2010; Malicki and Johnson, 2017).

Muestra del interés suscitado por esta estructura en la comunidad científica es el número creciente de publicaciones relacionadas con el cilio primario en los últimos años (**Fig. 1.2**). En este sentido, caben destacar dos puntos de inflexión: a partir de la década de 1960, cuando se iniciaron los estudios ultraestructurales del cilio primario y momento en el que se acuñó este término por Sorokin; y a partir del año 2003, cuando se realizan los primeros trabajos que vinculan el cilio primario con funciones sensoriales y, en concreto, con la transducción de señales mecánicas y de diferentes vías de señalización (Bloodgood, 2009).

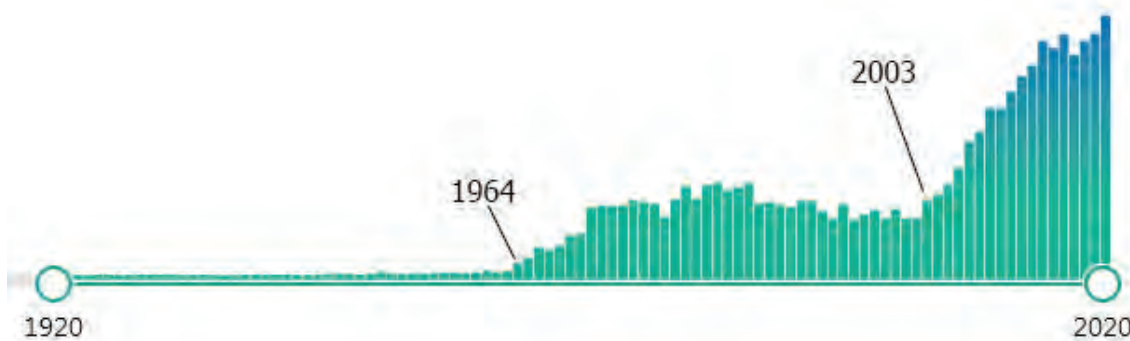


Fig 1.2. Artículos publicados en PubMed sobre el cilio primario en el último siglo. La imagen muestra los artículos sobre cilio primario por año. La gráfica muestra una tendencia creciente en los últimos 20 años, demostrando el interés que ha suscitado recientemente esta estructura.

1.2. ESTRUCTURA DEL CILIO PRIMARIO

El cilio primario está compuesto, fundamentalmente, por tres partes: el cuerpo basal, la zona de transición y el axonema (**Fig. 1.3**).

El cuerpo basal (**Fig. 1.3A y 1.3E**) procede de un centriolo modificado (también denominado centriolo materno) y, como tal, está compuesto por 9 tripletes de microtúbulos. A diferencia de los microtúbulos del citoesqueleto o del propio axonema (compuestos por tubulina α y β), el cuerpo basal presenta tubulina α , β , γ , δ y ϵ (Vertii et al., 2016). El cuerpo basal se ancla a la membrana del bolsillo ciliar (“ciliary pocket”) a través de las fibras de transición (Malicki and Johnson, 2017) (**Fig. 1.3D**) y presenta unos agregados proteicos (llamados apéndices subdistales) que se han relacionado con la activación del centriolo materno, así como con la orientación espacial del cilio primario (Mazo et al., 2016) y a los que se anclan microtúbulos del citoplasma (Mirvis et al., 2018). El centriolo materno mantiene una estrecha relación con el centriolo hijo y con el aparato de Golgi, que también está mediada por proteínas de los apéndices subdistales (Mazo et al., 2016). Además, del cuerpo basal emergen unas raíces ciliares, formadas por la proteína Rootletina, cuyas funciones exactas se desconocen aunque se ha sugerido su importancia en la estabilidad del cilio (Turn et al., 2021)

La zona de transición, localizada entre el cuerpo basal y el axonema, actúa como una compuerta que controla de forma específica el tránsito de proteínas y lípidos entre el citoplasma y el compartimento intraciliar, logrando así una composición proteolipídica cuantitativa y cualitativamente diferente al resto de la célula (Garcia-Gonzalo and Reiter, 2017). En esta zona aparece el collar ciliar (“ciliary necklace”) (**Fig. 1.3C**) que se caracteriza por la presencia de bandas de partículas intramembranas a las que se anclan los denominados enlaces en “Y”. Los enlaces en “Y”, o enlaces en forma de copa, están unidos por su base al cuerpo basal, mientras que los dos brazos se unen a las partículas del collar ciliar. El collar ciliar y los enlaces en Y se han relacionado con el paso selectivo de proteínas y lípidos al interior del cilio y al ensamblaje de proteínas de la membrana ciliar. El collar ciliar presenta una composición específica, diferente de la del resto del cilio (Gilula and Satir 1972; Satir and Christensen 2006).

El axonema (**Fig. 1.3B**), compuesto por 9 dobletes de microtúbulos sin par central, estructura 9+0, protruye hacia el medio extracelular donde entra en contacto con diferentes señales químicas y mecánicas (Malicki and Johnson, 2017). Estos microtúbulos sufren diferentes modificaciones post-traslacionales relacionadas con la estabilización de los polímeros de tubulina (acetilación, detirosinación, glutaminación, glucosilación...) (Wloga et al., 2017). No obstante, el axonema presenta una gran actividad de polimerización y despolimerización, especialmente, en la zona más distal, haciendo del cilio una estructura enormemente dinámica (Satir and Christensen 2006; Ishikawa and Marshall 2011). El axonema se encuentra envuelto por la membrana ciliar, continua a la membrana plasmática pero con una composición diferente como consecuencia de su origen a partir de vesículas del aparato de Golgi (ver más adelante) (Malicki and Johnson, 2017). Esta membrana presenta unas invaginaciones en su base, denominadas bolsillo ciliar (“ciliary pocket”). El bolsillo ciliar presenta una abundante actividad de endocitosis mediada por vesículas recubiertas de un material electrondenso

similar a la clatrina y está estrechamente relacionado con los filamentos de actina del citoesqueleto (Molla-Herman et al., 2010).

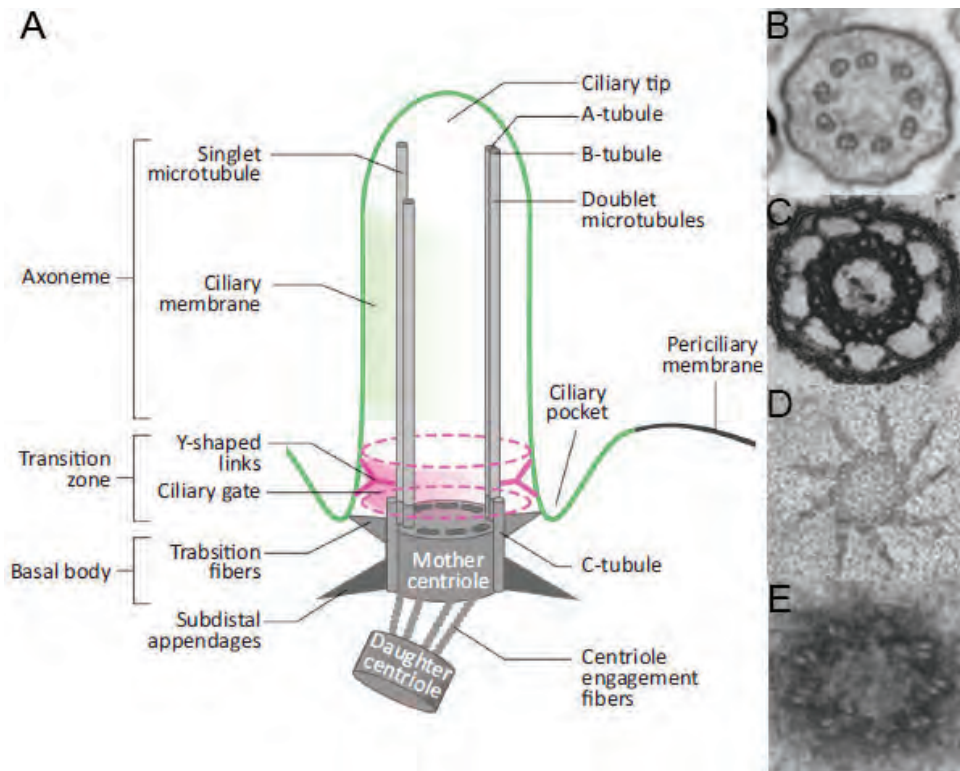


Fig. 1.3. Estructura general del cilio primario. A) El cilio primario está formado por tres partes fundamentales: el cuerpo basal (procedente de un centriolo modificado), la zona de transición y el axonema. En la imagen se detallan los componentes de cada una de estas partes. (Malicki and Johnson, 2017). En 3B-3E se muestran imágenes de microscopía electrónica de cortes transversales a nivel del axonema (B) (Falk et al., 2015); la zona de transición con los enlaces en Y y el collar ciliar (C) (Gilula and Satir, 1972); la zona de las fibras de transición (D) (Garcia-Gonzalo and Reiter, 2017) y el cuerpo basal (E), imagen propia.

1.3. CILIOGÉNESIS

La ciliogénesis es el proceso por el que se forma el cilio primario a partir de un centriolo denominado centriolo madre y que supone el centriolo más antiguo de los dos que forman el centrosoma.

Cuando el cilio no está formado, diversas proteínas como, por ejemplo, Cep290 (*Centrosomal protein of 290 kDa*) se encuentran alrededor del centrosoma formando parte de los satélites pericentriolares (Jenkins and Hernandez-Hernandez, 2015) donde son ubiquitinizadas por MIB1 (*MindbombE3 ubiquitin-protein ligase*) y degradadas (Villumsen et al., 2013; Jenkins and Hernandez-Hernandez, 2015). Por otra parte, CP110 (*Centriolar Coiled-Coil Protein Of 110 KDa*) se localiza en el extremo distal de los centriolos impidiendo la polarización de microtúbulos e interactuando con proteínas como Cep290 y Cep97 (*Centrosomal protein of 97kDa*) para impedir la formación del cilio primario (Tsang et al., 2008).

Ante determinadas situaciones, incluyendo estrés por rayos ultravioleta o calor (Villumsen et al., 2013), MIB1 es inactivado y las proteínas que forman los satélites pericentriolares dejan de ser ubiquitinadas y se unen a los centrosomas. Del mismo modo, se produce la retirada y degradación de CP110 del centrosoma. Todos estos cambios permiten que se inicie la formación del cilio primario.

Según la posición de los centriolos en las células se han descrito dos patrones fundamentales de ciliogénesis (Sorokin, 1968; Bernabé-Rubio and Alonso, 2017):

- **La vía intracelular o clásica (Fig. 1.4):** cuando el centrosoma se encuentra próximo al núcleo (típico de células mesenquimales, como los fibroblastos) el cilio crece desde el interior, estando prácticamente sumergido y presentando un profundo bolsillo ciliar. El cilio primario se desarrolla de forma intracelular mediante la aposición de vesículas procedentes del Golgi y endosomas sobre el centriolo madre, fusionándose en una gran vesícula ciliar (Sorokin, 1968), en un proceso mediado por las proteínas EHD (*EPS15 homology [EH] domain-containing proteins*). Esta migración de vesículas y su síntesis es controlada por proteínas G monoméricas Rab (específicamente Rab8 y Rab11), que interactúan con Cep290. De esta forma, en función de si CP110 está presente o no, Cep290 promueve o bloquea la formación del cilio primario (Tsang et al., 2008). En ocasiones, se ha observado que los centriolos migran hacia la membrana plasmática donde el cuerpo basal se ancla a través de las fibras de transición. Al fusionarse la vesícula única con la membrana plasmática, el cilio emerge al exterior celular.

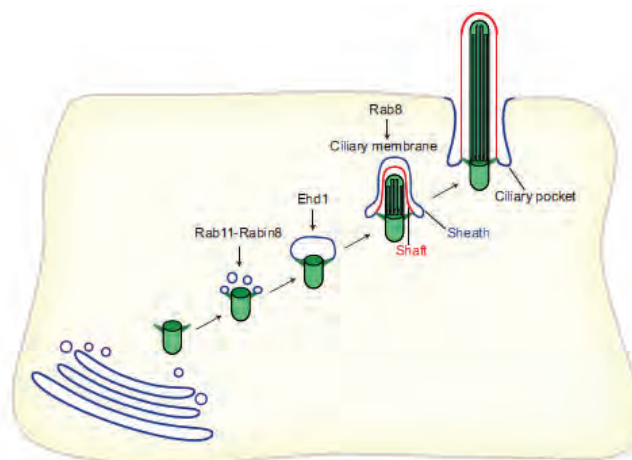


Fig. 1.4. Ciliogénesis intracelular o clásica. Esquema que muestra de manera simplificada cómo las vesículas del aparato de Golgi llegan al centriolo madre y forman una gran vesícula ciliar sobre la que se forma el axonema ciliar al tiempo que el centriolo migra hacia la membrana plasmática. Una vez que la vesícula se fusiona con la membrana plasmática el cilio primario emerge al exterior. Extraído de Bernabé-Rubio and Alonso 2017.

- **La vía alternativa (Fig 1.5):** Si, por el contrario, el centrosoma está próximo a la membrana plasmática (típico de células epiteliales) el cilio emerge desde la superficie, completamente expuesto y con un bolsillo ciliar pequeño (lo cual se ha relacionado con su función mecanosensora). Se ha relacionado el cuerpo medio o cuerpo de Flemming con este tipo de ciliogénesis (Bernabé-Rubio et al., 2016). El cuerpo medio procede del anillo contráctil

(una estructura compuesta por microtúbulos) presente en la citoquinesis que separa el citoplasma de las dos células hijas después de la división celular. Se ha observado que en el cuerpo medio aparece gran variedad de proteínas fundamentales para la génesis y el funcionamiento del cilio (como Cep97 y Rab8, entre otras). Así, durante la ciliogénesis de las células epiteliales, el cuerpo medio parece aproximarse a uno de los centriolos y cumple una función fundamental en el desarrollo de cilio primario, quizá transfiriendo componentes necesarios para su formación o mediando diferentes vías de señalización.

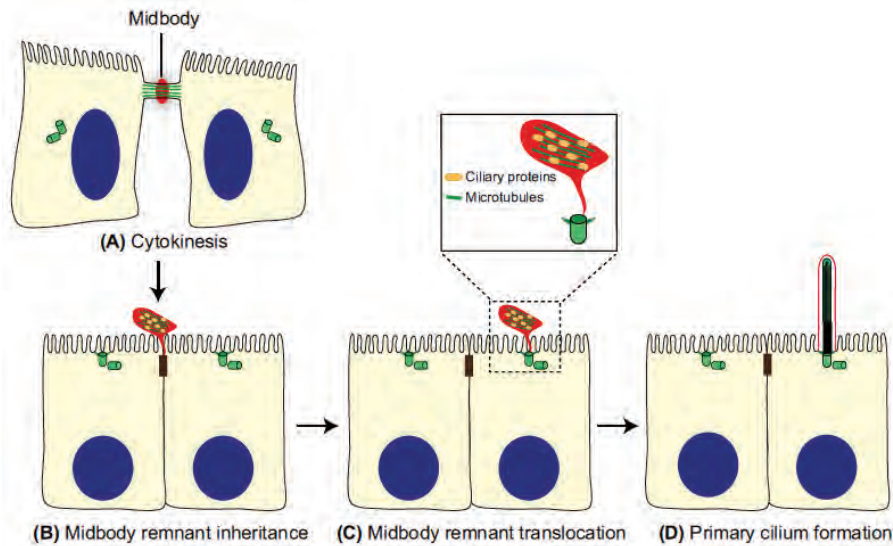


Fig. 1.5. Ciliogénesis alternativa. Esquema que muestra, de manera simplificada, cómo el cuerpo medio, que aparece durante la citoquinesis, se aproxima al centrosoma de una de las dos células hijas e interactúa con él para generar la formación del cilio primario. Extraído de Bernabé-Rubio and Alonso 2017.

1.4. TRANSPORTE Y DINÁMICA CILIAR

a) Transporte de vesículas al cilio

Dado que el cilio primario carece de la maquinaria celular necesaria para la síntesis de proteínas, es necesario que se produzca el transporte desde otros compartimentos celulares hasta la base del cilio (Ishikawa and Marshall, 2011) (**Fig. 1.6A**). Las proteínas específicas del cilio (estén libres en el citoplasma o dentro de vesículas) presentan las llamadas secuencias de localización ciliar que son reconocidos por las diferentes maquinarias de transporte intracelular (Garcia-Gonzalo and Reiter, 2017).

Así, estas proteínas son dirigidas de manera específica a través de las proteínas G monoméricas Rab8 y Rab11. Rab8 media el transporte de vesículas procedentes del aparato de Golgi, mientras que Rab11 controla las procedentes de los endosomas (Jenkins and Hernandez-Hernandez, 2015). Estas proteínas se unen a Rabin8 (factor intercambiador de guaninas, GEF por sus siglas en inglés) y median la unión de las vesículas al complejo *exocyst* (Malicki and Johnson, 2017); un complejo de unión que establece relaciones entre membranas donantes y receptoras y favorece su fusión en la membrana periciliar, mediante la regulación directa de las proteínas v-SNARE (*vesicle-Soluble NSF-N-ethylmaleimide-sensitive factor-Attachment ProteinREceptor*) y t-SNARE (*target-Soluble NSF-N-ethylmaleimide-sensitive factor-*

Attachment Protein Receptor) (Heider and Munson, 2012) (Fig. 1.6B). Se ha propuesto que la localización de este complejo en el cilio se produce a través de mecanismos que regulan la polaridad celular (Bernabé-Rubio and Alonso, 2017).

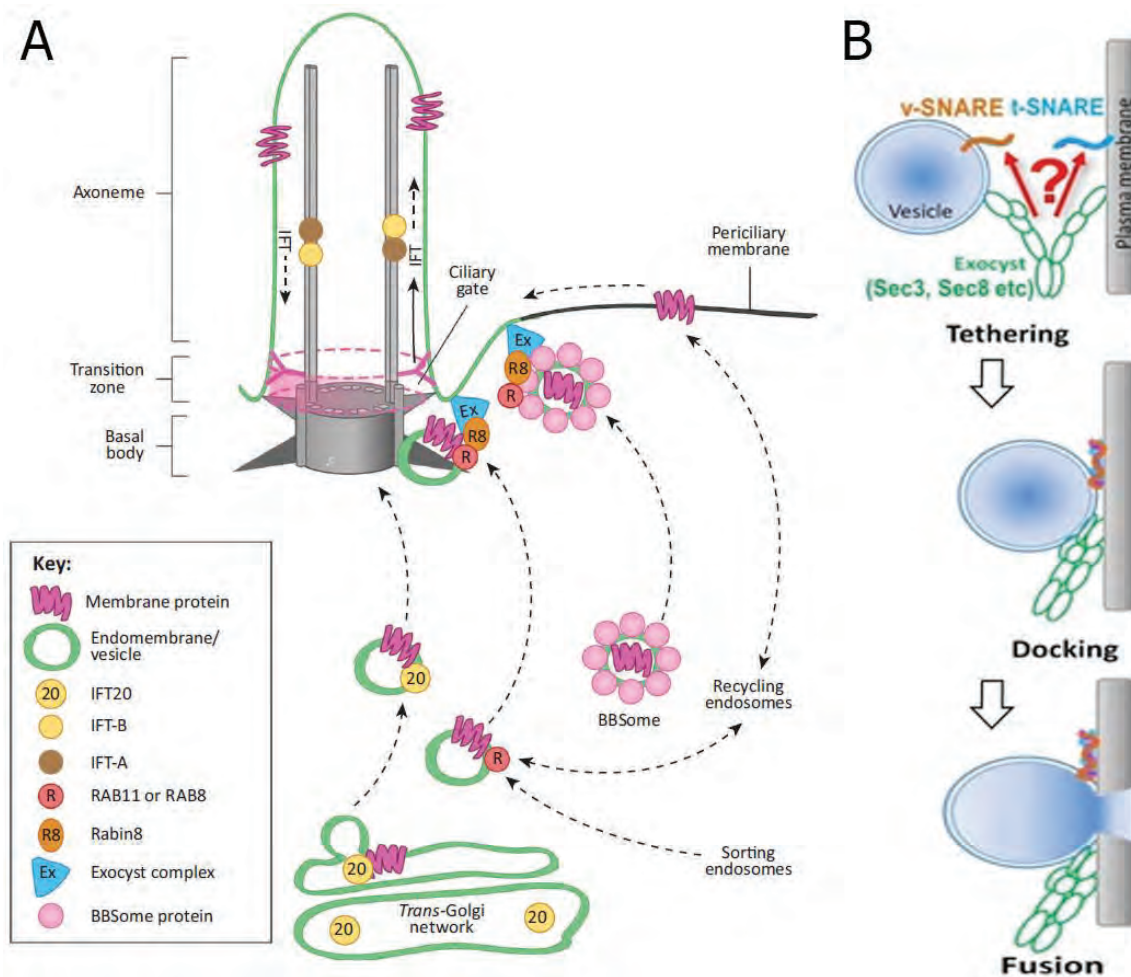


Fig. 1.6. Transporte ciliar. A) Existen diferentes vías que controlan el tráfico de proteínas al cilio primario. Así, se han relacionado isoformas concretas de las proteínas G monoméricas Rab, el BBSoma que recubre la vesícula de una forma similar a las cubiertas de clatrina o proteínas como IFT20. Extraído de Malicki and Johnson 2017. B) Funcionamiento del complejo exocyst, que media la relación entre membranas y regula la fusión de estas a través de las proteínas v-SNARE y t-SNARE. <https://www.mfpl.ac.at/about-us/news/article/news-detail/unravelling-the-first-step-of-vesicle-fusion.html>

Otro mecanismo por el que se produce el transporte de vesículas hacia el cilio primario es mediante el BBSoma (*Bardet-Biedl Syndrome-oma*), (Jenkins and Hernandez-Hernandez, 2015; Malicki and Johnson, 2017) (Fig. 1.6A). El BBSoma es un complejo compuesto por 7 subunidades que envuelve las membranas de una manera similar a la clatrina y que, mediante su interacción con la proteína ciliar Arl6 (*ADP-Adenosine Diphosphate-Ribosylation Factor-Like Protein 6*), media el paso de proteínas al interior del cilio (Jenkins and Hernandez-Hernandez, 2015). Mutaciones en genes que codifican el BBSoma se han relacionado (aunque no únicamente) con el síndrome de Bardet-Biedl (Braun and Hildebrandt, 2017).

Existen otras proteínas que se han relacionado con el transporte de vesículas hacia el cilio como, por ejemplo, IFT20 (*Intraflagellar Transport 20*) (Malicki and Johnson, 2017) (**Fig. 1.6A**).

En general, se debe tener en cuenta que estas rutas no son independientes y que existen importantes interacciones entre todas ellas.

b) La zona de transición

Tanto el compartimento intraciliar como la membrana ciliar poseen una composición cuantitativa y cualitativa diferente al resto de la célula. Para ello, se requiere la presencia de la llamada “compuerta ciliar” (*ciliary gate*) que controla de forma específica el paso de proteínas y lípidos entre el cilio y el resto de la célula.

Esta compuerta ciliar está formada por dos estructuras diferentes: las fibras de transición, que anclan el cuerpo basal a la membrana ciliar, y la zona de transición, ubicada en la base del axonema y que presenta estructuras propias como el collar ciliar o los enlaces en “Y” (**Fig. 1.3**) (Garcia-Gonzalo and Reiter, 2017). En la zona de transición se han descrito dos complejos proteicos interconectados: el complejo NPHP (o complejo de la Nefrocistina, relacionado con una ciliopatía: la nefroptosis), que se encuentra asociado a los microtúbulos de la zona de transición, y el complejo MKS (o complejo de proteínas asociadas al síndrome de Meckel) asociado fundamentalmente con la membrana ciliar (**Fig. 1.7**) (Garcia-Gonzalo and Reiter, 2017). El complejo NPHP se ha relacionado fundamentalmente con el control selectivo de las proteínas solubles, mientras que el complejo MKS se ha relacionado con el paso de proteínas transmembrana.

Entre las fibras de transición aparecen espacios de unos 60nm por los que las vesículas no son capaces de pasar. Las proteínas solubles parecen acumularse entre las fibras de transición hasta que llega una concentración en la que “desbordan” y pasan a través de estos espacios mediante un mecanismo que no es aún del todo conocido (Garcia-Gonzalo and Reiter, 2017). Las proteínas de mayor tamaño atraviesan la barrera mediante su unión a proteínas motoras asociadas a microtúbulos que funcionan en ambas direcciones. Además, también se ha descrito la presencia de importinas y exportinas y de proteínas G monoméricas Ran (encargadas de regular el paso de proteínas a través del poro nuclear). Todos estos hallazgos sugieren un paralelismo entre el control del tráfico de proteínas y lípidos en el cilio y en el núcleo celular (Garcia-Gonzalo and Reiter, 2017).

Por otra parte, las proteínas de membrana pueden llegar al compartimento ciliar de dos maneras: del mismo modo que las proteínas solubles, una vez que sufren un procesamiento para esconder sus partes hidrófobas, o mediante movimiento lateral desde la membrana periciliar (Garcia-Gonzalo and Reiter, 2012). Como hemos comentado, las vesículas con proteínas ciliares son transportadas hasta la base ciliar donde, mediante el complejo *exocyst* y las proteínas SNARE pueden fusionarse con la membrana plasmática periciliar. Una vez en la membrana periciliar diferentes maquinarias proteicas (como el BBSoma o motores microtubulares) reconocen las secuencias de localización ciliar permitiendo el paso a través de

la barrera de difusión de la membrana ciliar, compuesta por el complejo MKS y un anillo compuesto por septina (Garcia-Gonzalo and Reiter, 2012).

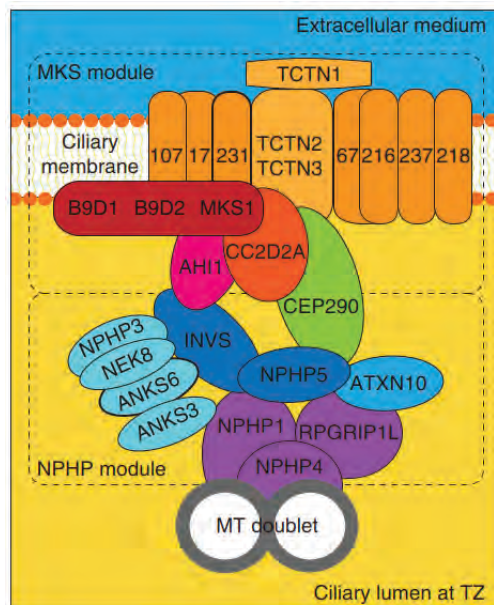


Fig. 1.7. Complejos proteicos de la zona de transición. La zona de transición actúa como un filtro para controlar el paso de proteínas solubles y de membrana al interior del cilio primario. Para ello juegan un papel fundamental dos complejos proteicos: el NPHP, unido a los microtúbulos del axonema de la zona de transición e implicado en el control del paso de proteínas solubles y el MKS, situado en la membrana ciliar y que regula el paso de proteínas de membrana. Ambos complejos interactúan entre ellos a través de proteínas adaptadoras. Extraído de Garcia-Gonzalo and Reiter 2017.

En general, estos mecanismos actúan como un verdadero filtro que regula la comunicación entre el cilio y el resto de la célula, controlando la entrada y salida de proteínas y lípidos. Este estrecho control pone de manifiesto la importancia de la correcta composición proteo-lipídica del cilio primario.

c) El transporte intraflagelar

Dentro del compartimento ciliar los diferentes proteínas y complejos se mueven de forma bidireccional a lo largo del axonema gracias a la maquinaria del transporte intraflagelar (IFT por sus siglas en inglés, **Fig. 1.8**).

Se han descrito dos complejos diferentes de transporte intraflagelar (Ishikawa and Marshall, 2017; Taschner and Lorentzen, 2016):

- IFT-A (*Intraflagellar Transport A*): implicado en el transporte retrógrado, es decir, en el transporte desde la punta del axonema hasta la base. Mutaciones en este complejo no parecen alterar de forma decisiva el ensamblaje del cilio. Este complejo actúa a través de la Dineína-2, que circula por el microtúbulo A del doblete de microtúbulos.

- IFT-B (*Intraflagellar Transport B*): regula el transporte anterógrado que va desde la base del cilio hasta el vértice. Su función es esencial para la correcta formación del cilio primario y desarrollo del axonema, con lo que mutaciones en este sistema dan lugar a cilios aberrantes. Ejerce su función a través de complejos proteicos basados en Kinesina-2. Circula por el microtúbulo B del doblete, evitándose así el choque entre los que van en un sentido y en el contrario.

Se ha propuesto que las proteínas que componen los complejos IFT se ensamblan en la base del cilio (en un proceso mediado por el BBSoma) y se unen a proteínas motoras como la Kinesina, así como a otras proteínas que funcionan como carga a transportar (incluyendo proteínas de membrana, proteínas solubles, proteínas del BBSoma o la propia Dineína-2). La carga es transportada hasta la punta del cilio, donde es liberada y el motor anterógrado inactivado mediante fosforilación. Entonces se ensambla el complejo IFT-A y se activa la Dineína-2 que transporta de manera retrógrada la carga hasta la base del cilio, donde se desensamblan los complejos (Taschner and Lorentzen, 2016; Ishikawa and Marshall, 2017) (**Fig. 1.8**).

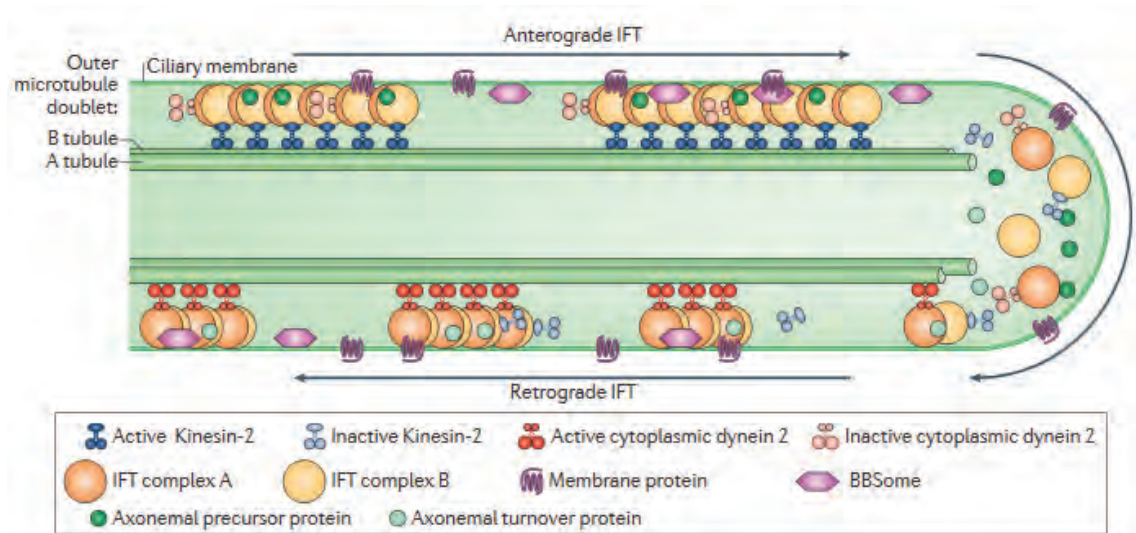


Fig. 1.8. Transporte intraflagelar. Esquema describiendo el transporte anterógrado, mediado por IFT-B y Kinesina-2 (parte superior) y retrógrado, mediado por IFT-A y Dineína-2, (parte inferior) dentro del axonema ciliar. Extraído de Ishikawa and Marshall 2011.

Además de participar en el transporte intraflagelar, diferentes proteínas IFT participan en procesos necesarios para el correcto funcionamiento del cilio. Así, se han relacionado proteínas IFT con el transporte de vesículas desde el aparato de Golgi hacia el cilio (IFT20), la activación y correcto funcionamiento de la vía de señalización Hedgehog (Hh) (IFT27/ IFT25) o la transición de transporte anterógrado y retrógrado en la punta del axonema (IFT172) (Taschner and Lorentzen, 2016).

En conclusión, el control de la composición del cilio primario, así como de la llegada, paso y transporte hasta el axonema ciliar de las diferentes proteínas necesarias para la correcta realización de todas sus funciones supone un proceso preciso y complejo, en el que participan una gran cantidad de proteínas y lípidos.

1.5. FUNCIONES DEL CILIO PRIMARIO COMO ANTENA SENSORIAL

La teoría vigente defiende que el cilio primario presenta primordialmente funciones sensoriales, recibiendo señales extracelulares que transduce e integra junto con elementos del interior de la célula para acabar produciendo una respuesta, frecuentemente relacionada con la proliferación, la diferenciación o el metabolismo celular. De este modo, el cilio primario supondría un perfecto interlocutor entre los medios extra e intracelular.

En lo referente al medio extracelular, la estructura, composición y proyección del cilio primario le confieren unas características excelentes para captar y transmitir señales, fundamentalmente, de dos tipos: mecánicas y químicas.

a) Cilio primario y mecanotransducción

Las células son sometidas a fuerzas mecánicas extracelulares que son transducidas en señales internas a través de mecanismos en los que participa el cilio primario. Para la regulación y control de estos procesos de mecanotransducción se han señalado tres características ciliares fundamentales: su rigidez, su longitud y la presencia de canales iónicos en su membrana (Ishikawa and Marshall, 2014; Spasic and Jacobs, 2017). La importancia de la captación de estas señales se ha puesto de manifiesto en tipos celulares que son sometidos a fuerzas mecánicas, como aquellos que están en contacto con flujos de fluidos (como colangiocitos, células endoteliales o células del túbulo distal renal) o a fuerzas de compresión (como osteocitos y condrocitos) (Spasic and Jacobs, 2017) aunque, probablemente, en la mayoría de células que presentan cilio primario, este capte (en mayor o menor medida) señales mecánicas del exterior celular.

Aunque recientemente puesto en duda (Delling et al., 2016), tradicionalmente se ha propuesto que las fuerzas mecánicas generarían que el axonema ciliar se doblara produciendo la apertura de canales iónicos, fundamentalmente de calcio, como los compuestos por las proteínas Policistina 1 y 2 (PC1/PC2; relacionadas con la poliquistosis renal); la entrada de calcio al interior del cilio y, posteriormente, la liberación de calcio de las reservas intracelulares mediante la interacción con los receptores de rianodina (Nauli et al., 2003; Lee et al., 2015) (**Fig 1.9**). También se ha descrito que las fuerzas de compresión en el tejido colágeno produciría la deformación en el cilio primario a través de la unión directa de este a la matriz extracelular por medio de integrinas (McGlashan et al., 2006). Esto produciría la entrada de calcio en el interior del cilio ante fuerzas de compresión, lo que provocaría la activación de la producción de proteínas de la matriz, como agreganos (Wann et al. 2012).

Por otra parte, existen procesos que regulan la respuesta del cilio a las fuerzas mecánicas, de manera que fuerzas de flujo, compresión o estiramiento excesivas provocan el desensamblaje ciliar con el fin de limitar la respuesta celular (Ishikawa and Marshall, 2014; Spasic and Jacobs, 2017). Del mismo modo, también se ha descrito un aumento de la rigidez del cilio primario como respuesta al flujo, probablemente en relación a un aumento de la acetilación de la tubulina de los microtúbulos del axonema (Nguyen et al., 2015).

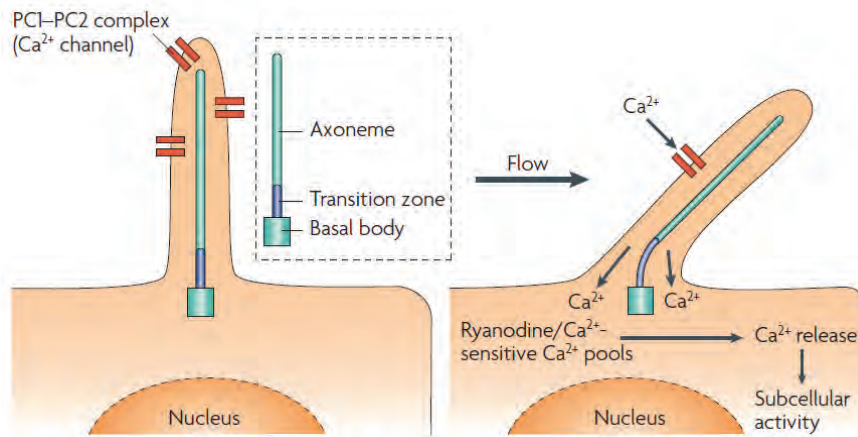


Fig. 1.9. Cilio primario y mecanotransducción. Ante fuerzas mecánicas, como el flujo de líquido, el axonema ciliar se dobla produciéndose la apertura de canales de calcio como el complejo PC1-PC2, que generan la entrada de calcio en el cilio y en el resto de la célula. Extraído de Fliegauf et al., 2007.

b) Cilio primario y quimiotransducción. Vías de señalización cilio-dependientes.

En la membrana del cilio primario se acumulan gran cantidad de receptores de diferentes vías de señalización que se unen a ligandos extracelulares desencadenando cascadas intracelulares que regulan diferentes procesos en la célula. Esta acumulación específica es estrechamente regulada por la zona de transición y confiere al cilio primario unas características inmejorables para actuar como un verdadero nodo que comunica y entrelaza diferentes vías de señalización y moléculas externas para regular el funcionamiento celular.

De las vías de señalización relacionadas con el cilio primario (Pala et al., 2017; Wheway et al., 2018; Anvarian et al., 2019), a continuación nos centraremos en la vía Hedgehog (Hh), dado que es la vía más estudiada y en la que más se ha trabajado a lo largo de esta tesis. El resto de vías han sido recogidas en el **ANEXO1** donde pueden consultarse sus principios generales así como su relación específica con el cilio primario. Estas otras vías son:

- Vía de mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*).
- Vía de Wnt (*Wingless-related integration site*)
- Vía de Notch
- Vía de TGF β (*Transforming Growth Factor β*)
- Vía de PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) y otros receptores tirosín-kinasa.
- Vía de Hippo
- Vía NF-kB (*Nuclear Factor kB*)
- Receptores Asociados a Proteínas G.

Vía Hedgehog (Hh)

Inicialmente, esta vía se relacionó con el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster*, donde juega un papel fundamental como morfógeno determinando la polaridad de los segmentos que componen la larva (Mohler, 1988). El nombre de Hedgehog (erizo en inglés) procede, de hecho, del fenotipo de las larvas de *Drosophila*, que presentan una cutícula dispersa (en lugar del patrón segmentario de las larvas *wildtype*) que recuerda a las púas de un erizo (**Fig. 1.10A**). En mamíferos, se ha descrito su importancia como morfógeno en la

diferenciación de los distintos tipos de neuronas medulares siguiendo un patrón dorso-ventral (Choudhry et al., 2014). No obstante, las funciones de esta vía no están limitadas al periodo embrionario y en organismos adultos se han relacionado con un sinnúmero de funciones fisiológicas, como el mantenimiento de células madre adultas (Han et al. 2008) o en procesos de diferenciación celular como la osteogénesis (Long et al. 2004); y también en situaciones patológicas, por ejemplo, el desarrollo de diferentes tipos de cáncer (Amakye et al., 2013; Chahal et al., 2018) y de algunas enfermedades neurológicas (Patel et al. 2017).

En mamíferos se han descrito tres ligandos de la vía Hh: Sonic Hh o Shh (el más estudiado, especialmente relacionado con el sistema nervioso y el correcto desarrollo de las extremidades), Indian Hh o Ihh (que juega importantes funciones en el desarrollo del sistema esquelético) y Desert Hh o Dhh (cuya expresión se restringe a las gónadas) (Basile Carballo et al., 2018). Estos ligandos son lipídicos en el retículo endoplasmático antes de ser secretados, uniéndose un grupo colesterol y uno palmitoil. Este paso es fundamental para que el ligando se convierta en una proteína funcional; sin embargo, le convierte en una molécula altamente hidrófoba y, en consecuencia, difícil de liberar al exterior celular. Para ello, existen tres vías diferentes (Ramsbottom and Pownall, 2016) (**Fig. 1.10B**). Por una parte, proteínas “sheddasas” interactúan con proteoglicanos heparán sulfato (HSPG, por sus siglas en inglés) y con las proteínas SCUBE2 (*Signal peptide, CUB domain and EGF like domain containing 2*) y Dispatched (Disp) para hidrolizar el grupo lipídico y producen la liberación de complejos multiméricos de Hh (más estables y activos que los monómeros). Por otra parte, se puede producir la internalización de partículas de Hh en cuerpos multivesiculares que son liberados al exterior como exosomas en un proceso que también está mediado por Disp y por proteínas ESCRT (*Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*). Por último, a través de moléculas HSPG se puede producir la carga de moléculas de Hh en lipoproteínas, produciéndose su liberación.

Una vez que se produce la liberación de los ligandos Hh, estos interactúan con los receptores transmembrana Patched –Ptch– (del que existen dos isoformas: Ptch1 y Ptch2), que se localizan en la membrana del cilio primario (Rohatgi et al., 2007; Ramsbottom and Pownall, 2016). Los ligandos Hh poseen diferentes co-receptores que regulan su función, potenciando su actividad (por ejemplo, CDO: *Cell adhesion-associated oncogene regulated*) o inhibiéndola (como HHIP: *Hh interacting protein*) (Ramsbottom and Pownall, 2016). Cuando se produce la unión de los ligandos a Ptch, se produce la salida de este del cilio. Esto hace que Ptch deje de bloquear la entrada del receptor transmembrana asociada a proteínas G Smoothed (Smo) al interior del axonema ciliar en un proceso mediado por proteínas IFT (específicamente Kif3A, *Kinesin Family Member 3A*), produciéndose la expresión de esta proteína en la membrana ciliar (Ramsbottom and Pownall, 2016; Rohatgi et al., 2007) (**Fig 1.11**). Para el correcto funcionamiento de Smo, es necesario que se produzca, además de su paso al cilio, su activación a través de la fosforilación por las kinasas CK1 (*Casein Kinase 1*) y GRK2 (*G Protein-Coupled Receptor Kinase 2*) (Ramsbottom and Pownall, 2016).

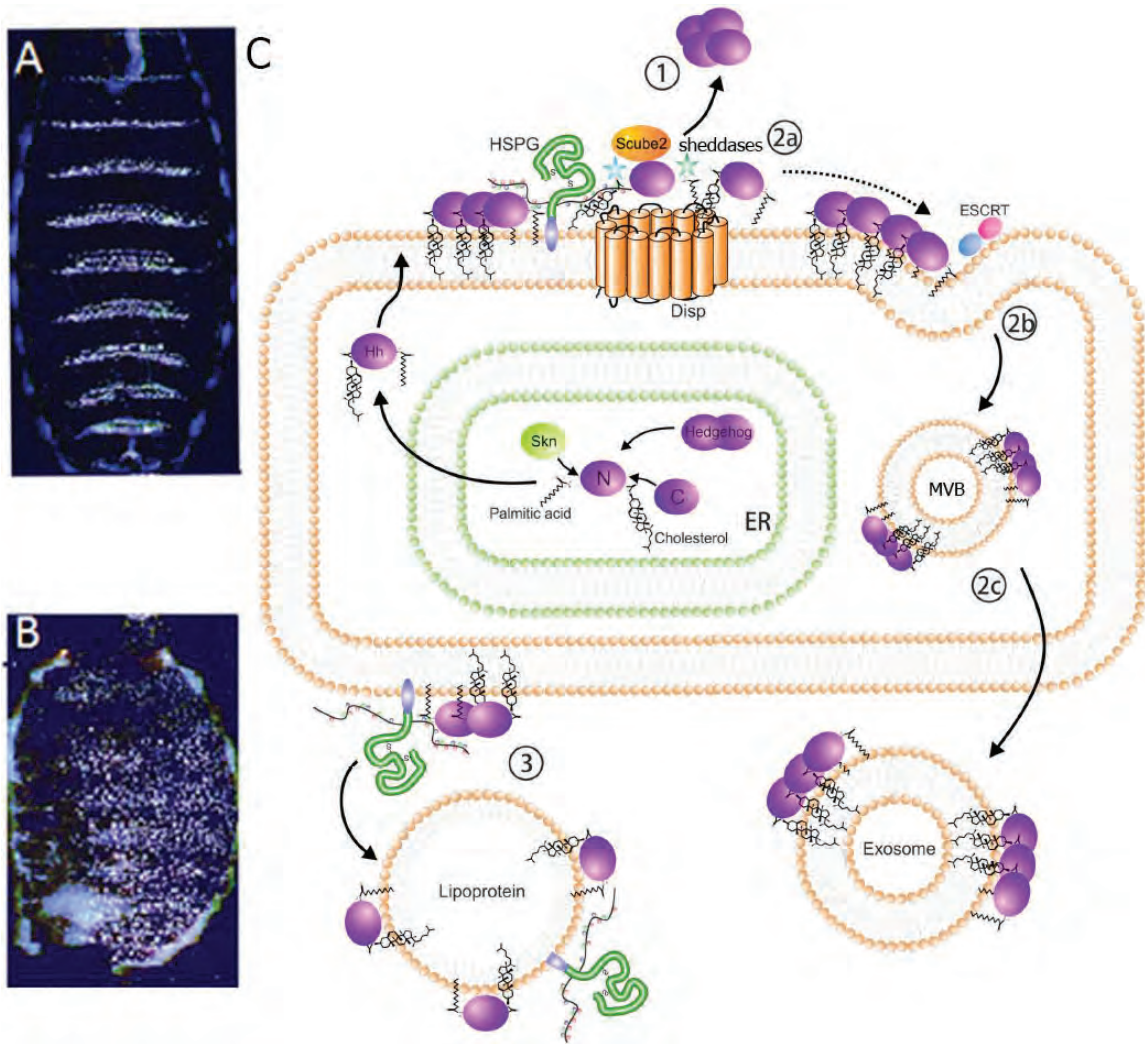


Fig. 1.10. Fenotipo Hh. Síntesis y liberación de los ligandos Hh. A) Larva de *Drosophila melanogaster* wildtype, nótese el patrón segmentario de la cutícula. Extraído de Burke et al. 1999 B) Larva de *Drosophila* mutante en el que se ha bloqueado la expresión de la vía Hh, la cutícula se extiende por toda la superficie de la larva, dándole aspecto de erizo. Extraído de Burke et al. 1999. C) Procesamiento de los ligandos Hh. En el retículo endoplasmático se produce la lipidación mediante colesterol y ácido palmítico del monómero de Hh. Una vez en la membrana forma multímeros que son liberados al exterior a través de diferentes vías: 1) mediante la hidrólisis de los grupos lipídicos por enzimas sheddases junto con Disp, Proteoglicanos Heparán Sulfato (HSPG) y Scube-2, 2) mediante la interiorización en cuerpos multivesiculares (MVB) por los complejos ESCRT y posterior liberación de exosomas o 3) en el interior de lipoproteínas, a través de un proceso mediado por HSPG. Extraído de Ramsbottom et al. 2016.

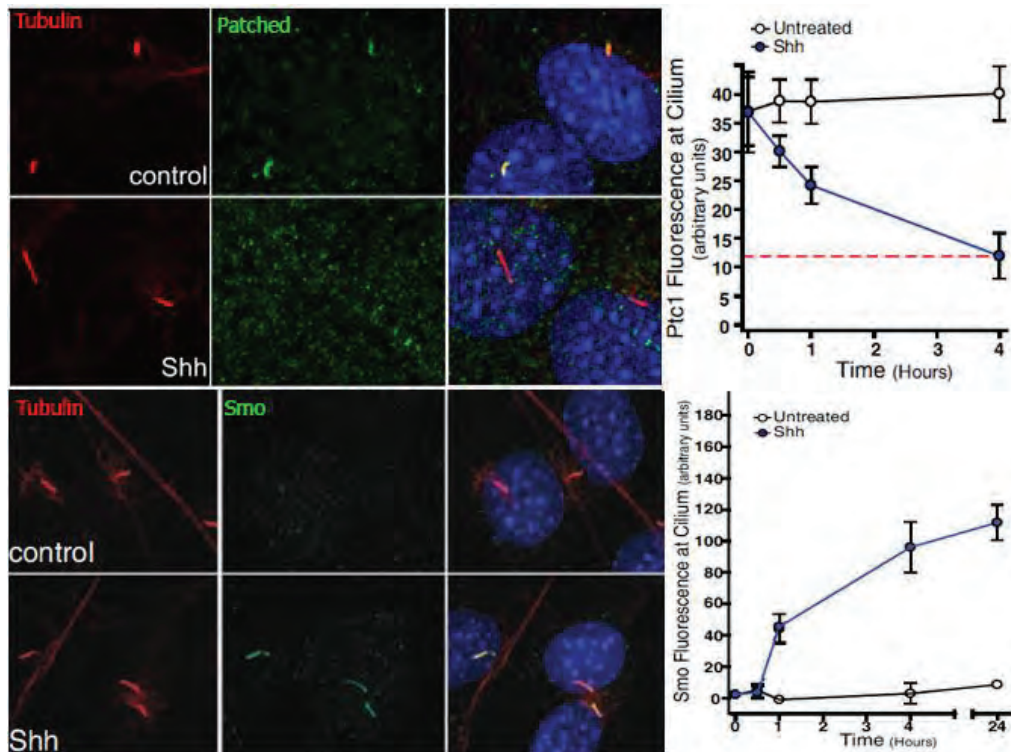


Fig 1.11. Flujo de Patched y Smo en el cilio ante la activación de la vía Hh. Cuando se añade el ligando Shh se produce la salida de Patched del cilio primario y la posterior entrada de Smo. Modificado a partir de Rohatgi et al., 2007.

Los efectores directos de la vía Hedgehog en vertebrados son las tres isoformas del factor de transcripción Glioma-Associated Oncogen (Gli1, Gli2 y Gli3), localizados en el cilio primario. En ausencia del ligando, Gli1 permanece secuestrado por la proteína SUFU (*Suppressor of fused homolog*); mientras que Gli2 y Gli3 salen del cilio y son fosforilados por PKA (Proteína Kinasa A), CK1y GSK3 β (Glicógeno Sintasa Kinasa 3 β). Esto favorece su reconocimiento por TRCP (*Beta-Transducin Repeat Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase*) que media su proteólisis en formas represoras que inhiben la transcripción de los genes diana de la vía Hh (Ramsbottom and Pownall, 2016) (**Fig 1.12A**).

Por el contrario, al unirse el ligando y producirse la inhibición de Ptch y activación y paso al cilio de Smo, este interactúa con las proteínas EVC (*Ellis-van Creveld Syndrome protein*) produciendo el procesamiento de la forma activa de Gli2 y la degradación de Gli3. Simultáneamente, se produce la liberación de Gli1 de SUFU permitiendo su traslocación al núcleo con la consecuente activación de la transcripción de los genes diana (Ramsbottom and Pownall, 2016) (**Fig 1.12B**). Gli1 se une al ADN al motivo GACCACCA y activa la transcripción de gran variedad de genes con diferentes funciones (Katoh and Katoh, 2009):

- Retroalimentación o feedback positivo (tiende a mantener la vía activa): GLI1
- Retroalimentación o feedback negativo (autolimitación de la vía): PTCH1, PTCH2, HHIP1.
- Proliferación celular: MYCN, CCND1, CCND2 (*CyclinD1-2*), CCNE (*CyclinE*), FOXM1 (*Forkhead M1*), CCNB1 (*CyclinB1*), CDC25B (*Cell Division Cycle 25B*).
- Supervivencia celular: BCL2 (*B-Cell Lymphoma 2*), CFLAR (*CASP8 And FADD Like Apoptosis Regulator*).

- Señalización de células madre: JAG2 (*Jagged Canonical Notch Ligand 2*), FST (*Follistatin*), GREM1 (*Gremlin 1*), BMP4 (*Bone Morphogenetic Protein 4*), WNT2B (*Wingless + int 2B*), WNT5A, PDGFRA (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor A*).
- Marcadores de células madre: BMI1, LGR5 (*Leucine Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor 5*), CD44 (*Cluster of Differentiation 44*), CD133 (o Prolamin-1 estrechamente relacionado con el cilio primario, ver apartado de cilio primario y células madre).
- Transición epitelio-mesenquimal (ver apartado específico): FOXC2 (*Forkhead Box C2*), SNAI1 (*Snail Family Transcriptional Repressor 1*), TWIST2, ZEB1 (*Zinc Finger E-Box Binding Homeobox*), ZEB2.
- Otros: FOXF1 (*Forkhead Box F1*), FOXL1 (*Forkhead Box L1*), PRDM1 (*PR/SET Domain 14*), PTHLH (*Parathyroid Hormone Like Hormone*).

En conclusión, Gli1 posee una función fundamentalmente activadora de la transcripción, Gli2 presenta una forma activadora y otra represora (si bien esta última es menos importante) y Gli3 es fundamentalmente un represor de la transcripción de genes.

Cabe mencionar que, además de esta vía llamada “canónica”, se han descrito dos rutas alternativas no canónicas, es decir, no dependientes de los factores de transcripción Gli. Así, se ha descrito que Ptch ejerce un efecto apoptótico vía caspasa que es inhibido cuando se unen los ligandos Hh. Por otra parte, Smo regularía el esqueleto de actina activando vías independiente de Gli mediante su actividad de receptor ligado a proteínas G (Robbins et al., 2012).

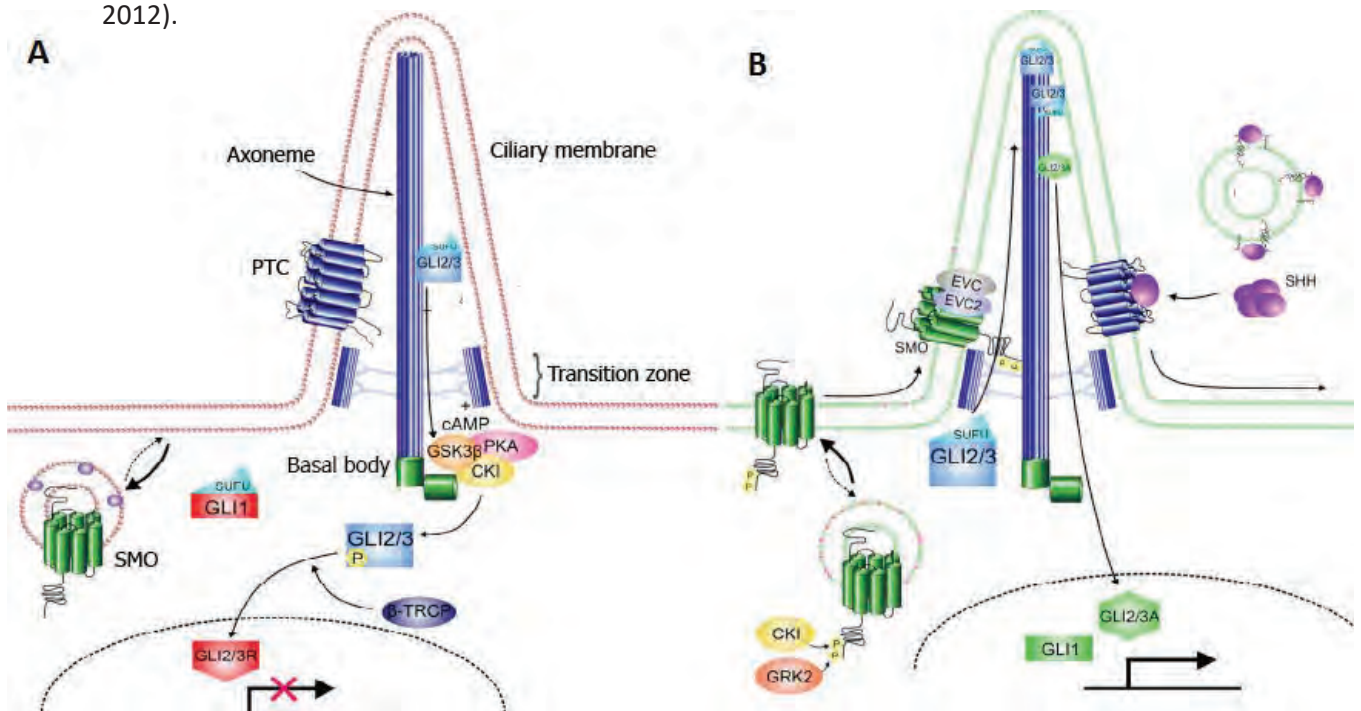


Fig 1.12. Esquema general de la vía Hedgehog y su relación con el cilio primario. A) En ausencia del ligando, Ptch se encuentra en la membrana ciliar, mientras que SMO es sequestrada en el citoplasma. En esta situación el factor de transcripción Gli1 es retenido fuera del núcleo por SUFU. Por otra parte, las quinasas GSK3β, CKI y PKA fosforilan Gli2 y Gli3 lo que favorece que sean reconocidas y procesadas a su forma represora por TRCP. Esta forma es trasladada al núcleo donde inhibe la transcripción de los genes diana de la vía. B) Cuando Hh se une a Ptch este sale de la membrana ciliar y permite el paso de Smo (que requiere ser fosforilado por CKI y GRK2 para ser activo). Una vez en el cilio, SMO interactúa con EVC para producir la disociación de Gli1 y SUFU, lo que permite la traslocación al núcleo del primero, y el paso de la forma activadora de Gli2 al núcleo. Modificado de Ramsbottom et al. 2016.

A la hora de estudiar y comprender la importancia del cilio primario en la señalización celular es fundamental comprender sus características inigualables como estructura física capaz de detectar señales del medio extracelular a través de ligandos y sustancias químicas y transducir esas señales hacia el interior celular generando cambios y modificaciones en su estructura y función. Más aún, al concentrar de manera selectiva un sinnúmero de proteínas y componentes de las vías de señalización en un espacio relativamente limitado, el cilio primario se presenta como un verdadero nodo que interconecta física y funcionalmente elementos de diferentes vías moleculares pudiendo explicar, en cierta manera, la gran influencia que unas rutas ejercen sobre otras. De esta manera, se debe tener en cuenta que las diferentes vías cilio-dependientes están interconectadas unas con otras, regulándose de una manera fina, compleja y aún no del todo comprendida.

c) Cilio primario y campo eléctrico

El cilio primario ha sido denominado como “antena celular”. Sin embargo, pocos son los estudios que han analizado la relación de esta estructura con el campo eléctrico. Se ha descrito que el cilio primario actúa como sensor de ondas electromagnéticas. Así, se ha observado que la diferenciación osteogénica que se produce ante la estimulación eléctrica de células madre derivadas de adipocitos es dependiente del cilio, en probable relación con canales dependientes de voltaje localizados en la membrana ciliar (Cai et al., 2017). Sin embargo, aún queda mucho por estudiar para comprender con precisión el papel que juega el cilio primario en el efecto de las ondas electromagnéticas sobre los sistemas biológicos.

1.6. RELACIONES DEL CILIO PRIMARIO CON LAS FUNCIONES CELULARES

a) Cilio primario y ciclo celular. Ensamblaje y desensamblaje ciliar.

El cuerpo basal del cilio primario procede de un centriolo que, durante la división celular, forma el huso mitótico. Así, durante la mitosis (fase M del ciclo celular) el cilio debe haberse desensamblado para permitir la correcta participación del centrosoma en la separación de los cromosomas (Izawa et al., 2015; Malicki and Johnson, 2017) (**Fig. 1.13**). Este desensamblaje se produce en dos partes: la primera se da antes de la transición de G1 a S y, la segunda, en la fase G2, justo antes de la mitosis (**Fig. 1.14**) (Malicki and Johnson, 2017).

Una de las relaciones más interesantes entre cilio primario y ciclo celular es la que se produce a través de la vía CDK5 (Kinasa Dependiente de Ciclinas 5) - Fbw7 (*F-Box And WD Repeat Domain Containing 7*) - Nde1 (*NudE Neurodevelopment Protein 1*). Nde1 es una proteína que se localiza en el centriolo madre y que se relaciona inversamente con la formación del cilio primario y su tamaño, de manera que cuando se elimina esta proteína se activa la ciliogénesis y se producen cilios de mayor longitud (Kim et al., 2011). Además, se ha observado que las células que carecen de Nde1 presentan un retraso en la reentrada al ciclo celular dependiente del cilio primario (Kim et al., 2011). CDK5 es regulada por el ciclo celular y media la ubiquitinización y degradación de Nde1 a través de Fbw7 (una E3-ubiquitin ligasa) durante las

fases G1 y G0 (Maskey et al., 2015). Por otra parte, Fbw7 se ha relacionado con el mantenimiento de las células madre tumorales en un estado de quiescencia (haciéndolas así resistentes al tratamiento oncológico) y con alteraciones en la diferenciación y proliferación de las células madre de diferentes tejidos (Takeishi and Nakayama, 2014). Si bien estos efectos también pueden deberse a otras proteínas ubiquitinizadas por Fbw7 (como, por ejemplo c-Myc), estos hallazgos sugieren una posible relación entre el cilio primario, el ciclo celular y las células madre fisiológicas y asociadas al cáncer a través de la degradación (mediada por Fbw7) de Nde1 y la inhibición del desensamblaje del cilio.

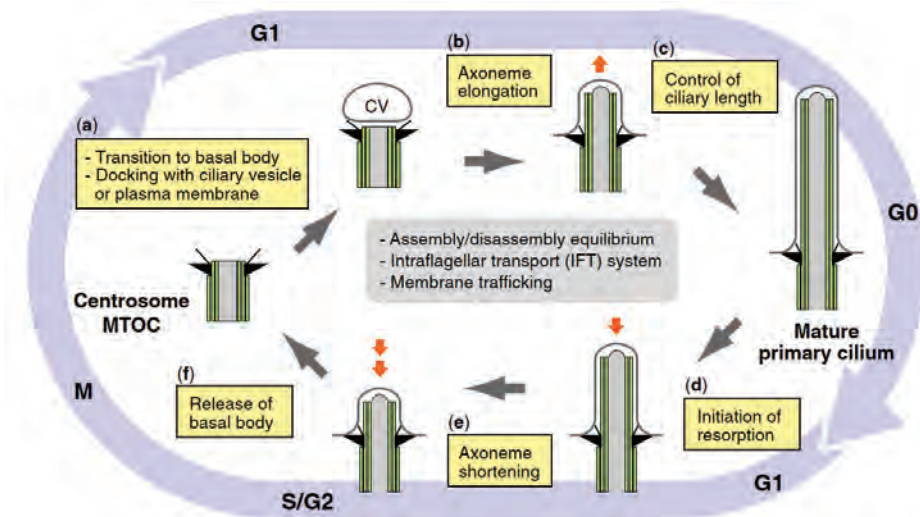


Fig. 1.13. Cilio primario y ciclo celular. Durante la mitosis (M) el centrosoma forma el huso mitótico, necesario para la correcta separación de los cromosomas. Una vez terminada la mitosis, en la fase G1, se produce la activación del centriolo madre y el proceso de ciliogénesis. Si la célula sale del ciclo celular (G0) el cilio puede seguir formado pero, al reintroducirse en el ciclo celular (fases G1, S y G2) se desensambla permitiendo que el centriolo madre pueda actuar, de nuevo, en el huso mitótico. MTOC: Centro Organizador de Microtúbulos, CV = Vesícula Ciliar. Extraído de Izawa et al. 2015.

Otra de las relaciones es a través de las proteínas Trichopleina y Aurora Kinasa A. En células en proliferación, Trichopleina activa Aurora A evitando la ciliogénesis y regulando la entrada y progresión de la fase M (Izawa et al., 2015). Así, en células en las que se bloquean estas proteínas se produce la formación permanente del cilio y el bloqueo del ciclo celular. Se ha observado que este bloqueo es cilio-dependiente, ya que al bloquear la ciliogénesis, estas células vuelven a entrar en el ciclo celular (Inoko et al., 2012). Del mismo modo, estas proteínas juegan un papel importante en el desensamblaje del cilio antes de la mitosis a través de HDAC6 (*Histone Deacetylase 6*) que revierte los cambios post-traduccionales de la tubulina del axonema, haciéndola más inestable y, en consecuencia, favoreciendo la reabsorción del cilio, especialmente durante la primera fase de desensamblaje, en G1 (**Fig. 1.14**) (Izawa et al., 2015; Malicki and Johnson, 2017). Se ha propuesto que la reabsorción de la parte distal del cilio por Aurora K y HDAC6 podría activar una serie de señales que permitirían el paso de la célula a la fase S que, una vez iniciada, activaría las proteínas encargadas de desensamblar la parte más proximal del cilio. Esta segunda fase de desensamblaje (en la fase G2) es mediada por Nek2 (*Never In Mitosis A-Related Kinase 2*) (kinasa que actúa en la transición de S a G2), que fosforila y activa Kif24 (con acción despolimerizadora de microtúbulos) (**Fig. 1.14**).

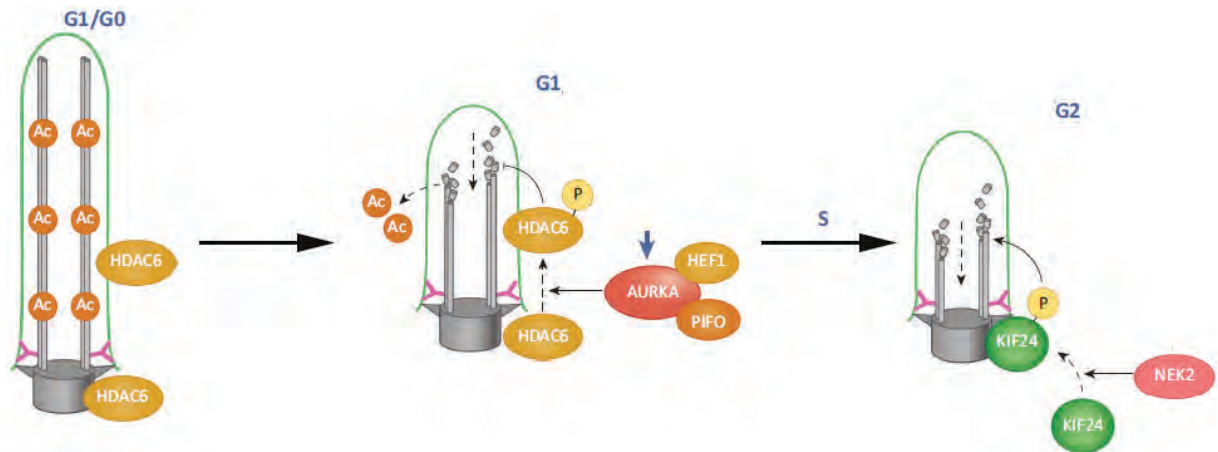


Fig. 1.14. Desensamblaje del cilio primario en el ciclo celular. El desensamblaje del cilio primario para permitir la liberación del cuerpo basal y el correcto funcionamiento del huso mitótico se produce en dos fases: una en G1 mediada por la quinasa Aurora A, que fosforila HDAC6, que desacetila la tubulina, haciendo los microtúbulos del axonema más inestables y permitiendo la reabsorción de la parte distal del cilio; y una segunda fase, en G2, mediada por Nek2, que fosforila y activa Kif24, quien media el desensamblaje de la parte más proximal del cilio. Modificado de Malicki and Johnson 2017.

En definitiva, el ciclo celular y la ciliogénesis están estrechamente relacionados y el cilio primario parece actuar como un ancla que evita la reentrada al ciclo celular interviniendo, en parte, la longitud del axonema. No obstante, debe tenerse en cuenta que el cilio primario también se ha relacionado con la proliferación celular, a través de la activación de cascadas de señalización (como Hh o IGF-1 –*Insulin-like Growth Factor 1*) (Izawa et al., 2015). Aunque estos hallazgos puedan parecer contradictorios, se ha propuesto que estas señales puedan activar, al mismo tiempo, el desensamblaje del cilio y la reentrada de la célula en el ciclo celular.

b) Cilio primario y células madre. Auto-renovación y diferenciación.

Otro de los temas estudiados en relación al cilio primario es su presencia y función en las células madre y en el proceso de diferenciación celular. Así, se ha descrito la presencia de cilio primario en diferentes poblaciones de células madre tanto embrionarias como adultas (Lyu and Zhou, 2017).

La relación del cilio primario con las células madre adultas del cerebro ha sido extensamente estudiada. De esta manera, como veremos posteriormente, la eliminación en el desarrollo de células madre adultas del hipocampo y de una región específica de la zona subventricular (las dos áreas que, tradicionalmente, presentan neurogénesis adulta en el SNC de mamíferos) produce una reducción de la reserva de células madre y de la formación de nuevas neuronas (Han et al., 2008; Tong et al., 2014). Por otra parte, mutaciones en genes necesarios para el correcto desensamblaje del cilio, detienen la regeneración de las células madre neuronales y generan su diferenciación precoz hacia neurona (Gabriel et al., 2016).

También se ha observado la importancia del cilio primario en las células satélite del músculo estriado, que presentan características de células madre (Fu et al., 2014; Marican et al., 2016).

Así, mediante estudios en cultivo de células satélites en diferenciación, se ha mostrado que, tras la división asimétrica, solo la célula destinada a mantenerse en el conjunto de células madre vuelve a expresar cilio, mientras que aquellas que se diferencian a célula muscular carecen de él. De hecho, la eliminación del cilio primario, produce un descenso en el número de estas células con capacidad de auto-renovación tras la división celular (Marican et al., 2016). Además, también se ha observado que el cilio primario, a través de la vía Hh, es necesario para la correcta diferenciación a miocitos (Fu et al., 2014). Estos hallazgos muestran la importancia del cilio primario en el mantenimiento de las células madre adultas musculares, así como en la diferenciación a miotubos maduros. Del mismo modo, se ha observado que la inhibición del cilio primario en células madre mesenquimales inhiben su diferenciación hacia osteocitos, condrocitos o adipocitos (Tummala et al., 2010). El cilio primario y la activación cilio-dependiente de la vía TGF β también han demostrado ser fundamentales en la diferenciación de un modelo celular de cardiomiocito (Clement et al., 2013).

Recientemente, se ha descrito la estrecha relación del cilio primario y las células madre a través de la proteína CD133 o Prominina-1 (Singer et al., 2018). Esta proteína de membrana asociada a proyecciones celulares (como microvellosidades o cilios) se ha utilizado ampliamente como marcador de célula madre, tanto en tejidos sanos como en cáncer (Pattabiraman and Weinberg, 2014), donde se ha relacionado con mayor resistencia al tratamiento y peor pronóstico (Singer et al., 2018). Además, se ha descrito su presencia específica en cilios, tanto primarios de células madre adultas (**Fig. 1.15**) (Mirzadeh et al., 2008; Singer et al., 2018) como móviles de algunas células endoteliales identificadas como posibles células madre quiescentes (Coskun et al., 2008). En un modelo fisiológico *in vivo* se ha observado cómo Prominina-1 juega un papel fundamental en la activación de las células madre y su proliferación a través del cilio primario (**Fig. 1.15**), regulando la vía Hh (Singer et al., 2018). De esta manera, la alteración del cilio primario, de Prominina-1 o de elementos de la vía Hh, producen una disminución del número de células madre y de su capacidad de proliferación (Singer et al., 2018). Por otra parte, se ha observado que, durante el proceso de diferenciación de las células madre, se produce la liberación de exosomas que contienen Prominina-1 (Bauer et al., 2011), produciéndose, en algunos casos, la liberación de estas vesículas desde el cilio primario (Singer et al., 2018). Por otra parte, también se ha descrito que un mal funcionamiento de Prominina-1 se relaciona con una disminución de la longitud del cilio primario (Jászai et al., 2020).

En conclusión, el cilio primario supone un elemento frecuente en diferentes tipos de células madre, jugando un papel fundamental (aunque no del todo esclarecido) en la proliferación, auto-regeneración y diferenciación de estas células.

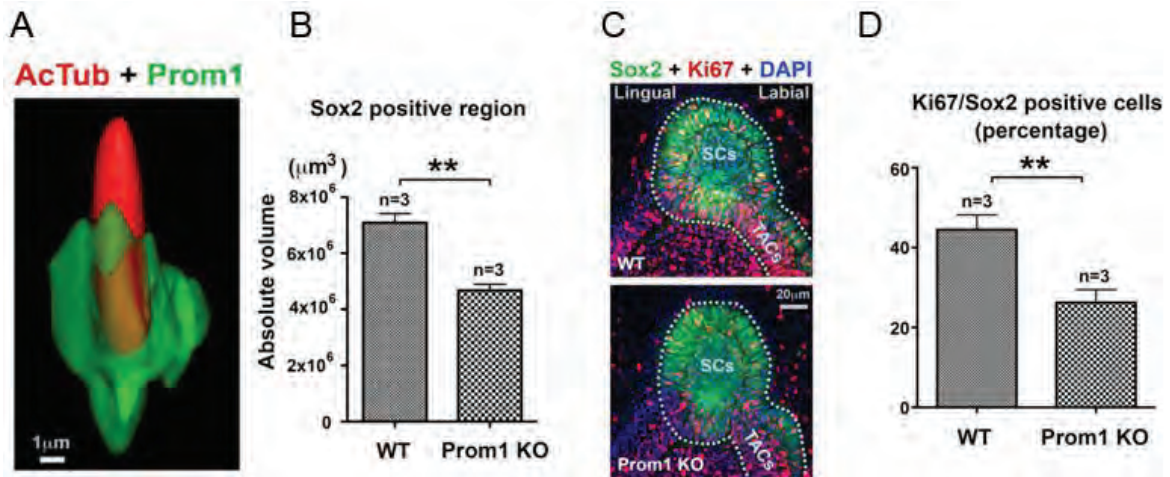


Fig. 1.15. Prominin-1, marcador de células madre, se localiza en el cilio primario y regula la proliferación de las células madre. Estudio del papel de Prominin-1 en relación al cilio primario en las células madre epiteliales del incisivo del ratón. A) Prominin-1 (en verde) se encuentra, en el cilio primario (tubulina acetilada, en rojo, marcando el axonema ciliar). B) Los ratones que no expresan Prominin-1 (Prom1 KO) presentan un volumen de células madre (Sox2+) menor en relación a controles salvajes o wildtype (WT). C y D) Además, estos ratones Prom1 KO presentan un menor número de células madre en división (Ki67/Sox2+). **Indica diferencias significativas. Modificado a partir de Singer et al. 2018.

c) Cilio primario y citoesqueleto. Polaridad y migración.

La relación del cilio primario y el citoesqueleto es muy estrecha. El cuerpo basal se origina a partir del centrosoma que compone el centro organizador de microtúbulos, del que surgen todos los microtúbulos que componen el esqueleto celular. Además, también se ha descrito que el centrosoma actúa como un centro regulador de la actina, nucleando filamentos de actina a través de proteínas de los satélites pericentriolares como PCM1 (*Pericentriolar Material 1*) (Farina et al., 2016).

Los microtúbulos que surgen del cuerpo basal presentan una importante función como elementos que dotan de estabilidad al cilio primario. Más aún, se ha observado que Kif2A regula la despolimerización de estos microtúbulos basales favoreciendo el desensamblaje del cilio e impidiendo su síntesis durante la división celular (Malicki and Johnson, 2017). Por otra parte, un adecuado balance entre tubulina polimerizada y libre en el citoplasma regula el crecimiento y longitud del cilio primario, de manera que si se reduce el número de tubulina soluble se inhibe el ensamblaje ciliar (Mirvis et al., 2018).

Respecto al papel de la actina en la función del cilio primario se han descrito diferentes vías por las que podría regularlo, fundamentalmente con un efecto antagónico (Malicki and Johnson, 2017; Mirvis et al., 2018): bloqueando la llegada de vesículas al cilio, formando una especie de barrera que dificultase el paso de proteínas dirigidas al cilio; favoreciendo la acumulación de proteínas que regulan la longitud y el ensamblaje o desensamblaje del cilio (como HDAC6); mediando la movilización del cuerpo basal hacia la membrana basal durante la ciliogénesis y a través de la vía Hippo y las proteínas YAP/TAZ (*Yes Associated Protein/*

Transcriptional coactivator with a PDZ-binding domain), que activa directamente la Kinasa Aurora A.

Sin embargo, también se han observado funciones de los filamentos de actina que favorecen la función ciliar. Así, en las células multiciliadas, se ha observado que existe un entramado de actina que envuelve los cuerpos basales, protegiéndolos del estrés mecánico externo y evitando su desprendimiento (Mahuzier et al., 2018), habiéndose observado una distribución similar en las células monociliadas (aunque de menor espesor).

Por otra parte, el citoesqueleto juega un papel fundamental en la polaridad celular, consistente en la distribución espacial asimétrica de los componentes celulares (Lo et al., 2012). Así, se han descrito tres tipos diferentes de polaridad celular: apicobasal (entre la parte apical y basolateral de la célula), plana (en un mismo plano celular, normalmente en la superficie apical) y antero-posterior (en los procesos de migración celular) (Figs. 1.16 y 1.17). El cilio primario se ha relacionado con los tres tipos de polaridad, como desarrollaremos brevemente en los siguientes párrafos.

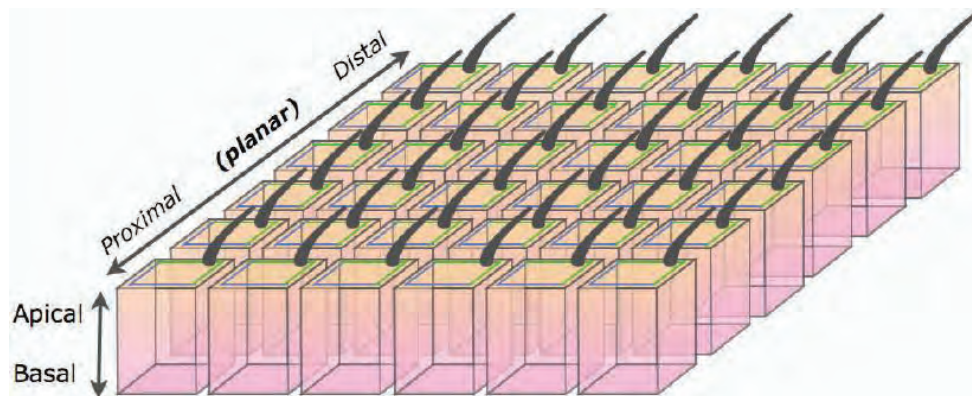


Fig. 1.16. Polaridad celular. La polaridad celular supone una distribución asimétrica de los componentes de las células, un elemento fundamental para su correcto funcionamiento. En la imagen se pueden observar dos tipos: la polaridad apico-basal, es decir, la distribución asimétrica entre el componente apical y el basolateral, y la polaridad celular plana, que supone la distribución diferente en el plano perpendicular al apicobasal, es decir, en el plano superficial del epitelio. Extraído de Lo et al., 2012.

De este modo, la presencia del cilio primario en la superficie apical de las células epiteliales se ha relacionado con el control de la polaridad, estableciendo una orientación vertical de los microtúbulos y regulando toda la estructura celular, especialmente la maquinaria de endo y exocitosis (Tang and Marshall, 2012). Del mismo modo, los complejos proteicos PAR (*Partitioning Defective*) y Crumbs, que regulan el dominio apical de la célula, juegan un importante papel en la ciliogénesis y, de hecho, se ha observado su localización en el cilio primario donde establece importantes relaciones con el sistema *exocyst* (ver apartado de ciliogénesis) (Bernabé-Rubio and Alonso, 2017).

La polaridad celular plana es fundamental para el desarrollo embrionario y la formación de tejidos como la piel o el oído interno. El papel del cilio primario en este tipo de polaridad se ha relacionado principalmente con la vía de Wnt (Jones and Chen, 2008), de manera que

diferentes proteínas ciliares parecen inhibir la vía canónica (β catenina dependiente) en favor de la no canónica, que regula proteínas fundamentales para el correcto desarrollo de la polaridad celular plana (Gerdes and Katsanis, 2008; Anvarian et al., 2019). Además, el kinocilio de las células ciliadas del oído interno juega un papel esencial en la polaridad plana de estas células de manera que mutaciones que lo alteran, producen alteraciones en la distribución de los estereocilios de la superficie celular (Jones and Chen, 2008).

Por otra parte, cabe destacar que el cilio primario posee un importante papel en la migración celular, mecanismo en el que los filamentos de actina y los microtúbulos son fundamentales, dándose una polaridad antero-posterior (Tang and Marshall, 2012; Veland et al., 2014). Así, el cilio se orienta paralelo a la dirección de la migración celular en una posición entre el núcleo y el polo de avance de la célula, captando señales solubles externas, especialmente PDGF, y contactando mediante integrinas presentes en la membrana ciliar con la matriz extracelular (Fig. 1.17). Esto desencadena una serie de señales que tienen como consecuencia (mediante mecanismos no del todo comprendidos aún) la movilización del centrosoma, el tráfico de vesículas y señales hacia el polo de avance y la polimerización de actina y microtúbulos en el mismo (Veland et al., 2014). De esta manera, el cilio primario se ha relacionado directamente con procesos concretos en los que la migración celular es esencial, como la reparación de tejidos o la cicatrización (Schneider et al., 2010), el desarrollo del sistema nervioso (Veland et al., 2014) o la metástasis tumoral (Eguether and Hahne, 2018).

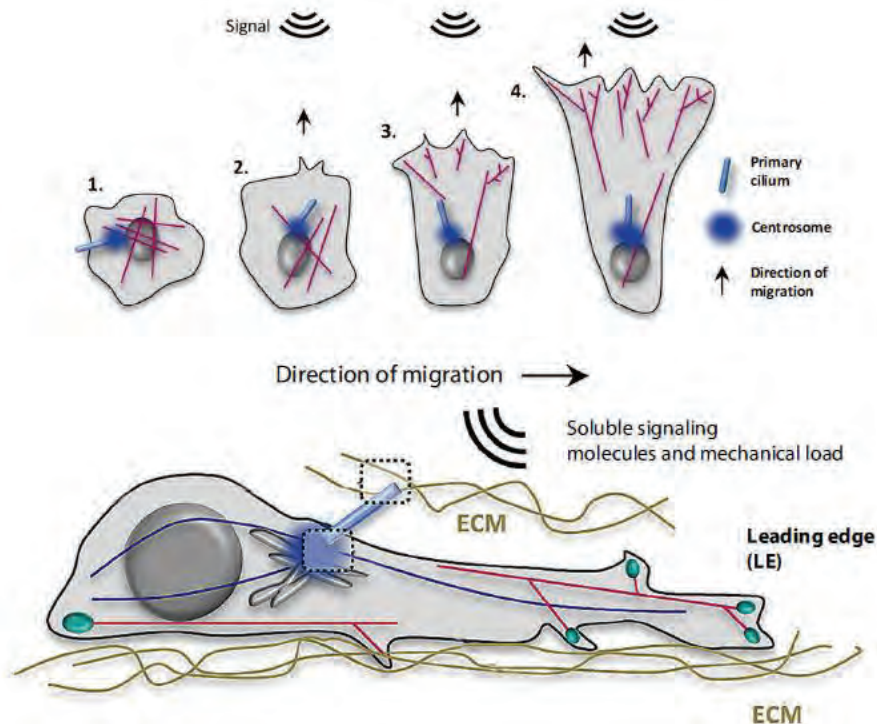


Fig. 1.17. El cilio primario regula la migración celular. Ante una señal quimiotáctica se produce la reorganización del centrosoma que se localiza entre el núcleo y el polo de avance ("leading edge"). El cilio primario se orienta paralelo a la dirección del movimiento y regula, a través de señales solubles y del contacto directo con proteínas de la matriz extracelular (ECM) la polimerización de actina y microtúbulos y la migración celular. Extraído de Veland et al., 2014.

d) Cilio primario, sistema ubiquitina-proteasoma y autofagia-lisosoma. Proteostasis y renovación.

Las células presentan una continua renovación de las proteínas que contienen, lo que permite el cambio de proteínas defectuosas y mal plegadas por otras de mejor calidad. Más aún, ante situaciones de privación de nutrientes, presentan “sistemas de seguridad” que logran una fuente de aminoácidos y otros elementos necesarios para mantener su correcto funcionamiento y asegurar su supervivencia. Estos mecanismos se basan fundamentalmente en dos sistemas: el sistema ubiquitina-proteasoma y el de autofagia-lisosoma (Mizushima and Komatsu, 2011; Boukhalifa et al., 2019;). Diferentes estudios han observado y descrito la estrecha relación del cilio primario con ambos sistemas, demostrando la importancia recíproca entre esta estructura celular y los mecanismos de proteostasis celular (Pampliega et al., 2013; Tang et al., 2013; Pampliega and Cuervo, 2016; Hossain and Tsang, 2018; Boukhalifa et al., 2019; Wiegering et al., 2019).

Sistema Ubiquitina-proteasoma

El sistema Ubiquitina-Proteasoma (o UPS, por sus siglas en inglés) es un sistema de proteólisis que se encarga tanto de la degradación como del procesamiento de proteínas. Algunos autores apuntan que hasta el 90% de las proteínas celulares son degradadas a través de este sistema. La selección de las proteínas que van a ser dirigidas al proteasoma se produce por la unión de moléculas de ubiquitina a través de un complejo enzimático compuesto de tres elementos: enzimas activadoras de la ubiquitina (E1), enzimas de conjugación de la ubiquitina (E2) y ligasas de ubiquitina (E3), que median el paso de moléculas de ubiquitina a las proteínas sustrato (Pagan et al., 2013; Boukhalifa et al., 2019; Wiegering et al., 2019). Una vez que la proteína diana presenta una cadena de ubiquitina (poliubiquitinización) esta es reconocida por el proteasoma, un complejo proteico compuesto por dos subunidades 19S que reconocen las proteínas poliubiquitinizadas y las despliegan, y una subunidad 20S (con actividad peptidasa), que media su degradación o procesamiento mediante proteólisis (**Fig. 1.18**).

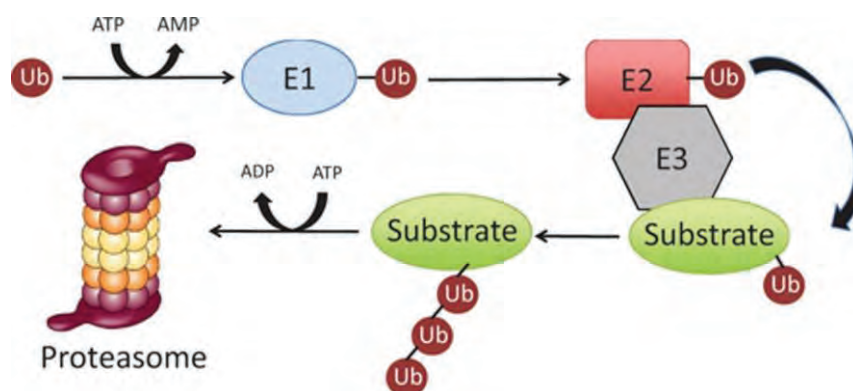


Fig. 1.18. El sistema UPS. Hasta el 90% de las proteínas es degradado por el proteasoma a través de procesos de ubiquitinización. Este mecanismo es mediado por tres enzimas: E1, E2 y E3. E1 activa la ubiquitina mediante la degradación de ATP a AMP y es transferido a E2. E3 se une a la proteína diana, mediando el paso final de ubiquitina al sustrato. La unión de varias moléculas de ubiquitina (poliubiquitinización) marca a la proteína diana para su transporte y procesamiento en el proteasoma. Extraído de Pagan et al. 2013.

El sistema UPS y el cilio primario interactúan de forma recíproca (**Fig 1.19**). Así, se ha observado que en el cuerpo basal del cilio primario se acumulan múltiples proteínas del sistema UPS, incluyendo enzimas con función E1, E2 y E3 así como componentes del proteasoma (Hossain and Tsang, 2018). La función del proteasoma tanto en el centriolo como en el cuerpo basal juega un papel fundamental en diferentes procesos relacionados con el cilio primario y, de hecho, se ha propuesto que se trata de un proteasoma específico, regulado de manera diferente al resto de proteasomas celulares (Wiegering et al., 2019). Así, regula la ciliogénesis mediante la degradación tanto de proteínas inhibitoras (como CP110, Trichopleína o Nde1) como de proteínas de los satélites pericentriolares, necesarias para la ciliogénesis (Kim et al., 2011; Villumsen et al., 2013; Jenkins and Hernandez-Hernandez, 2015; Hossain and Tsang, 2018). Además, también juega un papel fundamental en el control de la longitud del axonema y el control de diferentes vías de señalización, especialmente Hh, Wnt y Notch; a través del procesamiento de sus componentes en formas represoras o activadoras o mediante su degradación (Gerhardt et al., 2015; Wiegering et al., 2019).

Este proteasoma ciliar es regulado de manera específica por proteínas del cilio, como RPGRIP1 (*Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator Interacting Protein Ligand*), situada en la zona de transición y cuya pérdida de función se traduce en una inhibición del sistema UPS y la acumulación de proteínas poliubiquitinizadas (Gerhardt et al., 2015). Otras proteínas estrechamente relacionadas con el cilio primario como BBS4 (*Bardet Biedl Syndrome 4*) y OFD1 (*Oral-Facial-Digital Síndrome1*) han demostrado también un importante papel en la inducción del sistema UPS y la regulación de diferentes vías de señalización a través de este (Liu et al., 2014). Por otra parte, diferentes señales externas regulan la ubiquitinización de diferentes proteínas ciliares y su degradación por el proteasoma (Villumsen et al., 2013).

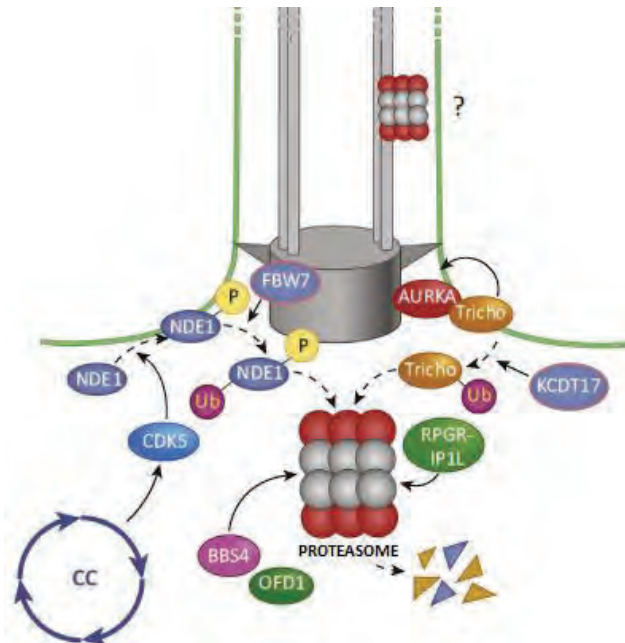


Fig. 1.19. La relación entre el cilio primario y el sistema UPS. Se ha descrito la presencia de proteasomas específicos en la base del cuerpo basal del cilio primario, así como enzimas relacionadas con la ubiquitinización de proteínas. El proteasoma regula de manera fundamental el funcionamiento del cilio primario, degradando proteínas relacionadas con la ciliogénesis, el desensamblaje ciliar, las vías de señalización o la longitud del axonema. Por otra parte, proteínas ciliares como RPGR1L, BBS4 u OFD1 actúan como activadores del sistema UPS. Extraído de Malicki and Johnson 2017.

Sistema Autofagia-lisosoma

La autofagia es el mecanismo por el que las células llevan parte de sus componentes al interior del lisosoma donde son degradados. Se han descrito tres tipos generales de autofagia: macroautofagia (donde se crea una membrana, el autofagosoma, que envuelve componentes citoplasmáticos y orgánulos, y que se fusiona posteriormente con el lisosoma), microautofagia (en la que el propio lisosoma incorpora sustancias citoplasmáticas mediante invaginación directa) y autofagia mediada por chaperonas (donde la chaperona Hsc70 se une a proteínas con la secuencia de aminoácidos KFERQ y media su incorporación al lisosoma mediante la unión a Lamp-2a) (**Fig. 1.20**) (Mizushima and Komatsu, 2011).

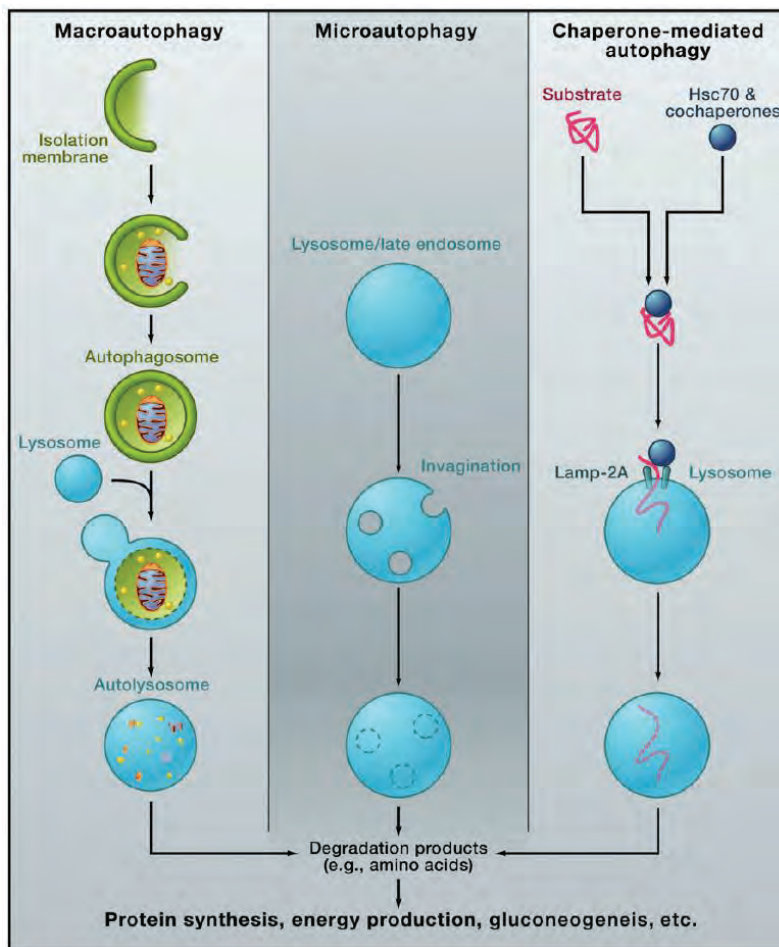


Fig. 1.20. Tipos de autofagia. Se han descrito tres tipos de autofagia: la macroautofagia, en la que se forma una invaginación membranosa que envuelve diferentes orgánulos y proteínas generando el autofagosoma; la microautofagia, en la que se producen invaginaciones de la membrana lisosomal, y la autofagia mediada por chaperonas, donde se produce el transporte de las proteínas diana a través de la chaperona hsp70. Extraído de Mizushima and Komatsu 2011.

La relación del cilio primario y la autofagia es también de carácter bidireccional (**Fig. 1.21**). Por una parte, el cilio primario parece regular la inducción de autofagia tanto en situaciones basales como de privación de nutrientes. Así, cuando la célula se enfrenta a situaciones de falta de nutrientes, se produce la acumulación de proteínas relacionadas con la génesis del autofagosoma en el cuerpo basal y axonema del cilio primario y se estimula la formación del autofagosoma (probablemente en una región próxima al bolsillo ciliar), a través de la vía Hh.

Por el contrario, tanto la inhibición de esta vía como del correcto desarrollo del cilio primario, disminuye la inducción de autofagia que se produce ante la privación nutricional (Pampliega et al., 2013). También se ha descrito una disminución de la autofagia basal al alterarse la formación del cilio primario secundaria a una activación excesiva de la vía de mTOR (Wang et al., 2015).

Por otra parte, los procesos de autofagia también regulan la formación y funcionamiento del cilio. Sin embargo, dada la degradación tanto de proteínas inhibitoras de la ciliogénesis (especialmente OFD1) (Tang et al. 2013) como promotoras (como IFT20) (Pampliega et al., 2013), se han descrito resultados contradictorios en el efecto sobre el número y longitud de cilios primarios de la inhibición de la autofagia. Con el fin de conciliar estos resultados, se ha propuesto que una autofagia basal, mediante la degradación predominante de IFT20, limita la ciliogénesis mientras que la autofagia inducida por privación nutricional, inclina el equilibrio hacia la formación del cilio a través de la degradación de OFD1 de los satélites pericentriolares (Pampliega and Cuervo, 2016; Boukhalfa et al., 2019;). De esta manera, la privación de nutrientes induce tanto la autofagia como la ciliogénesis.

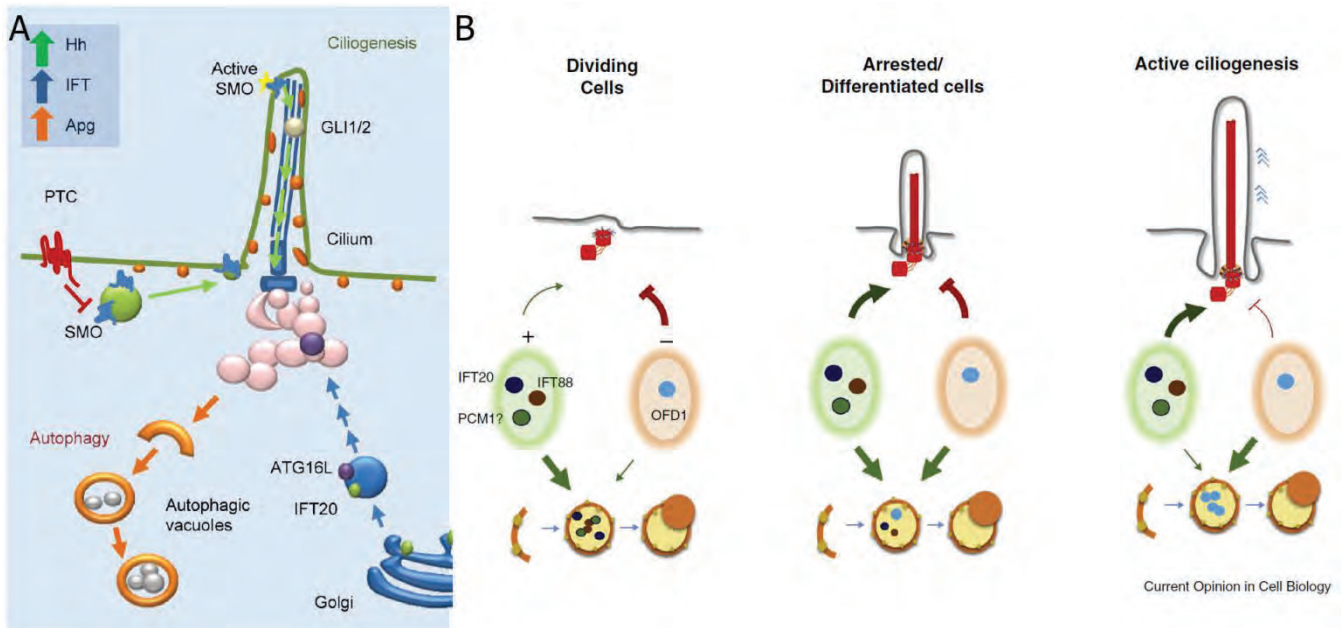


Fig. 1.21. Cilio primario y autofagia. A) Ante situaciones de privación nutricional, se produce la activación de la vía Hh produciéndose un reclutamiento, vía IFT20, de proteínas necesarias para la formación del autofagosoma (incluida ATG16L: Autophagy Related 16 Like 1) y la inducción de la autofagia. Extraído de Pampliega et al. 2013. B) Mediante la autofagia se regula la degradación de proteínas inductoras (IFT20) e inhibitoras (OFD1) de la ciliogénesis. En situaciones basales ambos grupos de proteínas se degradan por igual o predomina la degradación de proteínas inductoras (especialmente IFT20), produciéndose un mantenimiento/descenso del número y longitud de cilios. Sin embargo, ante situaciones de inducción de autofagia (como la privación nutricional) se produce un incremento en la degradación de OFD1 y, en consecuencia, un aumento de la longitud y número de cilios. Modificado a partir de Pampliega and Cuervo 2016.

e) Cilio primario y metabolismo.

Ante la presencia de alteraciones metabólicas en determinadas ciliopatías (como el síndrome de Bardet-Biedl y el síndrome de Alstrom, ver **Tabla 3**) (Ware et al., 2011) y, específicamente, de obesidad e intolerancia a la glucosa, se han realizado diversos estudios que intentan relacionar el papel del cilio primario en el metabolismo energético (Song et al., 2018) (**Fig. 1.22**).

De esta manera, las neuronas del núcleo arcuato del hipotálamo que se encargan de controlar la ingesta presentan cilio primario y su correcto funcionamiento es necesario para una adecuada monitorización del estado metabólico del organismo; así como el consecuente equilibrio de transmisores orexigénicos (que aumentan el apetito), como el Neuropeptido-Y y la *Agouti-related protein*, y hormonas anorexigénicas (que reducen el apetito) como la proopiomelanocortina (POMC) (Song et al., 2018). De este modo, alteraciones en el cilio primario de las neuronas POMC producen defectos en el control metabólico, con la consecuente hiperfagia y aumento de peso. Por otra parte, la propia dieta afecta y modifica el cilio primario de estas neuronas, de forma que su longitud se reduce ante dietas proclives a la obesidad (Song et al., 2018).

Por otra parte, el cilio primario se ha relacionado con el metabolismo de la glucosa a través, fundamentalmente, de la vía Hh. De esta manera, se ha observado que la activación de la vía no canónica de Hh a partir de Smo produce cambios metabólicos, induciendo la glucólisis (generando la captación de glucosa y la liberación de lactato). Además, se ha visto que esto es dependiente del cilio primario, ya que al eliminarlo este efecto se revierte (Teperino et al., 2012). Este efecto se produce fundamentalmente en las células musculares y adiposas pardas (Teperino et al., 2012; Song et al., 2018). Se ha observado, además, que el cilio primario presente en las células β del páncreas, es necesario para la correcta producción de insulina (Volta et al., 2019), relacionando esta estructura con el metabolismo glucídico a distintos niveles.

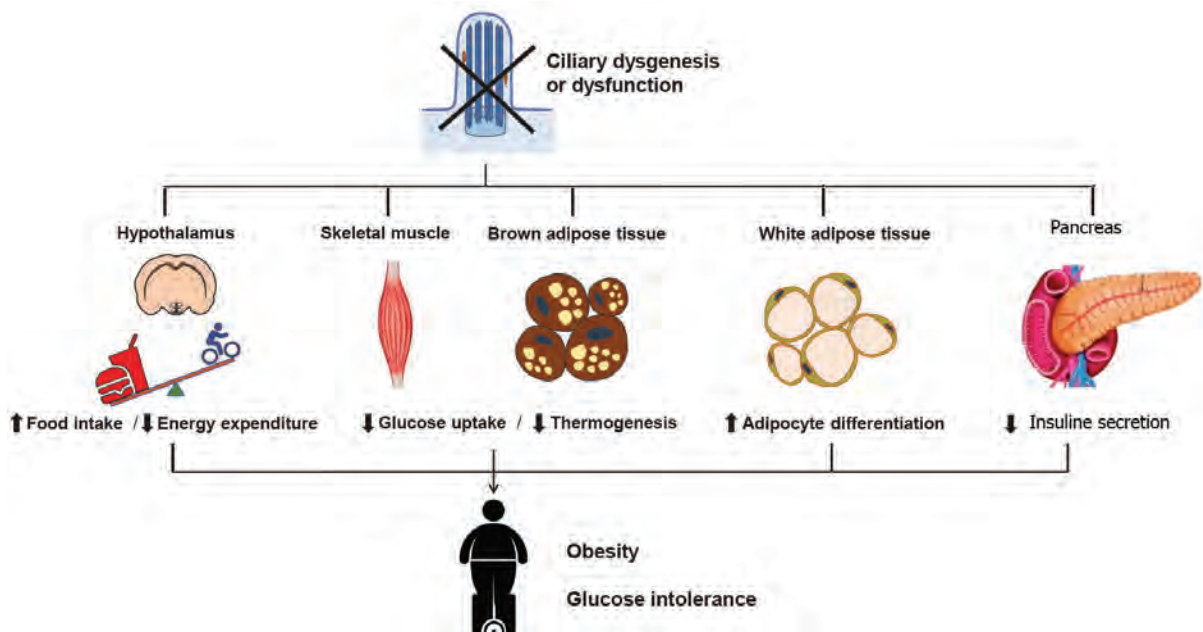


Fig. 1.22. Cilio primario y metabolismo. Ante alteraciones del cilio primario se producen defectos en las neuronas hipotalámicas que regulan la ingesta y el consumo energético, de manera que se produce un

desequilibrio proclive a la hiperfagia y la ganancia de peso. Del mismo modo, se produce una disminución de la captación de glucosa a nivel del músculo esquelético y del tejido adiposo pardo, un aumento en la diferenciación de los adipocitos del tejido adiposo blanco y una disminución de la secreción de insulina por las células β del páncreas. En conjunto, todas estas alteraciones conllevan a una intolerancia a la glucosa (y posible diabetes) y obesidad. Modificado de Song et al., 2018.

1.7. FUNCIONES ÓRGANO-ESPECÍFICAS DEL CILIO PRIMARIO. CILIOPATÍAS.

Aunque, a nivel general, el cilio primario presenta las funciones y relaciones descritas previamente, este realiza funciones determinadas en las células de cada órgano en función de sus características específicas. En la siguiente tabla (**Tabla 2**) se resumen sucintamente los órganos en los que se ha descrito con mayor precisión la presencia del cilio primario en alguno de sus tipos celulares y las funciones determinadas con las que se ha relacionado.

Tabla 2. Órganos en los que se ha propuesto una función del cilio primario a nivel fisiológico. Realizada a partir de Utrilla et al. 2015, Mitchison and Valente 2017 y Song et al., 2018.

ÓRGANO	FUNCIÓN
Riñón	Sensor del flujo, composición y osmolaridad urinaria. Polaridad celular (vía Wnt).
Hipotálamo	Regulación del metabolismo, control del apetito. Respuesta a leptina e insulina.
Cerebro	Regulación de las ramificaciones axonales y dendríticas. Funcionamiento neuronal.
Retina	Funcionamiento de los fotorreceptores (conos y bastones).
Hígado	Sensor del flujo, composición y osmolaridad biliar.
Páncreas	Sensor del flujo pancreático (exocrino), regulación de la secreción de insulina (endocrino).
Tejido adiposo	Control de la diferenciación de los adipocitos y del metabolismo. Termogénesis (tejido adiposo pardo).
Músculo	Captación de glucosa y metabolismo.
Esqueleto	Osificación endocondral (aunque también endomembranosa). Información de la matriz extracelular y fuerzas mecánicas esenciales en la distribución de las líneas de fuerza y morfogénesis osea.
Tiroides	Probable sensor del contenido del folículo tiroideo.
Vasos sanguíneos	Sensor del flujo, control del estrés por rozamiento y mediador de señalización por calcio y por óxido nítrico en células endoteliales.

Por otra parte, se han descrito una serie de patologías genéticas producidas por mutaciones a nivel de proteínas fundamentales para la correcta estructura y funcionamiento del cilio primario. En conjunto, estas enfermedades se han denominado ciliopatías y componen un complejo conjunto de trastornos con gran heterogeneidad clínica y sin que aparezca una correlación exacta genotipo-fenotipo. De esta manera, los diferentes síndromes descritos se han desarrollado en función de la clínica predominante, más que en referencia a la mutación o proteína afectada. La tabla siguiente (**Tabla 3**) describe las principales ciliopatías y los genes afectados.

Tabla 3. Principales síndromes producidos por mutaciones en proteínas ciliares o ciliopatías.
Extraído de Ware et al., 2011.

CILIOPATÍA	CARACTERÍSTICAS	GENES
Poliquistosis renal	Quistes renales, fibrosis hepática. Formas autosómico dominantes y recesivas.	<i>PKHD1, PKD1, PKD2</i>
Nefronoptosis	Quistes renales con y sin síntomas extrarrenales.	<i>NPHP1-4, IQCB1, CEP290, GLIS2, RPGRIP1L, NEK8, SDCCAG8, TMEM67, TTC21B</i>
Síndrome de Senior-Loken	Nefronoptosis juvenil, amaurosis de Leber	<i>NPHP1-6, SDCCAG8</i>
Amaurosis congénita de Leber	Alteración visual en el primer año de vida, retinopatía pigmentaria.	<i>GUCY2D, RPE65, LCA3-14, CEP290</i>
Síndrome de Meckel-Gruber	Quistes renales, alteración del SNC (encefalocele), polidactilia y cardiopatía congénita.	<i>MKS1, TMEM216, TMEM67, CEP290, RPGRIP1L, CC2D2A</i>
Síndrome de Joubert y relacionados	Hipoplasia del vermis cerebeloso (signo del diente molar), alteración del ritmo respiratorio, distrofia retiniana, anomalías renales.	<i>JBTS1, TMEM216, AHI1, NPHP1, CEP290, TMEM67, RPGRIP1L, ARL13B, CC2D2A</i>
Síndrome de Bardet-Biedl	Obesidad, polidactilia, retinitis pigmentosa, anosmia, enfermedad de Hirschsprung, cardiopatía congénita.	<i>BBS1-2, ARL6, BBS4-5, MKKS, BBS7, TTC8, BBS9, 10, TRIM32, BBS12, MKS1, CEP290, C2ORF86, MKS1, MKS3, CCDC28B</i>
Síndrome Oro-facio-digital tipo I	Alteraciones de la cavidad oral, la cara y los dedos. Anomalías del SNC. Quistes renales, ligado al X, letal en varones.	<i>OFD1</i>
Síndrome de Älstrom	Miocardopatía dilatada, obesidad, sordera neurosensorial, retinitis pigmentosa, alteraciones endocrinas, renales y hepáticas.	<i>ALMS1</i>
Síndrome de McKusick-Kaufman	Anomalías urogenitales (hidrometrocolpos), polidactilia, cardiopatía congénita.	<i>MKKS (BBS6)</i>
Síndrome de Ellis van Creveld	Displasia esquelética, cardiopatía congénita, polidactilia, displasia ectodérmica.	<i>EVC1, EVC2</i>
Condrodisplasia de Jeune	Displasia esquelética, deformidades torácicas, polidactilia, quistes renales, retinitis pigmentosa.	<i>IFT80</i>
Displasia cráneo-ectodérmica (Síndrome de Sensenbrenner)	Displasia cráneo-ectodérmica, tórax estrecho, anomalías dentarias, afectación hepato-renal.	<i>IFT122, WDR35</i>
Síndrome costillas cortas-polidactilia	Displasia esquelética letal, polidactilia, anomalías congénitas.	<i>NEK1, DYNC2H1</i>
Heterotaxia	Anomalías de la ubicación visceral, asplenia o polisplenia, cardiopatía congénita, atresia biliar, defectos de la línea media.	

2. CILIO PRIMARIO Y NEUROGÉNESIS

En el desarrollo de esta tesis hemos intentado comparar la presencia y potencial papel del cilio primario en procesos fisiológicos y patológicos. Como proceso fisiológico, nos hemos centrado fundamentalmente en la neurogénesis del Sistema Nervioso Entérico (SNE) adulto, aunque también haremos referencia a su desarrollo embrionario. Este último punto fue abordado durante una estancia externa realizada en el grupo de la Dra. Nathalie Spassky en "l'Institut de Biologie de l'École Normale Supérieure" de París.

A continuación, describiremos las características fundamentales del SNE y analizaremos los conocimientos actuales sobre el cilio primario en relación a la neurogénesis, tanto embrionaria como adulta.

2.1. EL SISTEMA NERVIOSO ENTÉRICO

a) Estructura, funciones y componentes

El SNE está formado fundamentalmente por dos plexos compuestos por gran cantidad de ganglios que se localizan a lo largo del tubo digestivo: el plexo submucoso (o de Meissner) y el mientérico (o de Auerbach) (Furness 2012) (**Fig. 2.1.**). A pesar de que, por su localización, siempre se ha situado al SNE dentro del Sistema Nervioso Periférico (SNP), este es un sistema con unas características morfológicas, embriológicas y fisiológicas únicas, más similares al SNC. De esta manera, se ha observado que el SNE es capaz de funcionar de manera autónoma aunque se eliminen todas sus conexiones con el SNC y, de hecho, se desarrollan de manera independiente durante el desarrollo embrionario, estableciendo a posteriori, interconexiones que comunican ambos sistemas para regular y ajustar sus funciones (Furness 2012; Furness and Stebbing 2017). Así, no se trataría de una relación de dependencia del SNE frente al SNC, sino de comunicación recíproca. De esta forma, se ha denominado al SNE como el "segundo cerebro" (Gershon, 1998), aunque algunos autores ya empiezan a apuntar que, dada su mayor antigüedad en la escala filogenética, apareciendo en cnidarios como la hidra, sería más apropiado considerarlo el "primer cerebro" (Junquera, Comunicación Personal, Furness and Stebbing 2017).

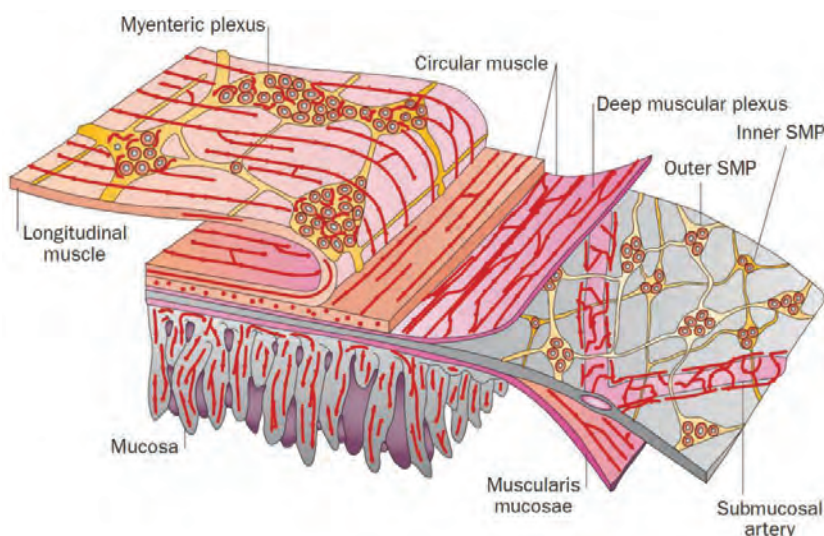


Figura 2.1. El sistema nervioso entérico. El SNE está compuesto por dos plexos principales que se ubican a lo largo del tubo digestivo de manera concéntrica: el plexo submucoso de Meissner (ubicado en la capa submucosa) y el plexo mientérico de Auerbach (localizado entre la capa muscular circular y la longitudinal, que forman la capa muscular del tubo digestivo). Extraído de Furness 2012.

El SNE cumple con una gran variedad de funciones entre las que destacan la coordinación de la musculatura gastrointestinal (fundamental para los movimientos peristálticos o de los diferentes esfínteres del tubo digestivo), el control de la secreción glandular o la regulación de la distribución del flujo sanguíneo. Además, mantiene una estrecha relación con otros componentes gastrointestinales como el epitelio digestivo (regulando la absorción de nutrientes e integridad de la barrera epitelial mediante la liberación de factores tróficos), el sistema inmunitario o el sistema neuroendocrino (Furness 2012). Alteraciones del SNE originan diferentes enfermedades que afectan, fundamentalmente, al aparato digestivo. Dentro de estas enfermedades (denominadas neuropatías entéricas) destacan la acalasia, la estenosis hipertrófica pilórica, el estreñimiento crónico, la enfermedad de Hirschprung, la enfermedad de Chagas (producida por el *Trypanosoma cruzi*) o diarreas neurosecretoras como el cólera (Furness 2012). Por otra parte, cada vez son más las evidencias que demuestran que diferentes enfermedades tradicionalmente consideradas del SNC únicamente (como la enfermedad de Parkinson, la de Alzheimer u otros trastornos prionoides) también afectan al SNE (Natale et al., 2011). Más aún, se ha propuesto que en muchos casos sería el propio tubo digestivo la puerta de entrada de los agentes que producen estas enfermedades, como, por ejemplo, la proteína prion de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob; que migrarían hasta llegar al SNC (Natale et al., 2011).

El SNE está clásicamente compuesto por diferentes poblaciones de neuronas (en un número similar al de la médula espinal) (Furness and Stebbing 2017) y células gliales que se ubican alrededor de ellas sin formar vainas de mielina. En el ser humano aparecen entre 1,3 y 1,9 células gliales por cada neurona en el plexo submucoso y entre 5,9 y 7 en el plexo mientérico (Hoff et al., 2008). Estas células gliales presentan marcadores como GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) (Jessen et al., 1984) o S-100 (Ferri et al., 1982), así como características ultraestructurales (caracterizada por abundantes gliofilamentos citoplasmáticos) (Gabella, 1981) que las asemejan a astrocitos. Por otra parte, otros estudios muestran que la glía entérica expresa PLP1 (*Proteolipid Protein 1*), relacionada con células gliales productoras de mielina como los oligodendrocitos o las células de Schwann (Rao et al., 2015). Además, estas células también expresan Nestina, un filamento intermedio que, como veremos más adelante, se ha relacionado estrechamente con las células madre neuronales (Vanderwinden et al. 2002; Cantarero Carmona et al. 2011). En definitiva, la glía entérica se trata de un subtipo de glía con propiedades únicas (Rao et al., 2015). En función de su morfología o su localización, se han propuesto diferentes clasificaciones de las células gliales entéricas (Gulbransen and Sharkey, 2012) (**Fig. 2.2**). Así, según su morfología, se distingue entre la glía tipo I o protoplasmática (similar a los astrocitos protoplasmáticos de la sustancia gris del SNC, con forma estrellada), la tipo II o fibrosa (similar a astrocitos fibrosos de la sustancia blanca del SNC, con forma alargada), la tipo III (con largas prolongaciones) y la tipo IV (de aspecto fusiforme) (**Fig. 2.2A**). Por otra parte, según su localización, distinguimos entre glía entérica del plexo submucoso (EG_{SMP}), del plexo mientérico (EG_{MP}), de la mucosa (EG_{Mucosa}) y la glía intramuscular (EG_{IM}) (**Fig. 2.2B**) (Gulbransen and Sharkey, 2012).

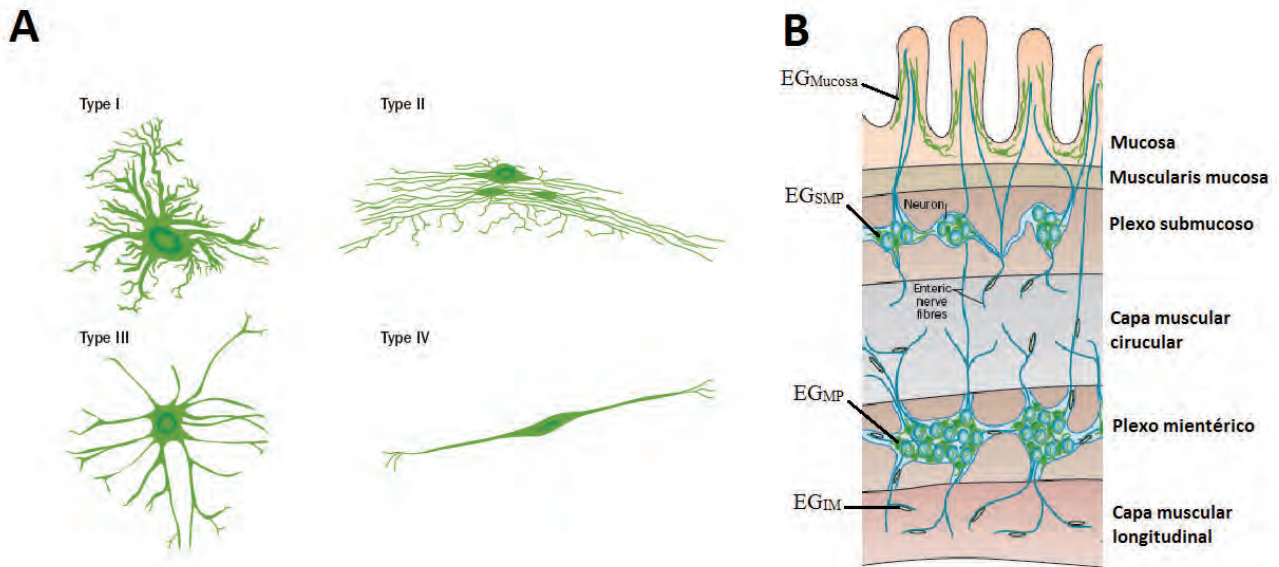


Figura 2.2. Subtipos de glía entérica. Diferentes subtipos de glía entérica según su morfología (A) o su localización (B). Modificado de Gulbransen and Sharkey 2012.

Por otra parte, existe otro tipo celular en estrecho contacto con el SNE y que es, frecuentemente, olvidado en los libros y revisiones sobre este sistema nervioso: las células intersticiales de Cajal (ICC, por sus siglas en inglés). Estas células, descritas por primera vez como neuronas primitivas por Santiago Ramón y Cajal (Ramón y Cajal, 1892), se caracterizan por presentar largas prolongaciones que interconectan entre sí (formando una red) y con diferentes elementos del tubo digestivo (incluyendo neuronas, células gliales, musculares, neuroendocrinas, vasos sanguíneos, células epiteliales...) (Kondo and Kaestner, 2019). Las ICC expresan marcadores específicos como el receptor c-Kit (Maeda et al., 1992) y el canal de cloro ANO1 (*Anoctamin1*) (Gomez-Pinilla et al. 2009). Además, al igual que las células gliales, expresan Nestina (Vanderwinden et al., 2002). Otra de las características fundamentales de estas células es la presencia de cilio primario (Junquera et al., 2007, 2011; Cantarero et al., 2011). Las ICC realizan funciones de “marcapasos” de los movimientos gastrointestinales, actúan como sensor de fuerzas mecánicas y presentan receptores de neuro y gliotransmisores (lo que pone en evidencia su relación con neuronas y células gliales). Además, también se han relacionado con el sistema inmune digestivo y con el microambiente de las células madre epiteliales (Kondo and Kaestner, 2019).

b) Embriogénesis del Sistema Nervioso Entérico

El SNE se origina a partir de células multipotenciales migratorias procedentes de la cresta neural que surgen a partir de procesos de transición epitelio-mesenquimal (Gershon, 1997; Lake and Heuckeroth, 2013; Nagy and Goldstein, 2017) (más adelante estudiaremos en profundidad la transición epitelio-mesenquimal, fundamentalmente asociada al cáncer, y el papel del cilio primario en la misma). En humanos, estas células migran y colonizan el tubo digestivo en la semana 4 de gestación (Nagy and Goldstein, 2017). Las células que originan el SNE proceden de manera específica de 3 regiones de la cresta neural: la zona troncal (que origina el SNE del esófago y de la parte proximal del estómago), la zona vagal (que da lugar a la mayor parte del SNE desde el estómago hasta el colon) y la zona sacra (que aporta células que

pueblan la parte distal del íleon y el colon) (Gershon, 1997; Lake and Heuckeroth, 2013) (**Fig 2.3**). Una vez que estas células llegan al tubo digestivo sufren un proceso de migración longitudinal o primaria (de proximal a distal en el caso de las procedentes de la cresta neural vagal y de distal a proximal, en las sacras) y, posteriormente, de forma centrípeta o migración secundaria desde el exterior del tubo hacia la zona submucosa (originándose así el plexo submucoso) (Lake and Heuckeroth, 2013).

Por otra parte, se ha descrito otra subpoblación de células procedentes de la parte ventral del tubo neural a nivel del romboencéfalo (las llamadas células VENT, por sus siglas en inglés) que originan subpoblaciones de neuronas, glía, ICC, células musculares e, incluso, células epiteliales en el estómago y el duodeno (Sohal et al., 2002).

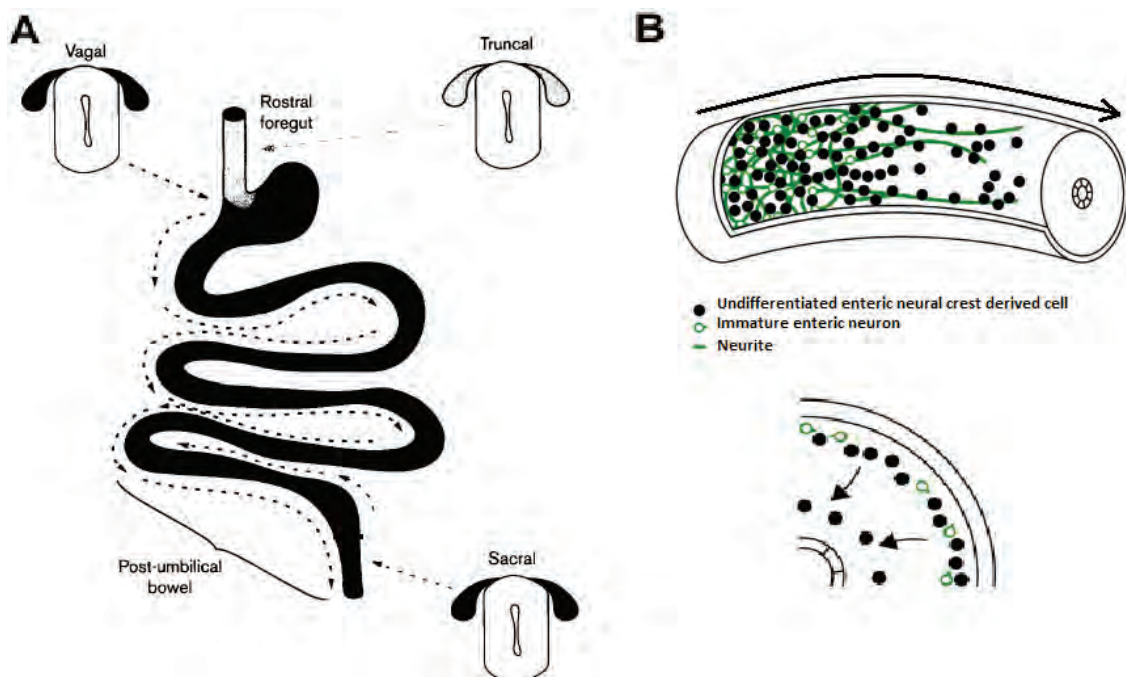


Figura 2.3. Desarrollo del SNE. A) El SNE procede de células derivadas de tres regiones concretas de la cresta neural: la zona vagal (la más importante), la troncal (que aporta células a la región más proximal) y la sacra (cuyas células migran a la parte más distal). Extraído de Gershon 1997. B) Una vez en el tubo digestivo, estas células migran inicialmente de manera longitudinal y, posteriormente, de manera centrípeta del exterior al interior del tubo digestivo. Extraído de Lake and Heuckeroth 2013.

El control de la migración, proliferación y diferenciación de las células progenitoras para originar los diferentes componentes del SNE está estrechamente regulado por diferentes proteínas y vías de señalización. Dentro de estas últimas, las más estudiadas son la del receptor tirosín-kinasa RET cuyo principal ligando es GDNF (*Glia Derived Neurotrophic Factor*) y la del receptor asociado a proteínas G EDNRB (*Endothelin Receptor type B*) cuyo ligando es la endotelina 3 (Lake and Heuckeroth, 2013; Nagy and Goldstein, 2017). Otro receptor muy asociado a estas células progenitoras es el receptor neurotrófico de baja afinidad p75 (Stemple and Anderson, 1992) que, además, ha sido descrito en el cilio primario en algunos tipos neuronales, en concreto, del hipocampo (Chakravarthy et al., 2010). Además, existen múltiples factores de transcripción que regulan el desarrollo y diferenciación de las células progenitoras como Phox2b (*Paired Like Homeobox 2B*), Sox10 (*SRY-Box Transcription Factor 10*) o Pax3

(*Paired Box 3*) (Pattyn et al., 1999; Lake and Heuckeroth, 2013). Por otra parte, la vía Hh que hemos estudiado previamente también juega un papel importante en el desarrollo del SNE, de manera que regula la migración centrípeta y promueve la proliferación de las células progenitoras mientras que inhibe su diferenciación hacia neuronas y su capacidad de migración (Fu et al., 2004).

c) Neurogénesis entérica adulta

La hipótesis de que en el SNE pudieran originarse nuevas neuronas durante la edad adulta ha despertado el interés de diferentes grupos de investigación, más aún, después de que la neurogénesis adulta se demostrara en el SNC (Altman and Das, 1965), acabando así con uno de los grandes dogmas de la neurociencia.

Inicialmente la mayoría de estudios se basaron en modelos celulares que demostraban la presencia de una población de células progenitoras positivas para Nestina que podía generar (*in vitro* y al ser transplantadas en animales) neuronas, glía, ICC y células musculares (Suárez-Rodríguez and Belkind-Gerson, 2004; Metzger et al., 2009a; Belkind-Gerson et al., 2013). Posteriormente, Laranjeira et al. (2011), mostró la presencia de una subpoblación celular (que relacionó con células gliales) positivas para Sox10, capaces de producir nuevas neuronas en cultivo e *in vivo* tras producirles una agresión química, pero no de manera fisiológica (Laranjeira et al., 2011). Por otra parte, en otro trabajo contemporáneo, no detectaron ninguna neurogénesis significativa en el SNE mediante técnicas de BrdU (Bromodesoxi-Uridina), un marcador que se incorpora a las células en división, y solamente hallaron un pequeño porcentaje de neuronas derivadas de células GFAP+ tanto en situaciones fisiológicas como tras producirles diferentes lesiones. Estos resultados les llevaron a concluir que la neurogénesis adulta en el SNE era prácticamente inexistente (Joseph et al., 2011).

Recientemente, se ha mostrado que una subpoblación de células positivas para Nestina y p75 pero negativas para Sox10 sí son capaces de generar nuevas neuronas en el SNE y que, de hecho, se produce un recambio continuo de neuronas en el SNE adulto de los ratones (Kulkarni et al., 2017). Los autores se refieren a estas células como una subpoblación única diferente de la glía entérica, a pesar de que expresan marcadores relacionados con esta como GFAP y S100 β (Kulkarni et al., 2017). Marcadores relacionados con las ICC, como c-Kit o ANO1, no fueron estudiados en este trabajo. Más aún, los autores proponen un esquema en el que la ruta de neurogénesis espontánea sería diferente de la inducida por lesiones, que sí provendría directamente de células gliales Sox10+ (**Fig.2.4**). Al igual que sucede en el SNC (Lim and Alvarez-Buylla, 2014; Moss et al., 2016; Bonafina et al., 2020), el ambiente de estas células progenitoras (conocido como nicho neurogénico) es fundamental para su funcionamiento y se ha observado que elementos como la microbiota, regulan la invasión del SNE y activan la proliferación de las células progenitoras Nestina+, así como su diferenciación hacia neuronas maduras, en un proceso posiblemente regulado por la liberación de serotonina (Liu et al., 2009; De Vadder et al., 2018;) y por Toll-like Receptor 2 (TLR2) (Yarandi et al., 2020).

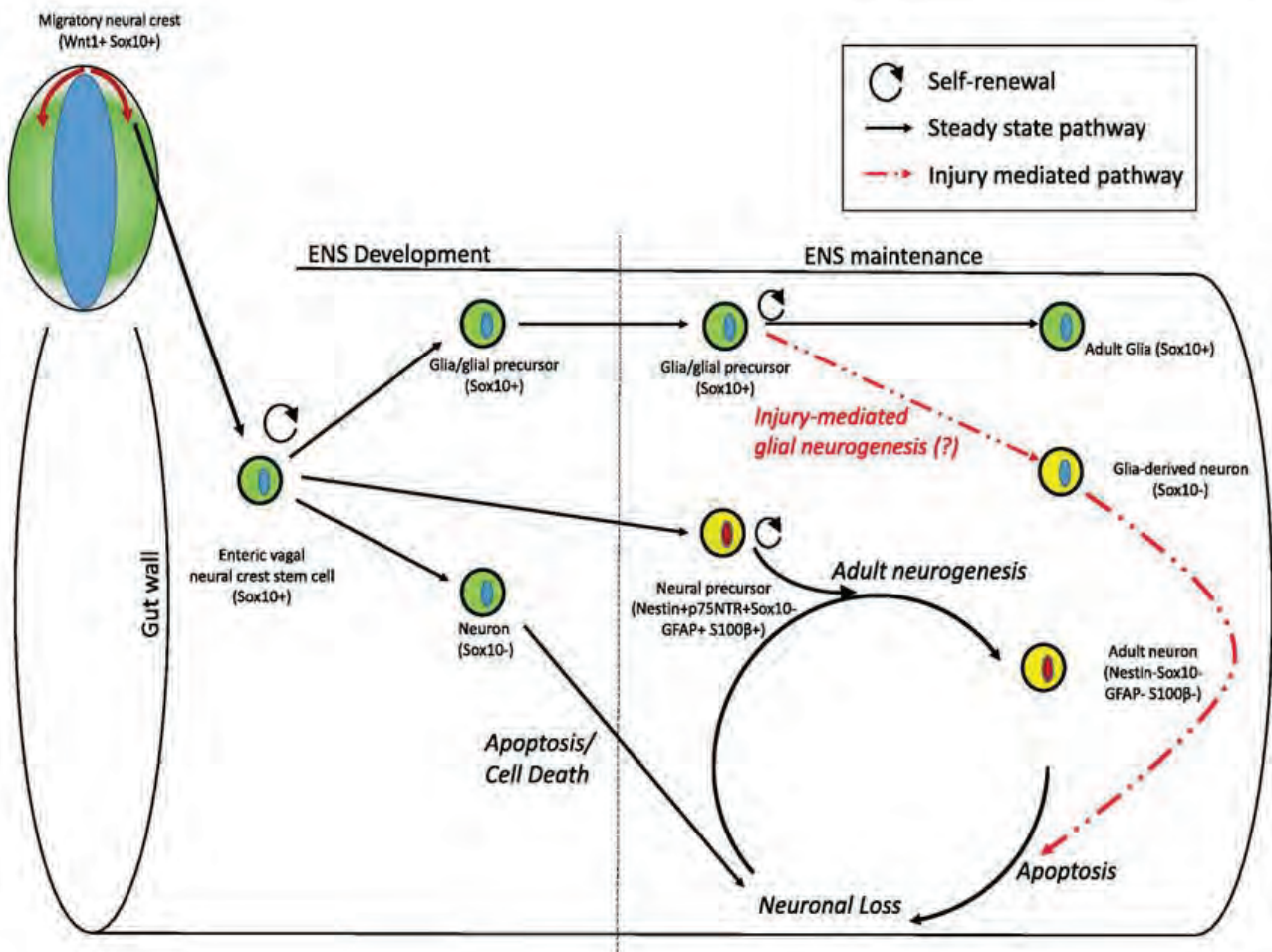


Figura 2.4. Neurogénesis del SNE adulto. Células procedentes de la cresta neural ($p75+$, $Ret+$, $Sox10+$) colonizan el intestino embrionario y dan lugar a glía y precursores gliales ($Sox10+$, $S100\beta+$, $GFAP+$), neuronas ($Sox10-$, $Nestina-$) y a células madre neuronales entéricas ($Nestina+$, $p75NTR+$, $Sox10-$, $S100\beta+$, $GFAP+$). Estas células precursoras generan nuevas neuronas en el SNE en condiciones fisiológicas, mientras que las células gliales pueden dar lugar a nuevas neuronas únicamente en casos de lesión (en rojo). Extraído de Kulkarni et al. 2017.

Pocos estudios se han centrado en la potencial neurogénesis entérica humana. Sin embargo, se ha observado la presencia de células progenitoras positivas para Nestina con la capacidad de generar neuronas *in vitro* y en explantes en otras especies (Metzger et al., 2009a; Metzger, et al., 2009b) y se ha apuntado a una población de células $S100\beta$, $Nestina+$ y $PGP9.5+$ (un marcador relacionado con el linaje neuronal) como posibles progenitoras neuronales (Azan et al., 2011).

A continuación, trataremos del papel del cilio primario en la neurogénesis. Los estudios previos sobre esta estructura y el desarrollo de nuevas neuronas en el SNE son prácticamente inexistentes, por lo que nos centraremos en las implicaciones que se han observado en la neurogénesis del SNC para, posteriormente, tratar de trazar un paralelismo entre la neurogénesis central y la entérica.

2.2. EL CILIO PRIMARIO EN LA NEUROGÉNESIS EMBRIONARIA

El cilio primario ha sido relacionado con un correcto desarrollo del SNC y alteraciones en su estructura o función (especialmente a través de Gli3) se han vinculado con trastornos en la formación de la corteza cerebral o del cuerpo caloso (Youn and Han, 2018).

En concreto, el cilio primario está implicado en la correcta formación de la glía radial, unas células necesarias para el desarrollo adecuado del cerebro durante la embriogénesis (**Fig.2.5A**). Estas células presentan una polaridad específica, de manera que el soma se encuentra próximo a la pared de los ventrículos del cerebro y emiten largas prolongaciones que llegan hasta la superficie cerebral. Las células de la glía radial no solamente son células madre de las que se originan, por división asimétrica, las neuronas, sino que componen un andamiaje, una guía ("*scaffold*" en inglés), por el que las neuronas migran hasta llegar al córtex (Stiles and Jernigan, 2010; Kandel et al., 2013) (**Fig. 2.5A**). Estas células de la glía radial poseen cilio primario (Higginbotham et al., 2013). Ante mutaciones en el gen *Arl13b* (*ADP Ribosylation Factor Like GTPase 13B*) que condicionan un mal funcionamiento de este cilio, se producen alteraciones en la polaridad de las células de la glía radial, de manera que el soma se localiza en la proximidad de la superficie cerebral y se produce una incorrecta migración de las neuronas del córtex y una formación aberrante del hipocampo (**Fig. 2.5B-D**) (Higginbotham et al., 2013).

Por otra parte, alteraciones en el cilio primario también se han relacionado con el correcto desarrollo de otras estructuras cerebrales. Así, mutaciones que alteran el transporte intraflagelar (reduciendo la expresión de *Kif3A*) producen un desarrollo inadecuado del cerebelo (Spassky et al., 2008) y de los ventrículos cerebrales (Foerster et al., 2017), en relación a la alteración de vías de señalización cilio-dependientes (en concreto, de la vía Hh en el caso del cerebelo y de la vía mTOR en el caso de los ventrículos) (**Fig.2.5E-H**).

En definitiva, estos estudios demuestran que la presencia y correcto funcionamiento del cilio primario es fundamental para el desarrollo adecuado del SNC. Sin embargo, ningún estudio hasta el momento ha tratado de estudiar las implicaciones de esta estructura en el desarrollo embrionario del SNE.

En el **ANEXO2**, encontraremos el informe de la estancia realizada en París, donde se muestran unos resultados preliminares en relación a los efectos de eliminar el cilio primario en las células progenitoras del SNE.

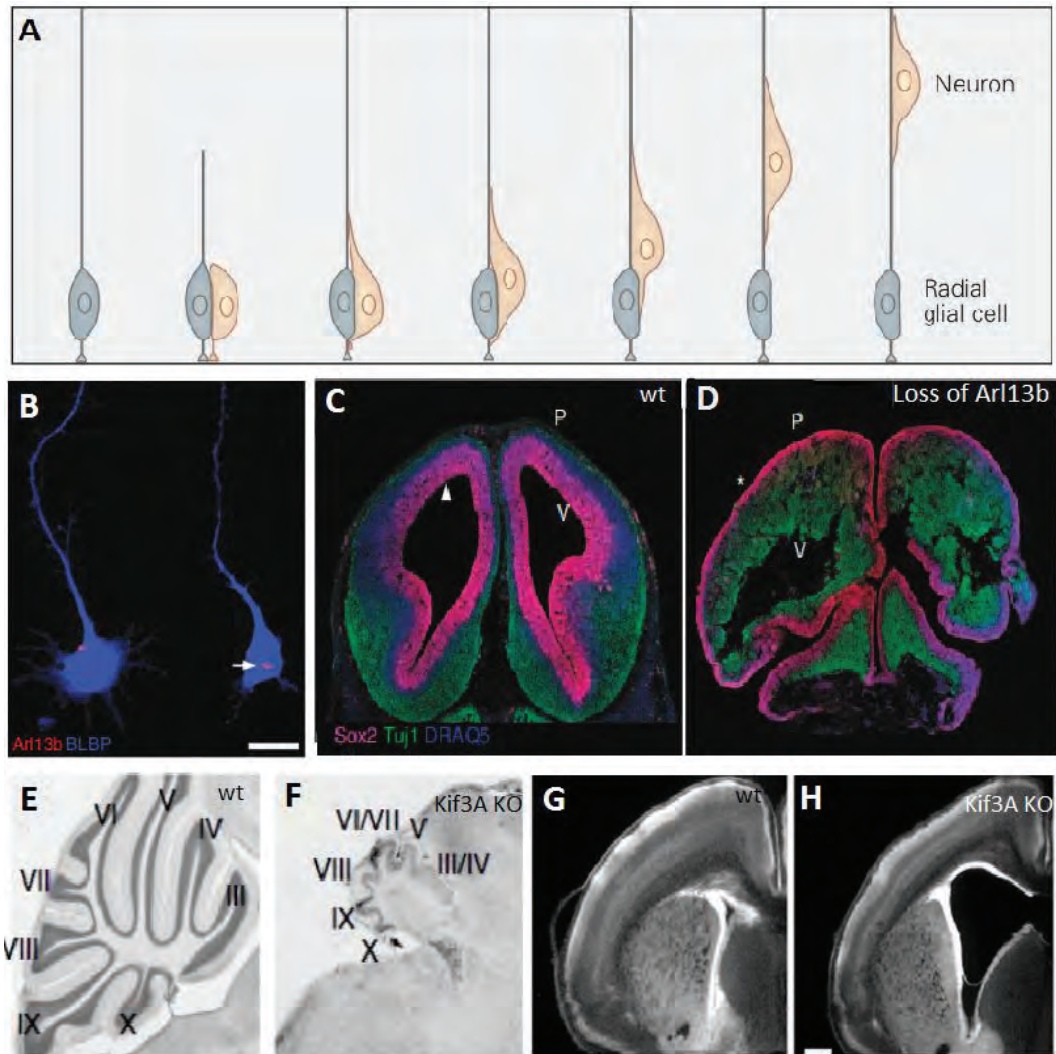


Figura 2.5. Desarrollo del SNC y cilio primario. A) Las células de la Glía Radial generan neuronas durante el desarrollo embrionario del cerebro y forman una guía para la correcta migración de las mismas. Extraído de Kandel et al. 2013. B) Las células de la glía radial expresan cilio primario (Arl13b, en rojo). BLBP (Brain Lipid Binding Protein) es un marcador de glía radial. C) De manera fisiológica, el soma de las células de la glía radial (marcado con Sox2: SRY-Box Transcription Factor 2) se encuentra cerca de la superficie ventricular (V) mientras que emiten prolongaciones hacia la superficie pial (P). D) Cuando se produce un mal funcionamiento del cilio primario, la polaridad de las células de la glía radial y la migración de las neuronas se altera. Modificado de Higginbotham et al. 2013. E-F) Por otro lado, la alteración del transporte intraflagelar (mediante el silenciamiento de Kif3A) produce una alteración en el desarrollo del cerebelo. Extraído Spassky et al. 2008. G-H) Las células ependimarias que cubren los ventrículos laterales también dependen del cilio primario para su correcto desarrollo y la alteración del funcionamiento de este produce hidrocefalia en los animales con Kif3A silenciado. Extraído de Foerster et al. 2017.

2.3. CILIO PRIMARIO EN LA NEUROGÉNESIS ADULTA

En los años 60, el dogma de que ninguna nueva neurona se producía en los mamíferos adultos fue descartado al identificar nuevas neuronas en el cerebro del ratón (Altman and Das, 1965). Posteriormente se observó que esta formación de nuevas neuronas también se producía en humanos (Eriksson et al., 1998). Aunque la existencia de neurogénesis adulta en el cerebro humano ha despertado cierta controversia recientemente (Boldrini et al., 2018; Sorrells et al.,

2018), parece que los resultados que niegan la identificación de neuronas generadas en la edad adulta puedan estar relacionadas con la manipulación de las muestras y los protocolos de fijación de las mismas, y los conocimientos actuales apoyan la existencia de neurogénesis adulta en el SNC humano (Kempermann et al., 2018).

Clásicamente se han identificado dos nichos en los que se producen nuevas neuronas en el cerebro adulto: la zona subgranular (ZSG) del giro dentado, una parte del hipocampo; y la zona subventricular (ZSV), en la parte inferior de los ventrículos laterales (Pino et al., 2017). Sin embargo, con el desarrollo de nuevas investigaciones, se han encontrado células madre neurales en muchos otros sitios del SNC como el hipotálamo, el cerebelo, el núcleo estriado o el córtex (Pino et al., 2017). A continuación, describiremos sucintamente los dos nichos neurogénicos adultos principales y las implicaciones del cilio primario en los mismos.

a) Cilio primario en la neurogénesis adulta de la zona subventricular.

Uno de los dos nichos clásicos donde se produce neurogénesis adulta en el SNC es la ZSV que envuelve a los ventrículos laterales y donde se forman neuroblastos que migran a través del tracto migratorio rostral hacia los bulbos olfatorios, donde estas células madre neuronales originan interneuronas maduras (**Fig. 2.6A**) (Zhao et al., 2008; Lim and Alvarez-Buylla, 2014; Lim and Alvarez-Buylla, 2016). Se ha descrito que cada zona de la ZSV origina subtipos específicos de interneuronas en los bulbos olfatorios (Lim and Alvarez-Buylla, 2014; Lim and Alvarez-Buylla, 2016). La citoarquitectura del nicho neurogénico de la ZSV se ha descrito con gran precisión, habiéndose identificado diferentes subpoblaciones celulares que cumplen funciones específicas y expresan marcadores concretos (**Fig. 2.6B**) (**Tabla 4**) (Lim and Alvarez-Buylla, 2014). Así, las células madre neurales quiescentes (denominadas células tipo B1) presentan una morfología de características astrocíticas con largas prolongaciones que contactan, por su lado apical, con la luz de los ventrículos (lado en el que emiten un cilio primario [**Fig. 2.6C**]) y, por el lado basal, con vasos sanguíneos de la zona (Lim and Alvarez-Buylla, 2014). Estas células presentan marcadores de tipo glial como GFAP, BLBP y GLAST (*Glutamate Aspartate Transporter*), que las relacionan con la estirpe astrocitaria y con las células de la Glía Radial. Además, se ha observado que expresan Prominina-1 (marcador de células madre) localizado en el cilio (Khatri et al., 2013). Cuando estas células madre quiescentes se activan (células B1a) expresan Nestina y originan unas células intermediarias amplificadoras con gran capacidad de proliferación (células C) que, finalmente, dan lugar a neuroblastos o células A que expresan marcadores como DCX (Doblecortina) o PSA-NCAM (*Polysialylated Neural-Cell-Adhesion Molecule*) (Lim and Alvarez-Buylla, 2014). Las células A forman un tracto envuelto por astrocitos por donde migran hasta el bulbo olfatorio. Todos estos tipos celulares están interconectados y regulados entre ellos y con otras estructuras del nicho neurogénico subventricular como vasos sanguíneos, el líquido cefalorraquídeo, las células endoteliales, la glía y las neuronas maduras del entorno (Lim and Alvarez-Buylla, 2014; Lim and Alvarez-Buylla, 2016). Se debe tener en cuenta que las células endoteliales y las células B1 proceden de una célula progenitora común (Ortiz-Álvarez et al., 2019).

La neurogénesis de la ZSV está estrechamente regulada por moléculas como neurotransmisores (por ejemplo, serotonina, acetilcolina, dopamina o GABA) y vías de

señalización como Wnt, Hh o Notch (Lim and Alvarez-Buylla, 2014). Especialmente interesante es el caso de la vía Hh: el ligando Shh se encuentra fundamentalmente en el líquido cefalorraquídeo donde también protruye el cilio primario de las células madre B1 (Lim and Alvarez-Buylla, 2014). En concreto, se ha observado la activación de la vía de señalización de Hh en el área ventral de la ZSV y la inhibición de esta vía produce una reducción de subpoblaciones específicas de neuronas del bulbo olfatorio, que derivan de esta región (Ihrie et al., 2011). En consonancia, la ablación del cilio primario en la ZSV, se tradujo en una reducción focalizada en la zona anteroventral y de las neuronas procedentes de esta zona (Tong et al., 2014). Además, se ha observado que en el cuerpo basal de las células madre de la ZSV aparece FGFR (Receptor del Factor de Crecimiento de Fibroblastos), cuya activación se relaciona con un incremento en la proliferación de las células C y un aumento en la capacidad migratoria de los neuroblastos (García-Gonzalez et al., 2016). Por otra parte, las neuronas inmaduras del bulbo olfatorio también presentan cilio primario y el correcto funcionamiento de la Adenilato Ciclasa III (una enzima localizada específicamente en el axonema ciliar) es fundamental para su correcta maduración y supervivencia, independientemente de la proliferación de las células madre de la ZSV (Luo et al., 2015).

Es importante tener en cuenta que la mayoría de estos estudios han sido realizados en mamíferos no humanos (fundamentalmente roedores). En lo referente al cerebro humano, la cantidad de células madre neuronales en esta región es muy inferior y únicamente se ha observado un verdadero tracto migratorio en niños, donde estas células madre migran hasta el lóbulo frontal (Bergmann et al., 2015; Lim and Alvarez-buylla, 2016).

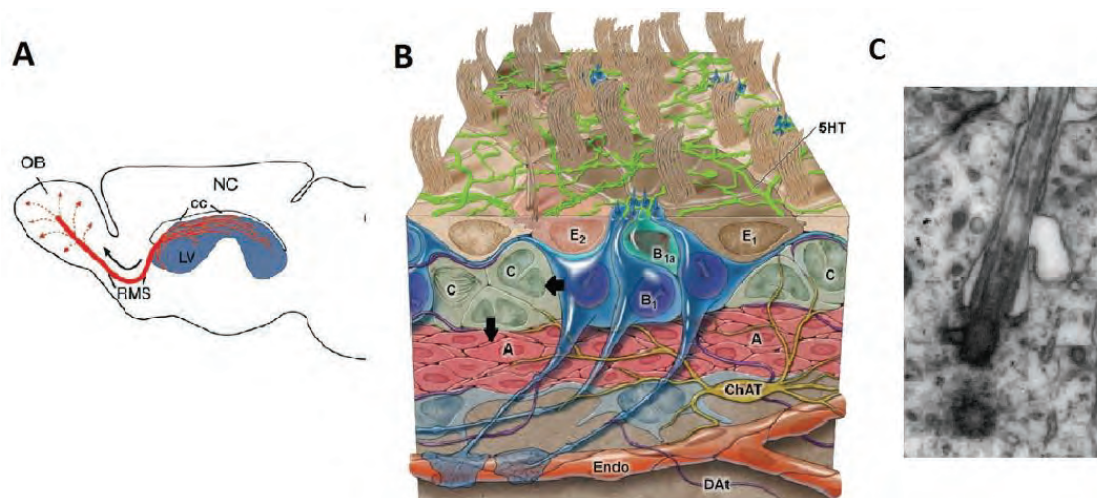


Figura 2.6. Neurogénesis en la ZSV. A) Modelo de neurogénesis adulta en la ZSV. Las nuevas neuronas migran en forma de neuroblastos por el tracto migratorio rostral (RMS, por sus siglas en inglés) hasta el bulbo olfatorio (OB). Extraído de Alvarez-Buylla and García-Verdugo 2002. B) Esquema de la disposición de los diferentes tipos celulares que forman la zona subventricular. Las células B dan lugar a las precursoras amplificadoras, tipo C, que forman los neuroblastos, células A, que darán lugar a las nuevas neuronas. Modificado de Lim and Alvarez-buylla 2014. C) Cilio primario de una célula B1. Extraído de Mirzadeh et al. 2008. CC = cuerpo calloso, LV = ventrículo lateral, NC = neocortex, CB = cerebelo, 5HT = fibras serotoninérgicas, DAT = fibras dopaminérgicas, ChAT = neuronas colinérgicas, Endo= endotelio.

Tabla 4. Marcadores de los subtipos de células precursoras de neuronas de la ZSV.
 Datos extraídos a partir de Khatri et al. 2013 y Lim and Alvarez-buylla 2014.

Células B	Células C	Células A
GFAP	Ascl1	PSA-NCAM
GLAST	Dlx2	Dlx2
BLBP	Gsx2	DCX
PRX		Tuj1
Sox2		
Prominin-1		
Nestina (en B activadas)		

GFAP = Glial Fibrillar Acid Protein (*Proteína Ácida Glio-Fibrilar*), *GLAST* = Glutamate Aspartate Transporter (*Transportador de Glutamato y Aspartato*), *BLBP* = Brain Lipid-Binding Protein (*Proteína de unión a lípidos cerebral*), *PRX* = *Periaxin*, *Ascl1* = Achaete-Scute homolog1, *Dlx2* = Distal-Less Homeobox 2, *Gsx2* = Genetic-Screened Homeobox 2, *PSA-NCAM* = Polysialylated Neural-Cell-Adhesion Molecule (*Molécula Polisializada de Adhesión a Células Neuronales*), *DCX* = Doublecortin (*Doblecortina*), *TuJ1* = Clase III de β -tubulina específica de neuronas.

b) Cilio primario en la neurogénesis adulta de la zona subgranular.

El otro nicho neurogénico clásico se encuentra en el giro dentado del hipocampo (Zhao et al., 2008; Toda and Gage, 2017). El giro dentado está compuesto por tres capas: la capa molecular, con las dendritas de las células granulares y las aferencias de otras partes del SNC, la capa granular, compuesta por los somas de las células granulares y la capa polimorfa o hilio, compuesta por los axones que forman las eferencias del giro dentado (**Fig. 2.7A**) (Amaral et al., 2007). Las células madre neuronales se encuentra justo bajo los somas de las células granulares, formando la ZSG y generan, durante la etapa adulta, nuevas neuronas granulares. La neurogénesis de esta zona se ha relacionado con las funciones propias del hipocampo: la memoria espacial (en la zona dorsal de ratones y posterior en humanos) y el comportamiento afectivo (en la zona ventral o anterior) (Christian et al., 2014; Toda and Gage, 2017). En concreto, estas nuevas neuronas serían fundamentales para la diferenciación de patrones (frente a las células preexistentes, que agruparían patrones) (Nakashiba et al., 2012). Del mismo modo, se ha relacionado la neurogénesis adulta con diferentes enfermedades neuropsiquiátricas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, la epilepsia, el síndrome del X frágil o los trastornos ansioso-depresivos (Zhao et al., 2008; Christian et al., 2014).

Al igual que ocurría en la ZSV, el proceso de neurogénesis presenta diferentes subtipos celulares, caracterizados por la expresión de diferentes proteínas (Encinas et al., 2011) (**Fig. 2.7B**) (**Tabla 5**). Así, existen unas células madre quiescentes (llamadas Radial Glia-Like o RGL o también células tipo 1) que presentan una importante prolongación vertical que asciende por la capa granular hasta la parte más interna de la capa molecular donde contacta con diferentes elementos del giro dentado (Moss et al., 2016). Estas células expresan marcadores muy relacionados con las células madre neuronales como Nestina, Vimentina, Sox2, BLBP y también el marcador glial GFAP. Estas células se dividen de forma asimétrica para originar células progenitoras amplificadoras (o tipo 2) que mantienen la expresión de Sox2 y BLBP y, en menor medida, de Nestina. A partir de ellas se originan neuroblastos (referidos en algunos artículos como células D o tipo 3) que expresan DCX, PSA-NCAM, NeuroD, Tuj1, Prox-1 y, en estadios

más avanzados, NeuN (*Neuronal Nuclear Antigen*). Posteriormente se forman neuronas inmaduras (con marcadores similares) y, finalmente, neuronas granulares maduras, que pierden la expresión de marcadores de inmadurez como DCX y PSA-NCAM y obtienen otros asociados a una diferenciación completa (como Calbindina) (Seri et al., 2004; Encinas et al., 2011) (Tabla 5).

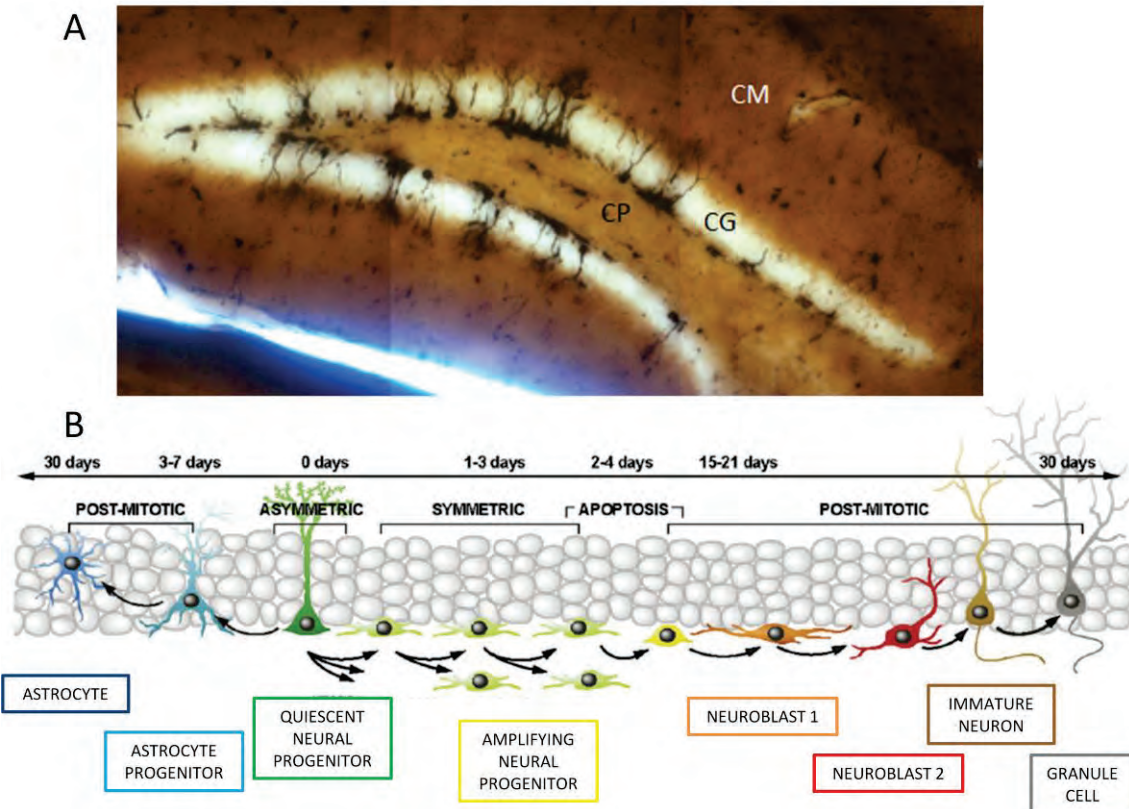


Figura 2.7. Neurogénesis del giro dentado. A) El giro dentado está compuesto por la capa molecular (CM), la capa granular (CG) y la capa polimorfa o hilio (CP). Entre estas dos últimas capas se encuentran las células madre neuronales (en negro). Imagen propia obtenida en el laboratorio del Dr. Nicolas Toni. B) La neurogénesis de la ZSG también consta de diferentes etapas compuestas por diferentes subpoblaciones hasta originar las neuronas maduras. Extraído de Encinas et al. 2011.

Tabla 5. Marcadores de las diferentes fases celulares de la neurogénesis de la ZSG.
 Extraído a partir de Seri et al. 2004 y Encinas et al. 2011.

Similar a Glía Radial	Progenitora amplificadora	Neuroblasto	Neurona inmadura	Neurona madura
GFAP	Sox2	PSA-NCAM	PSA-NCAM	Tuj1
Vimentin	BLBP	NeuD	NeuD	Prox-1
BLBP	Nestina +/-	DCX	DCX	NeuN
PRX		Tuj1	Tuj1	Calbindin
Sox2		Prox1	Prox1	
Nestina		NeuN (Neuroblasto 2)	NeuN	

Igualmente, la producción de nuevas neuronas en el giro dentado, depende estrechamente de gran diversidad de señales moleculares y elementos con los que están en contacto las células madre neuronales como los vasos sanguíneos, la matriz extracelular, la glía o las neuronas maduras (Moss et al., 2016; Bonafina et al., 2020).

En este sentido juega un importante papel el cilio primario. Así, existen diferentes trabajos que investigan el papel de esta estructura en la neurogénesis adulta del giro dentado. De este modo, tanto las células madre RGL como las células granulares maduras nacidas durante la etapa adulta presentan esta estructura. En estas últimas, el cilio primario parece jugar un importante papel en su integración sináptica a través de la regulación de la ramificación de las dendríticas mediada por la vía Wnt (Kumamoto et al., 2012). En lo referente a las células madre neurales de la ZSG, ratones transgénicos que carecen de Kif3A en las células que expresan GFAP, muestran un menor número de células RGL y una menor capacidad de neurogénesis durante la etapa adulta (Han et al., 2008) (**Fig. 2.8**). En el mismo trabajo muestran que estas alteraciones están en probable relación con alteraciones en la señalización Hh, ya que ratones con afectación en esta vía muestran un fenotipo similar (Han et al., 2008). Resultados similares se observaron utilizando otro modelo murino con ciliogénesis defectiva (Breunig et al., 2008). Se debe tener en cuenta que en estos trabajos provocan la alteración de la ciliogénesis desde la etapa embrionaria. En otro artículo, se logra un modelo transgénico en el que la alteración de la ciliogénesis se induce una vez que los ratones han nacido. Así, se observó que el cilio primario no es necesario para el mantenimiento y división simétrica de las células madre RGL pero sí para la proliferación de las células amplificadoras, sin que quede claro si se produce una menor división asimétrica de las células RGL o un menor potencial proliferativo de las propias células amplificadoras (Amador-Arjona et al., 2011). Esta alteración en la neurogénesis se reflejó en alteraciones a nivel conductual de estos ratones transgénicos (Amador-Arjona et al., 2011). Por otra parte, se ha visto que el estrés agudo produce un incremento de la proliferación de células madre neuronales en el giro dentado, así como de neuronas inmaduras ciliadas (Lee and Ko, 2018).

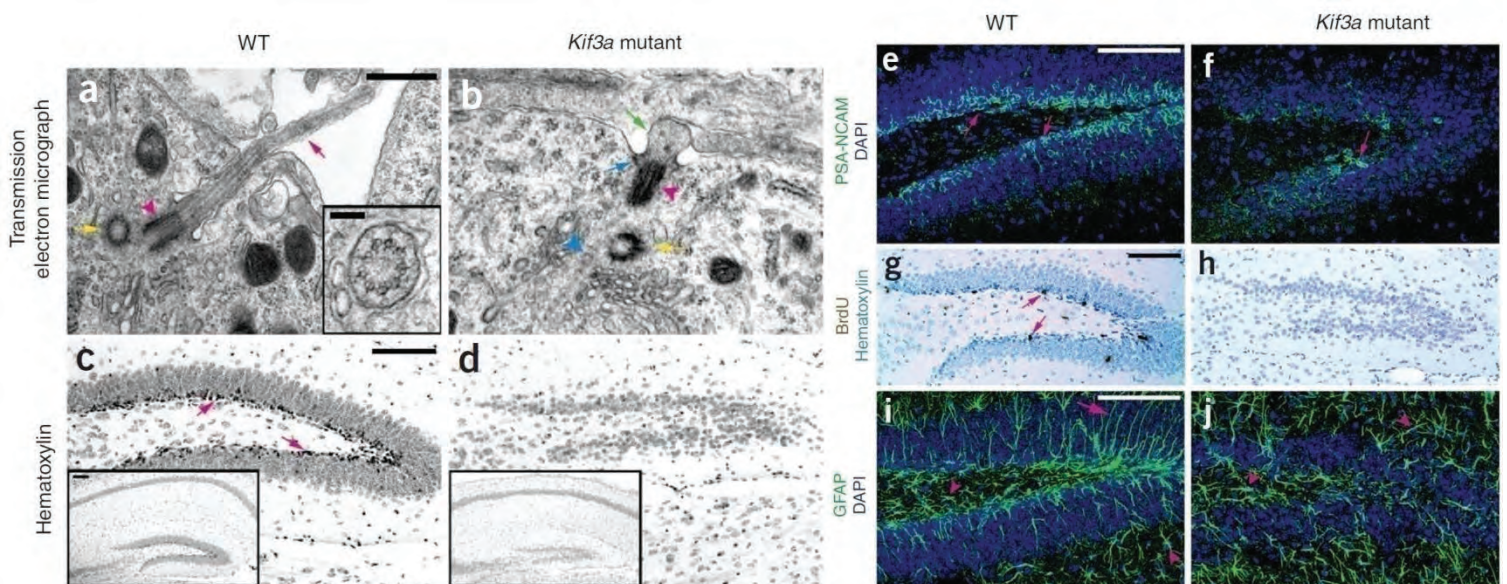


Figura 2.8. Cilio primario y neurogénesis de la ZSG. La ablación del cilio primario (a-b) en las células madre neurales provoca una alteración en el desarrollo del giro dentado (c-d), un menor número de células madre progenitoras (e-f e i-j) y una menor capacidad proliferativa (g-h). Extraído de Han et al. 2008.

En definitiva, el cilio primario es una característica común en las células madre de los nichos neurogénicos adultos. Su presencia se ha relacionado fundamentalmente con las células madre quiescentes, aunque su papel en la correcta maduración e integración de las nuevas neuronas también ha sido puesto de manifiesto. Más aún, se ha visto que (fundamentalmente a través de su capacidad de mediar la señalización celular) juega un importante papel en la activación, proliferación y migración de las células madre neuronales adultas.

3. CILIO PRIMARIO Y CÁNCER

Una parte importante del trabajo realizado durante esta tesis ha supuesto identificar y profundizar en las implicaciones del cilio primario en distintos tipos tumorales, tanto de estirpe epitelial (cáncer de vejiga), como mesenquimal (tumores del estroma gastrointestinal –GIST– o tumor de células gigantes del hueso). En las células tumorales se produce una serie de alteraciones que dan lugar a una proliferación descontrolada y a una tendencia a la invasión de otros tejidos (metástasis). Estas alteraciones suponen las llamadas “señas de identidad” (*hallmarks* en inglés) del cáncer (**Fig. 3.1**) (Hanahan and Weinberg, 2011).

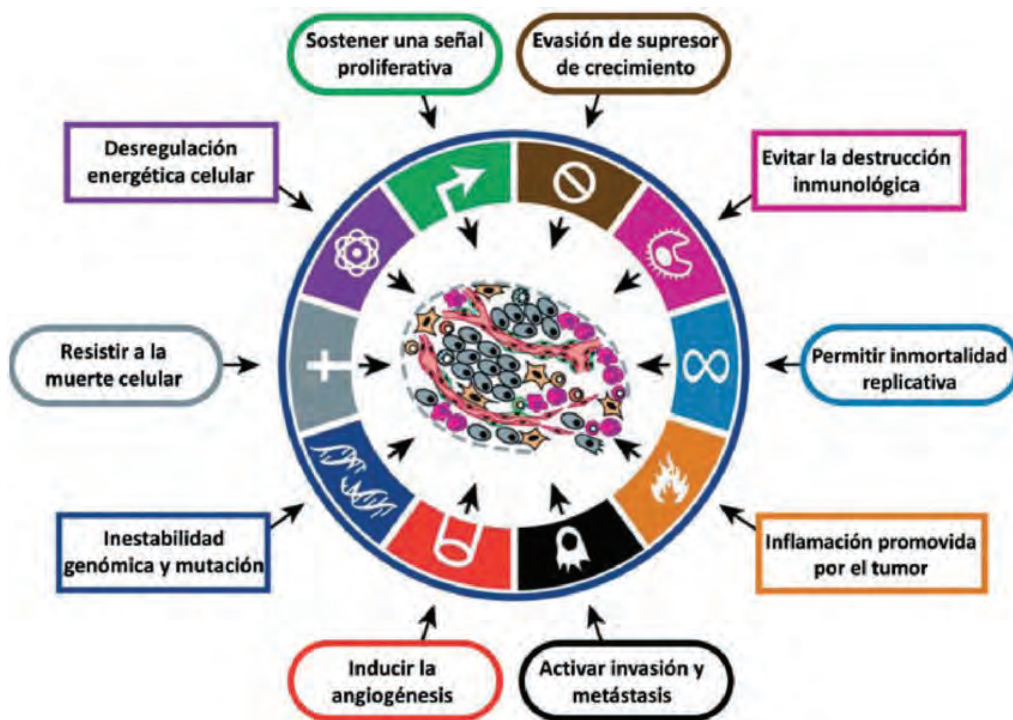


Fig. 3.1. Señas de identidad (hallmarks) del cáncer. En el desarrollo y mantenimiento de las células tumorales juega un papel fundamental una serie de procesos que se encuentran alterados respecto a las células fisiológicas. En el esquema se observan los elementos principales. Extraído de Hanahan and Weinberg 2011.

Muchos de estos procesos, fundamentales para el desarrollo y progresión del cáncer, están estrechamente relacionados con las funciones celulares con las que se ha vinculado al cilio primario (como el ciclo celular, la migración o la regulación de diferentes vías de señalización). Por ello, el papel del cilio primario en la formación de tumores ha despertado el interés de

diversos grupos y, aunque aún se desconocen elementos fundamentales de la implicación de esta estructura en el cáncer, se han comenzado a dilucidar algunas relaciones. A continuación, realizaremos una revisión del papel del cilio primario en diferentes aspectos del proceso de carcinogénesis.

3.1. RASGOS GENERALES DEL PAPEL DEL CILIO PRIMARIO EN EL CÁNCER

a) Aumento de la proliferación. Ciclo celular.

Una de las características fundamentales de las células tumorales es su capacidad de mantenerse en continua proliferación, de manera que se alteran los puntos de control que frenan la progresión del ciclo celular y mantienen la quiescencia celular. Como hemos descrito previamente, el cilio primario posee un papel fundamental en esta regulación del ciclo celular, ya que el cuerpo basal supone un centriolo modificado, necesario para formar el huso mitótico durante la mitosis (Izawa et al., 2015).

De esta manera, el desensamblaje del cilio primario y la liberación del centriolo serían necesarios para mantener una proliferación constante en las células tumorales. Así, proteínas que median este desensamblaje, previo a la fase M del ciclo, (como Aurora A, Trichopleína o Nde1) han sido estrechamente relacionadas con diferentes formas de cáncer y su inhibición frena la progresión del ciclo celular, manteniendo a las células en un estado quiescente y disminuyendo su potencial de proliferación (Seeger-Nukpezah et al., 2013; Izawa et al., 2015). Por ello, han sido propuestas como posibles dianas terapéuticas. Este efecto inhibitor del ciclo celular requiere una correcta formación del cilio primario, ya que al inhibir proteínas necesarias para la ciliogénesis, el freno de la proliferación logrado al bloquear estas proteínas se revierte (Inoko et al., 2012). De esta manera, el cilio primario se muestra como un elemento fundamental como regulador del ciclo celular en el desarrollo tumoral.

b) Vías de señalización cilio-dependientes y cáncer.

Muchas de las vías de señalización reguladas por el cilio primario han sido vinculadas a la formación, progresión y extensión tumoral, de manera que se han propuesto como posibles dianas antitumorales y se han comenzado a utilizar en la clínica diaria (Amakye et al., 2013; Liu et al., 2018).

Vía Hedgehog

En concreto, la vía Hh ha sido estrechamente relacionada con el cáncer (Amakye et al., 2013), hasta el punto de que se ha afirmado que hasta en el 25% de las muertes producidas por tumores, aparecía una sobreexpresión de esta vía (Chahal et al., 2018). Este incremento de Hh puede producirse a través de diferentes mecanismos. De esta manera, se pueden producir mutaciones en algún componente de la vía (activación ligando-independiente) o un exceso de señalización ligando-dependiente. Respecto a este último proceso, se han descrito diferentes formas, como la propia producción de los ligandos Hh por la célula tumoral, activando la vía de una forma autocrina; la producción de ligandos Hh por la célula tumoral afectando a las células no tumorales del microambiente tumoral; o, inversamente, la producción del ligando por

células del microambiente tumoral que estimulan la vía en las células cancerígenas (Amakye et al., 2013; C. Cochrane et al., 2015) (Fig. 3.2).

Esta sobreactivación de la vía Hh genera la activación de diferentes genes implicados en el desarrollo del cáncer como la proliferación celular (MYC, CCND1), la supervivencia celular (BCL-2), la migración y metástasis (TWIST, ZEB1, ZEB2 y Snail) o la angiogénesis (*Angiopoietin*) (Katoh and Katoh, 2009; Liu et al., 2018).

Especialmente interesante es el papel de la vía Hh en el mantenimiento de las células madre tumorales (Cochrane et al., 2015). Así, se ha observado la activación de esta vía en estas células madre, donde potencia la expresión de genes íntimamente relacionados con el control de las capacidades de autorenovación y mantenimiento características de estas células como Nanog, OCT4 (*Octamer-binding Transcription Factor4*), Nestina, Sox2 o Prominina-1. Como veremos en la siguiente sección, estas células son fundamentales para el desarrollo, mantenimiento e invasión tumorales. Diferentes estudios (mayoritariamente *in vitro*) han tratado de actuar sobre estas células mediante el uso de inhibidores de la vía Hh con resultados preliminares prometedores (Cochrane et al., 2015).

El cilio primario juega un papel fundamental en la regulación de la vía Hh en cáncer, tanto cuando la activación de esta vía se produce de manera ligando-dependiente como independiente. Así, se ha observado que el cilio primario es capaz de aumentar o inhibir la tumorogénesis inducida por mutaciones en componentes de la vía Hh en función de la naturaleza de la señal oncogénica (Han et al. 2009; Wong et al. 2009).

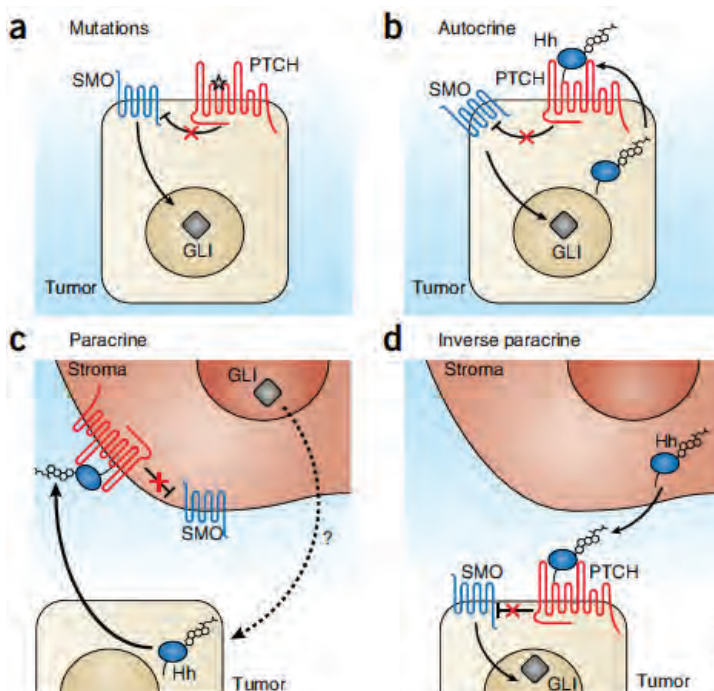


Fig. 3.2. Diferentes mecanismos de sobreactivación de la vía Hh en el cáncer. La activación de la vía se ha implicado estrechamente con procesos oncológicos. Esta activación puede deberse a mutaciones en los componentes de la vía (a), a la producción del ligando por la propia célula tumoral generando su propia activación de forma autocrina (b), produciendo el ligando la célula tumoral y modificando el microambiente para favorecer la progresión (c) o siendo este microambiente estromal el que produce el ligando, activando a las células tumorales (d). Extraído de Amakye et al., 2013.

Otras vías

La vía de Wnt se ha estudiado estrechamente con muchos de los componentes fundamentales de las células tumorales (Zhan et al., 2017). De esta manera, mutaciones en proteínas de esta vía se han relacionado con diferentes tipos de cáncer. Quizá el ejemplo más estudiado sea el de la proteína APC, cuyas mutaciones están vinculadas con el desarrollo del cáncer de colon. Además, la vía de Wnt también juega un papel fundamental en el mantenimiento de los telómeros de las células madre tumorales (por la activación de la expresión de la telomerasa por β -catenina), la transición epitelio-mesenquimal o la regulación de la respuesta inmune (Zhan et al., 2017). Por otra parte, la activación de la vía no-canónica de Wnt induce la actividad de Aurora K favoreciendo el desensamblaje ciliar y la progresión del ciclo celular (Fabbri et al., 2019).

Otra vía que ha sido estudiada en detalle en tumores, es la vía de mTOR (Tewari et al., 2019). Esta vía regula procesos fundamentales en el desarrollo tumoral, como el crecimiento, la proliferación, la supervivencia y el metabolismo celular. Así, se ha observado una sobreactivación de esta vía en gran número de tumores malignos. De hecho, PTEN (*Phosphatase And Tensin Homolog*), un importante inhibidor de Akt y, en consecuencia, de mTOR; es un importante supresor de tumores, que aparece mutado en gran cantidad de neoplasias (hasta el punto de ser la segunda mutación oncogénica más frecuente en el genoma humano, tras p53) (Tewari et al., 2019).

La vía de Notch se ha relacionado también con el mantenimiento de las células madre tumorales, la proliferación celular, la metastatización y la angiogénesis (a través de la vía del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular –VEGF–) (Liu et al., 2018).

La vía de TGF β juega un papel ambivalente en el desarrollo tumoral. Por un lado, juega un papel fundamental en el freno del ciclo celular y, por tanto, actúa como supresor tumoral; mientras que, por otra parte, en las células tumorales de estirpe epitelial activa la transición epitelio-mesenquimal y está muy implicada en la evasión del sistema inmune por parte del tumor (Massagué and Gomis, 2006).

Otras vías como las de los receptores tirosín kinasa (como PDGFR, EGFR o FGFR) también se han relacionado estrechamente con gran variedad de tumores y regulan elementos como la proliferación, progresión e invasión tumoral. Muchas de estas vías se han utilizado como dianas terapéuticas, lográndose fármacos de aplicación clínica (Liu et al., 2018).

En la **Figura 3.3** se muestran de forma esquemática la importancia de algunas de las vías relacionadas con el cilio y el papel que juegan en la expresión de proteínas estrechamente vinculadas con los procesos tumorales.

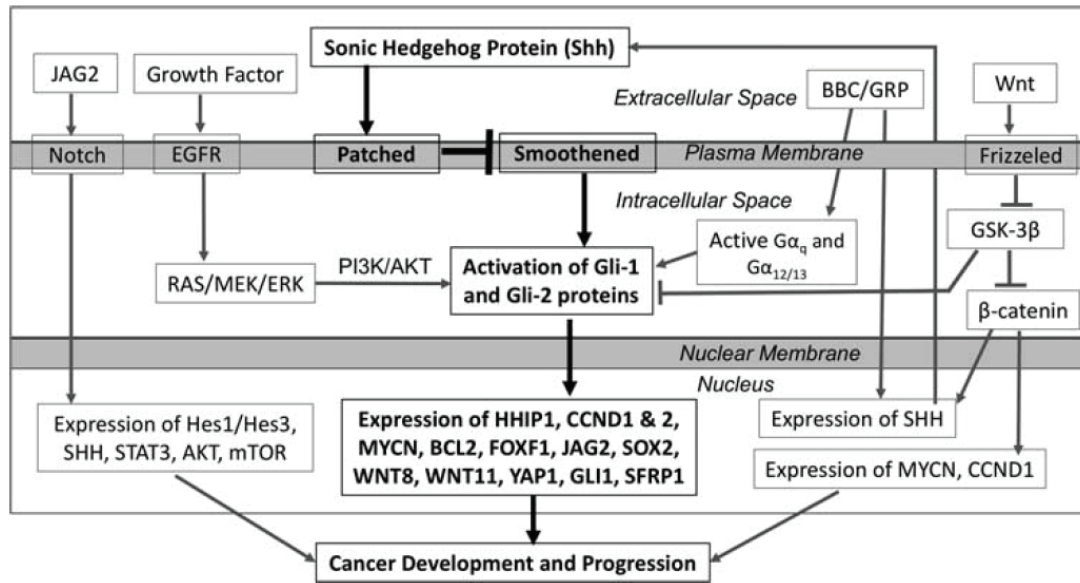


Fig. 3.3. Resumen del papel de diferentes vías de señalización dependientes del cilio primario en el desarrollo del cáncer. La gran mayoría de vías reguladas por el cilio primario han sido vinculadas con el desarrollo de neoplasias. Así, estas vías activan diferentes proteínas implicadas en diferentes procesos tumorales como la proliferación, la evasión de la apoptosis y de la respuesta inmune, la migración o la angiogénesis. Extraído de Chahal et al., 2018.

c) Cilio primario y células madre tumorales

Las células madre tumorales son una subpoblación celular dentro del tejido tumoral que se caracteriza por su capacidad de división asimétrica dando, por un lado, células con gran capacidad proliferativa que forman la mayoría del tumor y, por otro lado, nuevas células madre que quedan quiescentes, manteniéndose con un fenotipo indiferenciado y que juega un papel fundamental en la invasión a distancia y en la recidiva tumoral tras el tratamiento quimioterápico (Pattabiraman and Weinberg, 2014) (**Fig. 3.4**).

Este último hecho es consecuencia de su importante resistencia a los actuales fármacos antitumorales debido a la presencia de bombas de expulsión de fármacos en estas células y a que la mayoría de terapias actúan sobre las células en división descontrolada y no lo hacen sobre células quiescentes.

El papel del cilio primario en este tipo de células aún ha sido poco estudiado, a pesar de que existen diversos resultados que orientan a que esta estructura juega un papel fundamental en las células madre tumorales (al igual que lo hace en las células madre fisiológicas). De esta manera, existe un estudio que muestra que el bloqueo de la ciliogénesis conlleva una disminución de la capacidad de proliferar y autorrenovarse de las células madre de tumores de mama; más aún, relaciona esta implicación del cilio primario con la activación de la ruta Hh y con mecanismos de transición epitelio-mesenquimal (Guen et al., 2017).

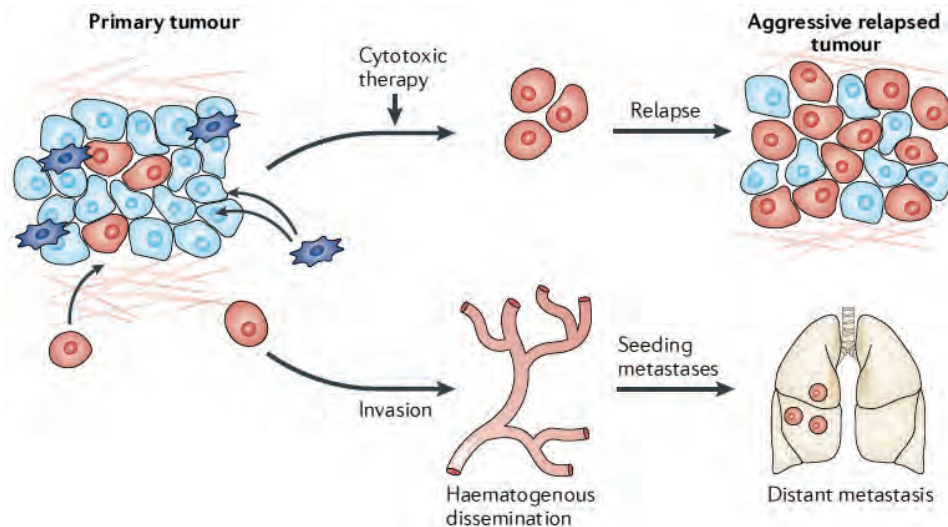


Fig. 3.4. Células madre tumorales. Las células madre tumorales son una subpoblación poco diferenciada y con capacidad de autorrenovarse y dar lugar a las células que forman el tumor. Estas células madre se muestran resistentes a la mayoría de fármacos citotóxicos habituales por la presencia de bombas de expulsión de fármacos y por su menor índice de división en relación al resto del tumor. Por ello, se han relacionado estrechamente con la recidiva tumoral post-tratamiento. Además, presentan una sorprendente capacidad de migración y diseminación, por lo que también se han vinculado con el desarrollo de metástasis y la progresión tumoral. Extraído de Pattabiraman and Weinberg 2014.

Previamente se ha descrito la importancia de la vía Hh en las células madre tumorales. Así, la activación de esta vía no sólo potencia la expresión de genes necesarios para el mantenimiento de estas células, sino que también es fundamental para el funcionamiento de la glicoproteína P, una bomba de expulsión que se ha relacionado con la resistencia de las células madre tumorales a los tratamientos habituales (Cochrane et al., 2015). Además, la inhibición de la vía Hh parece promover la diferenciación y pérdida del “stemness” de las células madre tumorales (Cochrane et al., 2015).

Por otra parte, se ha observado que Prominina-1 (también conocida como CD133 y utilizada con frecuencia como marcador de células madre tumorales) se ha relacionado con el cilio primario y con la correcta señalización Hh (Singer et al., 2018) (ver apartado de células madre y cilio primario).

No obstante, existe aún cierta controversia sobre el papel del cilio primario y de la vía Hh en algunos tipos de células madre tumorales (Fabbri et al., 2019), lo que demuestra la importancia de seguir investigando, para entender mejor, la función de esta estructura y esta ruta de señalización en este conjunto celular.

d) Migración y metástasis. Transición epitelio-mesenquimal y cilio

Una de las características principales de las células tumorales es su capacidad para migrar e invadir tanto tejidos vecinos como a larga distancia, generando metástasis que ensombrecen el pronóstico de los pacientes y dificultan la erradicación de la enfermedad.

En este sentido, un mecanismo fundamental que permite que las células epiteliales pierdan sus características y adquieran la capacidad de invadir tejidos locales y a distancia es la transición epitelio-mesénquimal (EMT, por sus siglas en inglés). La EMT es un proceso dinámico, transitorio y reversible que supone una modificación en la expresión de proteínas que determinan un fenotipo epitelial hacia uno mesénquimal.

Se han descrito tres subtipos de EMT según los procesos en los que se ve implicada (**Fig. 3.5**) (Zeisberg and Neilson, 2009). Así, el tipo 1 se da durante el desarrollo embrionario y supone la transformación del epitelio y neuroepitelio primitivos en células mesénquimales que producen la gastrulación del embrión y en células migratorias de la cresta neural, respectivamente; estas células pueden originar nuevos tejidos epiteliales (denominados epitelio secundario) por procesos inversos de transición mesénquimo-epitelial. El tipo 2, por otra parte, se produce por la transformación de células de epitelios secundarios en fibroblastos, especialmente en procesos de inflamación y fibrosis. Por último, el tipo 3 se produce en células tumorales, donde las células de carcinomas epiteliales adquieren características mesénquimales que favorecen la migración, invasión y metástasis (Zeisberg and Neilson, 2009). Además, cabe destacar que estos procesos de EMT también se han relacionado con la formación de células madre tumorales que, como hemos visto previamente, juegan un papel fundamental en la formación de metástasis (Shibue and Weinberg, 2017).

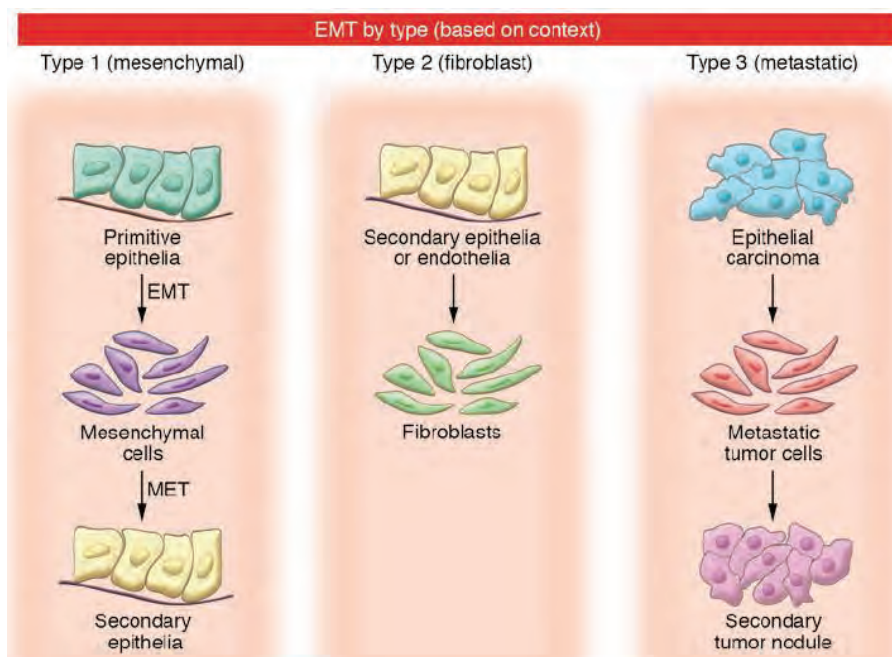


Fig. 3.5. Tipos de transición epitelio-mesénquimal. Se han descrito tres subtipos de transición epitelio-mesénquimal en función de los procesos celulares en los que está implicada. Así, el tipo 1 se produce en procesos embrionarios, donde se produce la migración del epitelio y neuroepitelio primitivos. En el tipo 2, epitelios maduros originan células mesénquimales (especialmente fibroblastos) como respuesta a señales externas, dando lugar a procesos de fibrosis reactiva. Por último, el tipo 3 se da en tumores epiteliales, de manera que las células cancerígenas adquieren propiedades que facilitan la invasión local y a distancia del tumor. Extraído de Zeisberg and Neilson 2009.

Ahora bien, ¿qué cambios se producen para modificar el fenotipo epitelial en uno mesénquimal? Ante los procesos de EMT, las células epiteliales pierden importantes

características que definen su naturaleza y su comportamiento (**Fig.3.6**). Así, se produce la pérdida de polaridad apicobasal típica de estos tejidos para originar una polaridad antero-posterior, característica de células mesenquimales y estrechamente implicada con procesos de migración celular (Zeisberg and Neilson, 2009; Lamouille et al., 2014; Prieto-García et al., 2017). Además, se produce una modificación de las proteínas de superficie que median las uniones intercelulares. De esta forma, los complejos de unión que mantienen las células epiteliales firmemente unidas unas con otras (compuestos por uniones estrechas, uniones adherentes basadas en E-cadherinas, desmosomas y uniones Gap) se desorganizan y dan lugar a la expresión de nuevas proteínas de superficie, propias de tejidos mesenquimales, como integrinas específicas, que interaccionan con la matriz extracelular, o N-cadherinas. Además, se produce una reorganización del citoesqueleto celular. Por una parte, el esqueleto de actina sufre una importante modificación, de manera que pasa de formar una densa red cortical, fundamental para mantener las uniones intercelulares epiteliales y la polaridad apicobasal, a acumularse como fibras de estrés en invadopodios que median la migración celular y la degradación de la matriz extracelular. Por otra parte, se produce también un cambio en la composición de los filamentos intermedios de proteínas de marcado rasgo epitelial (como las citoqueratinas) por otras mesenquimales (como la vimentina) (Lamouille et al., 2014). Además, aparecen cambios en la matriz extracelular, de manera que la membrana basal de los tejidos epiteliales, compuesta por colágeno IV, se desorganiza (en parte por la producción de metaloproteasas por las células) y favorece la invasión celular (Gonzalez and Medici, 2014).

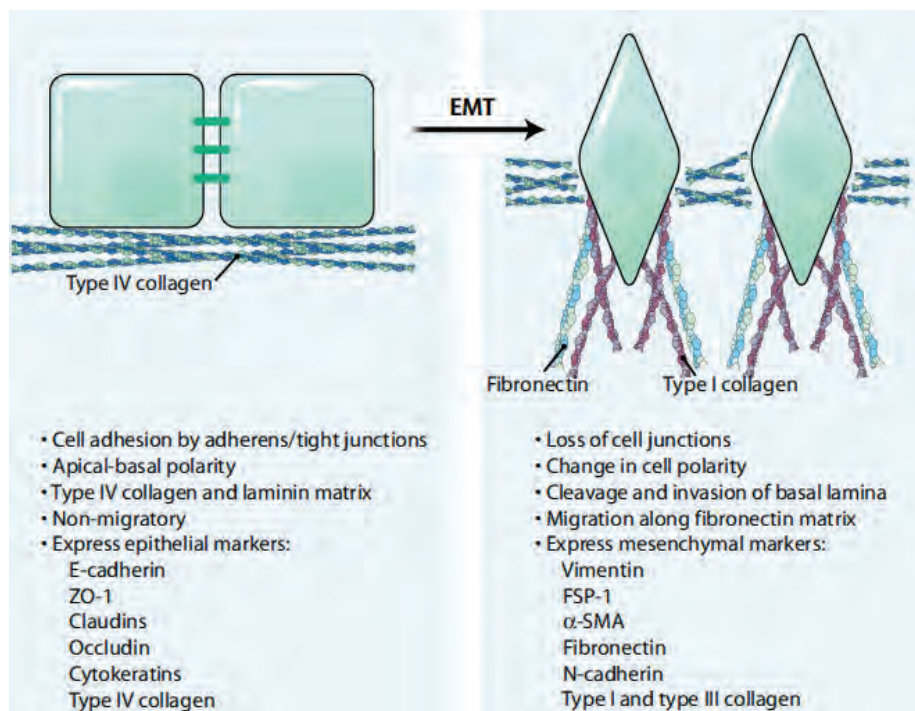


Fig. 3.6. Modificaciones fenotípicas en los procesos de transición epitelio-mesenquimal. En la EMT, se producen cambios a nivel de las proteínas de unión intercelular, de la polaridad celular (de una polaridad apicobasal a una antero-posterior, relacionada con la migración celular), de la composición de la matriz extracelular y del citoesqueleto (modificación en el patrón de actina y en la composición de los filamentos intermedios). Estos cambios suponen una disminución de la cohesión intercelular que mantiene la estabilidad tisular y un aumento del potencial de migración celular. Extraído de Gonzalez and Medici 2014.

La EMT está regulada por mecanismos moleculares que juegan un papel fundamental con el doble fin de aumentar la expresión de proteínas mesenquimales pro-migración y la represión de la transcripción de genes epiteliales. Diferentes vías de señalización como TGF β (la más estudiada y conocida en relación a este proceso), Wnt, Notch, Hh o receptores de tirosín kinasa producen la activación de factores de transcripción que regulan los procesos de EMT (Gonzalez and Medici, 2014). También señales de hipoxia mediadas por el Factor Inducido por Hipoxia α (HIF α) (ver más adelante) y de la matriz extracelular son mediadores que activan estos mecanismos. Curiosamente, la mayoría de estas vías de señalización dependen del cilio primario (como ya hemos visto previamente). Los factores de transcripción que actúan como llaves maestras de la transición epitelio-mesenquimal son Snail1 y Snail2 (también conocido como Slug), Twist, ZEB1 y ZEB2 (Gonzalez and Medici, 2014; Lamouille et al., 2014). Estas proteínas se unen a los promotores de genes que codifican proteínas como ocludina o E-cadherina para reprimir su transcripción mientras que también activan la transcripción de proteínas como metaloproteasas (fundamentales para que las células tumorales adquieran sus características pro-migración) y otras proteínas mesenquimales (Gonzalez and Medici, 2014; Lamouille et al., 2014). Además, estos reguladores de la EMT interaccionan entre ellos, regulando y activándose (por ejemplo, se ha observado que Snail1 y Twist activan la transcripción de ZEB1). Otro importante elemento de regulación de estos factores son los microRNA (miRNA). Estos son fragmentos de ARN no codificante que se unen a ARN mensajeros para inhibir su traducción a proteínas. Aunque existen diferentes miRNA implicadas en estos procesos, la familia más estudiada es aquella compuesta por miRNA200, que inhibe fundamentalmente la expresión de Snail2, ZEB1 y ZEB2 y que, a su vez, son inhibidos (mediante un proceso de feedback negativo) por estas proteínas (Lamouille et al., 2014; Caramel et al., 2018).

El cilio primario es una estructura fundamental en diferentes elementos que se ven alterados durante la transición epitelio-mesenquimal. Así, esta estructura juega un papel fundamental tanto en el mantenimiento de la polaridad apicobasal característica de células epiteliales (Tang and Marshall, 2012) como en los procesos de migración de células mesenquimales, mencionados anteriormente, donde se orienta hacia la dirección de desplazamiento celular y regula la interacción con proteínas de la matriz extracelular y los cambios en el citoesqueleto que permiten el desplazamiento celular y la polaridad antero-posterior (Veland et al., 2014). Sin embargo, pocos son los artículos que investigan directamente la relación de esta estructura celular con la EMT y con resultados aparentemente contradictorios. Así, algún artículo refiere que la pérdida del cilio primario produce la pérdida de polaridad celular y la activación de la EMT en cultivo de células renales no tumorales (Han et al., 2018) y se ha sugerido un papel de la pérdida del cilio primario en la EMT (Seeger-Nukpezah et al., 2013) (**Fig 3.7A**). Por otra parte, se ha descrito que los factores de transcripción que median la EMT (como Snail, Twist o ZEB1) estimulan la ciliogénesis y la activación de la vía Hh en un modelo *in vitro* de células mamarias fisiológicas y tumorales (Guen et al., 2017) (**Fig. 3.7B**). Más aún, en este artículo se demostró que este orgánulo es fundamental para que estos factores estimulen el mantenimiento de células madre fisiológicas y tumorales y que estas últimas sean capaces de originar tumores (Guen et al., 2017). Además, no debemos olvidar que la activación de vías que dependen del cilio activan la EMT, lo que también sugiere un papel activador del cilio primario en este proceso (Gonzalez and Medici, 2014).

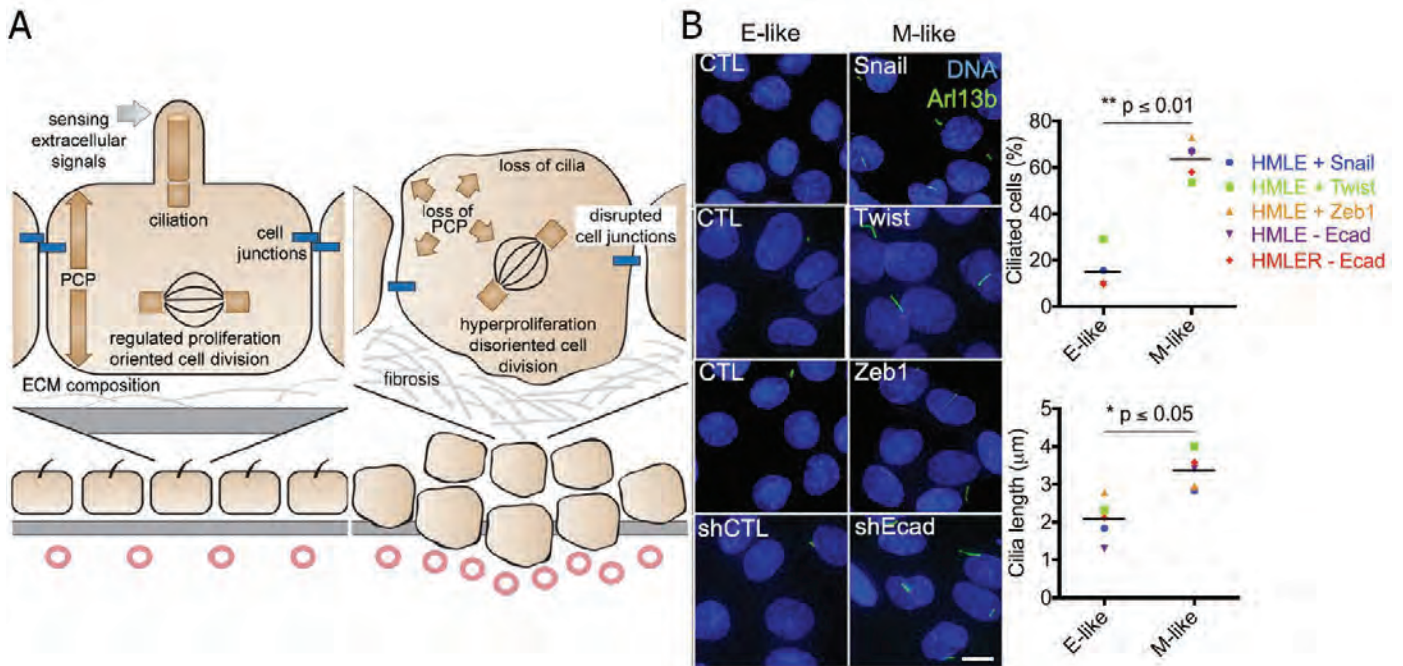


Fig. 3.7. EMT y cilio primario. A) Hipótesis de la pérdida del cilio primario como inductor de EMT. La pérdida del cilio primario, generaría una desorganización del citoesqueleto con pérdida de la polaridad apicobasal, la pérdida de las uniones intercelulares y la rotura de la membrana basal. Extraído de Seeger-Nukpezah et al. 2013. B) La EMT como inductor de la ciliogénesis. Por otra parte, Guen et al. 2017, observaron que los factores de transcripción que estimula la EMT inducen la ciliogénesis y la vía Hh y que estos son necesarios para el mantenimiento del "stemness" de células madre fisiológicas y tumorales (HMLE supone un modelo celular de células mamarias, mientras que HMLER es un modelo celular de cáncer de mama); así como del potencial de estas de generar tumores. E-like: fenotipo epitelial, M-like: fenotipo mesenquimal. Extraído de Guen et al. 2017.

f) Cilio primario en la relación tumor-microambiente. Angiogénesis.

En el inicio, progresión, invasión y resistencia a fármacos de las células cancerígenas juega un papel fundamental el microambiente tumoral, compuesto por diferentes tipos celulares y por la matriz extracelular (Hanahan and Coussens, 2012; Wu and Dai, 2017). Entre estas células se encuentran diferentes células del sistema inmune (tanto innato: macrófagos, *Natural Killers*, células dendríticas o neutrófilos, como adaptativo: linfocitos B y T), fibroblastos (los denominados fibroblastos asociados al cáncer o CAF, por sus siglas en inglés) y células endoteliales (Wu and Dai, 2017). Este entorno celular, que se comunica e interacciona de manera bidireccional con las células tumorales, se ha relacionado con diferentes funciones fundamentales en la biología del cáncer como, por ejemplo, la estimulación de la proliferación, la evasión de la apoptosis, el mantenimiento de células madre tumorales o la síntesis de una matriz extracelular especial que dificulta la difusión de fármacos antitumorales (Hanahan and Coussens, 2012). También es fundamental su implicación en la migración y metastatización tumoral a partir de la producción de metaloproteasas que destruyen la matriz extracelular o la síntesis de factores que inducen la transición epitelio-mesenquimal. Además, este entorno tumoral juega también un importante papel en la tolerancia inmunológica del tumor, que produce que estas células sean capaces de esquivar los métodos de defensa del sistema inmune (Hanahan and Coussens, 2012).

Aunque los trabajos que estudian la presencia e influencia del cilio primario en las células que componen el microambiente tumoral son poco numerosos (y se centran, una vez más, en las vías de señalización mediadas por el cilio primario), orientan a pensar que esta estructura celular juega un importante papel en estas células y en sus funciones específicas de apoyo al desarrollo tumoral. De entre los tres tipos generales que componen el microambiente tumoral, las células inmunitarias rara vez expresan cilio primario, mientras que los CAFs y las células endoteliales lo hacen frecuentemente (**Fig. 3.8**) (Liu et al., 2018).

Así, se ha observado que la producción del ligando Shh por las células tumorales del carcinoma de páncreas inducen la activación de la vía Hh en los fibroblastos del estroma induciendo un proceso de desmoplasia (caracterizado por un aumento del tejido conectivo), relacionado con un peor pronóstico en estos tumores (Bailey et al., 2008). Por otra parte, en un modelo de cáncer de mama, se ha descrito que el efecto inductor de la proliferación tumoral y la metástasis debido a Shh es dependiente de la activación de la vía en las células estromales, mientras que las células tumorales aisladas no se modifican. Más aún, la expresión de Shh por las células tumorales y de Gli1 por las células estromales demostró ser un factor de mal pronóstico en las biopsias de pacientes con cáncer de mama (O'Toole et al., 2011). Por otro lado, se ha descrito la presencia de cilio primario y de la activación de Hh en cultivos primarios de CAFs de próstata (Wilkinson et al., 2013). Esta activación, una vez más, también se relacionó con un efecto proliferativo sobre el tejido del epitelio prostático (Wilkinson et al., 2013).

En definitiva, en los tumores en los que más se ha implicado la vía Hh (y, en consecuencia, el cilio primario) con los efectos pro-tumorales del microambiente tumoral, son aquellos en los que se ha descrito que las células tumorales expresan un menor número de cilios primarios (ver tabla más adelante). Aún son necesarios más estudios para poder concretar las consecuencias que tienen estas diferencias en la expresión del cilio primario.

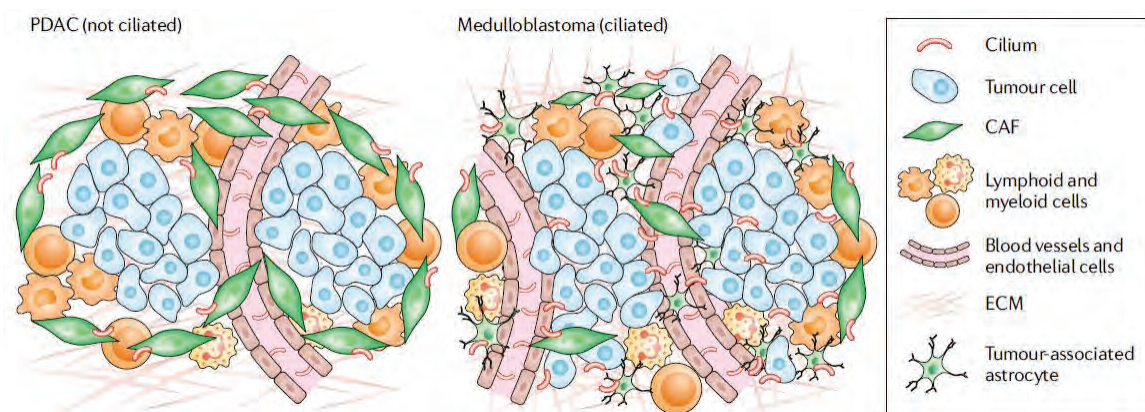


Fig 3.8. Cilio primario y el microambiente tumoral. El microambiente tumoral está compuesto fundamentalmente por tres tipos celulares: las células del sistema inmune (rara vez ciliadas), los fibroblastos asociados al cáncer (que, frecuentemente, expresan cilio primario) y las células endoteliales de la vasculatura tumoral (también frecuentemente ciliadas). El cilio primario de estas células juega un papel fundamental tanto en los tipos tumorales en los que las células cancerígenas expresan un número reducido de cilios (como el adenocarcinoma ductal de páncreas, PDAC por sus siglas en inglés), como en aquellos que expresan cilio primario (como el medulloblastoma). Extraído de Liu et al., 2018.

Por otra parte, en el desarrollo tumoral juega un papel fundamental la angiogénesis, un proceso por el que se generan nuevos vasos sanguíneos en la zona tumoral. La producción de estos nuevos vasos es fundamental para el mantenimiento tumoral, modifica el metabolismo de las células y facilita la invasión a distancia, dada la mayor permeabilidad de las paredes vasculares. En los tejidos adultos fisiológicos, las células endoteliales permanecen quiescentes; sin embargo, ante las situaciones de hipoxia que se producen en los tejidos tumorales como consecuencia de la proliferación descontrolada, se produce la inducción de la angiogénesis (Viallard and Larrivé, 2017). Así, ante situaciones de hipoxia, se inhibe la degradación de HIF α por una E3 ubiquitín ligasa llamada Von Hippel Lindau (VHL), que se localiza en el cilio primario. Esto genera la activación del VEGF que induce la proliferación de células endoteliales y la formación de nuevos vasos sanguíneos, que se generan de forma aberrante (Seeger-Nukpezah et al., 2013; Viallard and Larrivé, 2017). Además, las células endoteliales presentan cilio primario y juega un papel fundamental en la mecanosensación del flujo sanguíneo y las fuerzas de estrés y como mediador de vías de señalización del óxido nítrico y del calcio (Egorova et al., 2012). En definitiva, estos estudios muestran la importante relación del cilio primario con procesos fundamentales para la angiogénesis, como la señalización de VEGF o el funcionamiento endotelial.

f) Metabolismo tumoral y cilio primario.

Las células tumorales modifican su metabolismo, de manera que se potencia la glucólisis aún en presencia de oxígeno (lo que se ha denominado efecto Warburg) (Hanahan and Weinberg, 2011). Este cambio permite obtener energía en situaciones de hipoxia pero lo hace de manera menos eficaz en aerobiosis. Para compensar esto, se produce un aumento de la captación de glucosa, en la que se basa la prueba diagnóstica de PET (Tomografía por Emisión de Positrones). Se ha propuesto que se produce una relación escalonada entre dos subpoblaciones de células tumorales en función de su metabolismo. Así, las células que se encuentran en hipoxia producen lactato mediante glucólisis anaerobia, mientras que ese lactato es utilizado por las células que están en presencia de oxígeno para obtener energía mediante fosforilación oxidativa en las mitocondrias (Feron, 2009).

Como hemos visto previamente, el cilio tiene una importante (aunque aún no del todo comprendida) función en la regulación del metabolismo (Song et al., 2018). En los referente al metabolismo tumoral, existen pocos trabajos pero de gran interés. Así, se ha visto que en una línea celular de cáncer de tiroides, al inhibir la ciliogénesis se produce un descenso de la fosforilación oxidativa y un aumento de la glucólisis y de la síntesis de ácidos grasos mientras que producía un descenso en la capacidad de proliferación, migración, EMT e invasión de estas células (Lee et al., 2018). Sin embargo, en otro trabajo, en dos modelos celulares no tumorales, al inhibir la ciliogénesis se produjo un descenso de la glucólisis (Jeong et al., 2018). Probablemente estos efectos estén relacionados con la activación de la vía Hh, ya que como hemos descrito previamente (ver apartado de cilio primario y metabolismo), la activación de esta vía de forma no canónica en la base del cilio primario parece inducir la glucólisis modificando el metabolismo celular (Teperino et al., 2012). En definitiva, aunque parece que el cilio primario y la vía Hh tienen un papel fundamental en el metabolismo tumoral, aún son

necesarios nuevos experimentos que diluciden la función exacta tanto en tejidos sanos como en patológicos.

g) Cilio primario y apoptosis, daño del ADN y resistencia a quimioterápicos.

Otra característica del cáncer es la resistencia de las células tumorales a los mecanismos de control que inducen la muerte celular programada o apoptosis ante situaciones como la hipoxia, la acumulación de daño del ADN o el uso de fármacos antitumorales (Hanahan and Weinberg, 2011). Aunque aún escasos, son varios los artículos que relacionan el cilio primario con la muerte celular programada, los mecanismos de respuesta al daño del ADN y la resistencia de las células tumorales a los quimioterápicos.

Así, en modelos de células renales fisiológicas tratadas con cisplatino para inducir la apoptosis, se observó una disminución de la longitud y número de cilios en aquellas células tratadas. Más aún, al inhibir la ciliogénesis se logró un mayor efecto del cisplatino y un mayor número de apoptosis celular y se objetivó una relación inversa entre la presencia y longitud ciliar y la expresión de caspasas, de manera que el cilio primario tendría un efecto protector frente a la apoptosis (Wang et al., 2013). Por otra parte, en neuronas se ha observado que la presencia del cilio tiene un papel protector frente a etopósido (un quimioterápico que induce la apoptosis), mientras que su eliminación las hace más vulnerables frente a agresiones externas, aumentando la muerte celular (Choi et al., 2019).

En líneas celulares de glioblastoma, se observó que la inhibición de PCM1, produce un aumento de la apoptosis celular, así como de la sensibilidad de células cancerígenas a temozolamida, un fármaco antitumoral que daña el DNA (Hoang-Minh et al., 2016). Este efecto parece mediado por las alteraciones de la ciliogénesis secundarias al déficit de PCM1, ya que se observaron resultados similares al inhibir la proteína Kif3A, necesaria para la formación del cilio primario (Hoang-Minh et al., 2016). Del mismo modo, en células tumorales de tiroides, la eliminación del cilio primario se ha relacionado con un incremento de la apoptosis mediada por mitocondrias (Lee et al., 2021).

Por otra parte, en modelos de células cancerígenas resistentes a quimioterápicos se observa un incremento franco de células ciliadas (Jenks et al., 2018) y un aumento en la activación de la vía Hh. Consecuentemente, la inhibición de la ciliogénesis o de esta vía, resultó en una re-sensibilización de las células a los fármacos (Jenks et al., 2018).

En definitiva, todos estos artículos orientan hacia una función protectora del cilio primario frente a quimioterápicos y apoptosis. Estos resultados podrían deberse a una selección positiva de las células ciliadas que correspondería con las células madre quiescentes, es decir, las menos sensibles a los quimioterápicos y más resistentes a los mecanismos de apoptosis. No obstante, aún son necesarios más estudios que refuercen estas hipótesis.

Por otra parte, los mecanismos de reparación ante daños del ADN se encuentran alterados en las células tumorales, donde aparece una importante inestabilidad genómica como producto de la acumulación de mutaciones que se dan como consecuencia de la hiperproliferación de

estas células. Aunque todavía son pocos los estudios, se han relacionado diferentes proteínas importantes en la ciliogénesis y ubicadas próximas al centrosoma con mecanismos de reparación de ADN (Johnson and Collis, 2016), como Cep290. Otro ejemplo interesante es el de la proteína ATR (*Ataxia Telangiectasia and RAD3-related*), que juega un importante papel en la respuesta al daño del ADN y que, además, se ha demostrado que es fundamental para la correcta señalización de Hh y PDGF mediada por el cilio primario (Stiff et al., 2016). Sin embargo, aún queda por dilucidar si estas proteínas actúan en ambos procesos de forma independiente (han sido descritas funciones “extraciliares” de otras proteínas asociadas al cilio primario) o si existe una clara relación que una al cilio primario con estos mecanismos de reparación del ADN. Por otra parte, se han descrito recientemente interesantes relaciones del cilio primario con p53, el llamado “guardián del genoma” que, ante la acumulación de daños del ADN, induce procesos para bloquear la proliferación celular e inducir la apoptosis (Vogelstein et al., 2000). Así, se ha observado que modelos de daño genómico inducen la ciliogénesis mediada por p53 (Chen et al., 2021); mientras que, otro grupo, ha descrito que la inhibición de los factores supresores de tumores p53 y RB (*Retinoblastoma associated*) provocan una inducción aberrante de la ciliogénesis y, como consecuencia, una sobreactivación de la vía Hh ligando-dependiente (Cochrane et al., 2020).

En definitiva, el cilio primario es una estructura importante en diferentes mecanismos oncogénicos y su papel en el cáncer es cada vez más patente, aunque aún quedan muchos detalles por dilucidar.

3.2. DESCRIPCIÓN DE LA PRESENCIA/AUMENTO O DISMINUCIÓN DE LOS CILIOS PRIMARIOS EN FUNCIÓN DEL TIPO ESPECÍFICO DE CÁNCER

Diferentes estudios han descrito la presencia, aumento o disminución del cilio primario en relación con tejidos sanos. En la **Tabla 6** se expone el conocimiento actual sobre la presencia o ausencia del cilio primario en diferentes tipos tumorales.

Tabla 6. Síntesis de la bibliografía actual sobre la presencia/aumento o descenso del cilio primario en función del tipo tumoral.

AUMENTADO / PRESENTE	DISMINUIDO
Glioblastoma (Sarkisian et al., 2014)	Glioblastoma cultivo (Moser et al., 2009)
Glioma y Oligodendroglioma (resultados propios)	Colangiocarcinoma (Gradilone et al., 2014)
Meningioma (Findakly et al., 2020)	Feocromocitoma (O'Toole et al., 2019)
Carcinoma basocelular (Wong et al., 2009)	Melanoma (Kim et al., 2011; Zingg et al., 2018)
Osteosarcoma (Kowal and Falk, 2015)	Condrosarcoma (De Andrea et al., 2015)
Basal de mama cultivo (Guen et al., 2017)	Luminal de mama(K. Yuan et al., 2010)
GIST (Castiella et al., 2013)	Ovario cultivo (Egeberg et al., 2012)
Carcinoma renal papila (Schraml et al., 2009)	Carcinoma de células claras renal(Basten et al., 2013; Schraml et al., 2009)
Adenocarcinoma de páncreas (Yasar et al., 2017)	Ductal de páncreas(Bailey et al., 2008)
Adenocarcinoma de pulmón(Yasar et al., 2017)	Próstata(Hassounah et al., 2013; Yasar et al., 2017)
Carcinoma papilar de tiroides (Lee et al., 2019)	Carcinoma anaplásico de tiroides (Lee et al., 2019)
Adenocarcinoma de colon(Yasar et al., 2017)	
Linfoma folicular (Yasar et al., 2017)	
Meduloblastoma (Han et al. 2009)	
Tumor de células gigantes óseo (resultados propios)	
Carcinoma urotelial de vejiga (resultados propios)	
Rabdomiosarcoma (Fu et al., 2014)	

De esta tabla se desprende que se ha descrito tanto aumento como descenso del número de cilios en diferentes tipos tumorales. De este modo, aunque algunos han perfilado que la disminución del número y función del cilio primario se produce en tumores de estirpe epitelial, también puede apreciarse un aumento en algunos de estos tipos de cáncer.

OBJETIVOS

1. OBJETIVOS GENERALES

Esta tesis ha tenido como objetivo general profundizar en la presencia del cilio primario en los procesos de proliferación y diferenciación celular humanos. Para ello nos hemos centrado en:

1. Un proceso fisiológico, en concreto, la neurogénesis entérica.
2. Un proceso patológico, en concreto, el desarrollo tumoral (tanto en tumores mesenquimales como epiteliales).

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para cumplir con los objetivos generales hemos fijados los siguientes objetivos específicos:

1. Realizar el estudio ultraestructural del SNE humano adulto mediante microscopía electrónica, centrándonos en la búsqueda del cilio primario en las diferentes poblaciones celulares y analizando sus características. Completaremos el estudio con el análisis inmunohistoquímico de marcadores de las diferentes poblaciones celulares que componen el SNE y de células inmaduras y en proliferación, con el fin de analizar la relación del cilio primario con la neurogénesis adulta del SNE, intentando establecer paralelismos con la neurogénesis adulta del SNC.
2. Explorar, también, el papel del cilio primario en la neurogénesis embrionaria del SNE, mediante su eliminación selectiva en células progenitoras neurales.
3. Relacionar la presencia del cilio primario con la expresión de la vía Hh en tumores del estroma gastrointestinal (como un ejemplo de tumor mesenquimal) con el fin de completar los estudios que muestran la presencia del cilio en estos tumores y tratando de definir sus implicaciones funcionales en este tipo de cáncer.
4. Estudiar a nivel ultraestructural los tumores de células gigantes óseos (como otro ejemplo de tumor mesenquimal) y analizar la presencia de cilio primario y la expresión de la vía Hh en los mismos.
5. Confirmar y analizar la expresión de marcadores asociados a la EMT en el carcinoma urotelial de bajo y alto grado (como ejemplo de tumor epitelial). Para ello, realizaremos técnicas inmunohistoquímicas de marcadores epiteliales (E-cadherina, Citoqueratina), mesenquimales (Vimentina, N-cadherina) y de factores de transcripción vinculados a la EMT (Twist). Más aún, intentaremos buscar una relación entre la activación de estos procesos y la expresión de la vía Hh, así como del cilio primario en el carcinoma urotelial de bajo y alto grado. Completaremos estos estudios con un análisis ultraestructural de los procesos que tienen lugar en las células tumorales durante la EMT.

RESULTADOS



Supporting Evidence of Human Enteric Nervous System Adult Neurogenesis: Presence of Primary Cilia and Adult Neurogenesis Markers

Pablo Iruzubieta^{1,2} · Irene Cantarero³ · Marta Monzón^{1,2} · Manuel Lahoz¹ · Concepción Junquera^{1,2}

Received: 8 August 2020 / Accepted: 18 November 2020
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

Abstract

Adult neurogenesis has been profusely studied in central nervous system. However, its presence in enteric nervous system remains elusive although it has been recently demonstrated in mice and intimately linked to glial cells. Moreover, primary cilium is an important organelle in central adult neurogenesis. In the present study, we analysed some parallelisms between central and enteric nervous system (ENS) in humans based on ultrastructural and immunohistochemical techniques. Thus, we described the presence of primary cilia in some subtypes of glial cells and Interstitial Cells of Cajal (ICCs) and we performed 3-D reconstructions to better characterise their features. Besides, we studied the expression of several adult neurogenesis-related proteins. Immature neuron markers were found in human ENS, supporting the existence of adult neurogenesis. However, only ICCs showed proliferation markers. Hence, we propose a new paradigm where ICCs would constitute the original neural stem cells which, through asymmetrical cell division, would generate the new-born neurons.

Keywords Enteric glia · Primary cilia · Adult neurogenesis · Interstitial cell of cajal · Transmission electron microscopy

Introduction

Enteric nervous system (ENS) primarily consists of the submucosal and the myenteric plexus located within the gastrointestinal tract (Furness 2012). ENS is composed by three cellular types: enteric neurons, enteric glia and Interstitial Cells of Cajal (ICCs) (Junquera et al. 2011; Furness 2012). Although ENS is a component of the Peripheral Nervous System (PNS) and derives from the neural crest,

ENS ultrastructural and biochemical characteristics are more similar to Central Nervous System (CNS) (Gabella 1981; Gershon 1997). Accordingly, enteric glia has astrocyte-related markers such as GFAP (Jessen, Thorpe, and Mirsky 1984). Ultrastructure of these cells is also more similar to astrocytes than to Schwann cells. Thus, enteric glia presents a great amount of gliofilaments and provides a partial sheath to the ganglion neurons (Gabella 1981). Different subpopulations of enteric glial cells have been described based on their morphology (Hanani and reichenbach 1994), their location (Gulbransen and Sharkey 2012) or their protein expression (Rao et al. 2015).

It has been found that enteric glia actively participates in gastrointestinal motility, gut epithelial barrier function and gut blood supply, just as astrocytes do in blood brain barrier. Moreover, intraganglionic glia closely interacts with neurons, supporting them, releasing gliotransmitters and reacting to neuronal signals (Coelho-Aguiar et al. 2015; Grubišić and Gulbransen 2017). Moreover, glial cells play an important role in neurodegenerative and inflammatory disorders, interacting with the microbioma and the immune system (Coelho-Aguiar et al. 2015; Grubišić and Gulbransen 2017).

On the other hand, enteric glia has been proposed as a possible neural progenitor cell, participating in gliogenesis

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10571-020-01017-8>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Pablo Iruzubieta
pablo.iruzubieta@hotmail.es

- ¹ Department of Human Anatomy and Histology, Faculty of Medicine, University of Zaragoza, Zaragoza, Spain
- ² Institute for Health Research Aragón (IIS), Domingo Miral s/n, 50009 Zaragoza, Spain
- ³ Dpto. Biología Celular, Fisiología e Inmunología. Facultad de Medicina, Instituto Maimonides de Investigación Biomédica (IMIBIC), Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain

and adult neurogenesis in physiological (Kulkarni et al. 2017) as well as injured ENS (Laranjeira et al. 2011). Although adult neurogenesis is still controversial in ENS (Joseph et al. 2011), it is well-known in CNS. It has been specifically described in the subventricular (SVZ) and the subgranular (SGZ) zones of the dentate gyrus (Altman and Das 1965). The adult neural stem cells express astroglial markers (Alvarez-Buylla and García-Verdugo 2002) and have Radial Glia-Like features (Lim and Alvarez-Buylla 2014; Moss et al. 2016). Moreover, the expression of different proteins through the neurogenesis process has been precisely defined in CNS (Encinas et al. 2011). Thus, central neural progenitors show GFAP and Nestin and give rise to neuroblasts which express Doublecortin (DCX) and neuronal markers (Encinas et al. 2011). DCX expression is finally lost in mature neurons (Encinas et al. 2011). Interestingly, primary cilium is a common feature in adult central neural stem cells (Doetsch et al. 1999; Han et al. 2008).

Primary cilium is a non-motile organelle whose axoneme is made of nine peripheral doublets of microtubules (9 + 0 structure). It acts as a sensory antenna for signals implicated in development, 'stemness' and proliferation (Satir et al. 2010; Lyu and Zhou 2017; Malicki and Johnson 2017; Nishimura et al. 2018). It has been showed that all neural stem cells in SGZ and a subpopulation in the SVZ failed in new neurons formation after primary cilia ablation (Han et al. 2008; Tong et al. 2014) giving evidence of their relevance in neurogenesis.

Here we show new evidence of the parallelism between human ENS ganglia and CNS neurogenic niche. Hence, we show expression of neurogenesis-related proteins (Encinas et al. 2011) in adult human myenteric plexus and we ultra-structurally analyse the enteric glial cells which have been pointed as potential neural progenitors. These findings support that adult neurogenesis in ENS, previously described in mice by Kulkarni et al. (2017), also occurs in humans. Moreover, based on our results, we suggest a new paradigm where ICCs are adult neural stem cells that give rise to neurons through an intermediate state as glial cells.

Materials and Methods

Materials

For this study, five human colon samples were used. They were obtained from healthy edges of surgical tissues from patients with no intestinal inflammatory pathology. Samples were provided by *Hospital Clínico Lozano Blesa* from Zaragoza. All protocols developed were approved by the Human Research Ethics Committee "*Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón*".

Methods

TEM and 3D Reconstruction

After intestine extraction, samples (about 1–1.5 mm³) were washed in phosphate buffer and fixed with 2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde overnight at room temperature, 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 Sects. (1.5 µm) were cut with a diamond blade, lightly stained with 1% toluidine blue and examined by light microscopy (Olympus BX51 microscope, Olympus Imaging Corporation, Tokyo, Japan). Later, ultrathin (0.05 µm) sections were cut with a diamond blade, collected on Formvar coated single-slot grids, counterstained with 1% uranyl acetate and Reynold's lead citrate for 10 min and examined under a FEI Tecnai G2 Spirit TEM. The images were captured with Advanced Microscopy Techniques, using a Corp. Charge-Coupled Device (CCD from Danvers, MA, USA) imaging system.

Three-dimensional reconstructions from serial electron microscopy sections were performed using FIJI Image J software (Schindelin et al. 2012).

Immunofluorescence

Formalin-fixed paraffin-embedded tissues were cut into 2-µm sections and mounted on glass slides. The sections were deparaffinised in xylene for 20 min and rehydrated in graded ethanol (4 min in 100°, 4 min in 96°, 4 min in 70° and 5 min in distilled water). Tissues were permeabilised with 0.1% Triton X-100 in PBS for 8 min. Afterwards, an antigen retrieval step using buffer citrate (pH 6, DAKO S2031), was performed for 5 min in a microwave at 800 W and 3 additional min at 360 W.

Sections were incubated overnight at 4 °C with the following primary antibodies: monoclonal mouse anti-Acetylated tubulin (1:1000, T7451, Sigma Aldrich, Saint Louis, USA) and polyclonal rabbit anti-GFAP (1:100, Z0334, DAKO, Glostrup, Denmark) in a dark humidified chamber. Sections were washed in PBS three times for 5 min and incubated with secondary antibodies Donkey anti-Mouse IgG H + L Alexa Fluor 594 (1:1000, ThermoFisher, R37115) and Donkey anti-Rabbit IgG H + L Alexa Fluor 488 (1:1000, ThermoFisher, A-21206 Massachusetts, USA) for 1 h at room temperature in a dark humidified chamber. After washing in PBS, DAPI (1 µg/mL, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) was added for

1 min for nuclei counterstaining. Sections were washed in PBS and the slides were cover slipped with DAKO Fluorescence mounting medium (DAKO, S3023).

Samples were visualized with a confocal microscope (Zeiss LSM 900) and analysed with Zeiss Lite and Image_J Softwares.

Immunohistochemistry

Immunohistochemical staining was performed on 4- μ m thick formalin-fixed paraffin-embedded sections using EnVision@ (DAKO) method. The primary antibodies used in this study were: monoclonal mouse anti-Ki67, Clone MIB-1 (1:100, M7240, DAKO; Glostrup, Denmark), polyclonal rabbit anti-KIT (1:50, A4502 DAKO; Glostrup, Denmark), polyclonal rabbit anti-ANO1 (1:100, ab53212, Abcam; Cambridge, UK), monoclonal mouse anti-CD34 (1:50, M7165, DAKO; Glostrup, Denmark), monoclonal mouse anti-Nestin (1:400, MAB5326, Sigma Aldrich, Saint Louis, USA), polyclonal rabbit anti-GFAP (1:100, Z0334, DAKO, Glostrup, Denmark), monoclonal mouse anti-NSE (1:100, M0873, DAKO; Glostrup, Denmark), polyclonal rabbit anti-Doublecortin (1 μ g/mL, ab18723, Abcam; Cambridge, UK) and monoclonal mouse anti-p75 (4 μ g/mL, ab8877, Abcam; Cambridge, UK). Antibodies were diluted with DAKO diluent (S2022).

The tissue sections were deparaffinised in xylene for 20 min and rehydrated in graded ethanol (4 min in 100°, 4 min in 96°, 4 min in 70° and 5 min in distilled water). Prior to all assays a heat-induced antigen retrieval step was performed using buffer citrate (pH 6, DAKO S2031) by treatment for 5 min in microwave at 800 W and 3 additional min at 360 W. After washing twice with PBS for 3 min, endogenous peroxidase was blocked using peroxidase blocking reagent (DAKO, S2001) for 10 min and sections were washed in distilled water and PBS 3 min, twice.

Afterwards, sections were incubated with primary antibodies at 4 °C overnight in a humidified chamber. Sections were washed in PBS three times for 5 min and incubated with Labelled Polymer EnVision-HRP (DAKO K5007) for 1 h. To confirm the presence of immunocomplexes, 3,3' diaminobenzidine as chromogen and hydrogen peroxide as substrate were used. The samples were washed twice in distilled water, contrasted with Mayer's haematoxylin for 7 min, washed in tap water for 15 min, dehydrated in a graded ethanol (2 min in 70°, 2 min in 96° and 5 min in 100°) and cleared in xylene and cover slipped with Eukitt (03,989 Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA). Digital images were captured by Olympus BX1 microscope.

Results

Ultrastructural Features of Adult Enteric Glia

Firstly, we performed ultrastructural studies to better identify and characterize enteric ganglia features, focusing on glial cells ultrastructure.

In a general view, we identified the three main cellular components of enteric ganglia: neurons, glial cells and ICCs (Fig. 1). Enteric neurons can be identified by an electron lucent voluminous nucleus with prominent nucleoli (Fig. 1a, b). They are bigger than glial cells, which are located around neurons spreading cytoplasmic prolongations that envelope neuronal axons (Fig. 1b, c). Surrounding ganglia, ICCs can be identified (Fig. 1c). They are characterized by a voluminous nucleus with scarce perinuclear cytoplasm and long processes. These processes

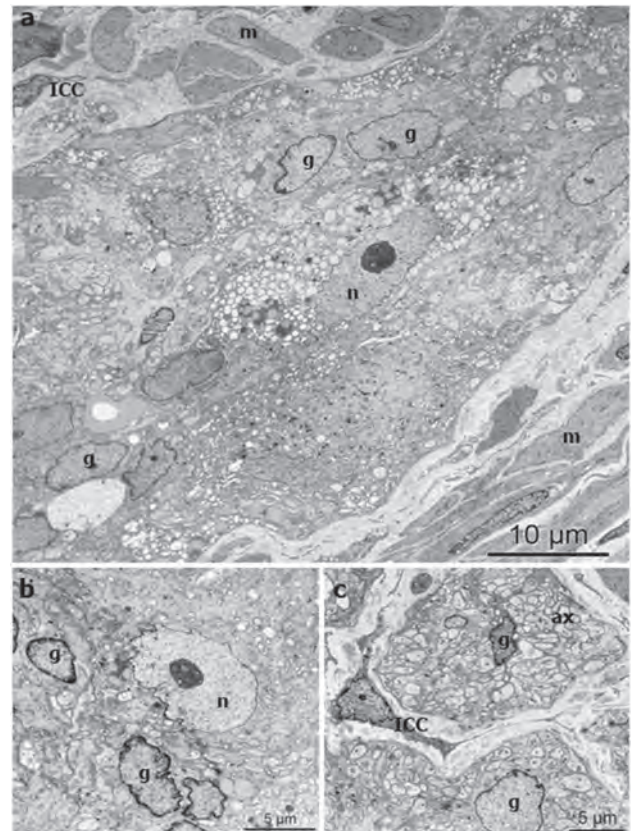


Fig. 1 Overall ultrastructure of human myenteric ganglia. **a** Overall TEM view of a myenteric ganglion. Myenteric ganglia are located between the longitudinal and circular muscular layers (m). Neurons (n) are characterized by a voluminous nucleus with prominent nucleoli. They are less numerous than glial cells (g). Interstitial Cells of Cajal (ICCs) are surrounding enteric ganglia and nervous tracts. **b** An enteric neuron in straight relation with two glial cells (g). **c** ICCs between two nervous tracts. Glial cells are enveloping axons (ax) forming unmyelinated nerves

contact structures such as ganglia, blood vessels, smooth muscle cells or other ICCs.

Regarding glial cells, we identified three ultrastructurally different subtypes depending on their appearance and location. The first population was composed by the glial cells located peripheral to enteric ganglia (ganglia-periphery glial cells) and were characterized by abundant euchromatin (ie. non-condensed chromatin) and marginal heterochromatin, which supposes an indirect sign of intense transcriptional activity (Fig. 2a, b). The second type, the glial cells on the periphery of nerve tracts (tract-periphery glial cells) were ultrastructurally similar to the former type (Fig. 2c, d). On the other hand, the last population was formed by the glial cells located inside the nervous tracts. It consists of a different subtype of glial cells identified by nuclei with abundant condensed chromatin and a more electron-dense cytoplasm (Fig. 2e, f).

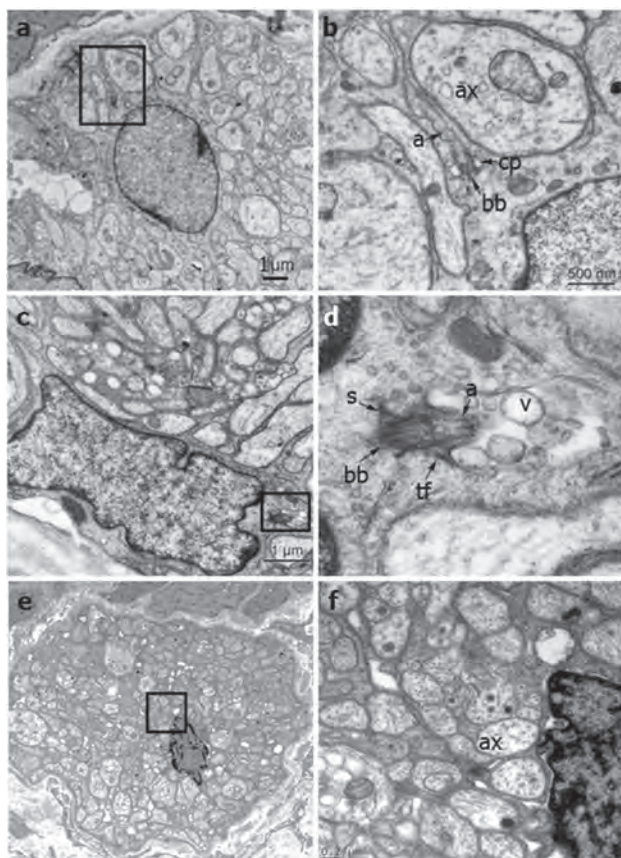


Fig. 2 Enteric ganglia subtypes and presence of primary cilia. We identified three subpopulations of glial cells based on their location and ultrastructural features. **a, b** The ganglia-periphery glia showed nuclei with euchromatin and primary cilia. **c, d** The tract-periphery glia shared similar features, such as the abundant euchromatin and the primary cilia. **e, f** Glia inside the nervous tracts showed condensed heterochromatin, extended cytoplasm prolongations ensheathing axon and did not express primary cilia. *ax* axons, *a* axoneme, *bb* basal body, *cp* ciliary pocket, *tf* transition fibres, *s* satellites, *v* vesicles

As a distinctive feature, only ganglia- and tract-periphery glial cells showed primary cilia (Fig. 2b and d). This organelle was located near cell membrane although sometimes appeared amongst neuronal axons. In order to exhaustively describe primary cilium ultrastructure, serial ultrathin sections were analysed and a 3-D reconstruction was performed (Fig. 3, Suppl. Video 1). Hence we identified primary cilia subcomponents formed by basal body, transition fibres that anchor primary cilia to cell membrane, satellites connected to basal body, axoneme and a membrane invagination called ciliary pocket. An important vesicular traffic was identified in ciliary pocket.

Moreover, we confirmed the presence of this structure in glial cells by immunofluorescence through co-location of the glial and ciliary axoneme markers, GFAP and acetylated tubulin, respectively. Furthermore, we quantitatively analysed the proportion of primary cilia in enteric glial cells (Fig. 4).

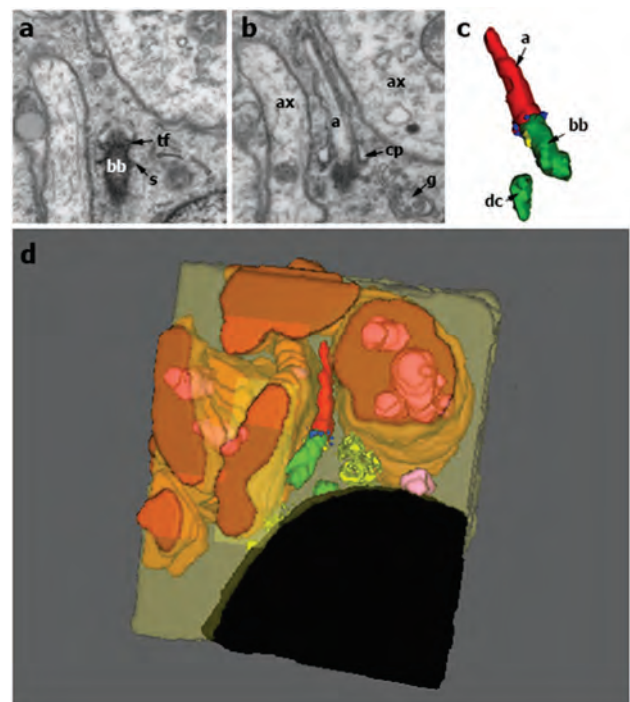


Fig. 3 Primary cilium 3D reconstruction. Ultrathin serial sections were analysed to get a proper idea of primary cilia ultrastructure and disposition. **a** Section showing cilium basal body (*bb*) with transition fibres (*tf*) and satellites (*s*). **b** Section showing ciliar axoneme (*a*) and the ciliary pocket (*cp*). **c** 3-D Reconstruction showing primary cilium and the daughter centriole (*dc*), focusing on primary cilium subcomponents: axoneme (red), basal body (green), transition fibres (blue) and satellites (yellow). **d** 3D reconstruction of a glial cell showing a primary cilium located between two axons. Other organelles such as Golgi apparatus (yellow) and mitochondria (pink) are also showed

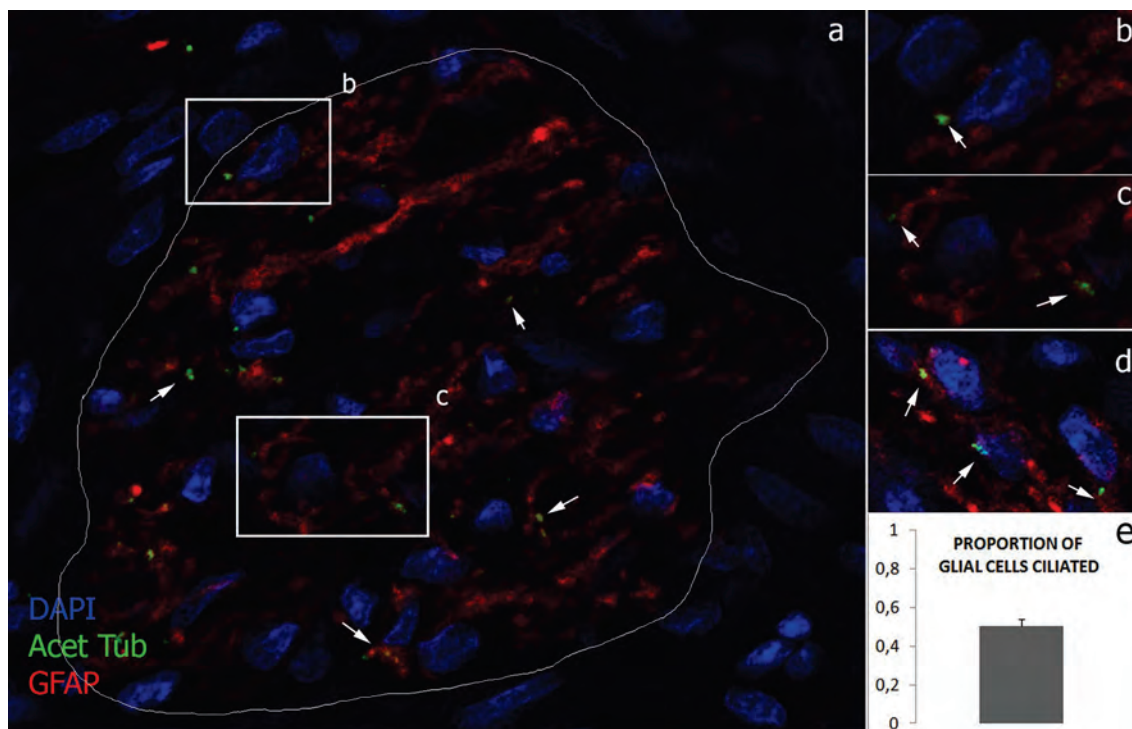


Fig. 4 Presence of primary cilia in glial cells showed by immunofluorescence co-location. We used Acetylated tubulin (Acet tub, green in the image) for primary cilia and GFAP (red in the image) for enteric glia to confirm the presence of primary cilia in glial cells. **a** Overall view of enteric ganglia (white line). **b–d** Magnification of

specific glial cells showing presence of primary cilia. Nuclei appear blue (DAPI staining). **e** Quantification showing the proportion of glial cells ciliated (50% approximately). Error bar shows standard error of mean (SEM)

Neurogenesis Markers in Adult Human Myenteric Ganglia

As enteric glial cells and primary cilia have been straightly related to adult neurogenesis, immunohistochemical experiments were performed to clarify cell proliferation and neurogenesis implications in human myenteric ganglia (Fig. 5, Table 1). Thus, we studied proliferation presence using the cell division marker ki-67 (Fig. 5a). Some ki-67 positive cells were found surrounding ganglia although no stained cell was found inside ganglia. Positive cells for ICC markers C-kit (Fig. 5b) and ANO1 (Fig. 5c) were found in a similar peripheral location. CD34 was also found in these peripheral cells but also in some (but not all) glial cells (Fig. 5d). Analogous but more extensive findings were found with neural stem cell marker Nestin (Fig. 5e). Hence, a high number of ICCs surrounding ganglia and glial cells expressed Nestin whereas neurons were clearly negative for this marker. Only glial cells were stained by GFAP (Fig. 5f).

Then, mature and immature neuronal markers were used to further study neurogenesis. All neurons were positive for the pan-neuronal marker Neuronal Specific Enolase (NSE) (Fig. 5g) whereas only a reduced but evident number of them showed immature markers such as Doublecortin (DCX) or

p75 (Fig. 5h, i, respectively). Those immature neurons were especially located in the periphery of ganglia.

Discussion

Here, we ultrastructurally studied human enteric ganglia (focusing on enteric glia and primary cilia) and we described the presence of markers related to neurogenesis in enteric ganglia of human colon.

As introduced, we found that two subpopulations of glial cells (ganglia- and nervous tract-periphery) show ultrastructural signs of transcriptional activity and primary cilia. This structure has been intimately related to adult neural stem cells in CNS (Doetsch, García-Verdugo, and Alvarez-Buylla 1999; Han et al. 2008) and its absence produced an impaired neurogenesis in SGZ and in a specific region of the SVZ (Han et al. 2008; Tong et al. 2014).

Furthermore, we showed that glial enteric cells were positive for the well-known neural stem cell marker Nestin as it was previously described (Vanderwinden et al. 2002; Cantarero et al. 2011). Based on these results and the existing literature, we propose that these ciliated glial cells might

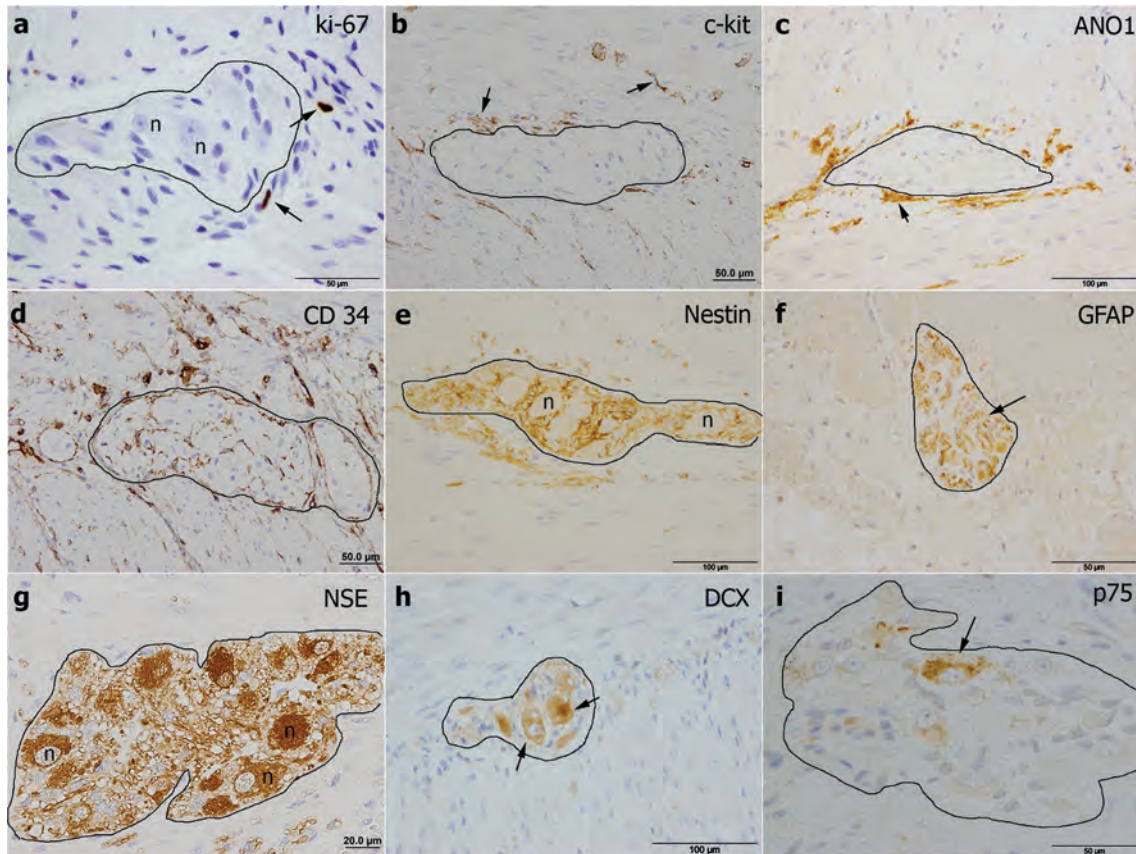


Fig. 5 Immunohistochemical study of adult neurogenesis markers. Adult neurogenesis-related proteins expression was studied in enteric ganglia. Thus, we analysed Ki-67 (a) as a proliferation marker and we found that only few surrounding enteric ganglia were Ki67-positive (arrows). We found a similar peripheral location for the ICC markers c-KIT (b) and ANO1 (c). CD34 and Nestin (markers related to stem

cells) were found both in ICCs and glial intraganglionic cells but not in neurons (d and e, respectively). On the other hand, GFAP was only found in glial cells (f). NSE stained all the neurons (g) whereas Doublecortin, DCX, (h) and p75 (i), which stained immature neurons, were positive for few ganglia peripheral neurons (arrows). Lines surround ganglia, n neuron

Table 1 Classification of marker expression regarding cellular populations of enteric ganglia

	ICC	Glial cells	Immature neuron	Mature neuron
Ki-67	+	-	-	-
C-kit	++	-	-	-
ANO1	+++	-	-	-
CD34	++	+	-	-
Nestin	+++	+++		
GFAP	-	++	-	-
DCX	-	-	++	-
P75	-	-	+	-
NSE	-	-	+++	+++

Based on immunohistochemical findings, we showed the cell subpopulations found in enteric ganglia. Thus, ICC are positive to c-KIT, ANO1, CD34, Nestin and Ki67; glial cells show CD34, Nestin and GFAP. Immature neurons show NSE, DCX and p75, whilst mature neurons only show NSE

be the intraganglionic precursors of neurons that have been described in mice (Kulkarni et al. 2017).

Moreover, our results give new support to the existence of adult neurogenesis in human ENS. Hence, the presence of immature neuron markers such as Doublecortin and p75, suggests the existence of adult new-born neurons in human ENS. Furthermore, p75 has been described as primary cilia-dependent in hippocampus neurons (Chakravarthy et al. 2010), supporting the importance of this organelle in adult neurogenesis. These findings were supported by the presence of Nestin in ICCs and glial cells.

However, no glial cells showed the proliferating marker Ki67 and only some peripheral cells, likely corresponding to ICCs, were positive for this marker. This made us believe that ICCs would be the primarily neural progenitor cell. In fact, this hypothesis is supported by other clues. Thus, ICCs were shown to be positive for Nestin (as was previously described by Vanderwinden et al. 2002) and they also showed primary cilia (Junquera et al. 2011) (Suppl. Fig. 1).

Besides, they present a similar morphology to CNS neural stem cells (the so-called Radial Glia-Like cells) consisting of long processes that contact with different elements of the niche, including blood vessels, neurons, glial cells, epithelia... Hence, this morphology allows ICCs to be in contact with the ENS neurogenic niche, where blood vessels components, neurotransmitters and microbiota play a fundamental role (Vadder et al. 2018; Zhao et al. 2008; Yarandi et al. 2020). This model is further supported by previous evidence of an extraganglionic origin of neural progenitor cells in ENS (Liu et al. 2009).

Regarding primary cilia and neurogenesis, although we were not able to identify primary cilia in adult human neurons, our group has previously showed primary cilia in Wistar rat enteric neurons (Luesma et al. 2013). In CNS adult neurogenesis, primary cilium is present in quiescent progenitors and disassembles when neurogenesis is activated. Afterwards, it is re-assembled and plays a fundamental role in new-born neurons integration (Kumamoto et al. 2012). A parallel process may be present in ENS neurogenesis, although further research would be necessary.

In conclusion, and trying to conciliate our results with previous literature, we propose a new paradigm where ICCs represent the neural stem cells, which, through asymmetric division (just as it happens in central neurogenesis), may differentiate into Nestin+ ciliated glial cells that would become

new enteric neurons (Fig. 6). This extraganglionic origin would also explain the peripheral location of DCX+p75+ immature neurons. Thus, ICCs could be a potential therapeutic target to treat different neurogastrointestinal disorders in humans, maybe through the modulation of primary cilia signalling. Nevertheless, one limitation of this work is that it is based on static protein expression of ENS components and ultrastructural features. The model of neurogenesis that we proposed implicates a process of cellular differentiation (ICC-Glia-Neuron) which is determined by the sequential expression of proteins. This is a dynamic process hard to study, especially, in human fixed tissues. However, a fundamental morphological clue which may lead the differentiation process has been identified: the primary cilium.

To sum up, our studies showed three glial subtypes based on ultrastructural features: ganglia-periphery, tract-periphery and intra-tract glia. The two first subpopulations (located in the periphery of ganglia and tracts) showed primary cilia. Moreover, we found immature neurons markers, especially in ganglia periphery, suggestive of adult enteric neurogenesis. However, only peripheral cells, corresponding to ICCs, were positive for proliferative indicators and, moreover, they also showed primary cilia. Thus, we propose a new paradigm where ICCs are neural stem cells that may give rise to new neurons in human adult ENS.

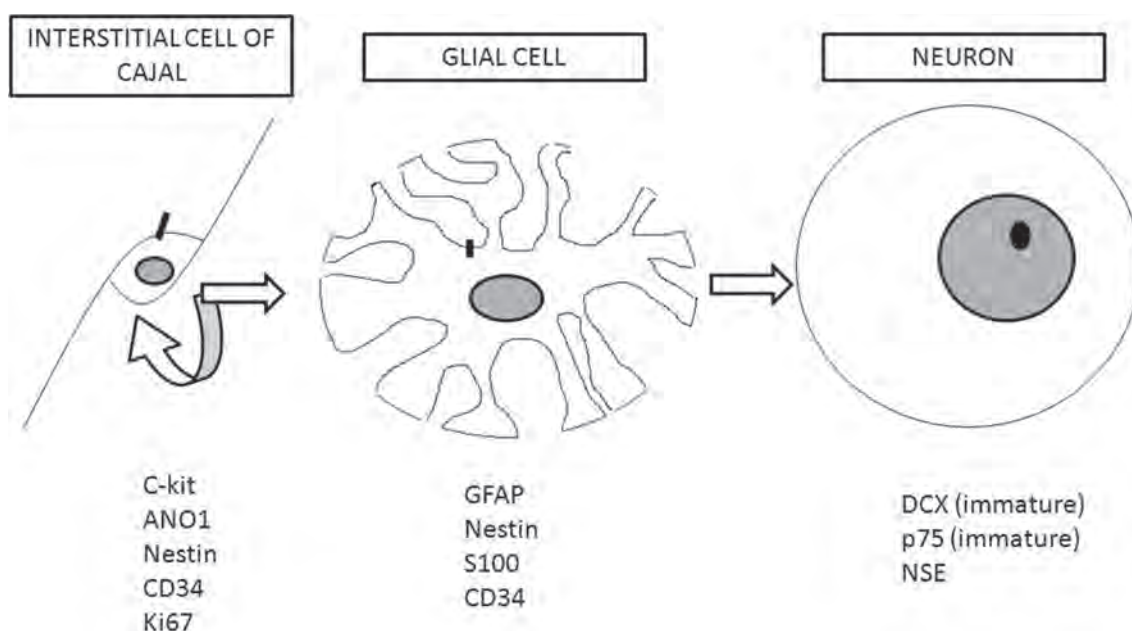


Fig. 6 Proposed paradigm for explaining adult enteric neurogenesis. ICCs are the only cells expressing proliferation markers and they show specific features that made them good candidates for neural progenitors. We suggest that ICCs (c-KIT+, ANO1+, Ki67+, Nestin+, CD34+, primary cilia) would give raise to glial cell (GFAP+,

CD34+, Nestin+, S100+, Ki67-, primary cilia) through asymmetric division and some of these glial cells would become immature neurons (DCX+, P75+, NSE+) and, lastly, mature neurons (DCX-, P75-, NSE+)

Acknowledgements Authors would like to acknowledge the use of *Servicio General de Apoyo a la Investigación - SAI, Universidad de Zaragoza*. No specific funding was received for the experiments performed in this paper. Authors would like to acknowledge Dr. Adolfo Lopez de Munain for allowing PI access to his facilities to perform revision experiments.

Data Availability The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Informed Consent According to submission guidelines, informed consent would not be necessary for this publication as only pathology slides were used.

References

- Altman J, Das GD (1965) Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124(3):319–335
- Alvarez-Buylla A, García-Verdugo JM (2002) Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* 22(3):629–634
- Cantarero Carmona CI, Luesma Bartolomé MJ, Lavoie-Gagnon C, Junquera Escribano C (2011) Distribution of nestin protein: immunohistochemical study in enteric plexus of rat duodenum. *Microsc Res Tech* 74(2):148–152. <https://doi.org/10.1002/jemt.20884>
- Chakravarthy B, Gaudet C, Ménard M, Atkinson T, Chiarini A, Prà ID, Whitfield J (2010) The P75 neurotrophin receptor is localized to primary cilia in adult murine hippocampal dentate gyrus granule cells. *Biochem Biophys Res Commun* 401(3):458–462. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.09.081>
- Coelho-Aguiar JM, Bon-Frauches AC, Gomes ALT, Veríssimo CP, Aguiar DP, Matias D, Thomas BBM, Gomes AS, Brito GAC, Moura-Neto V (2015) The enteric glia: identity and functions. *Glia* 63(6):921–935. <https://doi.org/10.1002/glia.22795>
- Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1999) Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(20):11619–11624. <https://doi.org/10.1073/PNAS.96.20.11619>
- Encinas JM, Michurina TV, Peunova N, Park JH, Tordo J, Peterson DA, Fishell G, Koulakov A, Enikolopov G (2011) Division-coupled astrocytic differentiation and age-related depletion of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* 8(5):566–579. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.03.010>
- Furness JB (2012) The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 9(5):286–294. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.32>
- Gabella G (1981) Ultrastructure of the nerve plexuses of the mammalian intestine: the enteric glial cells. *Neuroscience*. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(81\)90135-4](https://doi.org/10.1016/0306-4522(81)90135-4)
- Gershon MD (1997) Genes and lineages in the formation of the enteric nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 7(1):101–109. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(97\)80127-4](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(97)80127-4)
- Grubišić V, Gulbransen BD (2017) Enteric glia: the most alimentary of all glia. *J Physiol* 595(2):557–570. <https://doi.org/10.1113/JP271021>
- Gulbransen BD, Sharkey KA (2012) Novel functional roles for enteric glia in the gastrointestinal tract. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 9(11):625–632. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.138>
- Han Y-G, Spassky N, Romaguera-Ros M, Garcia-Verdugo J-M, Aguilar A, Schneider-Maunoury S, Alvarez-Buylla A (2008) Hedgehog signaling and primary cilia are required for the formation of adult neural stem cells. *Nat Neurosci* 11(3):277–284. <https://doi.org/10.1038/nn2059>
- Hanani M, reichenbach A (1994) Morphology of horseradish peroxidase (HRP)-injected glial cells in the myenteric plexus of the guinea-pig. *Cell Tissue Res* 278(1):153–160. <https://doi.org/10.1007/s004410050202>
- Jessen KR, Thorpe R, Mirsky R (1984) Molecular identity, distribution and heterogeneity of glial fibrillary acidic protein: an immunoblotting and immunohistochemical study of schwann cells, satellite cells, enteric glia and astrocytes. *J Neurocytol* 13(2):187–200. <https://doi.org/10.1007/BF01148114>
- Joseph NM, He S, Quintana E, Kim Y-G, Núñez G, Morrison SJ (2011) Enteric glia are multipotent in culture but primarily form glia in the adult rodent gut. *J Clin Invest* 121(9):3398–3411. <https://doi.org/10.1172/JCI158186>
- Junquera C, Cantarero I, Luesma MJ, Soriano-Navarro M, Martínez-Ciriano C, Castiella T, García-Verdugo JM (2011) The primary cilium: a relevant characteristic in interstitial cells of rat duodenum enteric plexus. *Histol Histopathol* 26(4):461–470
- Kulkarni S, Micci M-A, Leser J, Shin C, Tang S-C, Fu Y-Y, Liu L et al (2017) Adult enteric nervous system in health is maintained by a dynamic balance between neuronal apoptosis and neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci* 114(18):E3709–E3718. <https://doi.org/10.1073/pnas.1619406114>
- Kumamoto N, Gu Y, Wang J, Janoschka S, Takemaru KI, Levine J, Ge S (2012) A role for primary cilia in glutamatergic synaptic integration of adult-born neurons. *Nat Neurosci* 15(3):399–405. <https://doi.org/10.1038/nn.3042>
- Laranjeira C, Sandgren K, Kessaris N, Richardson W, Potocnik A, Berghe PV, Pachnis V (2011) Glial cells in the mouse enteric nervous system can undergo neurogenesis in response to injury. *J Clin Invest* 121(9):3412–3424. <https://doi.org/10.1172/JCI158200>
- Lim DA, Alvarez-Buylla A (2014) Adult neural stem cells stake their ground. *Trends Neurosci* 37(10):1–9. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.08.006>
- Liu M-T, Kuan Y-H, Wang J, Hen R, Gershon MD (2009) 5-HT4 receptor-mediated neuroprotection and neurogenesis in the enteric nervous system of adult mice. *J Neurosci* 29(31):9683–9699. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1145-09.2009>
- Luesma MJ, Cantarero I, Castiella T, Soriano M, Garcia-Verdugo JM, Junquera C (2013) Enteric neurons show a primary cilium. *J Cell Mol Med* 17(1):147–153. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2012.01657>
- Lyu R, Zhou J (2017) The multifaceted roles of primary cilia in the regulation of stem cell properties and functions. *J Cell Physiol* 232(5):935–938. <https://doi.org/10.1002/jcp.25683>
- Malicki JJ, Johnson CA (2017) The cilium: cellular antenna and central processing unit. *Trends Cell Biol* 27(2):126–140. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.08.002>
- Moss J, Gebara E, Bushong EA, Sánchez-Pascual I, O'Laio R, El M'Ghari I, Kocher-Braissant J, Ellisman MH, Toni N (2016) Fine processes of nestin-GFP-positive radial glia-like stem cells in the adult dentate gyrus ensheath the local synapses and vasculature. *Proc Natl Acad Sci* 113(18):E2536–E2545. <https://doi.org/10.1073/pnas.1514652113>
- Nishimura Y, Kasahara K, Shiromizu T, Watanabe M, Inagaki M (2018) Primary cilia as signaling hubs in health and disease. *Adv Sci*. <https://doi.org/10.1002/adv.201801138>

- Rao M, Nelms BD, Dong L, Salinas-Rios V, Rutlin M, Gershon MD, Corfas G (2015) Enteric glia express proteolipid protein 1 and are a transcriptionally unique population of glia in the mammalian nervous system. *Glia* 63(11):2040–2057. <https://doi.org/10.1002/glia.22876>
- Satir P, Pedersen LB, Christensen ST (2010) The primary cilium at a glance. *J Cell Sci* 123(4):499–503. <https://doi.org/10.1242/jcs.050377>
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S et al (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9(7):676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Tong CK, Han Y-G, Shah JK, Obernier K, Guinto CD, Alvarez-Buylla A (2014) Primary cilia are required in a unique subpopulation of neural progenitors. *Proc Natl Acad Sci* 111(34):12438–12443. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321425111>
- Vadder F, Grasset E, Mannerås L, Karsenty G, Macpherson AJ (2018) Gut microbiota regulates maturation of the adult enteric nervous system via enteric serotonin networks. *Proc Natl Acad Sci* 115(25):1–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1720017115>
- 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(2):261–268. <https://doi.org/10.1007/s00441-002-0590-3>
- Yarandi SS, Kulkarni S, Saha M, Sylvia KE, Sears CL, Pasricha PJ (2020) Intestinal bacteria maintain adult enteric nervous system and nitrenergic neurons via toll-like receptor 2-induced neurogenesis in mice. *Gastroenterology* 159:200–213
- Zhao C, Deng W, Gage FH (2008) Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132(4):645–660. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.033>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Hedgehog signalling pathway activation in gastrointestinal stromal tumours is mediated by primary cilia

Pablo Iruzubieta^{1,3} · Marta Monzón¹ · Tomás Castiella^{2,3} · Teresa Ramírez² · Concepción Junquera^{1,3}

Received: 11 April 2019 / Accepted: 24 June 2019

© The International Gastric Cancer Association and The Japanese Gastric Cancer Association 2019

Abstract

Background Gastrointestinal stromal tumour (GIST) is a mesenchymal cancer which derives from interstitial cells of Cajal. To determine whether a relationship between Hedgehog (Hh) signalling pathway and primary cilia exists in GIST tumours is intended here.

Methods Immunohistochemical, immunofluorescence and ultrastructural techniques were performed in this study.

Results We show that GIST cells present primary cilia (an antenna-like structure based on microtubules). But, moreover, we prove Hedgehog signalling pathway activation in these tumours (a pathway related with tumoural features such as proliferation, migration or stemness) and we show for the first time that this signalling pathway activation in GIST is mediated by primary cilia, likely in a paracrine way.

Conclusion Thus, primary cilia and Hedgehog signalling would be fundamental in tumoural microenvironment control of GIST cells for their maintenance, differentiation and proliferation.

Keywords GIST · Primary cilium · Hedgehog signalling · Ultrastructure · Immunohistochemistry

Introduction

Gastrointestinal stromal tumour (GIST) is the most common mesenchymal neoplasm of the human gastrointestinal tract. Incidence rates of GIST range between 6.5 and 14.5 per million per year [1]. It is mostly located in the stomach (60%) followed by the jejunum and ileum (30%), the duodenum (5%), colorectum (4%) and oesophagus or appendix (<1%) [2]. On the basis of immunophenotypical and ultrastructural similarities [3, 4], these tumours are thought to derive

from Interstitial Cells of Cajal (ICCs) or an ICC progenitor through somatic mutation.

GISTs have been classically classified into three principal subtypes attending to their morphology. According to published data, approximately 70% of cases are composed of spindle cells characterised by ovoid nuclei, paranuclear vacuolisation and syncytial cell borders. Around 20% of GISTs show epithelioid cells with round nuclei and the remaining 10% of cases show both mixed cellular populations [2].

Gain-of-function mutations in *KIT* are found in 70–80% of GISTs whereas *PDGFRA* tyrosine kinase receptor mutations are present in 10–15% of cases [3, 5]. Recently, ANO1, also known as TMEM16A or DOG1, has been reported as a highly sensitive and specific marker of GIST [6] irrespective of *KIT* or *PDGFRA* mutations [7]. It may stain up to one-third of *KIT*-negative GIST [8]. Thus, ANO1 has been proposed to be included in routine studies of GIST [9]. ANO1 is a calcium-activated chloride channel; it has been showed to regulate proliferation in ICCs [10] and primary ciliogenesis [11]. However, its exact role in GISTs remains elusive [12, 13].

Primary cilia are non-motile organelles composed by an axoneme of 9 peripheral doublets of microtubules (9 + 0 structure) projecting out of the cell surface. The axoneme

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10120-019-00984-2>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Pablo Iruzubieta
pablo.iruzubieta@hotmail.es

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

² Department of Pathological Anatomy, Legal and Forensic Medicine and Toxicology, Faculty of Medicine, University of Zaragoza, Zaragoza, Spain

³ Institute for Health Research Aragón (IIS), C/Domingo Miral s/n, 50009 Zaragoza, Spain

is originated from a basal body composed by a modified centriole that is anchored to the cell membrane by the transition fibres [14]. The transition zone, located between the axoneme and the basal body, acts as a gate that controls the traffic of proteins and lipids providing primary cilia with a different composition from cytosol and plasma membrane [15]. Primary cilia have important functions in different tissues based on three relevant features: supply of cell polarity, regulation of cell cycle and acting as sensory antenna for cell signalling [16]. Thus, several signalling pathways (such as Hedgehog, Wnt or TGF β) have been identified as primary cilia dependent [17, 18]. Moreover, mutations in primary cilia are related to a group of disorders called ciliopathies [16, 19].

In addition, primary cilia involvement in cancer has been closely related to the Hedgehog (Hh) signalling pathway [20, 21]. Hence, Hh signalling pathway activates transcription of different genes related to processes impaired in tumours such as cell proliferation, apoptosis, angiogenesis or epithelial–mesenchymal transition [22]. Furthermore, Hh signalling pathway has been recently implicated in maintenance and proliferation of cancer stem cells [21]. In fact, abnormal activation of this signalling pathway (both in a ligand-dependent and -independent way) can lead to cancer [20, 22].

Three Hh ligands have been identified in vertebrates: Indian (Ihh), Desert (Dhh) and Sonic (Shh). When the pathway is not activated, the Patched receptor is located in the ciliary membrane repressing the G-protein-coupled Smoothened (Smo) receptor by preventing its trafficking and localisation to ciliary membrane [20, 22, 23]. Then, Gli1 transcription factor is sequestered by SUFU while Gli2 and Gli3 are converted into their repressor forms [23]. Conversely, when the Hh ligands bind Patched, it is removed out from the primary cilia axoneme facilitating Smo localisation in ciliary membrane [24]. Smo produces SUFU-Gli1 dissociation, allowing Gli1 to enter the nucleus and activate gene transcription [18, 23].

Although previous studies have already identified the Hh signalling pathway in GIST [25, 26], here we evidence for the first time its activation by primary cilia in this type of tumours.

Materials and methods

Materials

Eight cases of stomach tumours that fulfilled the histological criteria of GISTs were examined in this study. Four of them were low-grade GIST, while the remaining four were high grade. They were retrieved from the files of the Department of Pathology at the University Clinic Hospital of Zaragoza.

All protocols developed were approved by the Human Research Ethics Committee (*Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón, CEICA*) from the *Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS)*.

Immunohistochemistry

Immunohistochemical staining was performed on 2- μ m-thick formalin-fixed paraffin-embedded sections using EnVision[®] (DAKO) method. The primary antibodies used in this study were: polyclonal rabbit anti-KIT (1:50, A4502 DAKO; Glostrup, Denmark), polyclonal rabbit anti-ANO1 (1:100, Abcam, ab53212; Cambridge, UK), polyclonal rabbit anti-Gli1 (1:200, Abcam, ab49314; Cambridge, UK), polyclonal rabbit anti-Smo (1:1000, LS Bioscience, LS-B4911, Seattle, WA, USA) and polyclonal goat anti-Patched (1:100, Santa Cruz, sc-6149; Dallas, TX, USA). Antibodies were diluted with DAKO diluent (S2022). The tissue sections were deparaffinised in xylene for 20 min and rehydrated in graded ethanol (4 min in 100°, 4 min in 96°, 4 min in 70° and 5 min in distilled water). Prior to all assays, a heat-induced antigen retrieval step was performed for KIT, ANO1, Gli1 and Smo immunolabeling using buffer citrate (pH 6, DAKO S2031) by treatment for 5 min in microwave at 800 W and 3 additional minutes at 360 W. For Patched staining, an antigen retrieval step using Tris-buffered saline (TBS, pH 9) was performed at 96 °C for 20 min.

After washing twice with PBS for 3 min, endogenous peroxidase was blocked using peroxidase blocking reagent (DAKO, S2001) for 10 min and sections were washed in distilled water and PBS 3 min, twice.

Afterwards, sections were incubated with primary antibodies at 4 °C overnight in a humidified chamber. Sections were washed in PBS three times for 5 min and incubated with Labelled Polymer EnVision-HRP (DAKO K5007) or Polyclonal Rabbit Anti-Goat Immunoglobulins/HRP (1:200, DAKO, P016002-2) for 1 h. To confirm the presence of immunocomplexes, 3,3'-diaminobenzidine as chromogen and hydrogen peroxide as substrate were used. The samples were washed twice in distilled water, contrasted with Mayer's haematoxylin for 7 min, washed in tap water for 15 min, dehydrated in a graded ethanol (2 min in 70°, 2 min in 96° and 5 min in 100°), cleared in xylene and cover slipped with Eukitt (03989 Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA).

Digital images were captured by Olympus BX1 microscope.

Immunofluorescence microscopy

Two-micrometre formalin-fixed paraffin-embedded sections were cut and mounted on glass slides. The sections were deparaffinised in xylene for 20 min and rehydrated in graded ethanol (4 min in 100°, 4 min in 96°, 4 min in 70°

and 5 min in distilled water). Tissues were permeabilised with 0.1% Triton X-100 in PBS for 8 min. Afterwards an antigen retrieval step using Tris-buffered saline (TBS, pH 9) was performed at 96 °C for 20 min for Acetylated-tubulin, Pericentrin and Patched. For Gli1 unmasking, a protocol using buffer citrate (pH 6, DAKO S2031) and treatment for 5 min in microwave at 800 W and 3 additional minutes at 360 W was used.

Sections were incubated overnight at 4 °C with the following primary antibodies: monoclonal mouse anti-Acetylated-tubulin (1:4000, Sigma Aldrich, T7451; St. Louis, MO, USA), polyclonal rabbit anti-Pericentrin (1:100, Abcam, ab4448; Cambridge, UK), polyclonal goat anti-Patched (1:100, Santa Cruz, sc-6149; Dallas, TX, USA) and polyclonal rabbit anti-Gli1 (1:200, Abcam, ab49314; Cambridge, UK) in a dark humidified chamber. Sections were washed in PBS three times for 5 min and incubated for 1 h at RT in a dark humidified chamber with secondary antibodies: donkey anti-mouse IgG H+L Alexa Fluor 594 (1:1000, ThermoFisher, R37115; Waltham, MA, USA), donkey anti-rabbit IgG H+L Alexa Fluor 488 (1:1000, ThermoFisher, A-21206; Waltham, MA, USA) and donkey anti-goat IgG H+L Alexa Fluor 488 (1:1000, ThermoFisher, A-11055; Waltham, MA, USA). After washing in PBS, DAPI (1 µg/mL, Sigma-Aldrich) was added for 1 min for nuclei counterstaining. Sections were washed in PBS and the slides were covered with fluorescence mounting medium (DAKO, S3023).

Samples were visualised with a fluorescence microscope (Olympus BX1 with DP70 Digital Camera System) and analysed with DP Controller Software. Every fluorescent channel was individually photographed and channels were merged using FIJI Image_J software [27].

Electron microscopy

After tumour extraction, samples (about 1–1.5 mm³) were washed in phosphate buffer and fixed with 2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde overnight at RT, washed in 0.1 M phosphate buffer for 5 min, post-fixed with 2% osmium, rinsed, dehydrated in graded acetone (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 µm) were cut with a diamond knife, lightly stained with 1% toluidine blue and examined by light microscopy (Olympus BX51 microscope, Olympus Imaging Corporation; Tokyo, Japan). Later, ultrathin (0.05 µm) sections were cut, collected on Formvar-coated single-slot grids counterstained with 1% uranyl acetate and Reynold's lead citrate for 10 min.

They were examined under a FEI Tecnai G2 Spirit TEM. The images were captured with Advanced Microscopy

Techniques, using a Corp. Charge-Coupled Device imaging system (CCD from Danvers, MA, USA).

Three-dimensional reconstructions from serial electron microscopy sections were performed using FIJI Image J software [27].

Results

GIST histological study

Haematoxylin–eosin studies showed two cell populations in the studied samples: on the one hand, spindle cells with ovoid nuclei and the characteristic paranuclear vacuoles (Fig. 1a, b); on the other hand, epithelioid cells with round nuclei and pale cytoplasm. Spindle cells were generally more numerous than epithelioid.

Moreover, we performed immunohistochemical experiments to confirm the diagnosis of GIST through the well-known GIST markers: KIT (Fig. 1c) and ANO1 (Fig. 1d). Both markers were positive in all samples, showing a cytoplasmic staining.

Thus, we identified our samples as GIST tumours, showing predominantly spindle cells and expressing both KIT and ANO1.

Primary cilia in GISTs

We performed double immunofluorescence experiments to co-localise Acetylated-tubulin (specific to axoneme of cilia) and Pericentrin (present in centrioles, including the basal body of cilia) (Fig. 2). Hence, a substantial number of GIST cells were evidenced to present primary cilia in determined areas from an overview picture (Fig. 2a–c).

Quantitative analyses were performed by counting the number of ciliated cells per High Power Field (HPF, magnification 400×) in areas of GIST samples where immunofluorescence staining was mainly positive. Thus, we showed that up to 25% of total cells were ciliated (Fig. 2d), discarding primary cilium as an occasional finding in GIST cells.

These primary cilia were also studied at ultrastructural level using Transmission Electron Microscopy (TEM). Primary cilia components (including basal body, transition zone and axoneme) were clearly identified (Fig. 3a–c) and active vesicular trafficking through the basal body was showed (Fig. 3d), confirming the dynamic nature of this organelle. Moreover, primary cilium is showed here projecting out of GIST cells and directly protruding into neighbour cell cytoplasm (Fig. 4a, b).

Furthermore, serial sections for TEM were performed with the purpose of reconstructing the three-dimensional disposition of primary cilium in GISTs (Fig. 4c, Online Resource 1). These reconstructions helped to clarify the

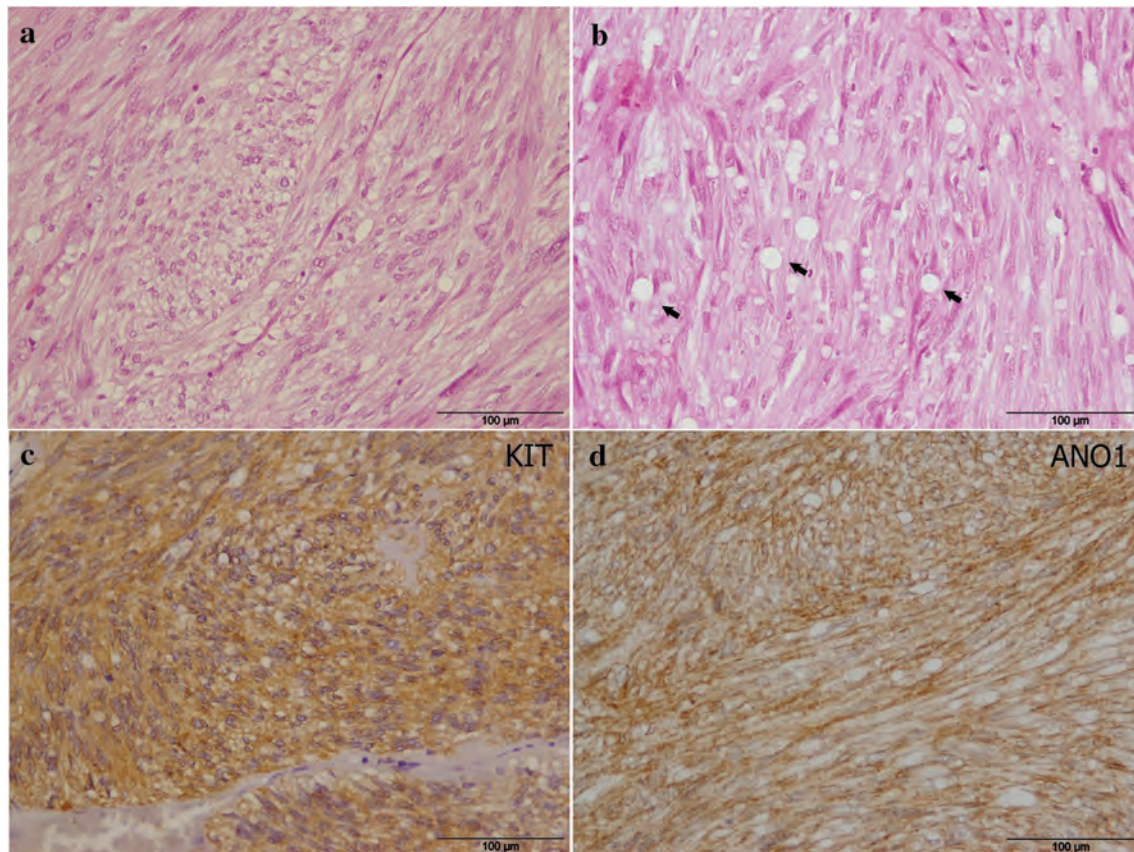


Fig. 1 GIST general histological study. **a** Spindle (sp) cells were predominant in GIST tumours. **b** These cells were characterised by ovoid nuclei and a prominent paranuclear vacuole (arrows). **c** GISTs

showed homogeneous cytoplasmic staining for KIT. **d** Specific immunostaining for ANO1 was also evidenced in cancer cells

disposition of ciliary components, their relation with cellular organelles (as Golgi apparatus or mitochondria) and the physical contacts that they mediate between neighbouring cells.

Hh signalling pathway in GISTs

To elucidate the role of primary cilia in GISTs, Hh signalling pathway and the relation of this signalling cascade with primary cilia in these cells were assessed. Thus, immunolabelling techniques for Patched, receptor of Hh ligands that trigger the activation of the pathway; Smo, which activates Gli1 nuclear translocation after entering primary cilia axoneme, and Gli1, the main effector transcription factor of the cascade were applied.

Immunolabelling studies for Patched evidenced a punctiform staining frequently located next to nuclei (Fig. 5a). With the aim of clarifying the relation of Hh signalling pathway with primary cilia, co-localisation studies for Acetylated-tubulin (as a marker for primary cilia) and Patched

were developed. We found that Patched was not located in ciliary axoneme but it was concentrated in ciliary basal body (Fig. 5b). This localisation in basal body suggests the activation of Hh signalling pathway through binding of Hh ligands to Patched receptor and its internalisation and removal from the axoneme of cilia. Furthermore, we showed Smo expression in cell membrane and regions near to nuclei (Fig. 6), suggestive of Hh signalling pathway activation.

Specific Gli1 immunostaining was detected in cytoplasm and nucleus of some cells (Fig. 7a, b). Gli1 presence in nuclei gives evidence of the activation of Hh pathway in GIST cells. Moreover, we performed immunofluorescence experiments to show the presence of primary cilia in Gli1+ cells. Our results showed that cells with primary cilia showed Gli1 expression in nuclei, confirming the Hh activation in ciliated cells (Fig. 7c).

Thus, Hh signalling pathway would be activated in GIST cells through primary cilia producing Patched removal from cilia axoneme, Smo entrance to axoneme and consequent Gli1 activation and transportation to nucleus, where transcription of target genes is switched on.

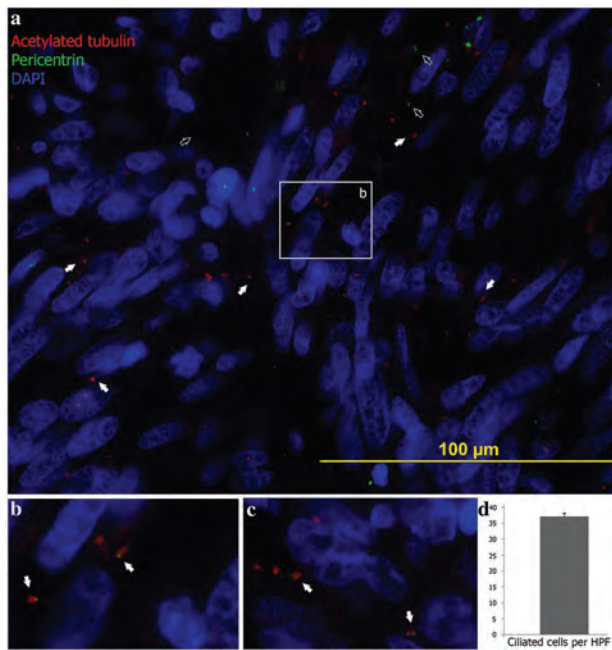


Fig. 2 Primary cilia in GISTs. Acetylated-tubulin (red) and Pericentrin (green)-labelled ciliary axoneme and basal body, respectively. Co-localisation studies by applying both markers constituted a clear evidence of primary cilia (some of them pointed with arrows). Pericentrin is also located in centrosomes; hence, Pericentrin-staining was also found unrelated to primary cilia (hollow arrows). **a** General view of GIST cells showing a relevant number of them presenting primary cilia. **b** Magnification from squared area in **a**. **c** Detail of cells expressing primary cilia in another area. **d** Quantitative analysis showing primary cilia per high power field (HPF, $\times 400$) in GISTs stained by immunofluorescence. Approximately 35 ciliated cells were identified per HPF in selected areas where a higher number of primary cilia were found. The total number of cells per HPF was between 120 and 140 approximately; thus, ciliated cells would suppose up to 25% of total cells. Results are expressed as mean \pm SEM

Furthermore, we tried to correlate Hh signalling activation with pathology grades of GIST (Table 1). Thus, we semi-quantitatively evaluated nuclear and cytoplasmic expression of Gli1. We found that low-grade GIST showed predominant cytoplasmic expression of Gli1 while main nuclear Gli1 staining was detected in high-grade tumours. These results suggest that Hh activation (evidenced by Gli1 nuclear expression) is especially present in high-grade GISTs.

Discussion

Primary cilia have been previously described in GISTs and their progenitor cells, ICCs [28–31]. According to the results provided in this study, primary cilium is confirmed to be a

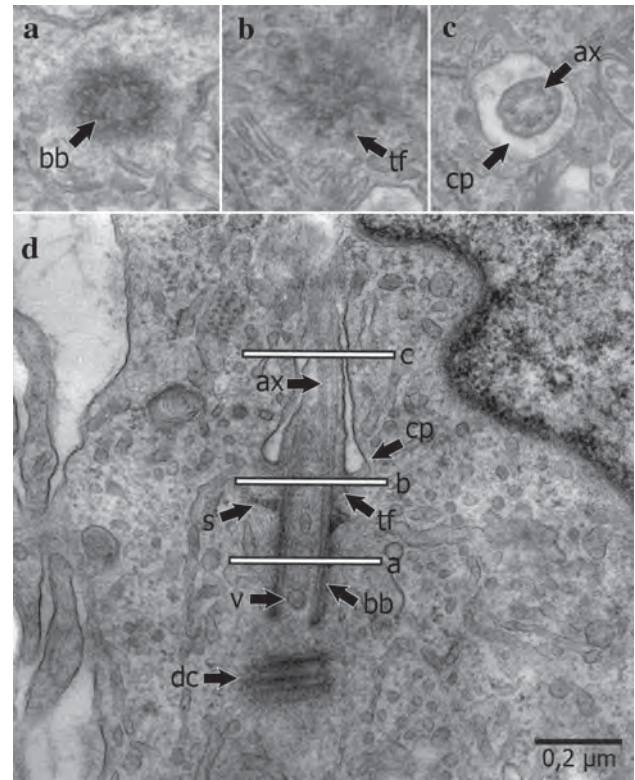


Fig. 3 TEM images showing primary cilia in GISTs. Primary cilia serial transversal sections in a GIST cell shows **a** basal body (bb), **b** transition zone characterised by the presence of transition fibres (tf) that anchors basal body to ciliary membrane and **c** axoneme (ax), that can be identified surrounded by the ciliary pocket (cp). **d** Longitudinal section of primary cilia in a GIST cell showing active vesicular trafficking (v) through the basal body (bb) and the different components of this organelle (dc daughter centriole; s satellites). White bars in **d** show the corresponding area in longitudinal view for transversal sections (**a–c**)

common and remarkable feature of GIST cells and not an incidental finding. Nevertheless, the exact role of this organelle in GIST remains unknown.

Primary cilia have been involved in cancer through different signalling pathways and mechanisms [32]. However, there is no agreement about the primary cilia number being increased or reduced in this pathology [33, 34]. One of the most studied ways of its implication in cancer development and maintenance is through Hh signalling pathway. This cellular signalling pathway disruption promotes several types of cancer, both in a ligand-dependent and -independent way, likely by maintaining cancer stem cells [20, 21]. It has been demonstrated that primary cilia play a vital role in physiological Hh signalling pathway, regulating the trafficking of different pathway components across the transition zone [24]. Furthermore, primary cilia are also important

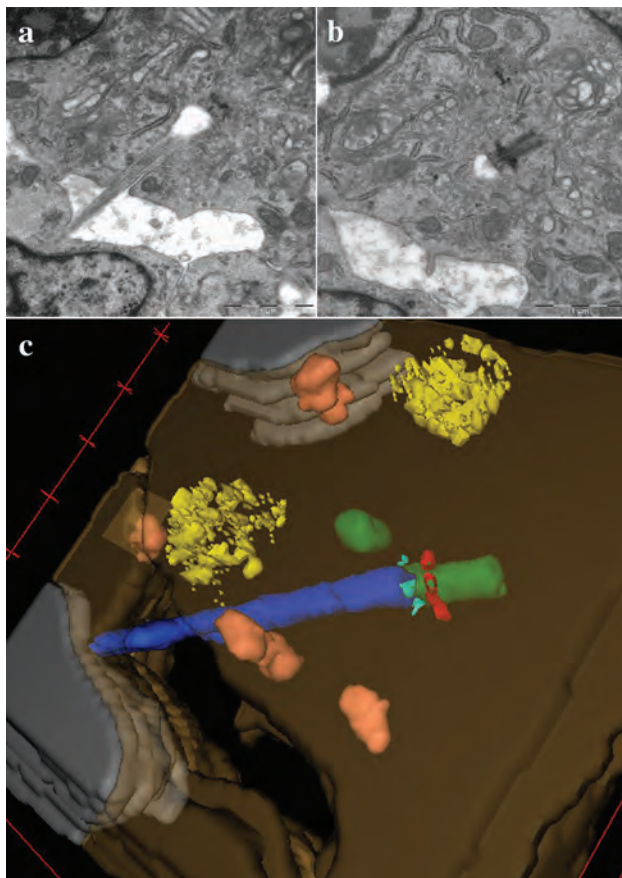


Fig. 4 Primary cilia 3-D reconstruction from TEM serial sections. **a**, **b** Two different serial images from a primary cilium in a GIST cell protruding into the cytoplasm of the neighbour cell. **c** Image corresponding to 3-D reconstruction. Primary cilia components are represented: the axoneme protruding out of the cell (blue), the basal body and the daughter centriole (green), satellites around basal body (red) and transition fibres that anchor the basal body to the ciliary pocket (cyan). Other organelles such as the Golgi apparatus (yellow) and some mitochondria (pink) are also shown. Nuclei are in grey and cytoplasm in clear brown

in cancer-related Hh signalling pathway. Thus, it has been shown that they are able to both, enhance or repress Hh ligand-independent tumorigenesis in models of medulloblastoma and basal cell carcinoma depending on the nature of the oncogenic signal [35, 36]. Moreover, a recent study has shown that epithelial–mesenchymal transition, an essential process in cancer progression and metastasis, induces ciliogenesis and Hh signalling pathway activation in *in vitro* models of breast cancer [37].

Nevertheless, the role of this signalling pathway in GIST remains unclear and its relation with primary cilia in these mesenchymal tumours has not been previously described.

Hh signalling pathway components have been reported to be expressed in human GIST by immunohistochemistry [25], RT-PCR and microarray analyses [26]. Furthermore, Tang et al. [26] showed, through microarrays analyses, Hh signalling pathway components and primary cilia-related proteins overexpression in GIST (independently of *KIT* or *PDGFR* mutations) compared to ICC. Furthermore, Shh agonists have been showed to increase cell proliferation in GIST cultures [38]. The results provided here confirm the presence of Hh signalling pathway components Gli1, Smo and Patched in GIST cells and their co-localisation with primary cilia.

Regarding the relation of Hh signalling pathway and KIT, the activating forms of Gli (Gli1 and Gli2) positively regulate KIT expression. Thus, pharmacological inhibition of Gli1 and Gli2 has been shown to reduce KIT expression and cell viability in GIST cell culture [26, 39]. As a counterpart, the repressor form Gli3 has been inversely correlated with KIT and its overexpression shown to reduce KIT expression [26, 40]. This effect was also present in wild-type GIST (non-*KIT*/non-*PDGFR* mutant GIST), suggesting that Hh signalling pathway activation and consequent Gli3 degradation may suppose a possible way to KIT overexpression in these tumours. Tang et al. [26] proposed that Hh signalling pathway would be ligand-independent; however, our results show that Patched is removed from ciliary axoneme, suggestive of ligand binding to Patched. Moreover, TEM images and 3D reconstructions show primary cilia in direct contact with surrounding cells. Hence, we propose that paracrine communication between GIST cells through primary cilia may be pivotal in Hh signalling pathway. This conclusion would agree with previously published results [25], where most GISTs expressing Hh signalling pathway components, expressed the Hh ligand Shh.

Further evidence of connection between GIST and Hh signalling pathway was proposed by Pelczar et al. [41]. Their studies defined *PDGFR*-positive GIST-like tumours in a Patched1-inactivated mutant murine model. However, both origin and tumour cells did not express KIT, so their classification as GIST may be doubtful. Besides, they did not perform ANO1 immunohistochemical assays (which is positive for up to one third of KIT-negative GIST [8]) that would have made results interpretation easier.

Here, we show evidence of the relation of Hh signalling pathway and primary cilia in human GISTs for the first time. Thus, we have shown that primary cilium is a relevant organelle in GIST cells, where it mediates Hh signalling pathway activation (likely in a ligand-dependent manner). Thus, ciliated cells showed Patched removal from axoneme, Smo expression and Gli1 entrance to cell nuclei, where

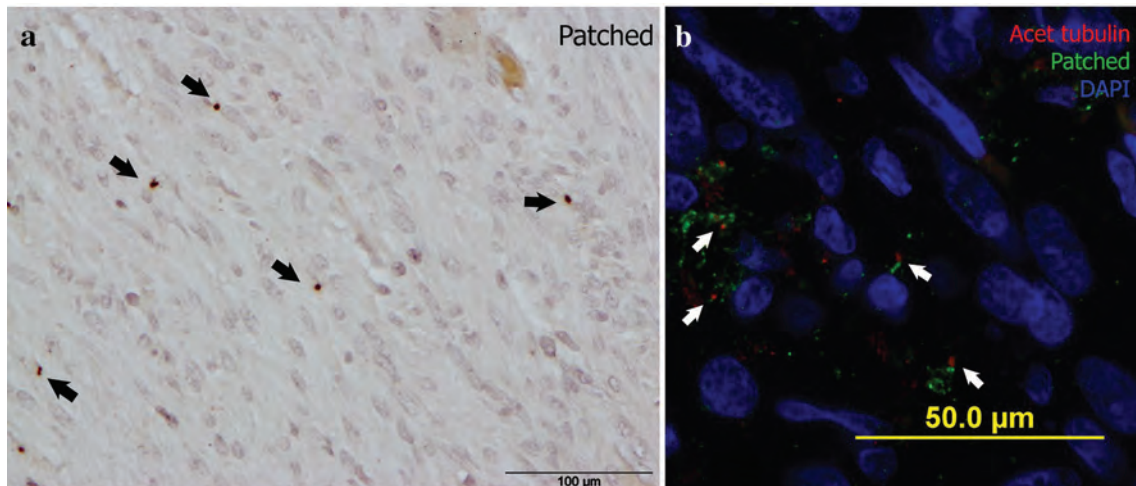


Fig. 5 Immunolabelling for Patched and its relation with primary cilia. **a** Punctiform Patched staining is located near nuclei (arrows). **b** Co-localisation of Acetylated-tubulin (labelling primary cilia axo-

neme; red) and Patched (green). Patched is not located in axoneme but in basal body (arrows), suggesting that Patched has been bound by the ligand and internalised out from the axoneme membrane

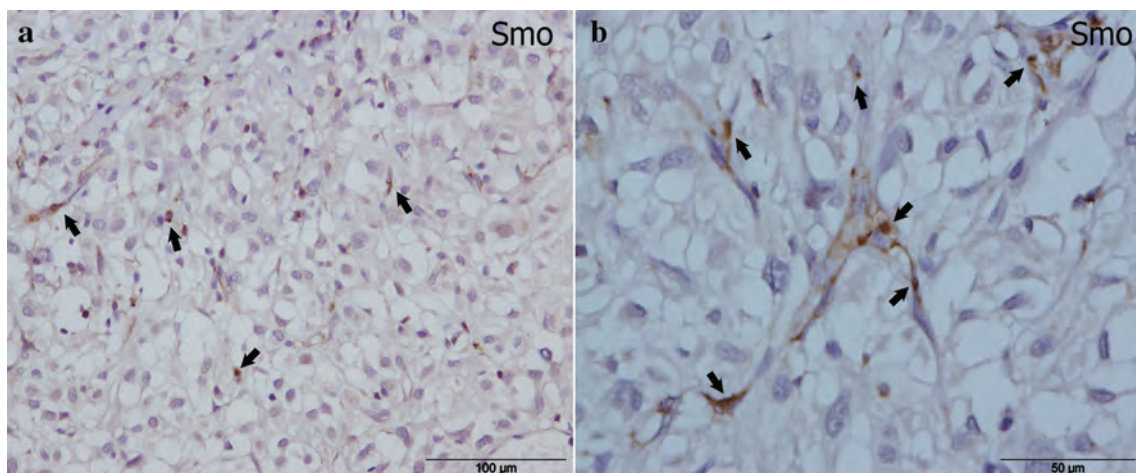


Fig. 6 Immunohistochemistry for Smo. **a** Panoramic view showing GIST cells expressing Smo in precise cell membrane regions and near nuclei (arrows). **b** Detail of immunostaining pattern

transcription of target genes is switched on. Moreover, 3D reconstructions and TEM images give an indisputable idea of the disposition and components of primary cilia, which

sometimes are close or in direct contact with neighbour cells, likely mediating paracrine communication between tumor cells.

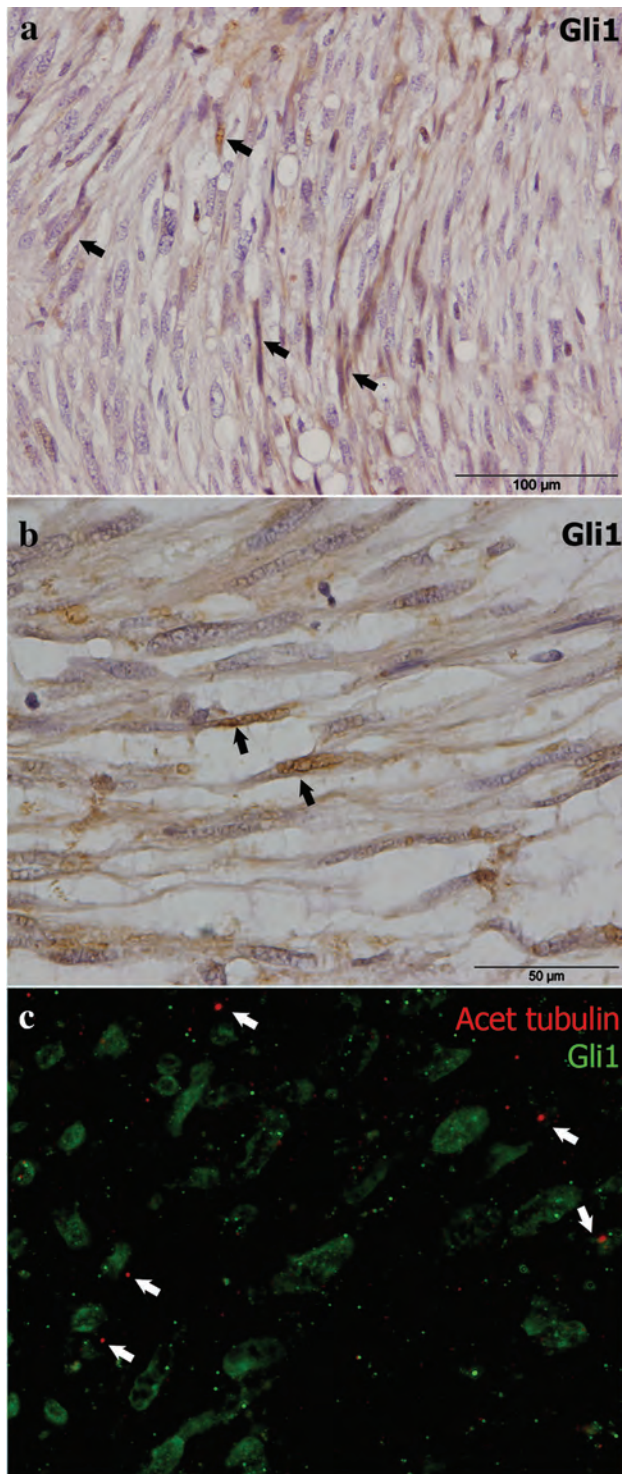


Fig. 7 Immunostaining for Gli1. Gli1-positive cells were heterogeneously presented in GISTs. Cytoplasmic and nuclear staining was detected. The presence of Gli1 in nuclei (arrows) means that Hh pathway is activated. **a** Magnification $\times 200$. **b** Magnification $\times 400$. **c** Co-localisation of Acetylated-tubulin (axoneme marker, in red) and Gli1 (green). Cells co-express a nuclear pattern of Gli1 and primary cilia (arrows) showing a clear relation between this organelle and the Hh signalling pathway activation

Table 1 Relation between Gli1 staining pattern and GIST grade

Case number	Grade	Nuclear staining	Cytoplasmic staining
1	Low	+	++
2	Low	+	++
3	Low	+	+++
4	Low	++	+
5	High	++	++
6	High	++	+
7	High	+++	++
8	High	+	+

Low-grade tumours show a weaker nuclear staining than high-grade tumours while cytoplasmic staining was more intense in low-grade tumours. + weak expression, ++ moderate expression, +++ intense expression

Acknowledgements The authors would like to acknowledge the use of Research Support General Service - SAI, University of Zaragoza and Mario Soriano for his excellent technical support. P.I. was supported during the experimental procedures by a student grant from the *Asociación Española contra el cáncer* (AECC).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Zhao X, Yue C. Gastrointestinal stromal tumor. *J Gastrointest Oncol*. 2012;3:189–208. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2078-6891.2012.031>.
- Foo WC, Liegl-Atzwanger B, Lazar AJ. Pathology of gastrointestinal stromal tumors. *Clin Med Insights Pathol*. 2012;5:23–33.
- Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* (80-). 1998;279:577–80. <https://doi.org/10.1126/science.279.5350.577>.
- Kindblom LG, Remotti HE, Aldenborg F, Meis-Kindblom JM. Gastrointestinal pacemaker cell tumor (GIPACT): gastrointestinal stromal tumors show phenotypic characteristics of the interstitial cells of Cajal. *Am J Pathol*. 1998;152:1259–69.
- Niinuma T, Suzuki H, Sugai T. Molecular characterization and pathogenesis of gastrointestinal stromal tumor. *Transl Gastroenterol Hepatol*. 2018. <https://doi.org/10.21037/tgh.2018.01.02>.
- Miettinen M, Wang ZF, Lasota J. DOG1 antibody in the differential diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: a study of 1840 cases. *Am J Surg Pathol*. 2009;33:1401–8. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3181a90e1a>.
- West RB, Corless CL, Chen X, et al. The novel marker, DOG1, is expressed ubiquitously in gastrointestinal stromal tumors irrespective of KIT or PDGFRA mutation status. *Am J Pathol*. 2004;165:107–13. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63279-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63279-8).

8. Liegl B, Hornick JL, Corless CL, Fletcher CDM. Monoclonal antibody DOG1.1 Shows higher sensitivity than KIT in the diagnosis of gastrointestinal stromal tumors, including unusual subtypes. *Am J Surg Pathol*. 2009;33:437–46. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e318186b158>.
9. Güler B, Imaz F, Tokuç B, et al. Histopathological features of gastrointestinal stromal tumors and the contribution of DOG1 expression to the diagnosis. *Balkan Med J*. 2015;32:388–96. <https://doi.org/10.5152/balkanmedj.2015.15912>.
10. Stanich JE, Gibbons SJ, Eisenman ST, et al. Anol1 as a regulator of proliferation. *Am J Physiol Liver Physiol*. 2011;301:G1044–G10511051. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00196.2011>.
11. Ruppertsburg CC, Hartzell HC. The Ca²⁺-activated Cl⁻ channel ANO1/TMEM16A regulates primary ciliogenesis. *Mol Biol Cell*. 2014;25:1793–807. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-10-0599>.
12. Simon S, Grabellus F, Ferrera L, et al. DOG1 regulates growth and IGFBP5 in gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res*. 2013;73:3661–700. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3839>.
13. Berglund E, Akcakaya P, Berglund D, et al. Functional role of the Ca²⁺-activated Cl⁻ channel DOG1/TMEM16A in gastrointestinal stromal tumor cells. *Exp Cell Res*. 2014;326:315–25. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.05.003>.
14. Malicki JJ, Johnson CA. The cilium: cellular antenna and central processing unit. *Trends Cell Biol*. 2017;27:126–40. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.08.002>.
15. Garcia-Gonzalo FR, Reiter JF. Open sesame: how transition fibers and the transition zone control ciliary composition. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028134>.
16. Braun DA, Hildebrandt F. Ciliopathies. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028191>.
17. Pala R, Alomari N, Nauli SM. Primary cilium-dependent signaling mechanisms. *Int J Mol Sci*. 2017. <https://doi.org/10.3390/ijms18112272>.
18. Wheway G, Nazlamova L, Hancock JT. Signaling through the primary cilium. *Front Cell Dev Biol*. 2018;6:1–13. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00008>.
19. Mitchison HM, Valente EM. Motile and non-motile cilia in human pathology: from function to phenotypes. *J Pathol*. 2017;241:294–309. <https://doi.org/10.1002/path.4843>.
20. Amakye D, Jagani Z, Dorsch M. Unraveling the therapeutic potential of the Hedgehog pathway in cancer. *Nat Med*. 2013;19:1410–22. <https://doi.org/10.1038/nm.3389>.
21. Chahal KK, Parle M, Abagyan R. Hedgehog pathway and smoothed inhibitors in cancer therapies. *Anticancer Drugs*. 2018. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000609>.
22. Scales SJ, De Sauvage FJ. Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. *Trends Pharmacol Sci*. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.03.007>.
23. Ramsbottom SA, Pownall ME, Roelink H, Conway SJ, Europe PMC Funders Group. Regulation of hedgehog signalling inside and outside the cell. *J Dev Biol*. 2016. <https://doi.org/10.3390/jdb4030023>.
24. Rohatgi R, Milenkovic L, Scott MP. Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science* (80-). 2007;317:372–6. <https://doi.org/10.1126/science.1139740>.
25. Yoshizaki A, Nakayama T, Naito S, et al. Expressions of sonic hedgehog, patched, smoothed and Gli-1 in human intestinal stromal tumors and their correlation with prognosis. *World J Gastroenterol*. 2006;12:5687–91.
26. Tang C-M, Lee TE, Syed SA, et al. Hedgehog pathway dysregulation contributes to the pathogenesis of human gastrointestinal stromal tumors via GLI-mediated activation of KIT expression. *Oncotarget*. 2016;7:78226–41.
27. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012;9:676–82. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.
28. Castiella T, Muñoz G, Luesma MJ, et al. Primary cilia in gastric gastrointestinal stromal tumours (GISTs): an ultrastructural study. *J Cell Mol Med*. 2013;17:844–53. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12067>.
29. Dvorak J, Sitorova V, Nikolov DH, et al. Primary cilia in gastrointestinal stromal tumors. *Neoplasma*. 2014;61:305–8. https://doi.org/10.4149/neo_2014_039.
30. Junquera C, Cantarero I, Luesma MJ, et al. The primary cilium: a relevant characteristic in interstitial cells of rat duodenum enteric plexus. *Histol Histopathol*. 2011;26:461–70.
31. Junquera C, Castiella T, Muñoz G, et al. Biogenesis of a new type of extracellular vesicles in gastrointestinal stromal tumors: ultrastructural profiles of spherosomes. *Histochem Cell Biol*. 2016;146:557–67. <https://doi.org/10.1007/s00418-016-1460-5>.
32. Seeger-Nukpezah T, Little JL, Serzhanova V, Golem EA. Cilia and cilia-associated proteins in cancer. *Drug Discov Today Dis Mech*. 2013;10:e135–e142142. <https://doi.org/10.1016/j.ddmec.2013.03.004>.
33. Yasar B, Linton K, Slater C, Byers R. Primary cilia are increased in number and demonstrate structural abnormalities in human cancer. *J Clin Pathol*. 2016;52:286–8. <https://doi.org/10.1136/jclinpath>.
34. Hassounah NB, Nagle R, Saboda K, et al. Primary cilia are lost in preinvasive and invasive prostate cancer. *PLoS ONE*. 2013;8:1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068521>.
35. Han YG, Kim HJ, Dlugosz AA, et al. Dual and opposing roles of primary cilia in medulloblastoma development. *Nat Med*. 2009;15:1062–5. <https://doi.org/10.1038/nm.2020>.
36. Wong SY, Seol AD, So PL, et al. Primary cilia can both mediate and suppress Hedgehog pathway-dependent tumorigenesis. *Nat Med*. 2009;15:1055–61. <https://doi.org/10.1038/nm.2011>.
37. Guen VJ, Chavarria TE, Kröger C, et al. EMT programs promote basal mammary stem cell and tumor-initiating cell stemness by inducing primary ciliogenesis and Hedgehog signaling. *Proc Natl Acad Sci*. 2017. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711534114>.
38. Qi Y, Zhao W, Wang Z, et al. Cross regulation of signaling pathways in gastrointestinal stromal tumor. *Oncol Lett*. 2018;16:6770–6. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9494>.
39. Saponara M, Urbini M, Astolfi A, et al. Molecular characterization of metastatic exon 11 mutant gastrointestinal stromal tumors (GIST) beyond KIT/PDGFRalpha genotype evaluated by next generation sequencing (NGS). *Oncotarget*. 2015;6:1–15. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6278>.
40. Cain JE, Islam E, Haxho F, et al. GLI3 repressor controls functional development of the mouse ureter. *J Clin Investig*. 2011;121:1199–206. <https://doi.org/10.1172/JCI45523>.
41. Pelczar P, Zibat A, Van Dop WA, et al. Inactivation of patched1 in mice leads to development of gastrointestinal stromal-like tumors that express Pdgfr but not kit. *Gastroenterology*. 2013;144:134–44. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.09.061>.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**STROMAL CELLS OF GIANT CELL TUMOUR OF BONE SHOW
PRIMARY CILIA**

Journal:	<i>Microscopy Research and Technique</i>
Manuscript ID	MRT-21-195.R2
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	04-Sep-2021
Complete List of Authors:	Castiella, Tomás; Aragon Health Sciences Institute Iruzubieta, Pablo; University of Zaragoza Faculty of Medicine, Human Anatomy and Histology Monleon, Eva; University of Zaragoza Faculty of Medicine, Human Anatomy and Histology Cardiel, M ^a José; Lozano Blesa University Clinical Hospital, Pathology Gómez-Vallejo, Jesús; Lozano Blesa University Clinical Hospital, Orthopaedics Monzón, Marta; University of Zaragoza Faculty of Medicine, Human Anatomy and Histology Junquera Escribano, Concepcion; University of Zaragoza Faculty of Medicine, Human Anatomy and Histology
Classifications:	transmission electron microscopy < ELECTRON MICROSCOPY, fluorescence microscopy < LIGHT MICROSCOPY
Keywords:	Giant Cell Tumor of Bone, Ultrastructure, Primary cilia, Hh signaling pathway

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3 **STROMAL CELLS OF GIANT CELL TUMOR OF BONE SHOW PRIMARY CILIA**
4
5 **PRIMARY CILIA IN GIANT CELL TUMOR OF BONE**
6

7 Tomás Castiella MD, PhD^{1(*)}, Pablo Iruzubieta MD^{2(*)}, Eva Monleón PhD²,
8
9 M^a José Cardiel MD¹, Jesús Gómez-Vallejo MD³, Marta Monzón PhD², M^a Concepción
10
11 Junquera PhD²
12
13
14

15
16 *1 Department of Pathology, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa*

17
18 *2 Department of Human Anatomy and Histology, Faculty of Medicine, University of Zaragoza*

19
20 *3 Department of Traumatology and Orthopaedic Surgery, Hospital Clínico Universitario Lozano*
21
22 *Blesa*

23
24 *(*)TC and PI are first co-authors*

25
26 *Institute for Health Research Aragón (IIS), Domingo Miral s/n, 50009 Zaragoza, Spain*
27
28

29
30
31 ***Corresponding Author: Pablo Iruzubieta, pablo.iruzubieta@hotmail.es***

32
33 *Phone: 00 34 976 761674*
34
35
36
37
38
39

40 **ORCID:**

41
42 Tomás Castiella: 0000-0001-7453-2470

43
44 Pablo Iruzubieta: 0000-0003-0331-6222

45
46 Eva Monleón: 0000-0002-7453-1766

47
48 Marta Monzón: 0000-0002-2787-9671

49
50
51 Concepción Junquera: 0000-0002-9951-107
52
53
54
55
56
57
58
59
60

ABSTRACT

Giant cell tumor of bone (GCTB) is a locally aggressive primary bone neoplasm composed by tumoral stromal cells and reactive monocytic/histiocytic cells that fuse to form osteoclast-like multinucleated cells. Recently, specific histone 3.3 mutations have been demonstrated in stromal cells of GCTB. Many of the pathways related to bone proliferation and regulation depend on the primary cilium, a microtubule-based organelle which projects outside the cell and acts as a sensorial antenna. In the present work, we aimed to study the presence and role of primary cilia in GCTB.

Ultrastructural, immunohistochemical and immunofluorescence studies were performed in order to demonstrate that the primary cilium is located in spindle-shaped stromal cells of GCTB. Moreover, we showed Hh signalling pathway activation in these cells. Hence, primary cilia may play a relevant role in GCTB tumorigenesis through Hh signalling activation in stromal cells.

Keywords: Giant cell tumor of bone, ultrastructural study, primary cilium, Hh signalling pathway

Research highlights

- Transmission electron microscopy allows to describe and differentiate cellular subpopulations in Giant Cell Tumor of Bone.
- The primary cilium is present in some tumoral Stromal Cells of Giant Cell Tumor of Bone.
- Hedgehog signalling is activated in these cells.

1. INTRODUCTION

According to the World Health Organisation (WHO) definition, giant cell tumor of bone (GCTB) is a locally aggressive primary bone neoplasm composed of proliferative mononuclear stromal cells (SCs), numerous reactive macrophages and large osteoclast-like multinucleated giant cells (GCs) (Athanasou et al., 2013). GCTB usually appears in young adults' metaphysis-epiphysis of long tubular bones. Although malignant transformation in GCTB is uncommon, pulmonary metastasis have been occasionally described (Athanasou et al., 2013).

Two mixed mononuclear cell types are present in the GCTB: monocyte-macrophage CD14+/CD68+ cells and SCs (Wülling et al., 2003). Nowadays, it is accepted that SCs represent the proliferative tumoral component of the GCTB; meanwhile, reactive multinucleated GCs are originated from blood monocytes recruited into the tumoral tissue (Wülling et al., 2003; Kim et al., 2012;). Recently, the mutation G34W in Histone H3 has been proved as a useful diagnostic marker of SC in GCTB (Cleven et al., 2015).

Previous ultrastructural studies dealing with GCTB have been focused on characterization of mononuclear cells and their osteoblastic or osteoclastic differentiation (Aparisi et al., 1977; Anazawa et al., 2006; Garcia et al., 2013). Furthermore, ultrastructural similarities between GCTB giant cells with physiological osteoclasts and with multinucleated GCs in lesions that mimic GCTB have been also reported (Anazawa et al., 2006).

The primary cilium is a microtubular non-motile structure composed of a 9+0 axoneme originated from a modified centriole which projects to the extracellular medium (Malicki & Johnson, 2017). Its presence in skeletal cells was detected almost 50 years ago (Tonna & Lampen, 1972). The potential role that this organelle may play in bone development and homeostasis was proposed in the early 21st century (Whitfield, 2003). However, there is increasing evidence that primary cilia-dependent signalling

1
2
3 pathways, like Hedgehog (Hh) ~~and Wnt~~, play a crucial role in regulating mammalian
4 bone development and turnover (Day & Yang, 2008). Thus, Hh pathway activation is
5 necessary for Runx2 expression, a transcription factor essential for correct osteoblast
6 differentiation (Rutkovskiy et al., 2016).
7
8
9
10

11
12 Three Hh ligands have been described: Sonic (Shh), Indian (Ihh) and Desert (Dhh)
13 (Ramsbottom & Pownall, 2016). Ihh has been mainly involved in bone formation (Yang
14 et al., 2015). When these ligands bind the transmembrane receptor Patched (located in
15 the ciliary membrane), it is removed from primary cilia, allowing Smo entrance in ciliary
16 axoneme. Then, Gli proteins are activated and translocated into the cellular nucleus,
17 where they promote target gene transcription (including Runx2) (Chahal et al., 2018).
18 Hh activation enhances expression of genes related to proliferation, angiogenesis or
19 epithelial-mesenchymal transition (Chahal et al., 2018). Thus, excessive Hh signalling
20 activation leads tumor formation and maintenance of cancer stem cells (Chahal et al.,
21 2018). Moreover, ciliary proteins, including Arl13b, have been shown to be essential in
22 Hh signalling and in its oncogenic implications (Larkins et al., 2011; Bay et al., 2018).
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35

36 Here, we show for the first time that SCs of GCTB present primary cilia. This finding
37 might have important implications in these tumors through Hh signalling pathway
38 activation.
39
40
41
42
43
44
45

46 2. METHODS

47
48 Six GCTB samples biopsied from patients were included in the present study. All
49 samples were provided by the *Hospital Clínico Lozano Blesa* from Zaragoza. All the
50 protocols developed were approved by the Human Research Ethics Committee of
51 Aragon (CEICA) and were in accordance with Helsinki Declaration.
52
53
54
55
56
57
58

59 2.1. Electron Microscopy

1
2
3 A piece of every tumor consisting of 2.5x2.5mm was immersed in 2.5% glutaraldehyde
4 for fixation for 4-6h. The samples were washed in PB, post-fixed with 2% osmium,
5 rinsed, dehydrated in graded ethanol, stained with 2% uranyl-acetate, cleared in
6 propylene oxide and embedded in araldite (Durcupan, Fluka). Serial semi-thin sections
7 (1.5µm) were cut and lightly stained with 1% toluidine blue. Later, ultrathin (0.08µm)
8 sections were cut with a diamond knife, collected on Formvar coated single-slot grids,
9 counter-stained with 1% uranyl acetate and Reynold's lead citrate for 10 minutes. They
10 were examined by a JEOL-JEM-1010 transmission electron microscope (TEM). The
11 images were captured with Gatan Bioscan Camera with pixel size 6.45µm x 6.45µm
12 and spatial resolution of 1024, 1024, 1, 1 (x, y, z, t) and automatic gain (assigning a
13 brightness value to each pixel depending on the clearest and the darkest intensity in
14 every image and highlighting electron density contrast).

2.2. Immunohistochemistry

32 Samples were processed according to standard histological procedures and stained
33 with hematoxylin and eosin (H&E). Immunohistochemical staining was performed on
34 formalin-fixed paraffin-embedded 4-µm thick sections. All immunohistochemical
35 products except primary antibody were obtained from DAKO (Denmark). Primary
36 antibodies used in this study were: monoclonal rabbit anti-Histone H3.3 G34W (2.5
37 µg/mL, Quimigen S.L., 31-1145-00, Madrid, Spain), polyclonal rabbit anti-Gli1 (1:200,
38 ABCAM, ab49314, Cambridge, UK), polyclonal rabbit anti-Smo (1:1000, LS Bioscience,
39 LS-B4911, Seattle, USA) and polyclonal goat anti-Patched (1:100, Santa Cruz, sc-
40 6149, Dallas, USA). Tissue sections were deparaffinised and hydrated using routine
41 methods and then subjected to heat-induced antigen retrieval. For Gli1 and Smo, buffer
42 citrate pH6 was used and the samples were treated during 6 minutes in an 800-W
43 microwave and at 360 W for 5 additional minutes. For H3.3 G34W and Patched
44 staining, samples were treated at 96°C for 20 min in EnVision™ FLEX Target Retrieval
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 solution High pH. Endogenous peroxidase was blocked for 30 minutes and sections
4 were washed in distilled water and PBS 3 min, twice.
5
6
7

8 Afterwards, sections were incubated with primary antibodies at 4°C overnight in a
9 humidified chamber, washed in PBS three times and incubated with secondary
10 antibody Rabbit-Mouse Labelled Polymer-Dako EnVision-HRP or Polyclonal Rabbit
11 Anti-Goat Immunoglobulins/HRP (1:200) for 1 hour. 3,3'-diaminobenzidine was used as
12 chromogen. The samples were washed twice in distilled water, contrasted with Mayer's
13 hematoxylin for 7 min, washed in tap water for 15 min, dehydrated in a graded series of
14 ethanol, cleared in xylene and cover slipped with Eukitt.
15
16
17
18
19
20
21
22

23 Negative controls where based on samples where no primary antibody was added. All
24 antibodies were commercial and supposedly validated.
25
26
27

28 All samples were analysed and digital images from representative areas were captured
29 by Olympus BX53 and Olympus UIS UPLFLN Series objectives. FN: 26.5. 20x AN 0.5
30 and 40x AN 0.75. Images were captured with Olympus DP72 Digital Camera. Pixel size
31 6.45µm x 6.45µm, total number of pixel 1.5 million. Exposition mode: SFL Auto and
32 spatial resolution of 4140x3096x1x1 (x, y, z, t).
33
34
35
36
37
38
39
40

41 2.3. Double Immunofluorescence Microscopy

42 Formalin-fixed paraffin-embedded tissues were deparaffinised and hydrated. Then,
43 antigen retrieval was performed at 96°C for 20 min in EnVision™ FLEX Target
44 Retrieval solution High pH. Sections were incubated overnight at 4°C with the following
45 antibodies: mouse-monoclonal anti-Acetylated tubulin (1:4000, Sigma Aldrich, T7451;
46 St. Louis, MO, USA), mouse monoclonal anti-Arl13b (1:50, Proteintech, 66739-1-Ig,
47 Manchester, UK) and rabbit-monoclonal anti-Histone H3.3 G34W (2.5 µg/mL, Quimigen
48 S.L., 31-1145-00, Madrid, Spain). They were washed in PBS and incubated with the
49 respective secondary antibodies: anti-Mouse AlexaFluor594 (1:1000, ThermoFisher
50 R37115; Waltham, MA, USA) and anti-Rabbit AlexaFluor488 (1:1000, ThermoFisher A-
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

21206; Waltham, MA, USA) for 1 hour at RT. Incubations were performed in a dark humidified chamber. After washing in PBS, DAPI (1 µg/mL, Sigma-Aldrich) was added for 1 minute for nuclei counterstaining. Sections were washed in PBS and covered with DAKO Fluorescence mounting medium.

All antibodies were commercial and supposedly validated.

Images were analysed using the following filters: U-MNUA2 for DAPI, U-MWIABA2 for Alexa Fluor 488 and U-MWIG2 for Alexa Fluor 594 in a Olympus BX53 microscope and Olympus UIS UPLFLN Series objectives. FN: 26.5. 20x AN 0.5 and 40x AN 0.75. Images were captured with Olympus DP72 Digital Camera. Pixel size 6.45µm x 6.45µm, total number of pixel 1.5 million. Exposition mode: Auto and spatial resolution of 4080x3072x1x1 (x, y, z, t). Images were analysed with DP Controller Software. Every fluorescent channel was individually photographed and channels were merged using FIJI Image_J software, where contrast and brightness were adjusted (Schindelin et al., 2012).

Statistical analyses were performed counting ciliated cells per High Power Field (HPF = x400) and using a non parametric test (Mann-Whitney U). Hence, representative areas were analysed (total of 18 images). In each HPF, between 70 and 100 mononuclear cells were present while the number of giant cells ranges from 0 to 7.

3. RESULTS

3.1. Preliminary histological study.

Histopathological techniques routinely confirmed the diagnosis of GCTB (Fig.1). Thus, H&E revealed the presence of multinuclear GCs scattered among mononuclear cells (Fig.1a). CD68 antibody labelled mononuclear histiocytic cells and multinucleated GCs (Fig.1b) while Histone H3.3 mutation G34W antibody labelled tumoral SCs (Fig.1c). Ki67 was exclusively expressed by mononuclear cells (Fig.1d).

3.2. GCTB ultrastructural findings

Electron microscopy examination evidenced two well-defined groups: mononuclear and multinucleated giant cells. In turn, mononuclear cells included two different phenotypes based on cytoplasm electrondensity and nuclear chromatin condensation. Thus, histiocytic cells showed lesser electrondensity and homogenous chromatin, while SCs cytoplasm were more electrondense and their nuclei showed condensed chromatin constituting marginal clusters in contact with nuclear envelope (Fig.2a).

SC morphology varied from fusiform-spindle to oval. They showed fine membrane prolongations contacting neighbour cells (Fig.2b). They presented cytoplasmic electron-light no-membranous inclusions conferring a characteristic vacuolated appearance (Fig.2b). Some mitochondria, scarce granular endoplasmic reticulum and abundant free ribosomes were observed. Centrioles, located near nuclei, showed subdistal appendages and they were related to intermediate filaments and numerous Golgi-derived vesicles (Fig.2c-d). All these findings are suggestive of centriolar activation.

Primary cilia were specifically observed in SCs (Fig.2e-f). Primary ciliogenesis sequentially ordered in Figure 3. Firstly, the ciliary vesicle (constituted by fusion of Golgi-derived vesicles) localizes on the distal pole of the mother centriole, which forms cilia basal body (Fig.3a). Then, the 9+0 axoneme grew from the basal body (Fig. 3b). Occasionally, abnormal duplication of centrioles was evidenced by detection of three centrioles, two of them originating cilia (Fig.3c). Figures 3d and 3e show ultrastructural features corresponding to a primary cilium in its maximum length. Basal body presented subdistal appendages and was anchored to cell membrane by transition fibres. The axoneme was originated from the basal body and it was located in a cell membrane invagination called ciliary pocket, where coated vesicles are concentrated as a sign of important molecular exchange (Fig.3e). In some ciliated cells, nuclei showed characteristic nuclear envelope prolongations (Fig. 3d-e). These nuclear structures have been previously called envelope-limited chromatin sheets (ELCS).

1
2
3 Primary cilia in these cells are originated from no-displaced centrioles and, therefore,
4 goes through the cytoplasm towards the extracellular medium.
5

6
7 The mononuclear histiocytic cells showed a less electron-dense cytoplasm (Fig.4a),
8 with abundant mitochondria, granular endoplasmic reticulum and prominent Golgi
9 apparatus. Although their nuclei showed a diverse morphology, peripheral nucleoli
10 were always found. They presented many lysosomes and fine phagocytic
11 prolongations (Fig.4b). These cells contact each other through cytoplasmic
12 prolongations (Fig.4b). A reduced number of these histiocytic cells showed scarce
13 organelles, abundant ribosomes and multivesicular bodies, all features suggestive of
14 an undifferentiated phenotype (Fig. 4c).
15

16
17 Multinucleated GCs included 10 to 30 nuclei. They showed oval or irregular
18 morphology and an electron light appearance. They presented a fine marginal
19 chromatin contacting nuclear membrane and prominent nucleoli (Fig.4d). Their
20 cytoplasm presented a homogenous distribution of organelles, abundant mitochondria
21 and lipid inclusions (Fig. 4d). Surrounding multinucleated GCs, both, mononuclear
22 histiocytic and stromal cells were located. Although defining dynamic processes from
23 TEM is always difficult, we could observe light undifferentiated histiocytic cells merging
24 with GCs and syncytial membrane disappearance, suggestive of cellular fusion
25 (Fig.4e).
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44

45 Some reactive foam cells plenty of electron lucent vacuoles were also found in these
46 tumors. They were probably involved in phagocytic processes as they showed
47 lysosomes with different content (Fig.4f). Few disperse lymphocytes and granulocytes
48 were also observed, the latter being involved in macropinocytosis processes.
49
50
51
52
53
54

55 3.3. Primary cilia and Hh signalling presence in GCTB

56 Immunofluorescent co-localisation of Histone H3.3 mutation G34W (specific for SCs of
57 GCTB) and Acetylated-tubulin (marker for cilia axoneme) and Arl13b (marker for ciliary
58
59
60

1
2
3 membrane) showed that stromal cells presented primary cilia (Fig. 5, Suppl. Fig. 1).
4
5 Primary cilia were usually located near nuclei, in agreement with electron microscopy
6
7 findings. Quantitative analyses showed that around 7 mononuclear cells per High
8
9 Power Field (x400) were ciliated, which supposed around 10% of mononuclear cells,
10
11 while no multinucleated giant cell presented cilia (Suppl. Fig.2).

12
13 Furthermore, the implications of primary cilia in GCTB were studied by analysis of the
14
15 activation of Hh signalling pathway, a well-known cilia-dependent pathway related to
16
17 tumorigenesis and bone regulation. Immunohistochemical experiments for Hh pathway
18
19 protein Patched, Smo and Gli1 were performed (Suppl. Fig. 3, Fig. 6). Patched (Suppl.
20
21 Fig. 3a) and Smo (Suppl. Fig. 3b) staining were located in paranuclear regions while
22
23 Gli1 labelled subtly but clearly cells nuclei (Fig. 6a-c). Nuclear staining of Gli1 is a sign
24
25 of Hh signalling activation. Thus, these results suggest that Hh signalling pathway is
26
27 present and activated in SCs of GCTB.
28
29
30
31

32 **4. DISCUSSION**

33
34 The nature and cellular components of GCTB have constituted the subject of multiple
35
36 previous studies. Most of them wrongly identified all mononuclear cells as stromal cells
37
38 based on conventional microscopy morphology. However, histochemical and electron
39
40 microscopy techniques shed light on cells identification (Hanaoka et al., 1970; Aparisi
41
42 et al., 1977). In this study we have accurately defined ultrastructural features of the two
43
44 different mononuclear cell populations identified by cytoplasm electrondensity and
45
46 nuclear chromatin condensation. Cells showing lesser electrodensity and homogenous
47
48 chromatin are called histiocytic cells here. The round histiocytic cells previously
49
50 described by other authors may correspond to activated histiocytes with phagocytic
51
52 capacity (Hanaoka et al., 1970; Aparisi et al., 1977). Intermediate phenotypes are
53
54 compatible with resting, activated or prior to giant cell formation stages.
55
56

57
58 The second mononuclear cell type, stromal cells (SCs), show higher electrondensity in
59
60 their cytoplasm and nuclei with condensed chromatin forming marginal clusters in

1
2
3 contact with nuclear envelope. This phenotype corresponds to stromal cells type 1 of
4 Aparisi (Aparisi et al., 1977). However, phenotypic variability appears. Probably, those
5 presenting features suggestive of undifferentiation may suppose cancer stem cells.
6
7 SCs have been defined as immature fibroblasts or primitive osteoblasts. Their close
8
9 histogenic relationship with osteoblasts is based on focal deposition of osteoid seen in
10
11 one third of GCTB (Spjut et al., 1983). Additionally, bone tissue is not only produced by
12
13 reactive osteoblasts but also by SCs (Goldring et al., 1987). According with the results
14
15 provided here, SCs are clearly defined as mesenchymal cells presenting special and
16
17 exclusive ultrastructural features such as presence of large electron-light vacuoles,
18
19 peculiar density of cytoplasm and activation of centrioles. The most novel finding
20
21 provided in the present study is the presence of primary cilia in these cells.
22
23
24
25

26
27 Primary cilia in osteoblasts and osteocytes contributes to bone formation and
28
29 homeostasis (Mitchison & Valente, 2017). Furthermore, the participation of primary cilia
30
31 in different types of cancer of epithelial and mesenchymal line has been demonstrated.
32
33 Nevertheless, the prevalence of cilia on human tumors remains unclear, and their role
34
35 in cancer is just beginning to be explored (Eguether & Hahne, 2018; Fabbri et al.,
36
37 2019). In human osteosarcoma MG63 cell line the number of ciliated cell is significantly
38
39 higher than expected (Kowal & Falk, 2015).
40

41
42 The cilia-dependant Hh signalling pathway plays a key role in both bone physiology
43
44 and pathology. Thus, it is essential for temporal and spatial regulation of bone
45
46 remodelling (Rodda, 2006; Yang et al., 2015). Moreover, Hh signalling pathway
47
48 (especially through the Ihh ligand) stimulates intramembranous and endochondral
49
50 ossification, bone turnover and remodelling of fractures sites (Yang et al., 2015).
51

52
53 The deregulation of Hh signalling pathway has been linked to some skeletal
54
55 development diseases (Rodda, 2006; Yang et al., 2015) and tumors (Scales & de
56
57 Sauvage, 2009). Furthermore, Hh signalling pathway in osteosarcoma was related to
58
59 radio-resistance and invasiveness (Qu et al., 2018). Interestingly, the ciliary membrane
60

1
2
3 protein Arl13b plays an essential role in tumoral Hh signalling through primary cilia
4
5 (Bay et al., 2018).

6
7 Here, we show Hh pathway activation in some SCs. These results are in accordance
8
9 with Horvai et al. (2012) where 10% of mononucleated cells expressed Ihh (we found a
10
11 similar proportion of ciliated cells, as it is described above). Besides, Horvai et al. also
12
13 showed that GCTB stromal cells expressed Runx2 (Horvai et al., 2012), a well-known
14
15 downstream target of Hh signalling pathway (Rutkovskiy et al., 2016).

16
17 The observation of primary cilia and Hh pathway activation in SCs suggests their role in
18
19 cellular signalling and tumorigenesis. Moreover, some ciliated SCs showed envelope-
20
21 limited chromatin sheets (ELCS), a structure described in cancer and stem cells (Olins
22
23 & Olins, 2009; Cebrián-Silla et al., 2017). These findings suggest that primary cilia may
24
25 play an important role in quiescent cancer stem cells of GCTB. This feature would
26
27 explain why only a specific population of stromal cells show primary cilia and Hh
28
29 activation and they are not constitutively present in every stromal cell. Moreover, the
30
31 dynamic nature of cilia assembly and Hh signalling must be taken into account while
32
33 the techniques performed in this paper are mainly static.

34
35 In conclusion, our study reveals that SCs of GCTB present primary cilia. Moreover, we
36
37 proved that Hh signalling pathway is activated in these cells, showing that primary cilia
38
39 may play an important role in GCTB tumorigenesis and could be consequently used
40
41 as a potential therapeutic target.
42
43
44
45
46

47 **5. DECLARATIONS**

48
49 **Funding.** No funding was specifically received for the experiments showed in this
50
51 paper.

52
53 **Competing interests.** The authors declare that they have no conflict of interest.

54
55 **Ethics approval and consent declarations.** All protocols and consents developed
56
57 were approved by the Human Research Ethics Committee “*Comité Ético de*
58
59 *Investigación Clínica de Aragón*”.
60

1
2
3 **Authors contribution.** TC conceived the study, performed ultrastructural experiments
4 and contributed to write the manuscript, PI performed immunohistochemical and
5 immunofluorescence studies and contributed to write the manuscript, EM performed
6 immunohistochemical experiments. MJC and JGV provided the samples. MM
7 contributed to write the manuscript. CJ conceived and supervised the study, performed
8 ultrastructural experiments, analysed the results and contributed to write the
9 manuscript.

10
11
12
13
14
15
16
17
18 **Acknowledgements:** Authors would like to acknowledge the use of *Servicio General*
19 *de Apoyo a la Investigación- SAI, Universidad de Zaragoza.*

20 21 22 23 24 **6. REFERENCES**

- 25
26
27
28 Anazawa, U., Hanaoka, H., Shiraishi, T., Morioka, H., Morii, T., & Toyama, Y. (2006).
29 Similarities between giant cell tumor of bone, giant cell tumor of tendon sheath,
30 and pigmented villonodular synovitis concerning ultrastructural cytochemical
31 features of multinucleated giant cells and mononuclear stromal cells.
32 *Ultrastructural Pathology*, 30(3), 151–158.
33 <https://doi.org/10.1080/01913120600689707>
- 34 Aparisi, T., Arborgh, B., & Ericsson, J. L. (1977). Giant cell tumor of bone: detailed fine
35 structural analysis of different cell components. *Virchows Archiv. A, Pathological*
36 *Anatomy and Histology*, 376(4), 273–298.
37 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/145722>
- 38 Athanasou, N., Bansal, M., Forsyth, R., Reid, R., & Z, S. (2013). Giant Cell Tumour of
39 Bone. In C. Fletcher, J. Bridge, P. Hogendoorn, & F. Mertens (Eds.), *WHO*
40 *Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone* (pp. 321–324). IARC.
- 41 Bay, S. N., Long, A. B., & Caspary, T. (2018). Disruption of the ciliary GTPase Arl13b
42 suppresses Sonic hedgehog overactivation and inhibits medulloblastoma
43 formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*
44 *of America*, 115(7), 1570–1575. <https://doi.org/10.1073/pnas.1706977115>
- 45 Cebrián-Silla, A., Alfaro-Cervelló, C., Herranz-Pérez, V., Kaneko, N., Park, D. H.,
46 Sawamoto, K., Alvarez-Buylla, A., Lim, D. A., & García-Verdugo, J. M. (2017).
47 Unique Organization of the Nuclear Envelope in the Post-natal Quiescent Neural
48 Stem Cells. *Stem Cell Reports*, 9(1), 203–216.
49 <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.05.024>
- 50 Chahal, K. K., Parle, M., & Abagyan, R. (2018). Hedgehog pathway and smoothed
51 inhibitors in cancer therapies. *Anti-Cancer Drugs*, 29(5), 387–401.
52 <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000609>
- 53 Cleven, A. H. G., Höcker, S., Briaire-De Bruijn, I., Szuhai, K., Cleton-Jansen, A. M., &
54 Bovée, J. V. M. G. (2015). Mutation analysis of H3F3A and H3F3B as a diagnostic
55 tool for giant cell tumor of bone and chondroblastoma. *American Journal of*
56 *Surgical Pathology*, 39(11), 1576–1583.
57 <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000512>
- 58 Day, T. F., & Yang, Y. (2008). Wnt and hedgehog signaling pathways in bone
59
60

- development. *Journal of Bone and Joint Surgery - Series A*, 90(SUPPL. 1), 19–24. <https://doi.org/10.2106/JBJS.G.01174>
- Eguether, T., & Hahne, M. (2018). Mixed signals from the cell's antennae: primary cilia in cancer. *EMBO Reports*, 19(11), e46589. <https://doi.org/10.15252/embr.201846589>
- Fabbri, L., Bost, F., & Mazure, N. (2019). Primary Cilium in Cancer Hallmarks. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6), 1336. <https://doi.org/10.3390/ijms20061336>
- Garcia, R. A., Platica, C. D., Alba Greco, M., & Steiner, G. C. (2013). Myofibroblastic differentiation of stromal cells in giant cell tumor of bone: An immunohistochemical and ultrastructural study. *Ultrastructural Pathology*, 37(3), 183–190. <https://doi.org/10.3109/01913123.2012.756092>
- Goldring, S. R., Roelke, M. S., Petrisson, K. K., & Bhan, A. K. (1987). Human giant cell tumors of bone. Identification and characterization of cell types. *Journal of Clinical Investigation*, 79(2), 483–491. <https://doi.org/10.1172/JCI112838>
- Hanaoka, H., Friedman, B., & Mack, R. P. (1970). Ultrastructure and histogenesis of giant-cell tumor of bone. *Cancer*, 25(6), 1408–1423. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197006\)25:6<1408::aid-cnrcr2820250622>3.0.co;2-#](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197006)25:6<1408::aid-cnrcr2820250622>3.0.co;2-#)
- Horvai, A. E., Roy, R., Borys, D., & O'Donnell, R. J. (2012). Regulators of skeletal development: A cluster analysis of 206 bone tumors reveals diagnostically useful markers. *Modern Pathology*, 25(11), 1452–1461. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2012.110>
- Kim, Y., Nizami, S., Goto, H., & Lee, F. Y. (2012). Modern interpretation of giant cell tumor of bone: Predominantly osteoclastogenic stromal tumor. *Clinics in Orthopedic Surgery*, 4(2), 107–116. <https://doi.org/10.4055/cios.2012.4.2.107>
- Kowal, T. J., & Falk, M. M. (2015). Primary cilia found on HeLa and other cancer cells. *Cell Biology International*, 39(11), 1341–1347. <https://doi.org/10.1002/cbin.10500>
- Larkins, C. E., Gonzalez Aviles, G. D., East, M. P., Kahn, R. A., & Caspary, T. (2011). Arl13b regulates ciliogenesis and the dynamic localization of Shh signaling proteins. *Molecular Biology of the Cell*, 22(23), 4694–4703. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-12-0994>
- Malicki, J. J., & Johnson, C. A. (2017). The Cilium: Cellular Antenna and Central Processing Unit. *Trends in Cell Biology*, 27(2), 126–140. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.08.002>
- Mitchison, H. M., & Valente, E. M. (2017). Motile and non-motile cilia in human pathology: from function to phenotypes. *Journal of Pathology*, 241(2), 294–309. <https://doi.org/10.1002/path.4843>
- Olins, D. E., & Olins, A. L. (2009). Nuclear envelope-limited chromatin sheets (ELCS) and heterochromatin higher order structure. *Chromosoma*, 118(5), 537–548. <https://doi.org/10.1007/s00412-009-0219-3>
- Qu, W., Li, D., Wang, Y., Wu, Q., & Hao, D. (2018). Activation of Sonic Hedgehog Signaling Is Associated with Human Osteosarcoma Cells Radioresistance Characterized by Increased Proliferation, Migration, and Invasion. *Medical Science Monitor*, 24, 3764–3771. <https://doi.org/10.12659/MSM.908278>
- Ramsbottom, S., & Pownall, M. (2016). Regulation of Hedgehog Signalling Inside and Outside the Cell. *Journal of Developmental Biology*, 4(3), 23. <https://doi.org/10.3390/jdb4030023>
- Rodda, S. J. (2006). Distinct roles for Hedgehog and canonical Wnt signaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast progenitors. *Development*, 133(16), 3231–3244. <https://doi.org/10.1242/dev.02480>
- Rutkovskiy, A., Stensløkken, K.-O., & Vaage, I. J. (2016). Osteoblast Differentiation at a Glance. *Medical Science Monitor Basic Research*, 22, 95–106. <https://doi.org/10.12659/MSMBR.901142>
- Scales, S. J., & de Sauvage, F. J. (2009). Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. *Trends in Pharmacological*

- 1
2
3 *Sciences*, 30(6), 303–312. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.03.007>
- 4 Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T.,
5 Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J., White, D. J.,
6 Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-
7 source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682.
8 <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- 9 Spjut, H., Dorfman, H. D., Robert E., F., & Lauren V., A. (1983). *Atlas of tumor*
10 *pathology. Tumors of bone and cartilage*. (1983), Armed Forces Institute of
11 Pathology.
- 12 Tonna, E. A., & Lampen, N. M. (1972). Electron microscopy of aging skeletal cells. I.
13 Centrioles and solitary cilia. *Journal of Gerontology*, 27(3), 316–324.
14 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5046597>
- 15 Whitfield, J. F. (2003). Primary cilium - Is it an osteocyte's strain-sensing flowmeter?
16 *Journal of Cellular Biochemistry*, 89(2), 233–237.
17 <https://doi.org/10.1002/jcb.10509>
- 18 Wülling, M., Delling, G., & Kaiser, E. (2003). The Origin of the Neoplastic Stromal Cell
19 in Giant Cell Tumor of Bone. *Human Pathology*, 34(10), 983–993.
20 [https://doi.org/10.1053/S0046-8177\(03\)00413-1](https://doi.org/10.1053/S0046-8177(03)00413-1)
- 21 Yang, J., Andre, P., Ye, L., & Yang, Y. Z. (2015). The Hedgehog signalling pathway in
22 bone formation. *International Journal of Oral Science*, 7(2), 73–79.
23 <https://doi.org/10.1038/ijos.2015.14>
24
25
26
27

28 FIGURE LEGENDS

29
30
31
32
33 **Fig. 1. Histological diagnosis and preliminary study of GCTB.** a) Hematoxylin-
34 Eosin staining shows two cellular types in GCTB: mononuclear and multinuclear giant
35 cells (GC). Some of the mononuclear cells showed a characteristic paranuclear
36 vacuole (arrow). Scale bar = 50µm b) CD68 is a specific marker for monocyte-
37 macrophage lineage. Thus, histiocytic mononuclear cells and giant cells (GC)
38 expressed CD68. Scale bar = 50µm c) Histone H3.3 G34W mutation is a specific
39 marker of the stromal neoplastic cells of GCTB. According to this, only mononuclear
40 cells were stained, some of them expressing paranuclear vacuoles (arrow). Scale bar =
41 50µm d) Immunolabeling for Ki67, marker of cell cycle activation and proliferation,
42 stained uniquely mononuclear cells. Scale bar = 100µm
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55

56 **Fig.2. TEM examination. Ultrastructural features of mononuclear cells of GCTB.**

57 a) Histiocytic (* light) and stromal (dark) cells are the main mononuclear components of
58 GCTB. Scale bar = 5µm b) Stromal cells (SCs) show large paranuclear vacuoles (v).
59
60

1
2
3 Scale bar = 2 μ m c-d) Centriole activation at different stages. Note the numerous small
4 vesicles (vs), subdistal appendages (s) and intermediate filaments (if) in relation with
5 centrioles; features related to centriolar activation. Scale bar = 500nm e) Primary cilia
6 in a SC. Scale bar = 2 μ m f) Magnification of squared area in e. Scale bar = 500nm. ax:
7 axoneme, bb: basal body, v: vacuoles, vs: vesicles, if: intermediate filaments, mt:
8 microtubule, s: subdistal appendages, g: Golgi
9
10
11
12
13
14
15
16
17

18 **Fig.3. TEM examination. Primary cilia in stromal cells of GCTB.** a) At the beginning
19 of ciliogenesis, small vesicles derived from Golgi-apparatus fuse in a ciliary vesicle (cv)
20 which localizes on top of the basal body (bb). Scale bar = 500nm b) Axoneme (ax)
21 originates from basal body and is surrounded by a cell membrane invagination called
22 ciliary pocket (cp). Daughter centriole shows pericentriolar satellites (s). Scale bar =
23 500nm c) Tumoral cells exceptionally showed centriole duplication, with two cilia
24 emerging. Scale bar = 500nm d) SC shows envelope-limited chromatin sheet (elcs)
25 and primary cilium. Scale bar = 1 μ m e) Primary cilium ultrastructural features. Scale
26 bar = 1 μ m. mt: microtubule, if: intermediate filaments, pr: polyribosomes, vs: vesicles,
27 sa: subdistal appendages, s: satellites, arrow: ciliary pocket, black arrowhead:
28 transition fibres, white arrowhead: coated vesicles, bb: basal body, ax: axoneme.
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

43 **Fig.4. TEM examination. Ultrastructural features of reactive cells: histiocytic light**
44 **cells and multinucleated giant cells.** a) Histiocytic cells show less electron-dense
45 cytoplasm than SCs and prominent nucleoli (ni). Scale bar = 2 μ m b) Organelle
46 distribution of histiocytic cells. Ly: lysosomes. Encircled: intercellular contact. Scale bar
47 = 1 μ m c) Detailed area of histiocytic cells organelles showing mitochondria (mt)
48 surrounded by endoplasmic reticula (er) near a multivesicular body (mvp). Scale bar =
49 500nm d) Giant Cells show multiple nuclei with prominent nucleoli (ni). Moreover, its
50 cell membrane shows short prolongations. A stromal cell (SC) appears near the GC.
51 Scale bar = 5 μ m e) A histiocytic cell seems to fuse with GC (arrows point cell
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 membrane disappearance). Scale bar = 5µm f) Foam cells sometimes show lysosomes
4
5 (ly) containing inclusions of different source. Scale bar = 5µm
6
7
8

9 **Fig.5.Stromal cells show primary cilia.** a) Immunofluorescent co-localisation of
10
11 Histone H3.3 G34W mutation in green and Arl13b (ciliary membrane) in red showed
12
13 that some stromal cells present primary cilia. Scale bar = 20µm b-d) Magnification of
14
15 cells showing Histone H3.3 G34W mutation and Arl13b co-localisation.
16
17
18
19

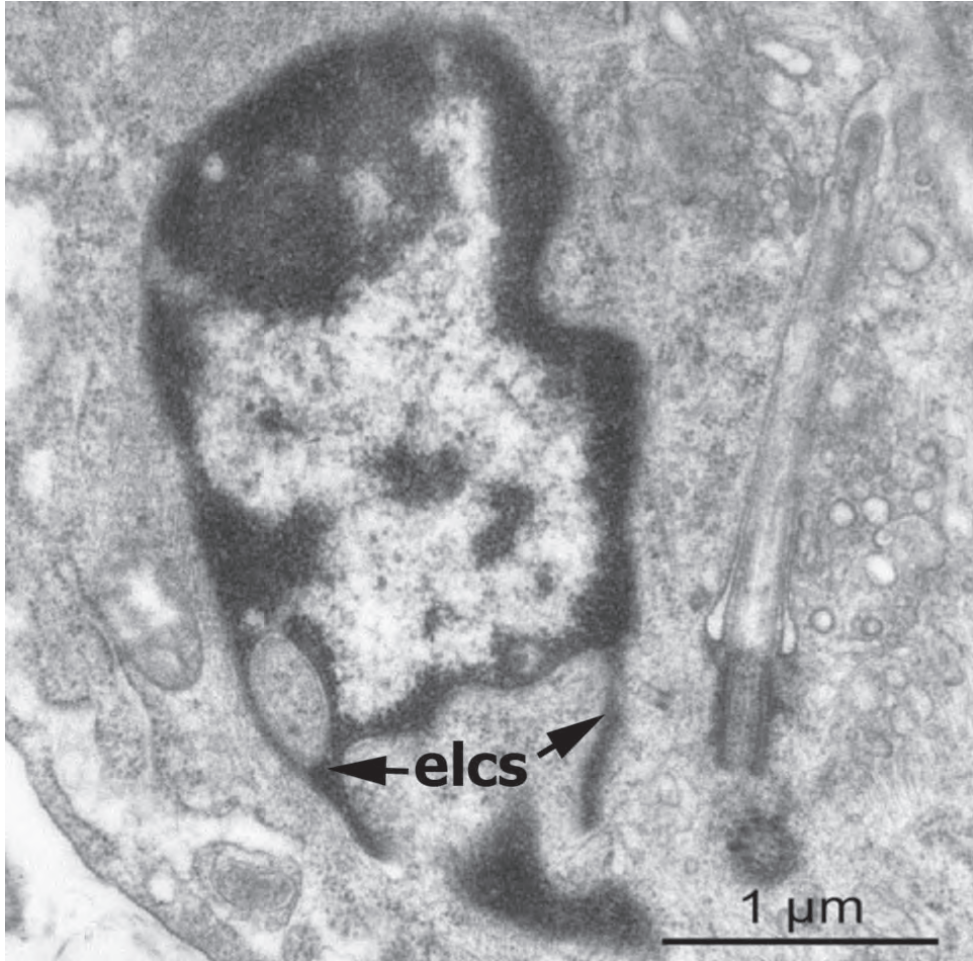
20 **Fig. 6. Immunohistochemical study of Hh pathway activation.** a-c) Nuclear labeling
21
22 of Gli1 was present in some mononuclear cells, showing activation of Hhsignaling
23
24 pathway. GC: Giant Cell. Scale bar = 20µm
25
26
27
28

29 **SupplementaryFig. 1. Immunofluorescence study of primary cilia in SCs GCTB.**
30
31 Co-localisation of Acetylated tubulin (red) and H3.3 G34W (green) give supporting
32
33 evidence of cilia in SCs of GCTB. Scale bar = 50µm
34
35
36
37

38 **Supplementary Fig. 2. Quantitative analysis of primary cilia presence in GCTB**
39
40 **cells.** Number of cells showing primary cilia per High-Power Field (HPF: x400). 18
41
42 representative images were analysed in total. In each HPF, between 70 and 100
43
44 mononuclear cells were present while the number of giant cells ranges from 0 to 7. No
45
46 multinucleated giant cells showed primary cilia, while around 7 to 8 mononucleated
47
48 cells (mean of 7,53) per HPF were ciliated (approximately 10% of total mononucleated
49
50 cells). Results are expressed as mean ± SEM. Mann-Whitney U Test showed a
51
52 statistical significance (p<0,00001).
53
54
55

56 **Supplementary Fig. 3. Smo and Patched staining in GCTB.** a) Some mononuclear
57
58 cells showed paranuclear staining for Patched. Scale bar = 20µm b) Similarly, only
59
60 mononuclear cells showed paranuclear expression of Smo. Scale bar = 20µm.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



A Giant Cell Tumor of Bone stromal cell showing a primary cilium and envelope-limited chromatin sheets (elcs).

81x80mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

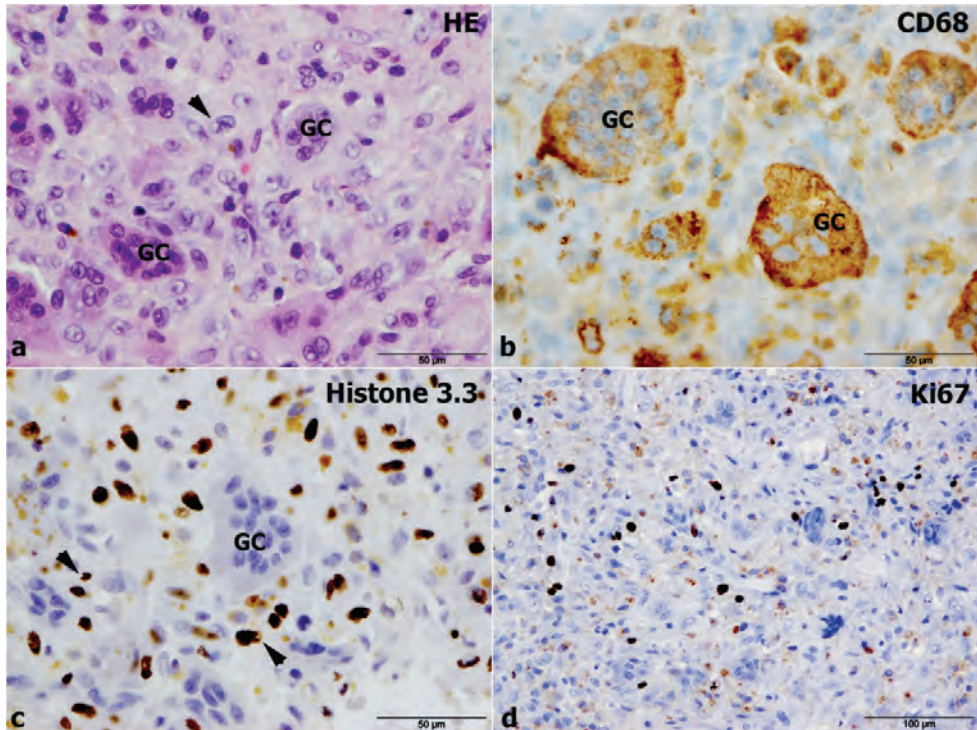


Fig. 1. Histological diagnosis and preliminary study of GCTB. a) Hematoxylin-Eosin staining shows two cellular types in GCTB: mononuclear and multinuclear giant cells (GC). Some of the mononuclear cells showed a characteristic paranuclear vacuole (arrow). Scale bar = 50µm b) CD68 is a specific marker for monocyte-macrophage lineage. Thus, histiocytic mononuclear cells and giant cells (GC) expressed CD68. Scale bar = 50µm c) Histone H3.3 G34W mutation is a specific marker of the stromal neoplastic cells of GCTB. According to this, only mononuclear cells were stained, some of them expressing paranuclear vacuoles (arrow).Scale bar = 50µm d) Immunolabeling for Ki67, marker of cell cycle activation and proliferation, stained uniquely mononuclear cells. Scale bar = 100µm

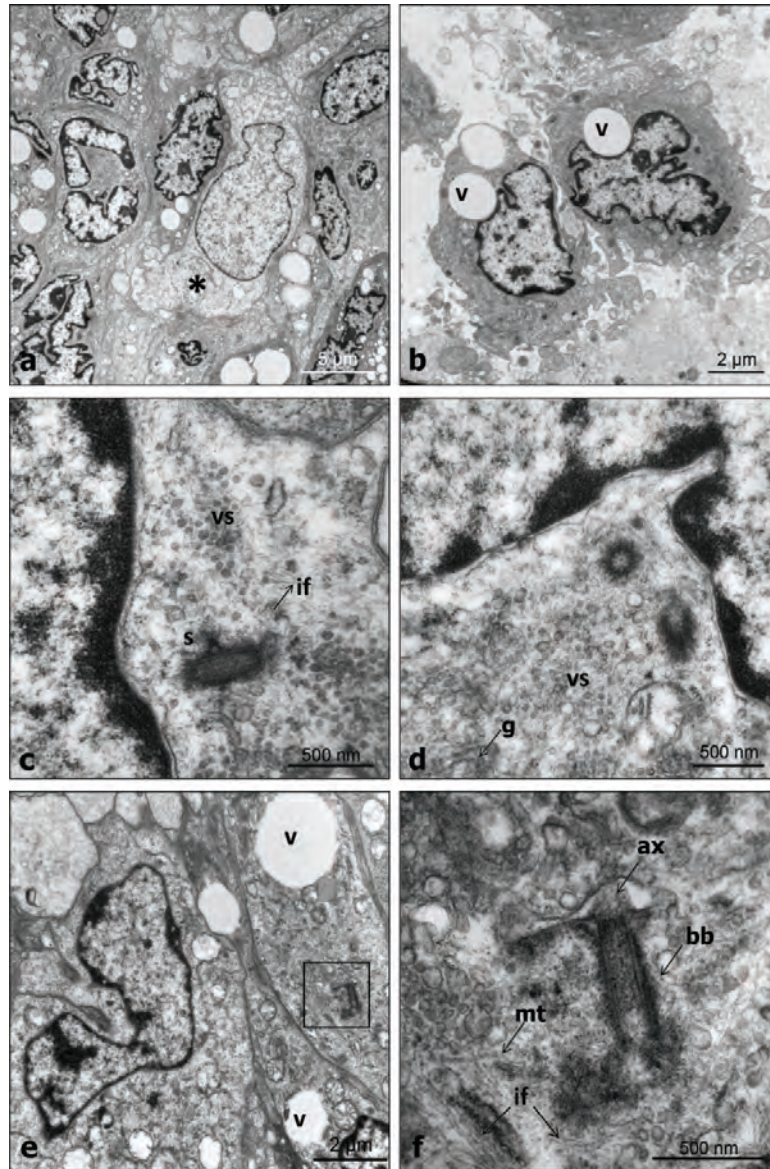


Fig.2. TEM examination. Ultrastructural features of mononuclear cells of GCTB. a) Histiocytic (*) and stromal (dark) cells are the main mononuclear components of GCTB. Scale bar = 5 μ m b) Stromal cells (SCs) show large paranuclear vacuoles (v). Scale bar = 2 μ m c-d) Centriole activation at different stages. Note the numerous small vesicles (vs), subdistal appendages (s) and intermediate filaments (if) in relation with centrioles; features related to centriolar activation. Scale bar = 500nm e) Primary cilia in a SC. Scale bar = 2 μ m f) Magnification of squared area in e. Scale bar = 500nm. ax: axoneme, bb: basal body, v: vacuoles, vs: vesicles, if: intermediate filaments, mt: microtubule, s: subdistal appendages, g: Golgi

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

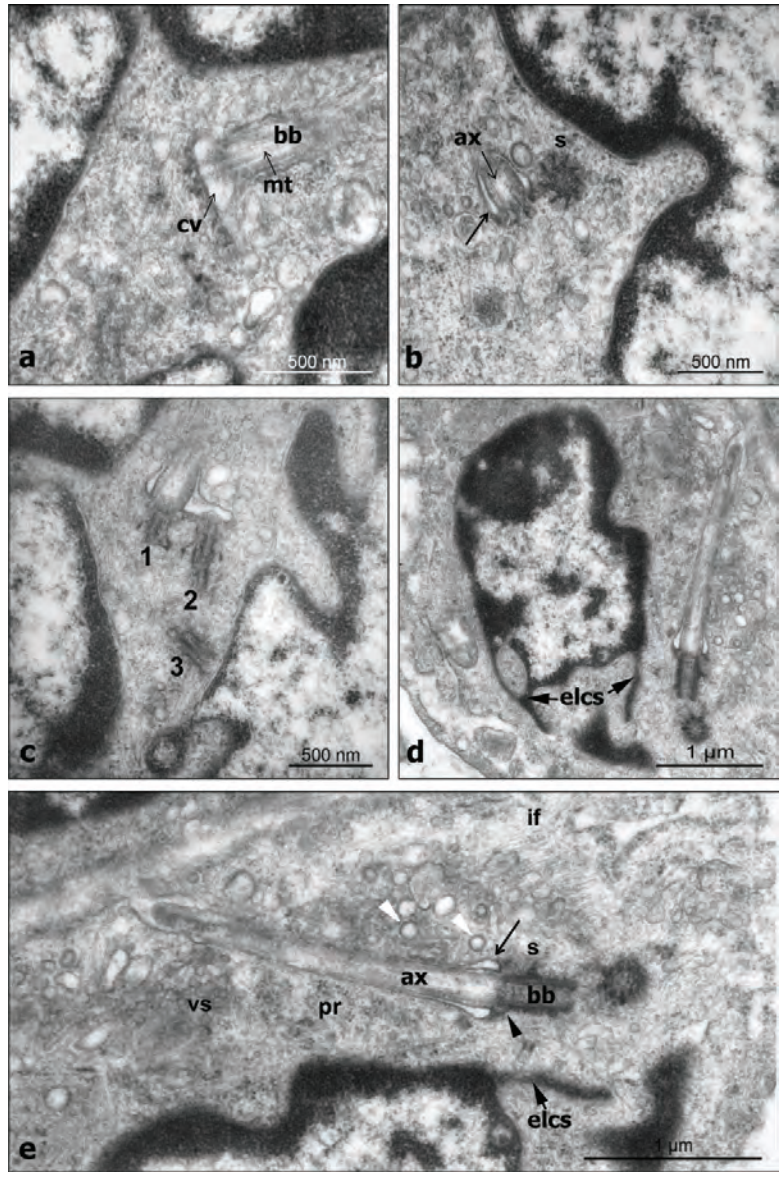


Fig.3. TEM examination. Primary cilia in stromal cells of GCTB. a) At the beginning of ciliogenesis, small vesicles derived from Golgi-apparatus fuse in a ciliary vesicle (cv) which localizes on top of the basal body (bb). Scale bar = 500nm b) Axoneme (ax) originates from basal body and is surrounded by a cell membrane invagination called ciliary pocket (cp). Daughter centriole shows pericentriolar satellites (s). Scale bar = 500nm c) Tumoral cells exceptionally showed centriole duplication, with two cilia emerging. Scale bar = 500nm d) SC shows envelope-limited chromatin sheet (elcs) and primary cilium. Scale bar = 1μm e) Primary cilium ultrastructural features. Scale bar = 1μm. mt: microtubule, if: intermediate filaments, pr: polyribosomes, vs: vesicles, sa: subdistal appendages, s: satellites, arrow: ciliary pocket, black arrowhead: transition fibers, white arrowhead: coated vesicles, bb: basal body, ax: axoneme.

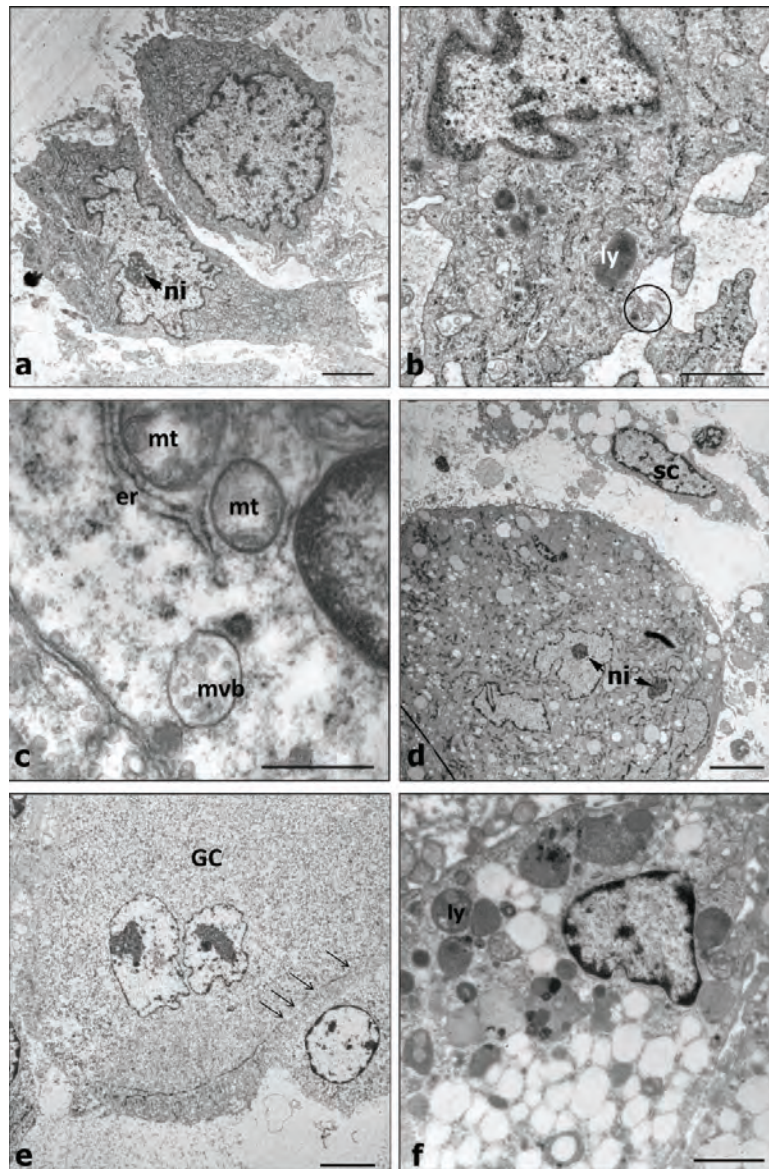


Fig.4. TEM examination. Ultrastructural features of reactive cells: histiocytic light cells and multinucleated giant cells. a) Histiocytic cells show less electron-dense cytoplasm than SCs and prominent nucleoli (ni). Scale bar = 2 μ m b) Organelle distribution of histiocytic cells. Ly: lysosomes. Encircled: intercellular contact. Scale bar = 1 μ m c) Detailed area of histiocytic cells organelles showing mitochondria (mt) surrounded by endoplasmic reticula (er) near a multivesicular body (mvp). Scale bar = 500nm d) Giant Cells show multiple nuclei with prominent nucleoli (ni). Moreover, its cell membrane shows short prolongations. A stromal cell (SC) appears near the GC. Scale bar = 5 μ m e) A histiocytic cell seems to fuse with GC (arrows point cell membrane disappearance). Scale bar = 5 μ m f) Foam cells sometimes show lysosomes (ly) containing inclusions of different source. Scale bar = 5 μ m

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

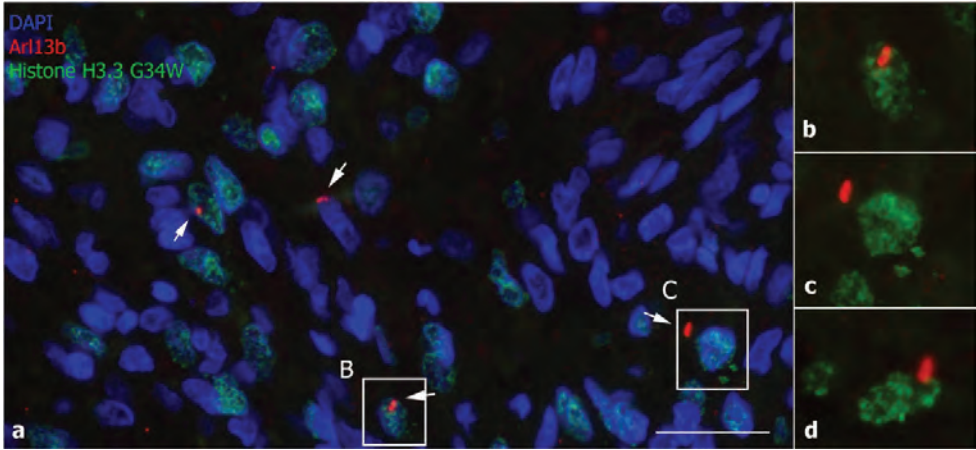


Fig.5. Stromal cells show primary cilia. a) Immunofluorescent co-localisation of Histone H3.3 G34W mutation in green and Arl13b (ciliary membrane) in red showed that some stromal cells present primary cilia. Scale bar = 20µm b-d) Magnification of cells showing Histone H3.3 G34W mutation and Arl13b co-localisation.

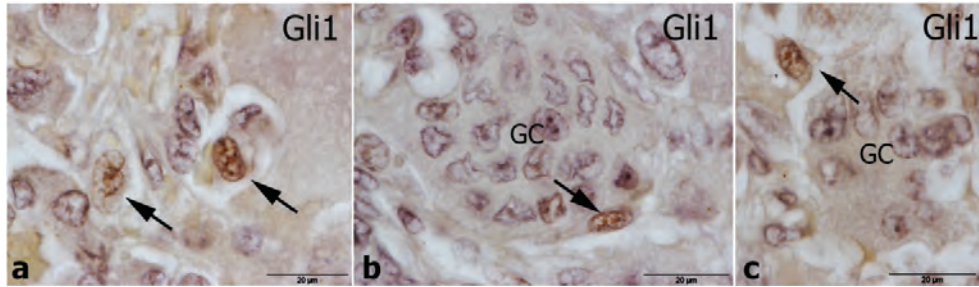


Fig. 6. Immunohistochemical study of Hh pathway activation. a-c) Nuclear labeling of Gli1 was present in some mononuclear cells, showing activation of Hh signaling pathway. GC: Giant Cell. Scale bar = 20μm



Primary cilia presence and implications in bladder cancer progression and invasiveness

Pablo Iruzubieta^{1,2} · Tomás Castiella^{2,3} · Eva Monleón¹ · Carmen Berga^{1,2} · Guillermo Muñoz³ · Concepción Junquera^{1,2}

Accepted: 13 January 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH, DE part of Springer Nature 2021

Abstract

Urothelial bladder cancer is the tenth most common cancer worldwide. It is divided into muscle and non-muscle invading bladder cancer. Primary cilia have been related to several cancer hallmarks such as proliferation, epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) or tumoral progression mainly through signaling pathways as Hedgehog (Hh). In the present study, we used immunohistochemical and ultrastructural techniques in human tissues of healthy bladder, non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC) and muscle-invasive bladder cancer (MIBC) to study and clarify the activation of epithelial-to-mesenchymal transition and Hedgehog signaling pathway and the presence of primary cilia. Thus, we found a clear correlation between EMT and Hedgehog activation and bladder cancer stage and progression. Moreover, we identified the presence of primary cilia in these tissues. Interestingly, we found that in NMIBC, some ciliated cells cross the basement membrane and localized in lamina propria, near blood vessels. These results show a correlation between EMT beginning from urothelial basal cells and primary cilia assembly and suggest a potential implication of this structure in tumoral migration and invasiveness (likely in a Hh-dependent way). Hence, primary cilia may play a fundamental role in urothelial bladder cancer progression and suppose a potential therapeutic target.

Keywords Bladder cancer · Primary cilia · Epithelial–mesenchymal transition · Hedgehog signalling pathway · Ultrastructure · Transmission electron microscopy

Introduction

Bladder cancer is the tenth most common cancer worldwide (Global Cancer Observatory 2018), being three times more frequent in men than women (Antoni et al. 2017). In the Western countries, the most common histological subtype is urothelial cancer, reaching 90% of cases (Bryan 2015).

Urothelial tumours are mainly classified in non-invasive and infiltrating neoplasms regarding the absence or presence (respectively) of muscle invasion (Humphrey et al. 2016). Non-Muscle Invasive Bladder Cancer (NMIBC) tumours comprise 75–85% of all urothelial cancers while the remaining 15–25% are Muscle Invasive Bladder Cancers (MIBC), which cause most bladder cancer-related deaths (Bryan 2015). Although NMIBC survival rate is excellent, it shows frequent recurrence and progression to MIBC (50% and 9%, respectively) (Liedberg et al. 2015).

Carcinomas progression and invasiveness are closely related to epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) (Prieto-García et al. 2017). EMT consists of the dynamic and reversible switch from an epithelial non-motile to a mesenchymal motile phenotype (Zeisberg and Neilson 2009; Lamouille et al. 2014; Prieto-García et al. 2017). During EMT, epithelial tumor cells undergo transient changes resulting in a mesenchymal phenotype characterized by a loss of cellular junctions, changes in cell–matrix adhesion, loss of apicobasal polarity, cytoskeletal changes and an increased

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00418-021-01965-2>.

✉ Pablo Iruzubieta
pablo.iruzubieta@hotmail.es

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

² Institute for Health Research Aragón (IIS), Domingo Miral s/n, 50009 Zaragoza, Spain

³ Department of Pathology, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, Zaragoza, Spain

contractility and motility (Lamouille et al. 2014). These features allow tumor cells to release from neighbor cells and migrate to distant areas. Thus, EMT is a key process in tumor progression, invasiveness and metastasis (Zeisberg and Neilson 2009; Prieto-García et al. 2017). EMT is induced by several transcription factors (remarkably Snail1, Snail2 or Slug, Twist, ZEB1 and ZEB2) (Lamouille et al. 2014). These transcription factors repress the expression of epithelial-related proteins such as cytokeratin and E-cadherin (which mediates cell to cell junctions) (Lamouille et al. 2014). Conversely, they induce the transcription of genes such as Vimentin and N-cadherin, which confer a mesenchymal phenotype (Lamouille et al. 2014). Regarding bladder cancer, Twist is the best-studied EMT-related transcription factor and its expression has been related to smoking, poorer prognosis and increase metastasis (Fondreville et al. 2009; Yun and Kim 2013).

EMT can be triggered by different signalling pathways such as TGF β , Notch, Wnt or Hedgehog (Hh) (Lamouille et al. 2014). Most of these pathways have been related to primary cilia (Wheway et al. 2018). Primary cilium is an organelle composed of a basal body (originated from a modified centriole) which gives rise to an axoneme protruding outside the cell. It has been related to different cellular functions including signaling pathway activation, cytoskeletal functions, cell cycle control or protein homeostasis (Malicki and Johnson 2017). Moreover, this structure regulates several cancer hallmarks (Fabbri et al. 2019). However, the presence and importance of primary cilia in bladder cancer is still not known and it has just started to be explored (Du et al. 2018).

Hh is the best-studied cilia-dependent pathway and it has been closely related to several types of cancer (Rohatgi et al. 2007; Amakye et al. 2013; Castiella et al. 2013; Chahal et al. 2018; Iruzubieta et al. 2019). Hh proper activation depends on primary cilia (Rohatgi et al. 2007). Thus, when Hh ligands bind Patched receptor, located in the ciliary membrane, it is removed from the cilia allowing Smoothed (Smo) entrance to the membrane and Glioma associated oncogene 1 (Gli1) activation and translocation into cell nuclei (Rohatgi et al. 2007; Ramsbottom et al. 2016). Gli1 activates target genes transcription, including genes related to EMT, angiogenesis and cancer stem cell maintaining (Katoh and Katoh 2009; Amakye et al. 2013; Chahal et al. 2018).

The exact relationship between Hh pathway and bladder cancer remains elusive. Thus, Hh has been proposed both as an inductor of EMT and invasiveness (Islam et al. 2016; Nedjadi et al. 2019) and as a protector element that restrains bladder cancer progression (Shin et al. 2014b).

In the present study, we study through immunohistochemical techniques EMT activation, Hh signalling pathway and primary cilia presence in bladder cancer. Besides, we performed a detailed ultrastructural study of tumoral cell

features and EMT process. Our results emphasize the importance of primary cilia in cancer metastasis and recurrence, proposing the relevance of primary cilia as a potential target in bladder cancer.

Methods

Materials

Six MIBC (all G3 except for one G2–G3, five pT2NxM0 and one pT3bN0M0), seven NMIBC (five G2 and two G1, all of them pTaNxM0) and two healthy bladder controls were used for the study. They were retrieved from the files of the Pathology Department at the University Clinic Hospital of Zaragoza. All protocols developed were approved by the Human Research Ethics Committee “Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón”.

Electron microscopy

Samples were washed in phosphate buffer and fixed with 2.5% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde overnight at RT, washed in 0.1 M phosphate buffer for 5 min, post-fixed with 2% osmium, rinsed, dehydrated in graded ethanol (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, lightly stained with 1% toluidine blue and examined by light microscopy (Olympus BX51 microscope, Olympus Imaging Corporation; Tokyo, Japan). Later, ultrathin (0.05 μ m) sections were cut, collected on Formvar coated single-slot grids counterstained with 1% uranyl acetate and Reynold's lead citrate for 1 min.

They were examined under a JEOL 1010 TEM. The images were captured with Gatan Bioscan Camera with pixel size 6.45 μ m \times 6.45 μ m and spatial resolution of 1024, 1024, 1, 1 (x, y, z, t) and automatic gain.

Immunohistochemistry

Immunohistochemical staining was performed on 4- μ m-thick formalin-fixed paraffin-embedded sections using EnVision® (DAKO) method. The primary antibodies used in this study were mouse anti-Cytokeratin Clone MNF116 (1:100, M0821 DAKO; Glostrup, Denmark), mouse anti-E-Cadherin Clone NCH-38 (1:100, M3612 DAKO; Glostrup, Denmark), mouse anti-Twist 2C1a (1:100, sc-81417, Santa Cruz, Dallas, TX, USA), rabbit anti-Gli1 (1:200, Abcam, ab49314; Cambridge, UK), rabbit anti-Smo (1:1000, LS Bioscience, LS-B4911, Seattle, WA, USA) and goat anti-Patched (1:100, Santa Cruz, sc-6149; Dallas, TX, USA).

The tissue sections were deparaffinised in xylene for 20 min and rehydrated in graded ethanol (see above). Prior to all assays, a heat-induced antigen retrieval step was performed for E-Cadherin, Gli1 and Smo immunolabeling using buffer citrate (pH6, DAKO S2031) by treatment for 5 min in microwave at 800 W and 3 additional minutes at 360 W. For cytokeratin and patched staining, an antigen retrieval step using TBS (pH9) was performed at 96 °C for 20 min. Twist unmasking was performed by heating in Tris–EDTA buffer (pH9) at 98 °C for 40 min.

After washing twice with PBS for 3 min, endogenous peroxidase was blocked using peroxidase blocking reagent (DAKO, S2001) for 10 min and sections were washed in distilled water and PBS 3 min, twice.

Afterwards, sections were incubated with primary antibodies at 4 °C overnight in a humidified chamber. Sections were washed in PBS three times for 5 min and incubated with Labelled Polymer EnVision-HRP (DAKO K5007) or Rabbit Anti-Goat Immunoglobulins/HRP (1:200, DAKO, P016002-2) for 1 h. To confirm the presence of immunocomplexes, 3,3′ diaminobenzidine was used as the chromogen. The samples were contrasted with Mayer’s haematoxylin 7 min, washed in tap water for 15 min, dehydrated in graded ethanol (2 min in 70°, 2 min in 96° and 5 min in 100°), cleared in xylene and coverslipped with Eukitt (03,989 Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA). Negative controls were based on samples to which no primary antibody was added. All antibodies were commercial and supposedly validated.

Whole samples were analysed and digital images from representative areas were captured by Olympus BX53 and Olympus UIS UPLFLN Series objectives. FN: 26.5. 20×AN 0.5 and 40×AN 0.75. Images were captured with Olympus DP72 Digital Camera. Pixel size 6.45 µm × 6.45 µm, total number of pixel 1.5 million. Exposition mode: SFL Auto and spatial resolution of 4140 × 3096 × 1 × 1 (x, y, z, t).

Immunofluorescence microscopy

Four µm formalin-fixed paraffin-embedded sections were cut and mounted on glass slides. The sections were deparaffinised in xylene for 20 min and rehydrated in graded ethanol (4 min in 100°, 4 min in 96°, 4 min in 70° and 5 min in distilled water). Tissues were permeabilised with 0.1% Triton X-100 in PBS for 8 min. Afterwards, an antigen retrieval step using Tris-buffered saline (TBS, pH9) was performed at 96 °C for 20 min.

Sections were incubated overnight at 4 °C with the following primary antibodies: mouse anti-Acetylated tubulin (1:4000, Sigma-Aldrich, T7451; St. Louis, MO, USA) and rabbit anti-Pericentrin (1:100, Abcam, ab44448; Cambridge, UK) in a dark humidified chamber. Sections were

washed in PBS three times for 5 min and incubated for 1 h at RT in a dark humidified chamber with secondary antibodies: donkey anti-mouse Alexa Fluor 594 (1:1000, ThermoFisher, R37115; Waltham, MA, USA), donkey anti-rabbit Alexa Fluor 488 (1:1000, ThermoFisher, A-21206; Waltham, MA, USA). After washing in PBS, DAPI (1 µg/mL, Sigma-Aldrich) was added for 1 min for nuclei counterstaining. Sections were washed in PBS and the slides were covered with fluorescence mounting medium (DAKO, S3023). Negative controls were based on samples to which no primary antibody was added. On the other hand, we used a ciliated tissue (Fallopian tube) as a positive control for cilia immunofluorescence. All antibodies were commercial and supposedly validated.

Images were analysed using the following filters: U-MNUA2 for DAPI, U-MWIABA2 for Alexa Fluor 488 and U-MWIG2 for Alexa Fluor 555 in a Olympus BX53 microscope and Olympus UIS UPLFLN Series objectives. FN: 26.5. 20×AN 0.5 and 40×AN 0.75. Images were captured with Olympus DP72 Digital Camera. Pixel size 6.45 µm × 6.45 µm, total number of pixel 1.5 million. Exposition mode: auto and spatial resolution of 4080 × 3072 × 1 × 1 (x, y, z, t).

Images were analysed with DP Controller Software. Every fluorescent channel was individually photographed using automatic autoexposure and channels were merged using FIJI Image_J software, where contrast and brightness were adjusted (Schindelin et al. 2012).

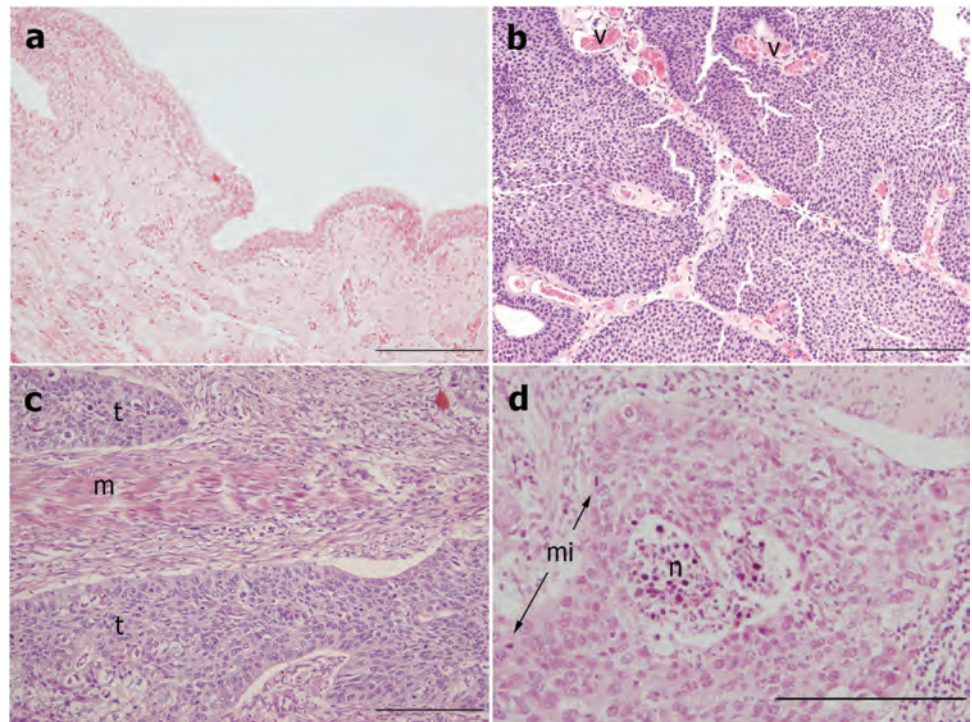
Statistical analyses were performed counting ciliated cells per High Power Field (HPF = ×400). The areas analysed were representative of the samples. A non-parametric test (Kruskal–Wallis test) was used.

Results

Histological study

Haematoxylin–eosin staining was performed in all samples (Fig. 1). Healthy bladder controls showed four to eight cellular layers with the characteristic umbrella cells on top (Fig. 1a). NMIBC presented abundant papillae composed of a thin vascularized stromal core surrounded by an increased number of cellular layers (Fig. 1b). On the other hand, MIBC samples show abundant heterogenous cells with atypia features such as enormous nuclei with prominent nucleoli, pale vacuolized cytoplasm, numerous mitosis and muscle invasion by tumoral cell cords (Fig. 1c). In some cases, necrotic areas were found, indicative of uncontrolled proliferation (Fig. 1d).

Fig. 1 Haematoxylin–eosin staining. **a** Healthy bladder composed of four to eight cellular layers and a prominent stroma. **b** NMIBCs show papillae of vascular stroma surrounded by numerous layers of tumoral cells that do not cross the basement membrane. **c** MIBCs are composed of heterogeneous atypical tumoral cells (t) that invade muscle (m). **d** Detail of MIBC showing mitosis (mi) and areas of necrosis (n). v: blood vessel. Scale bar = 200 μ m



Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in bladder cancer progression

As EMT is a predominant mechanism in tumor progression and invasiveness, we analyzed the expression of epithelial markers E-cadherin and Cytokeratin and the EMT-transcription factor Twist in bladder cancer stages regarding normal tissue (Fig. 2).

Our results showed that control samples showed prominent staining for cytokeratin (Fig. 2a) that was progressively reduced in NMIBC (Fig. 2b) and insignificant in MIBC (Fig. 2c). Similar results were found regarding E-cadherin expression (Fig. 2d–f). Although it was not consistently presented in the whole sample, there were specific areas in NMIBC tissues where E-cadherin and Cytokeratin expression was clearly reduced in basal cell layers and progressively increased in distal layers (Fig. 2b and e).

Accordingly, Twist nuclear staining was inexistent in the healthy bladder (Fig. 2g) and progressively increased and more intense in NMIBC (Fig. 2h) and MIBC (Fig. 2i). Twist expression was limited to tumoral cells while surrounding tissue showed no staining. The nuclear presence of Twist in these samples points to the activation of EMT program in bladder cancer cells, especially in MIBC. Once again, in NMIBC we found subtly predominant staining in basal layers (Fig. 2h).

Hence, our experiments confirmed that epithelial markers are reduced in bladder cancer while nuclear translocation of the EMT transcription factor Twist is increased. These

findings confirmed that EMT activation correlates with tumoral grade. Moreover, we found that NMIBC samples show EMT indicators predominantly in basal layers.

Hh signalling pathway in bladder cancer progression

Afterwards, we studied the presence of different Hh signalling pathway components in different tumor stages to clarify the role of this pathway in bladder cancer.

Thus, we performed immunohistochemical experiments for Patched receptor, Smo and the main pathway effector Gli1 (Fig. 3). We found that Hh pathway components were practically no present in healthy controls while they show intermediate staining in NMIBC and they were prominently expressed in MIBC.

Smo expression was absent in healthy controls (Fig. 3a) and subtle expression was found in NMIBC (Fig. 3b). However, in MIBC, Smo staining was present in cell membrane and intense cytoplasm accumulations (Fig. 3c). Accordingly, Patched was not expressed in control bladders (Fig. 3d). Conversely, it was found in a localized paranuclear area both in NMIBC (Fig. 3e) and MIBC (Fig. 3f), being especially intense and abundant in the latter.

Gli1 nuclear staining is an indisputable sign of Hh signalling pathway activation. No Gli1 staining was found in healthy controls (Fig. 3g), but light presence appeared in several NMIBC cells (Fig. 3h). Some isolated positive cells

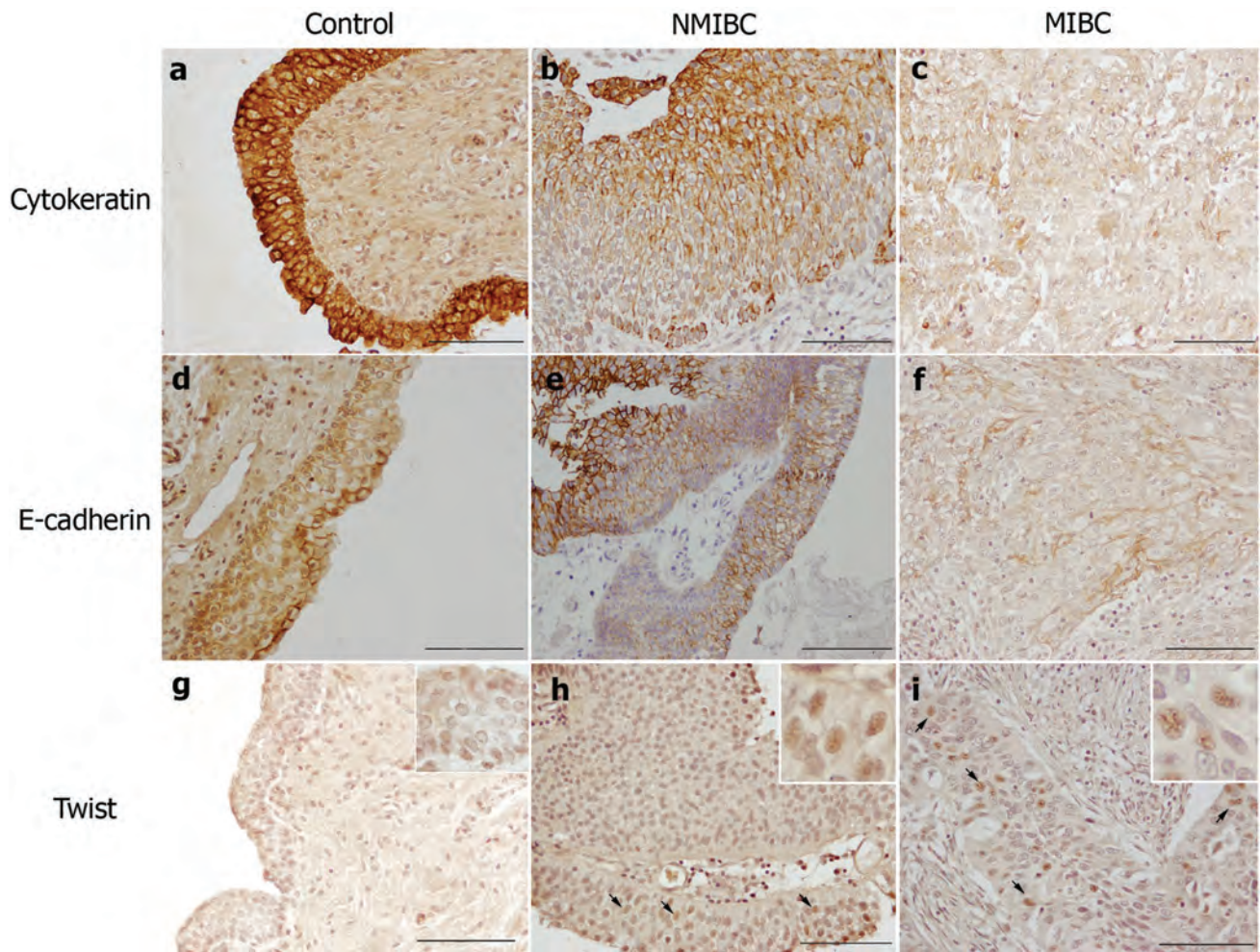


Fig. 2 Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in bladder cancer. Reduction of epithelial markers and nuclear location of Twist are signs of EMT. **a** Cytokeratin cytoplasmic expression was intensely positive in healthy controls. **b** In non-invasive tumours (NMIBC), some areas with characteristic staining were found. These areas showed a reduced cytotkeratin expression in basal layers. **c** In muscle-invasive bladder cancer (MIBC), however, only a weak expres-

sion was found. **d–f** Similar findings appeared regarding E-cadherin expression, which was mainly located in cell membranes. **g** Twist nuclear staining was fundamentally negative in control bladders, **h** whereas it was weakly positive in NMIBC especially in basal layers, although also distally and **i** clearly positive in numerous tumoral cells of MIBC but no in the surrounding tissue. Scale bar = 100 μ m

were found beyond the basement membrane. Gli1 nuclear expression was intensely present in MIBC cells (Fig. 3i).

These results show that Hh activation is directly related to tumoral grade. This supports the hypothesis of Hh signalling pathway role in bladder cancer progression and invasiveness showing, consequently, an intense expression in high-grade tumours.

Primary cilia in bladder cancer

Canonical Hh signalling pathway is mediated by primary cilia both in physiology and cancer. Once we found Hh activation in bladder cancer, we studied the presence of primary cilia in these tumours through immunofluorescence techniques. Hence, using specific markers for both primary cilia

axoneme (Acetylated Tubulin) and centrioles (Pericentrin), we analyzed the presence, number and proportion of primary cilia in healthy bladders, NMIBC and MIBC (Fig. 4).

Primary cilia were found in controls (Fig. 4a–c), NMIBC (Fig. 4d–f) and MIBC (Fig. 4g–i). Interestingly, both healthy controls and NMIBC, showed ciliated cells located fundamentally (though not uniquely) in basal layers (Fig. 4a and d). Furthermore, several ciliated cells were found across the basement membrane in NMIBC (Fig. 4d). Quantitative analyses were performed counting ciliated cells per high power field and a non-parametric test (Kruskal–Wallis) was used (Fig. 4j). The number of ciliated cells showed a clear tendency to progressively increase from controls to MIBC, although no statistical significance was found ($p = 0.084$). As these differences could be secondary to the increased

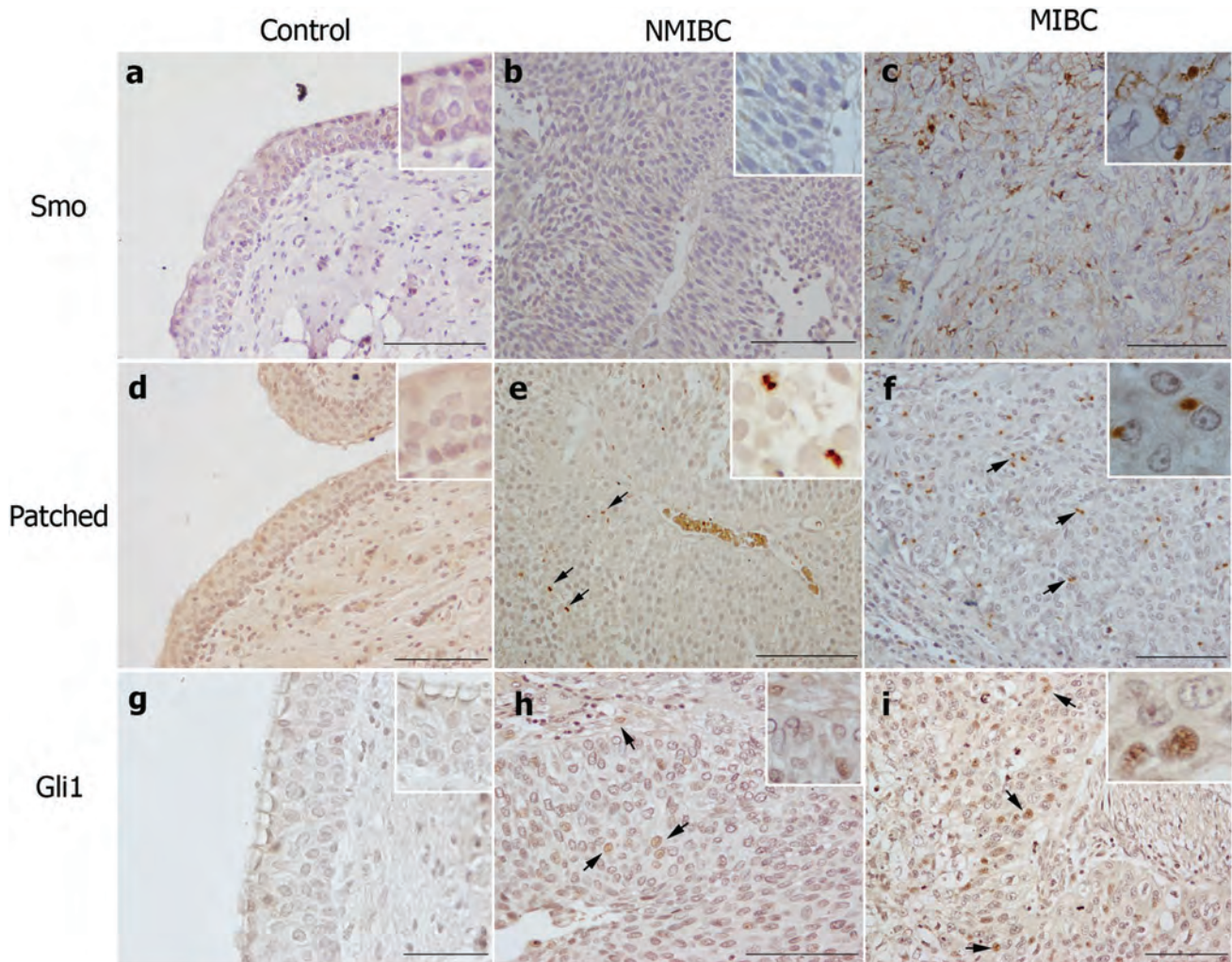


Fig. 3 Hh signaling pathway activation in bladder cancer. Immunohistochemical staining for main Hh pathway components (Smo, Patched and Gli1) was performed. **a** Control bladders show no expression of Smo. **b** Non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC) showed weak positivity to Smo while **c** Muscle-invasive bladder cancer (MIBC) showed intense expression both in cell membrane and cytoplasm aggregation. **d** Patched was not found in control tissues.

e Subtle expression was present in NMIBC and **f** intense positivity was found in MIBC, showing paranuclear aggregates. **g** Regarding Gli1, no nuclear staining was found in controls. **h** Some subtly positive cells were found in NMIBC, Isolated Gli1+ cells were found beyond the basement membrane. **i** Intense nuclear expression was identified in MIBC tumoral cells but not in surrounding cells. Scale bar = 100 μ m

number of cells found in cancer, we also studied the proportion of ciliated cells regarding the total number of cells per high power field (Fig. 4k). No apparent nor statistical significant differences were found neither ($p=0.4264$).

In conclusion, primary cilia were found in healthy controls, NMIBC and MIBC with a non-statistically significant tendency to be increased in high-grade tumours.

Ultrastructural study

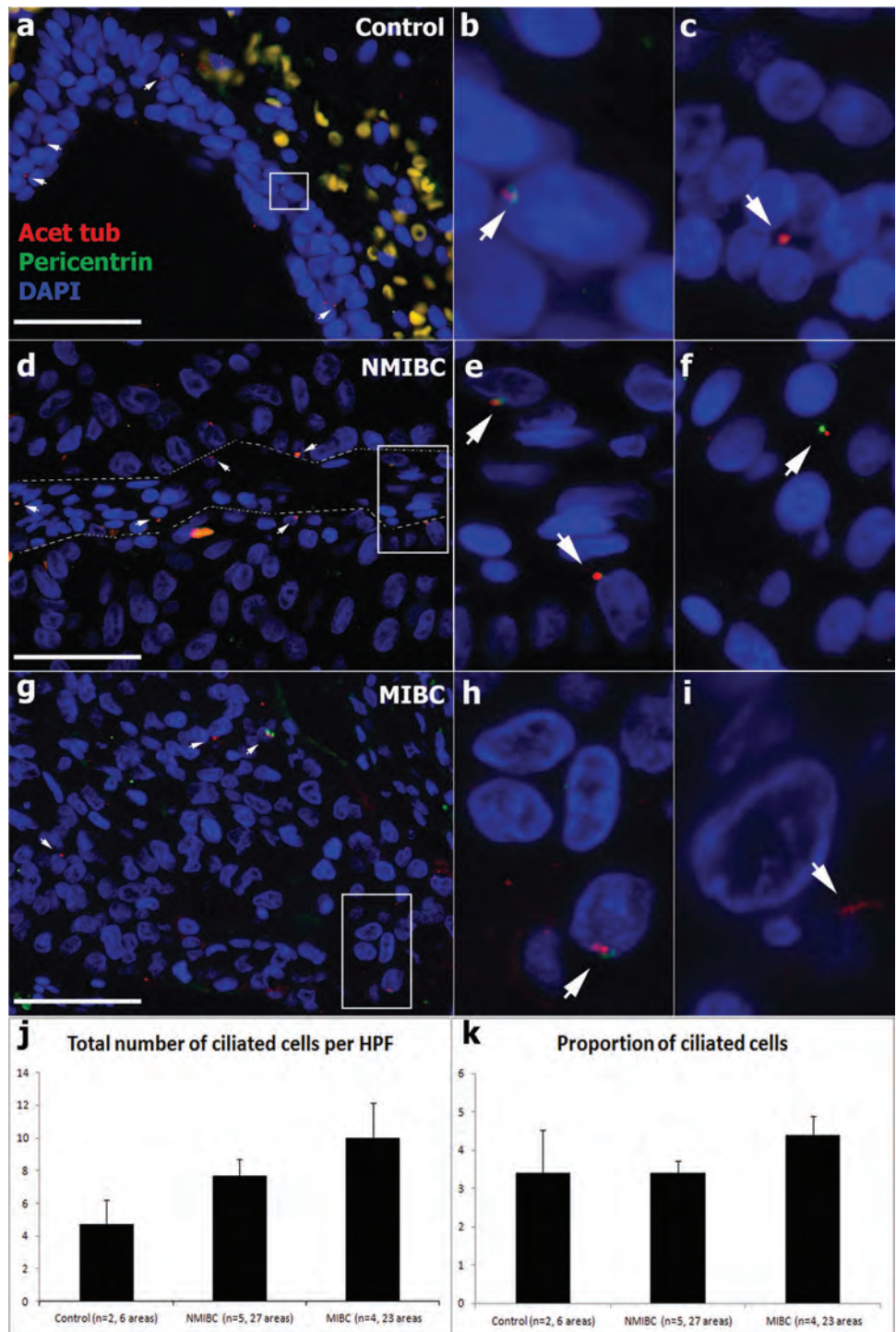
To better characterize the cells and the presence of primary cilia in bladder cancer, ultrastructural studies using transmission electron microscopy (TEM) were performed in tumoral tissues.

NMIBC

In low-grade tumours, hyperplastic epithelial cells were found. They appeared organized in perpendicular layers to the papillae axe. The number of cellular layers was increased comparing healthy controls (Fig. 5a). Two cellular subtypes were clearly identified regarding cytoplasm electron density: clear and dark cells (Fig. 5b).

On the one hand, clear cells were less numerous and they showed less electron dense cytoplasm. These cells were characterized by scarce rough endoplasmic reticula cisterns close to dictyosomes of Golgi apparatus, free polyribosomes and paranuclear location of centrioles. Converse to dark cells, clear cells showed abundant mitochondria with

Fig. 4 Primary cilia in controls, NMIBC and MIBC. Acetylated Tubulin marks ciliary axoneme while Pericentrin labels centrioles and, consequently, basal bodies. **a–c** Healthy bladder showing primary cilia in a general view (**a**) and detailed cells (**b, c**). Primary cilia were especially found in basal layers. **d–f** Primary cilia in NMIBC. Some ciliated cells were found across the basement membrane (dashed line). **g–i** Primary cilia in MIBC. **j** Quantitative analyses of total number of ciliated cells per High-Power Field. Apparent but not statistically significant differences could be detected by Kruskal–Wallis test ($p=0.084$). **k** Proportion of ciliated cells regarding the total number of cells. No differences were found ($p=0.4264$). Scale bar = 50 μm

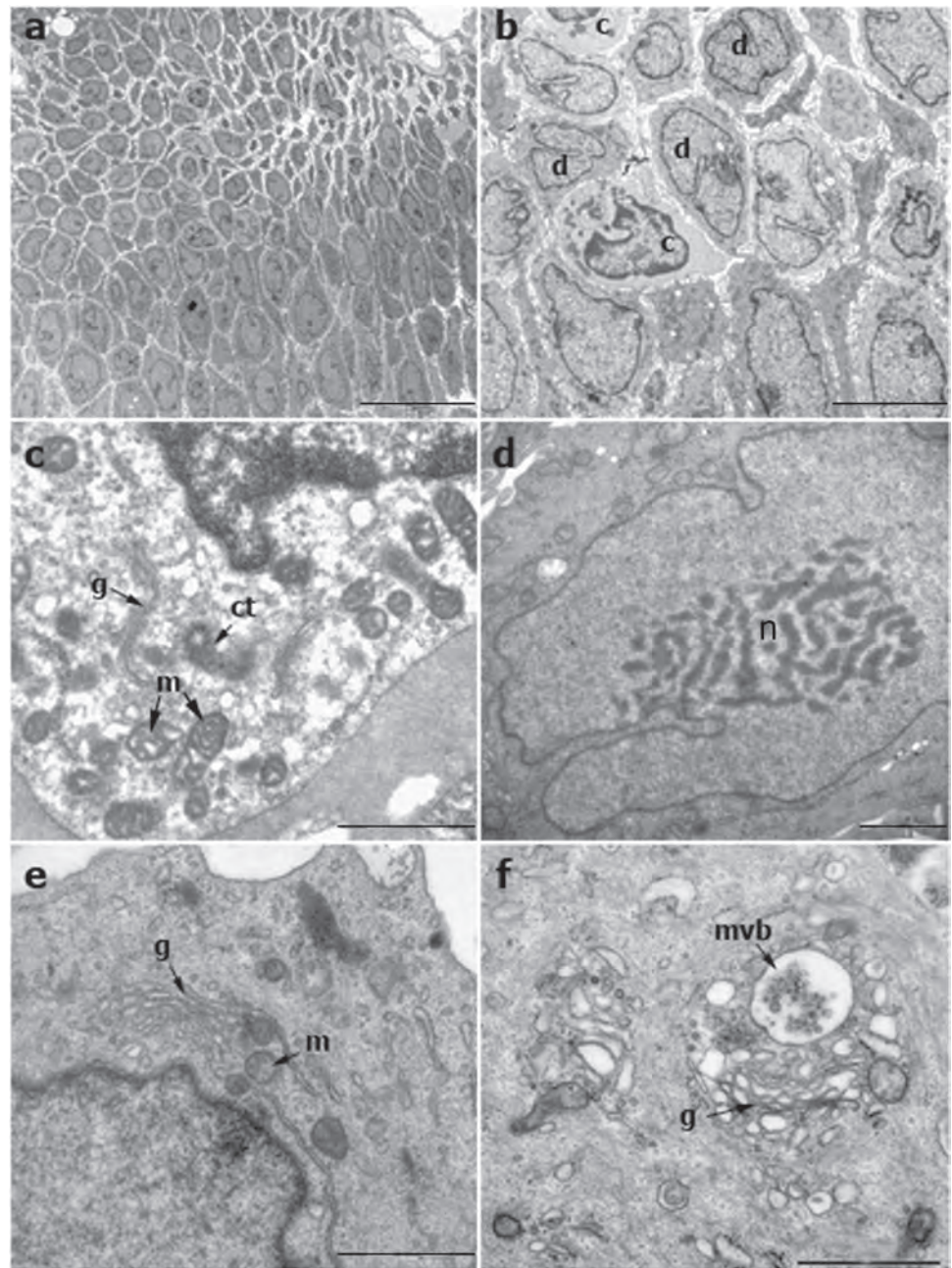


thicker crests (Fig. 5c). Moreover, they showed electron dense nuclei with abundant condensed heterochromatin, a sign of low transcriptional activity.

On the other hand, dark cells were the most frequent cell type in NMIBC. They showed voluminous oval nuclei with very decondensed euchromatin, suggesting active transcription, and a fine band of marginal heterochromatin surrounding the nuclear envelope. Nuclear envelopes

characteristically presented deep invaginations (Fig. 5d) which sometimes generates interesting structures called nuclear envelope-limited chromatin sheets (ELCS) (Sup. Fig. 1a). Furthermore, they usually showed a prominent fibrillar nucleolus (Fig. 5d). Dark cells had a medium electron dense cytoplasm which contained similar organelles than clear cells (Fig. 5e). Especially relevant is the presence of multivesicular bodies fulfilled by vesicles of different

Fig. 5 NMIBC ultrastructure. **a** Increased cellular layers in NMIBC. Scale bar = 20 μm **b** Two cellular types were found in NMIBC based on cytoplasm electron density: clear cells (**c**) and dark cells (**d**). Scale bar = 5 μm **c** Clear cells showed condensed heterochromatin and a clear cytoplasm composed of scattered rough reticulum, Golgi's dictyosomes (**g**) and small thick-crest mitochondria (**m**). Scale bar = 1 μm **d** Dark cells, however, show decondensed euchromatin with fibrillar nucleoli (**n**) and deep nuclear envelope invaginations. Scale bar = 1 μm **e-f** Dark cells cytoplasm is more electron dense and show abundant Golgi's dictyosomes (**g**), mitochondria (**m**) and characteristic multivesicular bodies (**mvb**). *ct* centrioles. Scale bar = 1 μm



sizes (Fig. 5f). Abundant filaments originate from the characteristic darker cytoplasm.

A detailed ultrastructural study identified EMT features in NMIBC (Fig. 6). Hence, urothelial cells located in basal layers lost their apicobasal polarity (Fig. 6a) due to desmosomes disassembly (Fig. 6b) and formation of filopodia-like structures (Fig. 6c), which allow cellular migration. As a consequence, intercellular space was wider. This mesenchymal phenotype acquisition was related to an increased number of mitochondria and centrioles activation.

Thus, in some dark cells, activation of centrioles was found, characterised by the loss of their perpendicular

disposition, the presence of ciliary vesicles and migration to the cellular surface (Fig. 7a). There, they bind the cell membrane and formed primary cilia (Fig. 7b, c). This structure was fundamentally found in basal cells (Fig. 7c). Primary cilia subcomponents such as 9+0 axoneme, basal body, transition fibres binding the cell membrane and subdistal appendages were identified. Primary cilia base was ensheathed by a membrane invagination called ciliary pocket.

Although diagnosed as NMIBC, some cells were found invading the basement membrane, showing a clear deformation of the cellular shape and a nuclear hourglass

Fig. 6 Ultrastructural changes in EMT in NIMBC. **a** Loss of polarity occurs in basal cells. Moreover, some dark cells (circled) have crossed the basement membrane. Scale bar = 10 μ m **b** Tumoral cells lose desmosomes (inset) and initiate the formation of filopodia (fil). Scale bar = 2 μ m (inset 250 nm) **c** Intercellular space is increased and cells show abundant filopodia (fil). *bv* blood vessel. Scale bar = 2 μ m

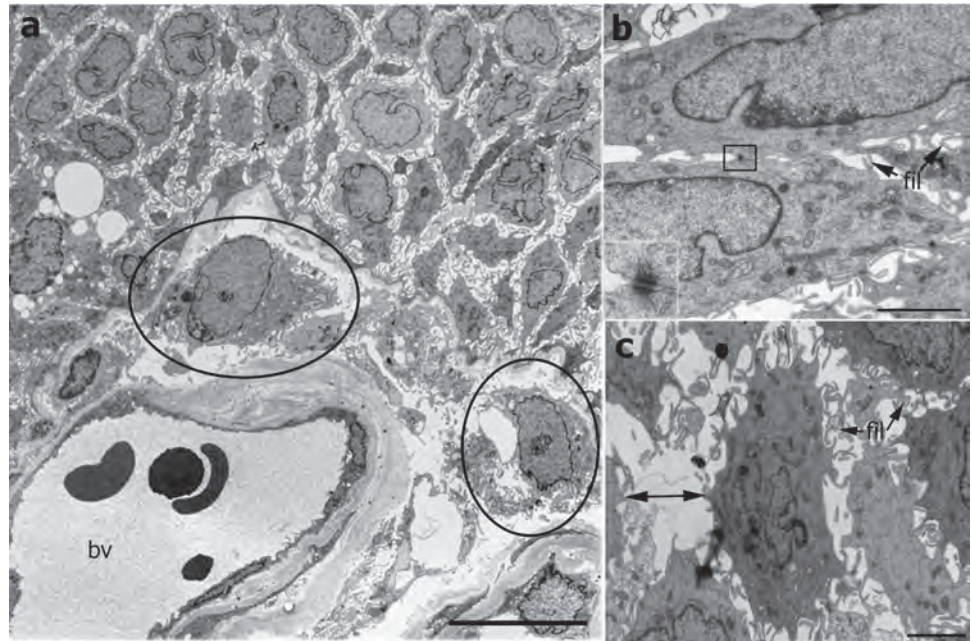
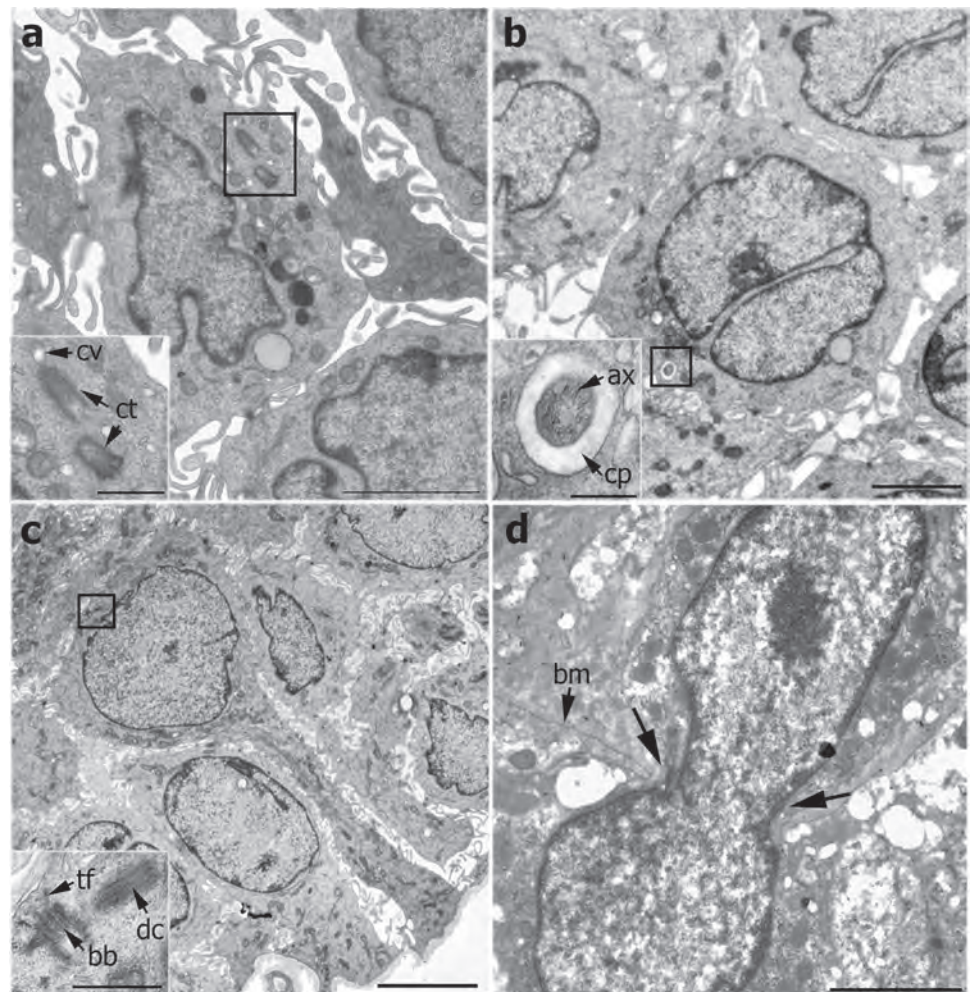


Fig. 7 EMT and primary cilia in dark cells of NMIBC and basement membrane invasion. **a** Dark cells located in the basal layer show activated centrioles which lost their typical perpendicular disposition (inset). Scale bar = 2 μ m (inset 500 nm) **b** Activated centrioles originate primary cilia that emerges to the extracellular space (inset). Characteristic nuclear invaginations are identified in these cells. Scale bar = 2 μ m (inset 250 nm) **c** A tumoral dark cell located on top of basement membrane showing an activated centriole binding cell membrane through transition fibres (tf) (inset). Scale bar = 5 μ m (inset 500 nm) **d** Some tumoral cells crossed the basement membrane (bm) by adapting the cellular shape through an hourglass-morphology nucleus (arrows). Scale bar = 2 μ m *ax* axoneme, *cv* ciliary vesicle, *ct* centrioles, *cp* ciliary pocket, *bb* basal body, *dc* daughter centriole



morphology (Fig. 7d). Some epithelial dark cells were found in lamina propria, located near blood vessels (Figs. 6a and 8a, c). Interestingly, these cells showed primary cilia projecting to the extracellular space, near Golgi apparatus (Fig. 8b,d). These cells kept a typical disposition of organelles in perinuclear area. However, their cytoplasm seemed extremely vacuolated and loss of cytoplasm fragments was found (Fig. 8).

MIBC

High-grade tumours showed an enormous cellular heterogeneity, although previously described clear and dark cells were still identifiable (Fig. 9a). Abundant mitosis (Fig. 9b) and some apoptotic cells were found (Sup. Fig. 1b). Moreover, tumoral infiltration of muscles, blood vessels and nerves was identified. Clear cells kept their cytological properties, highlighting irregular nuclei and deep invaginations of nuclear envelope (Fig. 9c). These cells established new contacts with clear cells by small punctiform

desmosomes and to dark cells through interdigitations generating tumoral cords (Fig. 9c and d). The so-called dark cells were more numerous than in low-grade tumours and, occasionally, they showed a fusiform-mesenchymal morphology (Sup. Fig. 1c). Some cells showed abundant autophagosomes containing rough endoplasmic reticula (Sup. Fig. 1d). Although the exact nature of these structures needs further research, it may point to autophagy impairment in these cells. Moreover, angiogenesis of new blood vessels was identified (Sup. Fig. 1e) and, as pointed above, necrosis and necroptosis were also found in some tumoral cells (Sup. Fig. 1f).

Activated centrioles and primary cilia were also found in MIBC cells (Fig. 9e, f).

Hence, ultrastructure showed that two types of cells were present in bladder cancer: clear and dark cells. The latter showed primary cilia and appeared in NMIBC crossing basement membrane and next to blood vessels. In MIBC, cells show an increased heterogeneity, abundant mitosis, invasiveness and some cellular alterations.

Fig. 8 Tumoral cells crossing basement membrane showed primary cilia. **a** and **c** Some cells showing the ultrastructural features of epithelial tumoral dark cells (i.e., fibrillar nucleoli, decondensed euchromatin, cytoplasmic composition) were found beyond the basement membrane (bm, dashed line) and near blood vessels (bv). These cells present a progressive vacuolization (v) that finally produce cytoplasm release. Interestingly, these cells showed primary cilia. Scale bar = 5 μ m **b** and **d** Magnification of squared areas in **a** and **c** (respectively) showing a detailed image of primary cilia and their components: basal body (bb), subdistal appendages (sa), axoneme (ax). Near primary cilia, Golgi apparatus is usually present (g). Scale bar = 500 nm **dc** daughter centriole, **n** nuclei, **tf** transition fibres

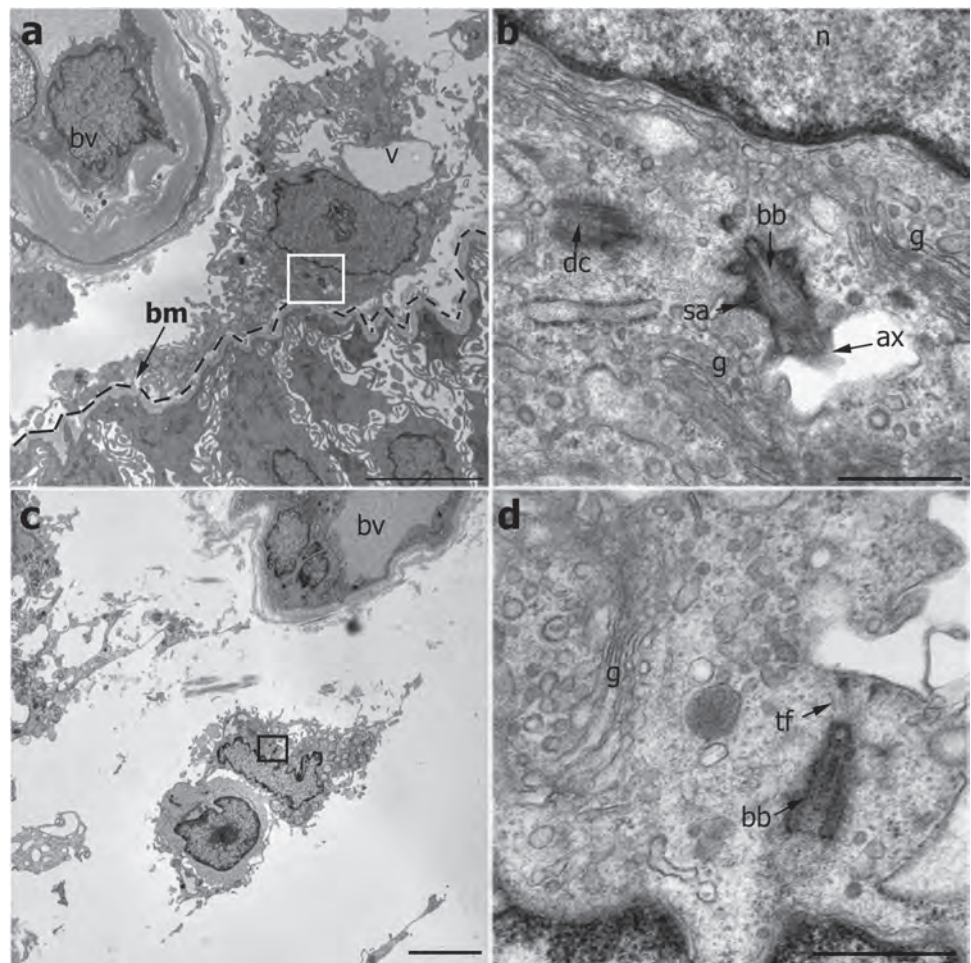
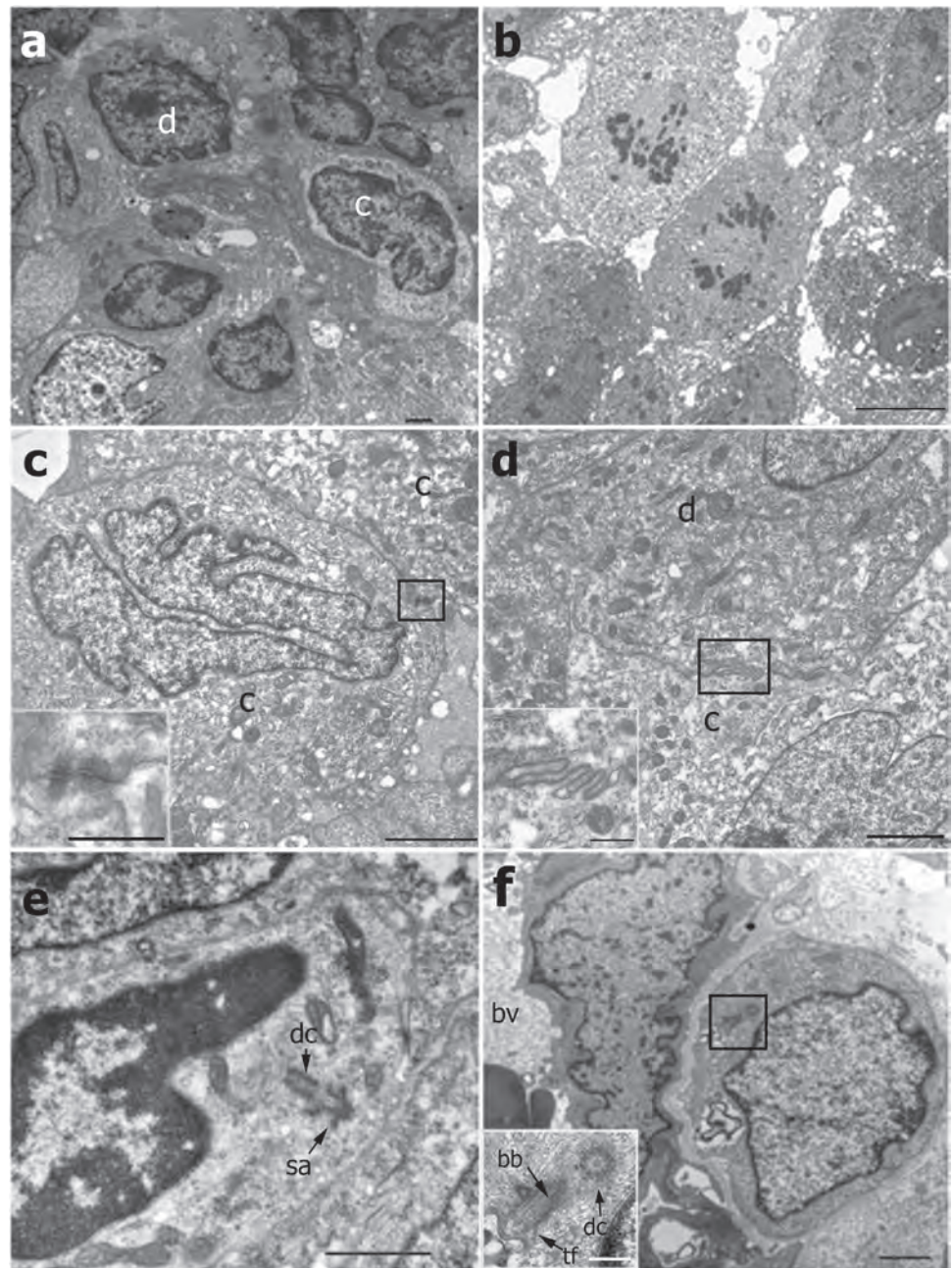


Fig. 9 MIBC ultrastructure. **a** Heterogenous cells were found in MIBC although dark (**d**) and clear (**c**) cells were identifiable. Scale bar = 1 μ m **b** Cells in mitosis showing condensed chromosomes separating to the cellular poles. Scale bar = 10 μ m **c** Clear cell (**c**) with a deep nuclear envelope invagination contacting neighbor clear cell (**c**) by punctual desmosomes (inset). Scale bar = 2 μ m (inset 500 nm) **d** Contacts between dark cells (**d**) and clear cells (**c**) consist of membrane interdigitations (inset). Scale bar = 2 μ m (inset 500 nm) **e** Activated centrioles with subdistal appendages (*sa*) and loss of their perpendicular disposition migrating to the cell membrane were found in MIBC cancer cells. Scale bar = 1 μ m **f** Dark cells of MIBC samples also present primary cilia (inset). Scale bar = 1 μ m (inset 250 nm) *bb* basal body, *tf* transition fibers, *dc* daughter centriole, *bv* blood vessel



Discussion

The present study shows new roles and potential implications of primary cilia in bladder cancer, pointing to the potential importance of this structure in tumor progression and invasiveness, likely in relation with epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) and the cilia-dependent Hedgehog (Hh) signalling pathway.

EMT is a key element in epithelial tumoral cells, which acquire features related to stemness, invasiveness and metastasis (Wever et al. 2008; Lamouille et al. 2014; Prieto-García et al. 2017). In bladder cancer, the EMT-activator Twist has

been related to tumor progression and epithelial markers downregulation (Fondrevelle et al. 2009; Yun and Kim 2013). Accordingly, we found increased Twist expression in MIBC and lower in NMIBC and health controls while the epithelial markers E-cadherin and cytokeratin were down-regulated in MIBC. These results confirmed that EMT program is activated in bladder cancer, especially in invasive tumors.

Several studies have demonstrated the importance of Hh signaling pathway in bladder cancer. However, the exact influence of Hh activation remains controversial. Most studies point that ligand-dependent Hh signaling activation

results in increased tumorigenicity, stemness, EMT and migration in bladder cancer (Fei et al. 2012; Islam et al. 2016; Kitagawa et al. 2019). Furthermore, inhibiting Hh has shown to reduce these effects in bladder cancer cells (Islam et al. 2016; Miao et al. 2018; Kitagawa et al. 2019) and to decrease cancer stem cell population (Wang et al. 2017). Conversely, Shin et al. have shown that Hh expression by urothelial basal cells plays a protective role in bladder cancer by stimulating urothelium differentiation through a feedback loop with stromal cells (Shin et al. 2014a). Consequently, they showed Hh reduction in a mouse model of bladder cancer and human samples (Shin et al. 2014a, b). Our results are in accordance with former works, showing an enhanced expression of Patched, Smo and Gli1 in MIBC. Besides, we did not find Hh pathway components expression in stromal cells or blood vessels as was described in Shin's work (Shin et al. 2014b).

Nevertheless, our experiments interestingly showed that basal cells in some areas of NMIBC presented Hh pathway activation and a reduction of epithelial markers. Our findings suggest that urothelial basal cells are importantly related to EMT and Hh activation in low-grade tumours and probably related to cancer initiation, recurrence and future progression; an idea also shared by other authors (Shin et al. 2014b).

Primary cilia have been straightly related to cancer although their exact role is not completely understood. Hence, it has been related to tumor progression, drug-resistance (Jenks et al. 2018), stemness and EMT activation (Guen et al. 2017) especially through Hh signalling (Chahal et al. 2018; Eguether and Hahne 2018). Moreover, primary cilia have been closely related with cell migration both in physiology and pathology (Schneider et al. 2010; Veland et al. 2014), orientating parallel to the movement direction and sensing different signals that regulate cell migration and interacting directly with the extracellular matrix (Veland et al. 2014). Furthermore, this structure also plays an important role in cellular polarity (Tang and Marshall 2012) and its impairment in tumoral epithelial cells.

Primary cilia presence in urothelium has not been defined. Here, we have described for the first time primary cilia in the healthy bladder, NMIBC and MIBC through immunofluorescence and electron microscopy techniques.

Our results show that primary cilia appear on basal cells of healthy controls and NMIBC. In fact, we have interestingly shown that in low-grade tumours, ciliated cells cross basement membrane and invade stroma, which may explain the high recurrent and progression rates found in NMIBC and may point to primary cilia as an important target in these tumours.

The absence of statistical differences in the proportion of ciliated cells in the samples studied would indicate the importance of primary cilia in every tumoral stage in urothelial carcinoma pointing out a specific subpopulation. Thus,

we believe this ciliated cellular subpopulation might be related to both, physiologic and cancer stem cells in urothelium as they are in other tissues (Lyu and Zhou 2017). These ciliated basal cells would be related to EMT, tumorigenesis, migration and invasiveness, probably through Hh pathway activation regardless of the ciliated cell proportion.

One study described a reduction of primary cilia in high-grade bladder cancer regarding non-cancerous tissues (Du et al. 2018). They described that they practically found no ciliated cells in NMIBC and MIBC. Conversely, we found an important number of ciliated cells in tumoral tissues. These opposite results could be a consequence of the heterogeneity found in human tumours, differences in sample processing or the short-length axoneme of urothelial cells which make cilia identification difficult. This short-length axoneme, generally embedded in the ciliary pocket, is in opposition to the long protruding cilia found in other tumours, such as GIST (Castiella et al. 2013). This difference might be in relation to the characteristic location of primary cilia near the cell membrane in epithelial cells (Sorokin 1968; Bernabé-Rubio and Alonso, 2017) and may affect ciliary signalling sensing.

On the other hand, we have described the main ultrastructural elements of EMT in urothelial carcinoma showing loss of cellular unions, formations of filopodia-like structures (which probable mediate cell migration), loss of polarity and enlargement of intercellular space. These processes are in parallel to primary cilia assembly, which remains during advanced stages (probably regulating tumoral progression). To the best of our knowledge, no one has previously described urothelial carcinoma EMT ultrastructural features.

Other ultrastructural findings showed in the present work point out important features of bladder cancer, i.e. ELCS, multivesicular bodies and autophagic vacuoles. ELCS are composed of chromatin fibers sheathed by inner nuclear membrane. Interestingly, they have been related to quiescent brain stem cells and they have been found in different tumours (Olins and Olins 2009; Cebrián-Silla et al. 2017). No one has described this structure in bladder cancer before. Bladder cancer exosomes play an important role in EMT activation and invasiveness (Franzen et al. 2015). Besides, we found abundant autophagosomes containing different organelles, especially rough endoplasmic reticula. Autophagy plays an important role in bladder cancer viability and drug resistance and its inhibition has been shown to increase tumoral cell apoptosis (Lin et al. 2017a, b).

Moreover, it has been described that primary cilia activate autophagy through Hh signaling (Pampliega et al. 2013), suggesting an additional mechanism for primary cilia-dependent bladder cancer formation and maintaining.

However, the aim of this work was descriptive and focused on human biopsies to analyse the ultrastructure of these tumours, to confirm previous studies of EMT and Hh in bladder cancer lines (Islam et al. 2016; Miao et al. 2018;

Kitagawa et al. 2019) and to give new evidence of primary cilia presence and potential implications. A limitation in this kind of study is the reduced number of samples.

In conclusion, our work sheds light on the importance of primary cilia in bladder cancer showing for the first time the presence of this structure in invasive cells of bladder cancer. Especially interesting is the presence of these ciliated invasive cells in NMBIC, which could explain the high recurrence index of these tumours. Primary cilia may play a fundamental role in basal cells which would initiate tumoral progression and invasiveness even in early tumoral stages probably through EMT and Hh activation. Furthermore, electron microscopy techniques have shown its importance to identify the ultrastructural nature of invading cells, giving evidence of potential targets for bladder cancer treatments.

Acknowledgements Authors would like to acknowledge the use of *Servicio General de Apoyo a la Investigación—SAI, Universidad de Zaragoza*.

Author contributions PI, EM and CB performed immunohistochemical experiments. TC and GM performed pathological analyses. PI, TC and CJ performed electron microscopy and its interpretation. PI and CJ wrote the manuscript. TC and CJ designs the study. All the authors read and approved the manuscript.

Funding No funding was specifically received for the experiments shown in this paper.

Compliance with ethical standards

Conflict of interests The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethics approval and consent declarations All protocols and consents developed were approved by the Human Research Ethics Committee “Comité Ético de Investigación Clínica de Aragón”.

References

- Amakye D, Jagani Z, Dorsch M (2013) Unraveling the therapeutic potential of the Hedgehog pathway in cancer. *Nat Med* 19(11):1410–1422. <https://doi.org/10.1038/nm.3389>
- Antoni S et al (2017) ‘Bladder cancer incidence and mortality: A global overview and recent trends. *Eur Assoc Urol* 71(1):96–108. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.06.010>
- Bernabé-Rubio M, Alonso MA (2017) Routes and machinery of primary cilium biogenesis. *Cell Mol Life Sci* 74(22):4077–4095. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2570-5>
- Bryan RT (2015) Cell adhesion and urothelial bladder cancer: The role of cadherin switching and related phenomena. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0042>
- Castiella T et al (2013) Primary cilia in gastric gastrointestinal stromal tumours (GISTs): An ultrastructural study. *J Cell Mol Med* 17(7):844–853. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12067>
- Cebrián-Silla A et al (2017) Unique organization of the nuclear envelope in the post-natal quiescent neural stem cells. *Stem Cell Reports* 9(1):203–216. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.05.024>
- Chahal KK, Parle M, Abagyan R (2018) Hedgehog pathway and smoothened inhibitors in cancer therapies. *Anticancer Drugs*. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000609>
- Du E et al (2018) Analysis of potential genes associated with primary cilia in bladder cancer. *Cancer Manag Res* 10:3047–3056. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S175419>
- Eguether T, Hahne M (2018) Mixed signals from the cell’s antennae: primary cilia in cancer. *EMBO Rep* 33:e46589. <https://doi.org/10.15252/embr.201846589>
- Fabbri L, Bost F, Mazure N (2019) Primary cilium in cancer hallmarks. *Int J Mol Sci* 20:1336. <https://doi.org/10.3390/ijms20061336>
- Fei DL et al (2012) Hedgehog signaling regulates bladder cancer growth and tumorigenicity. *Cancer Res* 15:4449–4459. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-4123>
- Fondrevelle ME et al (2009) The expression of twist has an impact on survival in human bladder cancer and is influenced by the smoking status. *Urol Oncol* 27(3):268–276. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2007.12.012>
- Franzen CA et al (2015) Urothelial cells undergo epithelial-to-mesenchymal transition after exposure to muscle invasive bladder cancer exosomes. *Oncogenesis* 4(8):e163–e210. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2015.21>
- Global Cancer Observatory (2018) ‘Estimated number of incident cases from 2018 to 2040, liver, both sexes, all ages’, p. 800. Available at: http://gco.iarc.fr/tomorrow/graphic-isotype?type=0&population=900&mode=population&sex=0&cancer=39&age_group=value&apc_male=0&apc_female=0
- Guen VJ et al (2017) EMT programs promote basal mammary stem cell and tumor-initiating cell stemness by inducing primary ciliogenesis and Hedgehog signaling. *Proc Natl Acad Sci*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711534114>
- Humphrey PA et al (2016) The 2016 WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs—Part B: prostate and bladder tumours. *Eur Assoc Urol* 70(1):106–119. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.02.028>
- Iruzubieta P et al (2019) Hedgehog signalling pathway activation in gastrointestinal stromal tumours is mediated by primary cilia. *Gastric Cancer*. <https://doi.org/10.1007/s10120-019-00984-2>
- Islam S et al (2016) Sonic hedgehog (Shh) signaling promotes tumorigenicity and stemness via activation of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in bladder cancer. *Mol Carcinog* 55(5):537–551. <https://doi.org/10.1002/mc.22300>
- Jenks AD et al (2018) Primary cilia mediate diverse kinase inhibitor resistance mechanisms in cancer. *Cell Reports* 23(10):3042–3055. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.05.016>
- Katoh Y, Katoh M (2009) Hedgehog target genes: mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation. *Curr Mol Med*. <https://doi.org/10.2174/156652409789105570>
- Kitagawa K et al (2019) Possible correlation of sonic hedgehog signaling with epithelial–mesenchymal transition in muscle-invasive bladder cancer progression. *J Cancer Res Clin Oncol* 145(9):2261–2271. <https://doi.org/10.1007/s00432-019-02987-z>
- Lamouille S, Xu J, Derynck R (2014) Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15(3):178–196. <https://doi.org/10.1038/nrm3758.Molecular>
- Liedberg F et al (2015) Local recurrence and progression of non-muscle-invasive bladder cancer in Sweden: A population-based follow-up study. *Scand J Urol* 49(4):290–295. <https://doi.org/10.3109/21681805.2014.1000963>
- Lin JF et al (2017a) Cisplatin induces protective autophagy through activation of BECN1 in human bladder cancer cells. *Drug Des Devel Ther* 11:1517–1533. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S12464>

- Lin YC et al (2017b) Chloroquine and hydroxychloroquine inhibit bladder cancer cell growth by targeting basal autophagy and enhancing apoptosis. *Kaohsiung J Med Sci* 33(5):215–223. <https://doi.org/10.1016/j.kjms.2017.01.004>
- Lyu R, Zhou J (2017) The multifaceted roles of primary cilia in the regulation of stem cell properties and functions. *J Cell Physiol* 232(5):935–938. <https://doi.org/10.1002/jcp.25683>
- Malicki JJ, Johnson CA (2017) The cilium: cellular antenna and central processing unit. *Trends Cell Biol* 27(2):126–140. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.08.002>
- Miao X et al (2018) Down-regulation of microRNA-224 -inhibits growth and epithelial-to-mesenchymal transition phenotype -via modulating SUFU expression in bladder cancer cells. *Int J Biol Macromol* 106:234–240. <https://doi.org/10.1016/j.ijbio mac.2017.07.184>
- Nedjadi T et al (2019) Sonic hedgehog expression is associated with lymph node invasion in urothelial bladder cancer. *Pathol Oncol Res* 25(3):1067–1073. <https://doi.org/10.1007/s12253-018-0477-6>
- Olins DE, Olins AL (2009) Nuclear envelope-limited chromatin sheets (ELCS) and heterochromatin higher order structure. *Chromosoma* 118(5):537–548. <https://doi.org/10.1007/s00412-009-0219-3>
- Pampliega O et al (2013) Functional interaction between autophagy and ciliogenesis. *Nature* 502(7470):194–200. <https://doi.org/10.1038/nature12639>
- Prieto-García E et al (2017) Epithelial-to-mesenchymal transition in tumor progression. *Med Oncol*. <https://doi.org/10.1007/s12032-017-0980-8>
- Ramsbottom SA et al (2016) Regulation of hedgehog signalling inside and outside the cell. *J Dev Biol*. <https://doi.org/10.3390/jdb4030023.Regulation>
- Rohatgi R, Milenkovic L, Scott MP (2007) Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science* 317(5836):372–376. <https://doi.org/10.1126/science.1139740>
- Schindelin J et al (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9(7):676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schneider L et al (2010) Directional cell migration and chemotaxis in wound healing response to PDGF-AA are coordinated by the primary cilium in fibroblasts. *Cell Physiol Biochem* 25(2–3):279–292. <https://doi.org/10.1159/000276562>
- Shin K, Lim A, Zhao C et al (2014b) Hedgehog signaling restrains bladder cancer progression by eliciting stromal production of urothelial differentiation factors. *Cancer Cell* 26(4):521–533. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.09.001>
- Shin K, Lim A, Odegaard JI et al (2014a) Cellular origin of bladder neoplasia and tissue dynamics of its progression to invasive carcinoma. *Nat Cell Biol*. <https://doi.org/10.1038/ncb2956>
- Sorokin SP (1968) Centriole formation and ciliogenesis. *Aspen Emphysema Conf* 11:213–216
- Tang N, Marshall WF (2012) Centrosome positioning in vertebrate development. *J Cell Sci* 125(21):4951–4961. <https://doi.org/10.1242/jcs.038083>
- Veland IR, Lindbæk L, Christensen ST (2014) Linking the primary cilium to cell migration in tissue repair and brain development. *Bioscience* 64(12):1115–1125. <https://doi.org/10.1093/biosci/biu179>
- Wang D et al (2017) Curcumin inhibits bladder cancer stem cells by suppressing Sonic Hedgehog pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 493(1):521–527. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.08.158>
- De WO et al (2008) ‘Molecular and pathological signatures of epithelial–mesenchymal transitions at the cancer invasion front. *Histochem Cell Biol*. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0464-1>
- Wheway G, Nazlamova L, Hancock JT (2018) Signaling through the primary cilium. *Front Cell Develop Biol* 6:1–13. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00008>
- Yun SJ, Kim W (2013) ‘Role of the epithelial-mesenchymal transition in bladder cancer: from prognosis to therapeutic target. *Korean J Urol* 54:645–650
- Zeisberg M, Neilson EG (2009) Review series personal perspective Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest* 119(6):1429–1437. <https://doi.org/10.1172/JCI36183.protected>

Publisher’s Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

DISCUSIÓN

1. EL CILIO PRIMARIO Y LA NEUROGÉNESIS ENTÉRICA

Como modelo fisiológico en el que estudiar la presencia y papel del cilio primario, nos hemos centrado en el SNE y, en concreto, en su neurogénesis.

Por un lado, hemos intentado comprender el papel de este orgánulo en la neurogénesis embrionaria del SNE mediante su eliminación selectiva en células progenitoras de ratones transgénicos.

Por otra parte, se ha realizado un estudio ultraestructural e inmunohistoquímico de los ganglios entéricos del colon humano adulto con el fin de identificar aquellas células que expresan cilio primario y buscar su semejanza con las células progenitoras neuronales del SNC, también ciliadas. La neurogénesis en el SNC, mucho mejor conocida, nos permite establecer un paralelismo con el SNE para comprender mejor estos procesos y la potencial implicación del cilio primario en los mismos. Como resultado de este trabajo, hemos publicado un artículo en la revista *“Cellular and Molecular Neurobiology”*.

1.1. EL CILIO PRIMARIO EN LA NEUROGÉNESIS EMBRIONARIA DEL SISTEMA NERVIOSO ENTÉRICO.

Aunque solo contamos con resultados preliminares y con la gran limitación de que solo se logró tener un animal que careciese de cilio en las células progenitoras del SNE, la estancia realizada en el “Institut de Biologie de l’École Normale Supérieure” abre el camino al nada estudiado papel del cilio primario en el desarrollo embrionario del SNE (ver **ANEXO2**). Nuestros resultados muestran que, efectivamente, la eliminación del cilio primario en las células progenitoras del SNE *Phox2b+*, produce un descenso en el número de neuronas que forman el SNE postnatal. Este descenso parece producirse, especialmente, en el colon, la región más distal del SNE, lo que orientaría a una disminución en la migración celular, aunque también se observa un leve descenso de la proliferación de estas células (medida por la expresión de *Ki67*).

Estos hallazgos estarían en consonancia con los estudios que muestran la relación de la enfermedad de Hirschsprung con ciliopatías como el síndrome de Bardet-Biedl o de McKusick-Kaufman (Amiel et al., 2008; Forsyth and Gunay-Aygun, 2020). La enfermedad de Hirschsprung es una neuropatía entérica que se caracteriza por una obstrucción intestinal congénita debida a una agangliosis entérica en los tramos más distales del intestino (Amiel et al., 2008). Entre los genes que más se han relacionado con esta enfermedad se encuentran *RET*, *EDNRB*, *SOX10* o *PHOX2B* (Amiel et al., 2008). Más aún, se ha observado también que la disminución de expresión de proteínas del BBSoma, así como alteraciones en la vía no canónica de Wnt y Hh producen alteraciones en la correcta migración de las células madre de la cresta neural (que expresan cilio primario), provocando una disminución de neuronas entéricas en las zonas distales del tubo digestivo (similar a lo que sucede en la enfermedad de Hirschsprung) y una alteración del peristaltismo (Tobin et al., 2008). Estos resultados apoyan la importancia del cilio primario en la correcta migración de las células de la cresta neural para formar el SNE.

En conclusión, la eliminación del cilio primario en las células progenitoras *Phox2b+*, muestra un fenotipo similar a la enfermedad de Hirschsprung en tanto en cuanto el número de neuronas disminuyó especialmente a nivel distal, con un descenso de hasta el 50%. No obstante, y por desgracia, la ausencia de más ratones con el genotipo adecuado, nos impidió confirmar estos resultados y hacer más estudios como el control del peso, la valoración del tránsito gastrointestinal o

las posibles implicaciones de diferentes vías de señalización como Hh o p75 en estos trastornos, quedando la puerta abierta a futuros estudios.

1.2. EL CILIO PRIMARIO EN LA NEUROGÉNESIS ADULTA ENTÉRICA: DE LAS CÉLULAS INTERSTICIALES DE CAJAL A LAS NEURONAS PASANDO POR LA GLÍA.

Por otra parte, analizamos a nivel ultraestructural e inmunohistoquímico muestras humanas de colon adulto. A partir de estos estudios, identificamos 3 subtipos específicos de glía entérica basada en su localización y sus características ultraestructurales: la glía periférica de los ganglios, glía periférica de los tractos nerviosos y glía del interior de los tractos; hallando en los dos primeros subtipos cilio primario. Del mismo modo, marcadores de neuronas inmaduras como Doblecortina o p75, apoyan la idea de que se produzca neurogénesis adulta en el SNE humano. A pesar de los estudios que relacionan la neurogénesis adulta del SNE con la glía entérica (Laranjeira et al., 2011), nuestros estudios inmunohistoquímicos no lograron hallar marcadores de proliferación en estas células. No obstante, sí que se identificaron en células compatibles con las ICC, que se encontraban alrededor de los ganglios. Esto, junto con el patrón inmunohistoquímico (con marcadores como Nestina) y sus características ultraestructurales únicas, muy relacionadas con la Glía Radial y con las células madre adultas del SNC (presentando cilio primario y con una forma alargada, con abundantes prolongaciones en contacto con la gran diversidad celular que compone el nicho entérico), nos orienta a proponer un nuevo modelo: las ICC supondrían células madre quiescentes que se dividirían de forma asimétrica para originar neuronas a través de un paso intermedio como glía entérica.

Por desgracia, en la gran mayoría de bibliografía existente sobre el SNE y su neurogénesis, las ICC son olvidadas. De esta manera, muchas veces se incluyen dentro del término general glía entérica y rara vez se identifican de forma individual mediante marcadores específicos como c-Kit o ANO1. Esto dificulta el poder relacionar de forma más exacta y directa a estas células con la neurogénesis entérica adulta descrita en la bibliografía. No obstante, existen diferentes indicios y datos indirectos que apoyan esta concepción de las ICC como posibles células madre neuronales. Así, en un trabajo de Boesmans et al. (2015), se clasifica la glía entérica en 4 tipos: la tipo I o intraganglionar, la tipo II ubicada en los tractos nerviosos interganglionares, la tipo III ubicada alrededor de los ganglios, donde forma una red, y la tipo IV, localizada entre las fibras de las capas musculares. Dentro de esta clasificación, cabe destacar que la glía tipo III posee unas características que la identifican perfectamente con las ICC. Así, estas células se encuentran alrededor de los ganglios, emitiendo prolongaciones que conectan con otras células formando una compleja red y también envolviendo los vasos sanguíneos, una característica típica de las ICC (Cantarero et al., 2011). Más aún, Boesmans et al. muestran que esta glía tipo III carece de GFAP mientras que expresa S100 β y Sox10, y sugieren que sería una glía más indiferenciada, más inmadura en relación a la glía tipo I (Boesmans et al., 2015). Cabe destacar que las ICC también se han mostrado que expresen S100 β (Abd-Elhafeez et al., 2020 y resultados propios) y carecen de GFAP. Otro elemento a tener en cuenta, es la positividad de las ICC para Nestina, un marcador relacionado con las células madre neuronales (Vanderwinden et al. 2002; Cantarero Carmona et al. 2011). Además, la mayoría de experimentos que identifican células madre pluripotenciales en el intestino adulto se basan en aislar o estudiar células positivas para Nestina (Suárez-Rodríguez and Belkind-Gerson, 2004; Metzger et al., 2009a; Kulkarni et al., 2017; Yarandi et al., 2020), entre las que se incluirían las ICC. Un hecho importante es que en uno de estos

trabajos, estas mismas células positivas para Nestina expresan c-Kit y CD34, lo que orienta a que se traten de las ICC (Suárez-Rodríguez and Belkind-Gerson, 2004). En ese mismo trabajo, incluso se muestra que esa misma célula progenitora podría dar lugar, además de glía y neuronas, a células musculares lisas (Suárez-Rodríguez and Belkind-Gerson, 2004), las cuales han sido estrechamente relacionadas con las ICC (Torihashi et al., 1999). En consonancia, las ICC también cumplen algunos criterios de las células identificadas como células madre en Kulkarni et al. 2017, como la expresión de Nestina y S100 β (Kulkarni et al., 2017), aunque (a diferencia de las células progenitoras de este trabajo) carecen de GFAP y en nuestros estudios no se aprecia un claro marcaje de p75 en las ICC. También se debe tener en cuenta que, en este artículo, se refieren a las células madre neuronales entéricas como diferentes a la glía entérica (al carecer del marcador Sox10) aunque relacionada (Kulkarni et al., 2017), lo que podría orientar a que este otro tipo celular podrían ser las ICC.

Por otra parte, en nuestro modelo las células madre se encontrarían alrededor de los ganglios (donde se encuentran las ICC y donde observamos células Ki67+) y migrarían hasta integrarse como nuevas neuronas intraganglionares. Esta ubicación extraganglionar de las células madre neuronales entéricas ya ha sido observada por otros autores (Liu et al. 2009), quienes demostraron que el uso de agonistas serotoninérgicos y, en concreto, del receptor 5-HT₄ (5-Hidroxi-triptamina) producía una activación de células progenitoras neuronales extraganglionares que migraban al interior de los ganglios para integrarse en los circuitos neuronales preexistentes. Si bien ellos muestran que estas células extraganglionares ya presentan los marcadores neuronales HuC/D y DCX (Liu et al. 2009), marcaje que nosotros solo hemos detectado a nivel intraganglionar. Más aún, este receptor 5-HT₄ ha sido descrito en neuronas e ICC pero no en células gliales (Liu et al. 2005; Liu et al. 2009). Sin embargo, la adición de agonistas del receptor 5-HT₄, ha mostrado un aumento en la proliferación de células gliales GFAP+ y de neuronas (Belkind-Gerson et al., 2015). En conjunto, estos resultados apoyan nuestro paradigma de que las ICC puedan ser células madre neuronales extraganglionares y, conciliando la bibliografía existente, podría darse a través de un paso intermedio como célula glial (lo que podría explicar el aumento de células GFAP positivas a pesar de no haberse encontrado que expresen 5-HT₄).

En nuestro modelo se produciría la división de las células progenitoras (las ICC) que, mediante un proceso de transdiferenciación, originarían, a través de un paso intermedio como célula glial, una neurona inmadura y, posteriormente, una neurona madura entérica. Esto estaría en consonancia con recientes hallazgos del SNC, donde se ha observado que la neurogénesis de determinadas zonas (incluidas algunas regiones de la ZSV y la ZSG pero también en el córtex, las meninges y la médula espinal) se produce por transdiferenciación de células madre quiescentes sin que se produzca una etapa de proliferación activa (Pino et al., 2017). Otro elemento que podría apoyar este mecanismo es que el cilio primario que encontramos en las células de la glía entérica se encuentra, con frecuencia, embebido en el citoplasma (ver reconstrucción tridimensional) y en células localizadas en la periferia; mientras que el de las ICC protruye profusamente hacia el exterior celular. Esto podría corresponder con la reabsorción del cilio primario durante el proceso de neurogénesis; aunque también se ha descrito la presencia de cilio primario en neuronas entéricas (Luesma et al., 2013). Este proceso dinámico también supondría un paralelismo con la neurogénesis adulta del SNC, donde, inicialmente, el cilio primario de las células madre se desensambla y, posteriormente, las nuevas neuronas vuelven a presentar cilio primario que, de hecho, es fundamental para su correcta integración dentro de los circuitos preexistentes (Han et al., 2008; Kumamoto et al., 2012; Lim and Alvarez-Buylla, 2014).

En este trabajo, hemos mostrado, por primera vez, la presencia de cilio primario en algunos subtipos de las células gliales y hemos tratado de relacionarlo con la neurogénesis entérica y con otra célula frecuentemente ciliada en el SNE: las ICC (Cantarero et al., 2011; Junquera et al., 2011).

El papel del cilio primario en la neurogénesis adulta del SNE (y aún en la fisiología general del SNE) es completamente desconocido; sin embargo, son varios los trabajos que señalan su importancia en la neurogénesis adulta de los nichos neurogénicos clásicos del SNC (ver apartado Cilio y Neurogénesis del Marco Teórico). En este sentido, esta estructura actúa como mecano y quimiosensor y participa en multitud de vías de señalización y de funciones celulares fundamentales para el control y regulación de la neurogénesis (ciclo celular, diferenciación, “stemness”, migración celular...). En concreto existe algún trabajo que, de forma indirecta, podría relacionar el cilio primario con la neurogénesis entérica. Así, el receptor neurotrófico p75, fundamental para el desarrollo del SNE (Nagy and Goldstein, 2017) y relacionado con la neurogénesis entérica adulta, se ha encontrado también en neuronas granulares del hipocampo, donde se ubica en el cilio primario (Chakravarthy et al., 2010). En nuestros experimentos inmunohistoquímicos hemos observado la presencia de este marcador en neuronas inmaduras localizadas en la periferia de los ganglios entéricos. Por otra parte, aunque se conoce poco de las diferentes vías de señalización que median la neurogénesis entérica, existen algunos trabajos que implican vías cilio-dependientes. Así, se ha objetivado el papel de la vía mTOR (a través de PTEN y Akt), de manera que la activación de esta vía produciría un aumento en la neurogénesis entérica (Becker et al., 2013). Respecto a la vía Hh, células compatibles con ICCs de la lámina propia expresan Gli1 y, de hecho, expresan factores neurotróficos fundamentales para el mantenimiento del nicho de las células madre epiteliales del intestino (Degirmenci et al., 2018). No obstante, aún queda mucho por entender del papel de esta estructura en las células del SNE y serán necesarios futuros trabajos para esclarecer sus implicaciones en la neurogénesis entérica adulta.

En conclusión, la diversidad de trabajos, el uso de diferentes marcadores (siendo Nestina el más extendido y el utilizado unánimemente en todos los trabajos realizados) y la no referencia clara en prácticamente ninguno de ellos a las ICC (ni uso de marcadores específicos), dificulta la identificación exacta de las ICC como células progenitoras. No obstante, son muchos los indicios, incluyendo los marcadores utilizados (entre los que se encuentran marcadores de proliferación celular como Ki67), su localización espacial, sus interacciones con el nicho neurogénico entérico, la expresión de cilio primario (una estructura presente y con importante implicaciones en las células madre neuronales adultas del SNC) y el hecho de que en varios trabajos también se apunte a que esas células progenitoras originan células musculares. Además, y dados los artículos que identifican marcadores gliales como GFAP o Sox10 con esta neurogénesis, así como la presencia (descrita por primera vez en este trabajo) del cilio primario en la glía entérica y la presencia de marcadores comunes en ambos tipos celulares (como Nestina) proponemos que pueda darse un paso intermedio de ICC a glía, de forma paralela a lo que se produce en la neurogénesis central.

Con el fin de intentar reunir la bibliografía existente (en ocasiones, divergente) en las tablas siguientes (**Tabla 7 y 8**) se reúnen los principales marcadores de cada tipo celular y los principales trabajos sobre neurogénesis adulta entérica y sus características principales.

Tabla 7. Marcadores de las principales células del SNE.
Datos extraídos a partir de la bibliografía citada y resultados propios.

ICC	Glía	Neurona inmadura	Neurona madura
Nestina	Nestina	Doblecortina	PGP9.5
C-Kit	S100 β	P75	C-RET
ANO1	GFAP	PGP9.5	NSE
Vimentina	Sox10	C-RET	HuC/D
CD34	PLP1	NSE	Tuj1
S100 β		HuC/D	
		Tuj1	

Tabla 8. Selección de artículos sobre la neurogénesis entérica.
Marcadores de las células progenitoras y modelo que se utilizó en el estudio.

Referencia	Marcadores	Modelo
Suárez-Rodríguez and Belkind-Gerson, 2004	Nestina+, Vimetina+, CD34+, c-Kit+	<i>In vitro</i> . Ratón.
Metzger et al., 2009b	Nestina+, p75+, Sox10+,GFAP-	<i>In vitro</i> . Humano
Laranjeira et al., 2011	Sox10+	<i>In vivo</i> . Ratón. Inducido por lesión.
Azan et al., 2011	Nestina+, PGP9.5+, S100b-	<i>Ex vivo</i> . Humano.
Kulkarni et al., 2017	Nestina+, p75+, Sox10-, GFAP+	<i>In vivo</i> . Ratón.
Yarandi et al., 2020	Nestina+, TLR2+, TLR4+	<i>In vivo</i> . Ratón.

Un elemento importante a la hora de valorar la neurogénesis adulta del SNE es la posible diferencia entre la neurogénesis fisiológica y la secundaria a una lesión (Laranjeira et al., 2011; Kulkarni et al., 2017). Así, se ha propuesto que, en cada caso, se activarían poblaciones progenitoras diferentes, siendo en situaciones patológicas células gliales y, en fisiológicas, una población celular diferente a la glía entérica (Kulkarni et al., 2017) (**Figura 2.4 del Marco Teórico**). En nuestro modelo, esta población podría estar compuesta por las ICC. Esta diferencia se hace más patente si tenemos en cuenta que en modelos patológicos, la inhibición de c-Kit produce un aumento de la producción de nuevas neuronas (aunque en una localización ectópica), efecto que no se observa en situaciones fisiológicas (Tamada and Kiyama, 2016). Estos resultados vuelven a poner el foco en la relación entre las ICC y la neurogénesis entérica.

En definitiva, el cilio primario ha mostrado jugar un papel fundamental tanto en la embriogénesis como en la neurogénesis adulta del SNC. Nuestros trabajos han tratado de arrojar algo más de luz sobre las posibles implicaciones de esta estructura celular en la neurogénesis entérica, apoyándonos en un probable paralelismo entre el SNC y el SNE, basados también en estudios que proponen un origen filogenético común para ambos sistemas (Furness and Stebbing 2017). Aunque son precisos más experimentos y más estudios que completen y refuercen el trabajo iniciado por nosotros, los resultados preliminares sugieren una importancia vital del cilio primario para un correcto desarrollo del SNE, fundamentalmente a nivel distal. Por otra parte, en los ganglios miéntéricos del colon humano adulto, tanto las ICC como algunos subtipos de glía entérica muestran cilio primario, lo que (reforzado por la expresión de diferentes marcadores asociados a la neurogénesis entérica y central)

apoya la idea de que se produzca una neurogénesis adulta en el SNE humano y que el cilio primario juegue un papel importante en la misma. Comprender la función real del cilio primario en estos procesos, las rutas de señalización implicadas y si las ICC, tal y como proponemos, realmente suponen una población de células madre neuronales, tendría importantes implicaciones tanto a nivel de comprensión del funcionamiento del SNE como a nivel terapéutico, ya que se podría tratar de actuar sobre esta estructura y sobre las ICC con el fin de tratar diferentes neuropatías entéricas. Más aún, tener una población de células madre neuronales a nivel entérico (fácilmente accesible por endoscopia), abre la posibilidad de utilizarlas con fines regenerativos en patologías del SNC. Aunque pueda parecer fantástico, este uso de las células madre neuronales entéricas en medicina regenerativa para tratar patologías tanto del SNE como SNC, ya ha empezado a ser explorado y se han publicado trabajos de gran interés que exploran el injerto de células madre neuronales entérica en el SNE y en el SNC (Burns et al., 2016; Cheng et al., 2017; Jevans et al., 2018).

2. EL CILIO PRIMARIO EN PROCESOS TUMORALES

En el transcurso de esta tesis también se ha analizado el papel del cilio primario en un proceso patológico. Para ello nos hemos centrado en tumores de diferentes estirpes, fundamentalmente mesenquimales (GIST y tumor de células gigantes óseo) y epiteliales (carcinoma urotelial de vejiga). De forma más sucinta, también se ha analizado algún tipo de tumor del SNC, en concreto un glioma de bajo grado.

En general, estos estudios han mostrado la presencia de cilio primario en las células tumorales y han explorado las implicaciones de este orgánulo en relación a elementos fundamentales de las neoplasias como, por ejemplo, la transición epitelio-mesenquimal o vías de señalización como Hh.

2.1. TUMOR DEL ESTROMA GASTROINTESTINAL

Los GIST son tumores mesenquimales procedentes de las ICC o de un progenitor común a ambos (Hirota, 1998; Kindblom et al., 1998). En consonancia, la mayoría de los tumores GIST expresan marcadores relacionados con las ICC como c-Kit (80-95%), ANO1 (90-95%) o CD34 (70%) (Miettinen et al., 2009; Tornillo, 2014). Además, la mayoría de tumores GIST se relacionan con mutaciones de ganancia de función en los genes KIT o PDGFR (Niinuma et al., 2018). En el trabajo presentado en esta tesis (y publicado en la revista *"Gastric Cancer"*), hemos confirmado la presencia del cilio primario en estos tumores (como había sido descrito por nuestro grupo en Castiella et al. 2013) y, además, hemos profundizado en su estudio mediante técnicas inmunohistoquímicas y de inmunofluorescencia. Más aún, hemos realizado un estudio tridimensional a partir de imágenes seriadas de TEM, logrando una comprensión espacial óptima de la disposición del cilio primario, sus componentes y su relación con el microambiente tumoral. Además, se ha analizado la presencia de los elementos que componen la vía Hh (Ptch, Smo, Gli1) y se ha observado cómo en los tumores GIST se produce una localización de Ptch en el cuerpo basal y una entrada de Gli1 al núcleo, sugiriendo la activación de la vía Hh de una forma ligando-dependiente a través del cilio primario. Por otra parte,

se observó una tendencia a una mayor presencia de Gli1 en el núcleo de las células de tumores de alto grado.

Estos resultados están en consonancia con los trabajos publicados que muestran una disminución de la viabilidad de células GIST en cultivo al inhibir la vía Hh (Saponara et al., 2015; Tang et al., 2016) así como su relación con la vía c-Kit. De esta manera, la forma represora de Gli3, se uniría al promotor de c-Kit produciendo la inhibición de su expresión. Ante la activación de la vía Hh, se produciría la degradación de Gli3 y la liberación de Gli1 y Gli2, lo que conllevaría un aumento de la expresión de c-Kit (Tang et al., 2016). Esta activación de Hh, que tanto estos trabajos como nosotros hemos demostrado, se produciría incluso en los tumores GIST que carecen de mutación de ganancia de función en c-Kit y PDGFR (los llamados tumores *wildtype*) (Tang et al., 2016) y explicaría la tumorigénesis de estos tumores así como la sobreexpresión de c-Kit incluso en ausencia de mutación.

Más aún, la proteína ANO1 (también presente en las ICC) juega un importante papel en la ciliogénesis. Así, en células epiteliales en cultivo esta proteína, que forma un canal de cloro activado por calcio, se organiza formando un anillo (*nimbus*) que acumula proteínas relacionadas con la ciliogénesis (como Arl13b o proteínas del sistema *exocyst*) y su bloqueo inhibe la formación y extensión del cilio primario (Ruppersburg and Hartzell, 2014).

En definitiva, el cilio primario supone una característica frecuente de las células tumorales de los GIST, donde media la vía Hh probablemente regulando otras vías (como, por ejemplo, c-Kit o PDGFR, que también ha sido descrita en relación al cilio primario) y el crecimiento, proliferación e invasión de estos tumores. Característicamente, en estos tumores el cilio protruye hacia el exterior, probablemente por su importante relación con elementos extracelulares como señales del microambiente tumoral.

2.2. TUMOR DE CÉLULAS GIGANTES ÓSEO

Otro de los trabajos se ha basado en el estudio de la presencia del cilio primario y sus potenciales implicaciones en el tumor de células gigantes óseo. Este tipo de tumor está formado por tres tipos celulares (Goldring et al., 1987): las células tumorales o células estromales, las células histiocitarias mononucleares y las células gigantes multinucleares. Por una parte, las células estromales neoplásicas están estrechamente relacionadas con las células madre mesenquimales y, en concreto, con el linaje osteoblástico (aunque también pueden originar condroblastos y adipocitos) (Wülling et al., 2003); además, se ha identificado en estas células una mutación específica (G34W) en el gen *H3F3A*, que codifica la Histona 3.3, y que supone una importante herramienta para el diagnóstico de estos tumores (Cleven et al., 2015). Por otra parte, los otros dos tipos celulares son de carácter reactivo procedentes del linaje monocítico-macrófago. Nuestro trabajo ha mostrado la presencia de cilio primario en las células estromales tumorales, demostrando la co-localización de esta estructura en células positivas para la mutación G34W en la Histona 3.3. Más aún, mediante tinciones inmunohistoquímicas hemos observado la presencia de los componentes de la vía Hh (Ptch, Smo y Gli1) en células mononucleares, que corresponderían a las células tumorales.

Estos resultados están en concordancia con los estudios que relacionan el cilio primario con importantes funciones de los osteoblastos y las células madre mesenquimales, donde juega importantes funciones para la regulación de la señalización de vías como la de PTH (Hormona Paratiroidea) y RANKL (*Receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand*) (Tummala et al., 2010; Martín-Guerrero et al., 2020). Por otra parte, también se ha relacionado la vía Hh en procesos de diferenciación hacia el linaje osteoblástico, activando la expresión de Runx2 (*Runt-related transcription factor 2*), también conocido como CBFA1 (*core-binding factor subunit alpha-1*) y en la osificación endocondral (en concreto a partir del ligando Ihh) (Long et al., 2004; Rutkovskiy et al., 2016; Komori, 2019).

En lo referente a otros tumores óseos, se ha observado una disminución en la proporción de células con cilio primario en muestras de condrosarcoma (Andrea et al., 2015), mientras que apareció aumentado en una línea celular de osteosarcoma (MG63) (Kowal and Falk, 2015). Además, el cilio primario regula la pérdida de polaridad celular en el osteocondroma (Andrea et al., 2010). Del mismo modo, se han detectado alteraciones de la vía de señalización Hh en diferentes enfermedades neoplásicas óseas incluyendo encondromas, osteocondromas u osteosarcomas (Tiet and Alman, 2003; Qu et al., 2018). En este último, se demostró la importancia de la vía Hh en la viabilidad tumoral, su resistencia a la radioterapia y la supresión de la apoptosis (Qu et al., 2018). Más aún, células mononucleares positivas para Ihh han sido identificadas en tumores de células gigantes óseos, respaldando nuestros resultados, que implican la vía Hh en estos tumores (Horvai et al., 2012). Además, debemos tener en cuenta que el cilio no aparece en las células gigantes reactivas y que, en ocasiones, se asocia a elementos como las ELCS (*Nuclear Envelope-Limited Chromatin Sheets*), especializaciones de la envoltura nuclear que se han relacionado con células madre quiescentes y algunos tipos tumorales (Olins and Olins, 2009; Cebrián-Silla et al., 2017;).

En conjunto, estos resultados muestran la presencia de cilio primario y la activación de la vía Hh en las células estromales de los tumores de células gigantes óseos y apuntan a una posible diana terapéutica, así como un posible marcador de las células madre tumorales.

2.3. CARCINOMA UROTELIAL DE VEJIGA.

Otro de los trabajos realizados ha consistido en estudiar la presencia y relación de la EMT, la vía Hh y el cilio primario con la progresión de los carcinomas uroteliales. Hemos observado cómo la activación de la EMT y de la vía Hh se produce, de manera progresiva, según aumenta el estadio tumoral, siendo especialmente importante en los tumores que invaden la capa muscular.

Por una parte, hemos analizado la expresión de marcadores asociados a la EMT en los carcinomas uroteliales. Así, se ha propuesto que, en un porcentaje importante de carcinomas uroteliales, se produciría un cambio en la expresión de cadherinas, disminuyendo la E-cadherina (de características epiteliales) y aumentando la N-cadherina (típica de neuronas y células mesenquimales) y la P-cadherina (presente en células de la capa basal de los epitelios) (Bryan, 2015). Por otra parte, son varios los factores de transcripción asociados a la EMT que se han relacionado con el carcinoma urotelial, entre los que cabe destacar Twist (Yun and Kim, 2013), cuya expresión se ha asociado con el pronóstico de los pacientes (Fondrevelle et al., 2009). Nuestro trabajo va en consonancia con los resultados previos, mostrando una disminución de los marcadores epiteliales E-Cadherina y Citoqueratina y un incremento de marcadores de EMT (y, en concreto, de Twist) en los tumores

uroteliales, iniciándose ya en tumores de bajo grado y mateniéndose especialmente activada en carcinomas invasivos.

Además, el estudio mediante microscopía electrónica nos ha permitido identificar las características ultraestructurales de la EMT, un aspecto muy poco estudiado previamente. De esta manera, en los tejidos de carcinoma urotelial (incluso en los estadios iniciales) hemos observado una pérdida de la polaridad apicobasal de las células uroteliales normales, así como la pérdida de uniones intercelulares (fundamentalmente de desmosomas) y el aumento del espacio intercelular. Especialmente interesante también es la aparición de estructuras similares a filopodios o proyecciones digitiformes que suponen especializaciones de la membrana plasmática y que están estrechamente implicadas en procesos de migración e invasión celular (Lamouille et al., 2014).

Por otra parte, son varios los artículos que relacionan la vía Hh con el carcinoma urotelial de vejiga, aunque existe cierta controversia sobre el papel exacto que desempeña esta vía. Así, hay un grupo cuyos trabajos muestran que las células de las capas basales (que expresan Shh) son las células madre de las que procede tanto el urotelio fisiológico como los carcinomas uroteliales, y que es la pérdida de expresión de Shh (y la consecuente inactivación de la vía Hh en las células estromales) la que produce un microambiente que favorece el desarrollo de tumores *in situ* y, posteriormente, de carcinomas invasivos (Shin et al., 2014a; Shin et al., 2014b). Por el contrario, existen otros grupos que muestran que un aumento de la activación de la vía Hh en las células tumorales se asocia a un aumento en su capacidad de migración, su invasión y el crecimiento tumoral (Fei et al., 2012; Islam et al., 2016; Wang et al., 2017; Kitagawa et al., 2019). De hecho, se ha propuesto que la activación de esta vía en el carcinoma urotelial sea ligando-dependiente (Fei et al., 2012), lo que apuntaría directamente al cilio primario como mediador de esta activación. Sin embargo, ningún trabajo previo ha abordado la relación del cilio primario, la vía Hh y la EMT en este tipo de tumores. Nuestros resultados sugieren, como el grupo de Shin, que el inicio tumoral se produce a partir de las células basales, que expresan cilio y empiezan a atravesar la membrana basal; sin embargo, los estudios inmunohistoquímicos reflejan un aumento de la expresión de marcadores de la vía Hh como Smo, Ptch o Gli1 (con un marcaje nuclear, signo de activación de la vía), especialmente marcado en los tumores invasivos. Estos resultados aúnan las propuestas de los dos grupos y muestran que la activación de la vía Hh mediada, probablemente, por el cilio primario se relaciona con la progresión tumoral.

Otro hallazgo de este trabajo es la presencia, en algunas regiones concretas de tumores de bajo grado, de marcadores de activación de Hh y EMT en las capas más cercanas a la membrana basal. Esto debe añadirse a la aparición de algunas células atravesando la membrana basal en los tumores de bajo grado y la presencia de células tumorales ciliadas en la lámina propia, próximas a los vasos sanguíneos, y que se desprenden de parte de su citoplasma. Estos resultados sugieren que, ya en estadios iniciales, se produce la invasión por parte de células tumorales y que el cilio juega un importante papel en estos procesos; lo que podría explicar por qué los carcinomas uroteliales de bajo grado tienen una recurrencia de hasta el 50% (Liedberg et al., 2015), pudiendo señalar nuevas dianas terapéuticas.

En relación a estos hallazgos, son escasos los trabajos que estudian directamente el cilio primario en el carcinoma urotelial y únicamente existe un artículo donde muestran un descenso en los tejidos tumorales frente a los controles (Du et al., 2018). En nuestro trabajo hemos encontrado una

tendencia no significativa a que haya más células ciliadas en los tumores invasivos; sin embargo, la proporción de células ciliadas respecto al total es semejante en los tejidos sanos, los carcinomas de bajo grado y los de alto grado, lo que sugiere que el papel del cilio en los carcinomas uroteliales sea más “cualitativo” que “cuantitativo”. Esto apoyaría a que sea una mayor activación de la vía Hh lo que origina estos tumores. De hecho, ya se ha señalado que la activación de la vía Hh (de manera ligando-dependiente) estimula la EMT del carcinoma urotelial (Islam et al., 2016). Además, el cilio primario (a partir del cuerpo basal y el centriolo hijo, centro organizador de microtúbulos y de los filamentos de actina) modificaría la disposición del citoesqueleto arrastrándolo y, en consecuencia, regulando las uniones intercelulares y la polaridad. Este mecanismo, que relaciona estrechamente el cilio primario con la migración celular, también supondría una relación fundamental en el papel de esta estructura en la EMT.

A este respecto, el cilio primario ha sido vinculado a la EMT y a la migración celular. Así, como hemos visto previamente, el cilio primario se orienta en el sentido del movimiento celular y actúa como una antena que recibe señales quimiotácticas (Veland et al., 2014) (**Fig. 1.17 del Marco Teórico**). Existen algunos trabajos que empiezan a explorar la relación directa del cilio primario con la EMT. Por una parte, se ha observado que los factores de transcripción asociados a la EMT (incluyendo Twist) inducen la ciliogénesis y la activación de la vía Hh en un modelo celular de carcinoma basal de mama (Guen et al., 2017) (**Fig 3.7 del Marco Teórico**). Además, en un modelo *in vitro* de glioblastoma multiforme, la expresión de ZEB1 (otro factor de transcripción activado en la EMT) se ha observado en células ciliadas (Sarkisian et al., 2014). No obstante, debemos tener en cuenta que también se han escrito algunos trabajos que proponen que la EMT, la pérdida de la polaridad celular y el aumento de su potencial migratorio estaría en relación a un desensamblaje del cilio (Seeger-Nukpezah et al., 2013; Han et al., 2018) (**Fig 3.7 del Marco Teórico**). Tratando de conciliar ambas perspectivas, quizá la relación del cilio primario con la EMT sea similar a la que mantiene con el ciclo celular (donde activa señales de proliferación y se desensambla acto seguido para permitir la división celular) y los resultados contradictorios sean simplemente un ejemplo de la observación puntual de procesos dinámicos (como la EMT, la regulación del ciclo celular o el ensamblaje y desensamblaje ciliar) desde nuestros experimentos estáticos. Otra opción sería que estos procesos dependan del tipo celular. No obstante, son necesarios más estudios para poder dilucidar la relación de esta estructura con la EMT de una manera exacta.

En definitiva, en función de nuestros resultados y de la bibliografía existente, proponemos que las células basales ciliadas del carcinoma urotelial supondrían células madre tumorales en las que se produciría la activación de mecanismos de EMT y de la vía Hh, adquiriendo características mesenquimales que les permitirían atravesar la lámina propia e iniciando así el proceso de metástasis. Además, esta activación de Hh induciría la proliferación descontrolada que originaría el tumor. De esta manera, el cilio se mostraría, una vez más, como un elemento fundamental en la tumorigénesis.

2.4. GLIOMA DE BAJO GRADO

Un breve trabajo preliminar, enviado como póster al *VIII International Congress of Histology and Tissue Engineering* demuestra las fases de la ciliogénesis y del desarrollo de esferosomas, una estructura multivesicular descrita por nuestro grupo en algunos tipos tumorales (Junquera et al., 2016), en un caso de glioma de bajo grado (ver **ANEXO3**).

En lo referente al cilio primario en los gliomas, la mayoría de trabajos se centran en su presencia en el glioblastoma, donde existe cierta polémica, habiendo trabajos que describen una ciliogénesis defectiva en algunas líneas celulares de estos tumores (Moser et al., 2014), mientras que otros muestran un importante porcentaje de células con cilios normales en biopsias humanas (Sarkisian et al., 2014). Por otra parte, el cilio primario se ha relacionado con la proliferación y resistencia al tratamiento (Álvarez-Satta and Matheu, 2018; Sarkisian and Semple-Rowland, 2019), mostrando un aumento de la apoptosis y de la sensibilidad a quimioterápicos al inhibir la proteína PCM1, fundamental para la ciliogénesis (Hoang-Minh et al., 2016).

2.5. DISCUSIÓN CONJUNTA

De los trabajos previos se concluye la presencia del cilio primario en las células neoplásicas de diferentes tipos tumorales. Esto se encuentra en consonancia con los trabajos realizados que relacionan el cilio primario con elementos fundamentales del desarrollo tumoral (ver sección Cilio Primario y Cáncer del Marco Teórico). Más aún, en estos tumores hemos observado que el cilio primario regula la activación de la vía Hh, muy relacionada con la tumorigénesis (Amakye et al., 2013; Chahal et al., 2018).

A pesar de que la relación entre el cilio primario y las señales de identidad tumorales han sido ampliamente descritas (ver sección Cilio Primario y Cáncer del Marco Teórico), aún son necesarios más estudios para comprender con precisión los mecanismos por los que esta estructura influye en el cáncer. Así, se ha descrito tanto el aumento como el descenso del cilio primario en diferentes estirpes tumorales (**Tabla 6**). Lo más probable es que en todos estos casos haya un malfuncionamiento del cilio primario (en ocasiones por defecto y en otras por exceso) que induzca la activación de señales oncogénicas o altere funciones celulares que desencadenan la proliferación e invasión descontroladas. En nuestra experiencia, todos los tumores estudiados por nuestro grupo expresan cilio, incluso en diferentes estadios. No obstante, hemos encontrado diferencias en los cilios de los tumores estudiados, de manera que en el carcinoma urotelial presentan, por lo general, una menor longitud, mientras que tanto en los GIST como en los tumores de células gigantes óseos protruyen al exterior de manera clara y con un largo axonema. Quizá esto se encuentre en relación a la distinta disposición y formación del cilio primario en las células mesenquimales (donde suele aparecer próximo al núcleo y envuelto en el bolsillo ciliar) frente a las epiteliales (en las que característicamente, suele presentarse en la membrana apical, sin que aparezca un bolsillo ciliar significativo) (Bernabé-Rubio and Alonso, 2017; Sorokin, 1968). Otra posible explicación son las diferentes implicaciones del cilio primario en las diferentes estirpes tumorales, implicando los componentes extra e intracelulares de este. Así, en los tumores epiteliales tendría una importancia capital (además de la función como antena sensorial) el desplazamiento del citoesqueleto por el

cuerpo basal (en relación a procesos de EMT y migración) mientras que en los tumores mesenquimales la función fundamental sería como antena extracelular.

Merece una mención especial las implicaciones que se derivan del cilio primario, la EMT y la invasión celular de los estudios realizados en el carcinoma urotelial. Así, hemos observado la presencia de células atravesando la membrana basal incluso en niveles iniciales de enfermedad y, más interesante aún, alguna de estas células invasoras presenta cilio primario. Esto, junto con la activación del programa de EMT (observándose el aumento de expresión de Twist, la disminución de marcadores epiteliales y características ultraestructurales precisas como la aparición de filopodios, la disminución de uniones intercelulares, la pérdida de polaridad o el aumento del espacio intercelular) y la activación de la vía Hh, muestra las potenciales implicaciones del cilio primario en un aumento de la capacidad invasora de las células del carcinoma urotelial y, en consecuencia, un mayor índice de recidiva y metástasis.

Por otra parte, existen diferentes indicios y hallazgos que nos hacen pensar que, posiblemente, las células que muestran cilio primario en los diferentes tumores sean las células madre tumorales. Esta hipótesis se ve reforzada por la idea de que las células que se están dividiendo de forma activa y descontrolada no podrían expresar cilio primario, ya que el cuerpo basal se utiliza para la formación del huso mitótico (ver Cilio Primario y Ciclo Celular en el Marco Teórico). Además, existen abundantes trabajos que asocian el cilio primario con las células madre y con marcadores de estas como Prominina-1 (Pattabiraman and Weinberg, 2014; Singer et al., 2018; Jászai et al., 2020;). Por otra parte, se ha observado que las células resistentes a quimioterápicos presentan cilio primario (Jenks et al., 2018) y que este regula la sensibilidad a estos fármacos (Hoang-Minh et al., 2016), lo cual coincide con las células madre tumorales, que también son las más resistentes a los fármacos antineoplásicos (Pattabiraman and Weinberg, 2014). Otro elemento a favor de esta conclusión, es que varias de las vías de señalización vinculadas al cilio primario (como Hh o Notch) se han relacionado estrechamente con el mantenimiento de las células madre tumorales y, de hecho, son fundamentales para que estas células conserven la mayoría de sus características identificativas (como la resistencia a fármacos, su menor diferenciación, su capacidad de autorrenovación o su potencial migratorio e invasivo) (Cochrane et al., 2015; Chahal et al., 2018; Liu et al., 2018). Además, en nuestros trabajos hemos identificado la presencia de ELCS en algunas células ciliadas de los tipos tumorales estudiados. Estas estructuras han sido relacionadas con células madre quiescentes en el cerebro adulto donde se han relacionado con el “almacenamiento” de telómeros, y se han propuesto como un marcador de las mismas (Cebrián-Silla et al., 2017). En el futuro, serían necesarios nuevos experimentos que confirmasen la presencia de esta estructura en las células madre tumorales (como la co-localización de marcadores como Prominina-1 y cilio, por ejemplo) y su potencial implicación.

En definitiva, el cilio se relaciona de diferentes maneras con el desarrollo de tumores en formas aparentemente paradójicas tanto en relación a su presencia como a su ausencia si bien en todos los tumores analizados por nuestro grupo, la presencia del cilio primario parece implicarse con la patogénesis tumoral. De ello podemos deducir que dada la heterogeneidad celular entre los diferentes tumores e incluso dentro de las diferentes células que los componen, el cilio primario podría jugar papeles diferentes. Más aún, también se debe tener en cuenta el carácter dinámico de todos estos procesos. De esta manera, proponemos un modelo en el que el cilio primario juega un papel fundamental como antena sensorial en el funcionamiento de las células madre tumorales quiescentes, aquellas más resistentes a los fármacos antitumorales y que se han relacionado muy

estrechamente con la progresión y recidiva tumoral. Ante señales externas (especialmente relacionadas con vías cuya sobreexpresión se ha relacionado con el cáncer, como Hh, mTOR o Wnt) se produciría la activación celular, el consecuente desensamblaje ciliar y la proliferación celular, pasando de ser una célula madre tumoral quiescente, receptiva a señales del microambiente tumoral, a una célula sin cilio que frene el ciclo celular, permitiendo la proliferación descontrolada.

Todos estos resultados orientan a que el cilio primario juegue un importante papel en la génesis, el mantenimiento y la invasión tumorales y, en consecuencia, lo señalan como una potencial diana terapéutica. De hecho, si el cilio primario fuera (como proponemos) una estructura fundamental en las células madre tumorales, desarrollar fármacos que regulen su funcionamiento afectaría directamente al “corazón” del tumor, actuando sobre las células que lo originan y que son las más resistentes a los tratamientos habituales. Apoyando esta idea, fármacos que regulan vías cilio-dependientes, como Hh, ya han sido desarrollados y se utilizan en algunos tipos tumorales concretos (Scales and de Sauvage, 2009; Chahal et al., 2018;).

3. EL CILIO PRIMARIO COMO ELEMENTO FUNDAMENTAL DE LAS CÉLULAS MADRE FISIOLÓGICAS Y TUMORALES

Con el fin de correlacionar los hallazgos relacionados con el cilio primario tanto en el SNE (modelo fisiológico) como en los diferentes tipos tumorales estudiados (modelo patológico), hallamos que en ambos casos el cilio primario podría relacionarse con las células madre y con el mantenimiento de las características de estas células. Apoyan esta conclusión las vías de señalización mediadas por el cilio, su relación con el ciclo celular y la bibliografía existente que lo vincula con otros procesos relacionados como el desarrollo del SNC o la neurogénesis adulta de la ZSV y, sobre todo, de la ZSG. Del mismo modo, hay diferentes vías que han sido relacionadas con el cilio primario y, al mismo tiempo, con las células madre. Especialmente interesante es el caso de la Prominina-1 (Singer et al., 2018; Jászai et al., 2020;) y también de la ruta CDK5-FBW7-NDE1 que regula la quiescencia de células madre tumorales (Takeishi and Nakayama, 2014), el ciclo celular (Izawa et al., 2015) y la ciliogénesis (Kim et al., 2011).

Esto explicaría los hallazgos que hemos realizado en diferentes tipos tumorales, en los que las células que expresan cilio primario son subpoblaciones específicas que presentan unos rasgos más indiferenciados y con características de células madre. Del mismo modo, también apoyaría que las ICC fueran células madre neuronales y el paso intermedio en la neurogénesis como células gliales (que también expresan cilio primario).

En definitiva, el cilio primario, podría ser un marcador de células madre, tanto en la homeostasis celular como cuando esta rompe sus patrones normales de actuación y las células comienzan a proliferar inadecuadamente. Así, actuaría como una antena sensorial, sensible a las señales externas, que podría activar diferentes vías fundamentales para funciones celulares como la proliferación y diferenciación tanto en procesos regenerativos como tumorales.

CONCLUSIONES

1. Nuestros estudios IHQ con marcadores de neuronas inmaduras (DCX, p75, c-RET) confirman la formación de nuevas neuronas en el SNE del colon humano adulto.
2. Poblaciones específicas de células gliales presentan cilio primario y marcadores de células madre neuronales como Nestina. Del mismo modo, las ICC que rodean los ganglios entéricos expresan Nestina y Ki67, además presentan cilio primario, características que las hacen compatibles con células madre neurales.
3. Todo lo anterior nos lleva a proponer un modelo en el que las ICC, a través de un paso intermedio como glía entérica, originarían nuevas neuronas en el SNE humano adulto.
4. Las células de los tumores GIST presentan activación de la vía Hh mediada por el cilio primario. Además, en los tumores de alto grado existe una mayor actividad de esta vía.
5. Las células estromales del tumor de células gigantes óseo presentan cilio primario, así como activación de la vía Hh.
6. Algunas células basales del carcinoma urotelial sufren procesos de EMT y presentan cilio primario. Las células basales de los tumores que atraviesan la membrana basal también expresan cilio primario, lo que indica un importante papel de esta estructura en las fases tempranas del proceso de metástasis.
7. Los marcadores de activación de la vía Hh y de la EMT, correlacionan con el grado de los carcinomas uroteliales, siendo más significativo en los tumores de alto grado.
8. Las características morfológicas del cilio primario son diferentes en función de la estirpe celular del tumor, de manera que en los tumores mesenquimales (GIST y tumor de células gigantes) son largos y protruyen al exterior mientras que en el carcinoma epitelial (carcinoma urotelial) el axonema es más corto. Estas diferencias están probablemente relacionadas con la diferencia en la ciliogénesis en células mesenquimales y epiteliales y con implicaciones específicas del cilio en cada tipo tumoral.
9. El cilio primario es una estructura fundamental tanto de las células madre fisiológicas como de las células madre tumorales, realizando importantes funciones en ambas, lo que le señala como una potencial diana terapéutica.

REFERENCIAS

- Abd-Elhafeez, H. H., Abou-Elhamd, A. S., & Soliman, S. A. (2020). Morphological and immunohistochemical phenotype of TCs in the intestinal bulb of Grass carp and their potential role in intestinal immunity. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70032-y>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2010). *Molecular Biology of the Cell* (5th ed.). Omega.
- Altman, J., & Das, G. D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *The Journal of Comparative Neurology*, *124*(3), 319–335. <https://doi.org/10.1002/cne.901240303>
- Alvarez-Buylla, A., & García-Verdugo, J. M. (2002). Neurogenesis in adult subventricular zone. *The Journal of Neuroscience*, *22*(3), 629–634. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1062-11.2011>
- Álvarez-Satta, M., & Matheu, A. (2018). Primary cilium and glioblastoma. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, *10*, 1–14. <https://doi.org/10.1177/1758835918801169>
- Amador-Arjona, A., Elliott, J., Miller, A., Ginbey, A., Pazour, G. J., Enikolopov, G., Roberts, A. J., & Terskikh, A. V. (2011). Primary Cilia Regulate Proliferation of Amplifying Progenitors in Adult Hippocampus: Implications for Learning and Memory. *Journal of Neuroscience*, *31*(27), 9933–9944. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1062-11.2011>
- Amakye, D., Jagani, Z., & Dorsch, M. (2013). Unraveling the therapeutic potential of the Hedgehog pathway in cancer. *Nature Medicine*, *19*(11), 1410–1422. <https://doi.org/10.1038/nm.3389>
- Amaral, D. G., Scharfman, H. E., & Lavenex, P. (2007). The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Progress in Brain Research*, *163*, 3–22. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(07\)63001-5](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(07)63001-5)
- Amiel, J., Lantieri, F., Burzynski, G., Borrego, S., Pelet, A., Arnold, S., Miao, X., Griseri, P., Brooks, A. S., Antinolo, G., Pontual, L. De, Munnich, A., Kashuk, C., West, K., Wong, K. K., Lyonnet, S., Chakravarti, A., Tam, P. K., Ceccherini, I., ... Fernandez, R. (2008). Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: a review. *Journal of Medical Genetics*, *45*(3), 1–14. <https://doi.org/10.1136/jmg.2007.053959>
- Andrea, C. E. D., Wiweger, M., Prins, F., Bovée, J. V. M. G., Romeo, S., & Hogendoorn, P. C. W. (2010). Primary cilia organization reflects polarity in the growth plate and implies loss of polarity and mosaicism in osteochondroma. *Laboratory Investigation*, *90*(7), 1091–1101. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2010.81>
- Andrea, C. E. De, Zhu, J., Jin, H., Bovée, J. V. M. G., & Jones, K. B. (2015). Cell cycle deregulation and mosaic loss of Ext1 drive peripheral chondrosarcomagenesis in the mouse and reveal an intrinsic cilia deficiency. *Journal of Pathology*, *236*, 210–218. <https://doi.org/10.1002/path.4510>
- Anvarian, Z., Mykytyn, K., Mukhopadhyay, S., Pedersen, L. B., & Christensen, S. T. (2019). Cellular signalling by primary cilia in development, organ function and disease. *Nature Reviews Nephrology*, *15*(4), 199–219. <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0116-9>
- Azan, G., Low, W. C., Wendelschafer-Crabb, G., Ikramuddin, S., & Kennedy, W. R. (2011). Evidence for neural progenitor cells in the human adult enteric nervous system. *Cell and Tissue Research*, *344*(2), 217–225. <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1130-9>

- Baek, H., Shin, H. J., Kim, J. J., Shin, N., Kim, S., Yi, M. H., Zhang, E., Hong, J., Kang, J. W., Kim, Y., Kim, C. S., & Kim, D. W. (2017). Primary cilia modulate TLR4-mediated inflammatory responses in hippocampal neurons. *Journal of Neuroinflammation*, *14*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0958-7>
- Bailey, J. M., Swanson, B. J., Hamada, T., Eggers, J. P., Singh, P. K., Caffery, T., Ouellette, M. M., & Hollingsworth, M. A. (2008). Sonic Hedgehog Promotes Desmoplasia in Pancreatic Cancer. *Clinical Cancer Research*, *14*(19), 5995–6004. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0291>
- Basile Carballo, G., Ribeiro Honorato, J., Pinto Farias de Lopes, G., & Leite de Sampaio e Spohr, T. C. (2018). A highlight on Sonic hedgehog pathway. *Cell Communication and Signaling*, *16*(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s12964-018-0220-7>
- Basten, S. G., Willekers, S., Vermaat, J. S., Slaats, G. G., Voest, E. E., van Diest, P. J., & Giles, R. H. (2013). Reduced cilia frequencies in human renal cell carcinomas versus neighboring parenchymal tissue. *Cilia*, *2*(1), 2. <https://doi.org/10.1186/2046-2530-2-2>
- Bauer, N., Wilsch-Bräuninger, M., Karbanová, J., Fonseca, A. V., Strauss, D., Freund, D., Thiele, C., Huttner, W. B., Bornhäuser, M., & Corbeil, D. (2011). Haematopoietic stem cell differentiation promotes the release of prominin-1/CD133-containing membrane vesicles—a role of the endocytic-exocytic pathway. *EMBO Molecular Medicine*, *3*(7), 398–409. <https://doi.org/10.1002/emmm.201100147>
- Becker, L., Peterson, J., Kulkarni, S., & Pasricha, P. J. (2013). Ex Vivo Neurogenesis within Enteric Ganglia Occurs in a PTEN Dependent Manner. *PLoS ONE*, *8*(3), e59452. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059452>
- Belkind-Gerson, J., Carreon-Rodriguez, A., Benedict, L. A., Steiger, C., Pieretti, A., Nagy, N., Dietrich, J., & Goldstein, A. M. (2013). Nestin-expressing cells in the gut give rise to enteric neurons and glial cells. *Neurogastroenterology & Motility*, *25*(1), 61–67. <https://doi.org/10.1111/nmo.12015>
- Belkind-Gerson, Jaime, Hotta, R., Nagy, N., Thomas, A. R., Graham, H., Cheng, L., Solorzano, J., Nguyen, D., Kamionek, M., Dietrich, J., Cherayil, B. J., & Goldstein, A. M. (2015). Colitis Induces Enteric Neurogenesis Through a 5-HT4-dependent Mechanism. *Inflammatory Bowel Diseases*, *21*(4), 870–878. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000326>
- Bergmann, O., Spalding, K. L., & Frisén, J. (2015). Adult Neurogenesis in Humans. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *7*(7), a018994. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018994>
- Bernabé-Rubio, M., & Alonso, M. A. (2017). Routes and machinery of primary cilium biogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *74*(22), 4077–4095. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2570-5>
- Bernabé-Rubio, M., Andrés, G., Casares-Arias, J., Fernández-Barrera, J., Rangel, L., Reglero-Real, N., Gershlick, D. C., Fernández, J. J., Millán, J., Correas, I., Miguez, D. G., & Alonso, M. A. (2016). Novel role for the midbody in primary ciliogenesis by polarized epithelial cells. *Journal of Cell Biology*, *214*(3), 259–273. <https://doi.org/10.1083/jcb.201601020>
- Bloodgood, R. A. (2009). From central to rudimentary to primary: the history of an underappreciated organelle whose time has come. The primary cilium. In *Methods in cell biology* (Vol. 94). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/s0091-679x\(08\)94001-2](https://doi.org/10.1016/s0091-679x(08)94001-2)

- Boehlke, C., Kotsis, F., Patel, V., Braeg, S., Voelker, H., Bredt, S., Beyer, T., Janusch, H., Hamann, C., Gödel, M., Müller, K., Herbst, M., Hornung, M., Doerken, M., Köttgen, M., Nitschke, R., Igarashi, P., Walz, G., & Kuehn, E. W. (2010). Primary cilia regulate mTORC1 activity and cell size through Lkb1. *Nature Cell Biology*, *12*(11), 1115–1122. <https://doi.org/10.1038/ncb2117>
- Boesmans, W., Lasrado, R., Vanden Berghe, P., & Pachnis, V. (2015). Heterogeneity and phenotypic plasticity of glial cells in the mammalian enteric nervous system. *Glia*, *63*(2), 229–241. <https://doi.org/10.1002/glia.22746>
- Boldrini, M., Fulmore, C. A., Tartt, A. N., Simeon, L. R., Pavlova, I., Poposka, V., Rosoklija, G. B., Stankov, A., Arango, V., Dwork, A. J., Hen, R., & Mann, J. J. (2018). Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. *Cell Stem Cell*, 589–599. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.03.015>
- Bonafina, A., Paratcha, G., & Ledda, F. (2020). Deciphering New Players in the Neurogenic Adult Hippocampal Niche. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*(July), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00548>
- Boukhalfa, A., Miceli, C., Ávalos, Y., Morel, E., & Dupont, N. (2019). Interplay between primary cilia, ubiquitin-proteasome system and autophagy. *Biochimie*, *166*, 286–292. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.06.009>
- Braun, D. A., & Hildebrandt, F. (2017). Ciliopathies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *9*(3). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028191>
- Bray, S. J. (2016). Notch signalling in context. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *17*(11), 722–735. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.94>
- Breunig, J. J., Sarkisian, M. R., Arellano, J. I., Morozov, Y. M., Ayoub, A. E., Sojitra, S., Wang, B., Flavell, R. A., Rakic, P., & Town, T. (2008). Primary cilia regulate hippocampal neurogenesis by mediating sonic hedgehog signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(35), 13127–13132. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804558105>
- Bryan, R. T. (2015). Cell adhesion and urothelial bladder cancer: The role of cadherin switching and related phenomena. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *370*(1661). <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0042>
- Burke, R., Nellen, D., Bellotto, M., Hafen, E., Senti, K.-A., Dickson, B. J., & Basler, K. (1999). Dispatched, a Novel Sterol-Sensing Domain Protein Dedicated to the Release of Cholesterol-Modified Hedgehog from Signaling Cells. *Cell*, *99*(7), 803–815. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81677-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81677-3)
- Burns, A. J., Goldstein, A. M., Newgreen, D. F., Stamp, L., Schäfer, K., Metzger, M., Hotta, R., Young, H. M., Andrews, P. W., Thapar, N., Belkind-Gerson, J., Bondurand, N., Bornstein, J. C., Chan, W. Y., Cheah, K., Gershon, M. D., Heuckeroth, R. O., Hofstra, R. M. W., Just, L., ... Vanden Berghe, P. (2016). White paper on guidelines concerning enteric nervous system stem cell therapy for enteric neuropathies. *Developmental Biology*, *417*(2), 229–251. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.04.001>
- Cai, S., Bodle, J. C., Mathieu, P. S., Amos, A., Hamouda, M., Bernacki, S., Mccarty, G., & Lobo, E. G. (2017). Primary cilia are sensors of electrical field stimulation to induce osteogenesis of human adipose-derived stem cells. *FASEB Journal*, *31*(1), 346–355. <https://doi.org/10.1096/fj.201600560R>

- Cantarero Carmona I, Luesma Bartolomé, M. J., Lavoie-Gagnon, C., & Junquera Escribano, C. (2011). Distribution of nestin protein: Immunohistochemical study in enteric plexus of rat duodenum. *Microscopy Research and Technique*, *74*(2), 148–152. <https://doi.org/10.1002/jemt.20884>
- Cantarero, I., Luesma, M. J., & Junquera, C. (2011). The primary cilium of telocytes in the vasculature: electron microscope imaging. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *15*(12), 2594–2600. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01312.x>
- Caramel, J., Ligier, M., & Puisieux, A. (2018). Pleiotropic Roles for ZEB1 in Cancer. *Cancer Research*, *78*(1), 30–35. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-2476>
- Castiella, T., Muñoz, G., Luesma, M. J., Santander, S., Soriano, M., & Junquera, C. (2013). Primary cilia in gastric Gastrointestinal Stromal Tumours (GISTs): An ultrastructural study. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *17*(7), 844–853. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12067>
- Cebrián-Silla, A., Alfaro-Cervelló, C., Herranz-Pérez, V., Kaneko, N., Park, D. H., Sawamoto, K., Alvarez-Buylla, A., Lim, D. A., & García-Verdugo, J. M. (2017). Unique Organization of the Nuclear Envelope in the Post-natal Quiescent Neural Stem Cells. *Stem Cell Reports*, *9*(1), 203–216. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.05.024>
- Chahal, K. K., Parle, M., & Abagyan, R. (2018). Hedgehog pathway and smoothed inhibitors in cancer therapies. *Anti-Cancer Drugs*, *29*(5), 387–401. <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000609>
- Chakravarthy, B., Gaudet, C., Ménard, M., Atkinson, T., Chiarini, A., Dal Prà, I., & Whitfield, J. (2010). The p75 neurotrophin receptor is localized to primary cilia in adult murine hippocampal dentate gyrus granule cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *401*(3), 458–462. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.09.081>
- Chen, T., Huang, B., Tang, T. K., & Wang, L. Y. C. (2021). Genotoxic stress-activated DNA-PK-p53 cascade and autophagy cooperatively induce ciliogenesis to maintain the DNA damage response. 1865–1879. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-00713-8>
- Cheng, L., Hotta, R., Graham, H., Belkind-Gerson, J., Nagy, N., & Goldstein, A. M. (2017). Postnatal human enteric neuronal progenitors can migrate, differentiate, and proliferate in embryonic and postnatal aganglionic gut environments. *Pediatric Research*, *81*(5). <https://doi.org/10.1038/pr.2017.4>
- Choi, B. K. A., D'Onofrio, P. M., Shabanzadeh, A. P., & Koeberle, P. D. (2019). Stabilization of primary cilia reduces abortive cell cycle re-entry to protect injured adult CNS neurons from apoptosis. *PLoS ONE*, *14*(8), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220056>
- Choudhry, Z., Rikani, A. A., Choudhry, A. M., Tariq, S., Zakaria, F., Asghar, M. W., Sarfraz, M. K., Haider, K., Shafiq, A. A., & Mobassarah, N. J. (2014). Sonic hedgehog signalling pathway: a complex network. *Annals of Neurosciences*, *21*(1), 28–31. <https://doi.org/10.5214/ans.0972.7531.210109>
- Christensen, S. T., Clement, C. A., Satir, P., & Pedersen, L. B. (2012). Primary cilia and coordination of receptor tyrosine kinase (RTK) signalling. *The Journal of Pathology*, *226*(2), 172–184. <https://doi.org/10.1002/path.3004>
- Christensen, S. T., Morthorst, S. K., Mogensen, J. B., & Pedersen, L. B. (2017). Primary Cilia and Coordination of Receptor Tyrosine Kinase (RTK) and Transforming Growth Factor β (TGF-

- β) Signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(6), a028167.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028167>
- Christian, K. M., Song, H., & Ming, G. (2014). Functions and Dysfunctions of Adult Hippocampal Neurogenesis. *Annual Review of Neuroscience*, 37(1), 243–262.
<https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-071013-014134>
- Clement, C. A., Ajbro, K. D., Koefoed, K., Vestergaard, M. L., Veland, I. R., Henriques de Jesus, M. P. R., Pedersen, L. B., Benmerah, A., Andersen, C. Y., Larsen, L. A., & Christensen, S. T. (2013). TGF-β Signaling Is Associated with Endocytosis at the Pocket Region of the Primary Cilium. *Cell Reports*, 3(6), 1806–1814.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.05.020>
- Cleven, A. H. G., Höcker, S., Briaire-De Bruijn, I., Szuhai, K., Cleton-Jansen, A. M., & Bovée, J. V. M. G. (2015). Mutation analysis of H3F3A and H3F3B as a diagnostic tool for giant cell tumor of bone and chondroblastoma. *American Journal of Surgical Pathology*, 39(11), 1576–1583. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000512>
- Cochrane, C. R., Watkins, D. N., Cain, J. E., Cochrane, C. R., Vaghjiani, V., Szczepny, A., Jayasekara, W. S. N., Gonzalez-rajala, A., Kikuchi, K., Mccaughan, G. W., Burgess, A., Gough, D. J., Watkins, D. N., & Cain, J. E. (2020). *Hedgehog signaling Trp53 and Rb1 regulate autophagy and ligand- dependent Hedgehog signaling*. 130(8), 4006–4018.
- Cochrane, C., Szczepny, A., Watkins, D., & Cain, J. (2015). Hedgehog Signaling in the Maintenance of Cancer Stem Cells. *Cancers*, 7(3), 1554–1585.
<https://doi.org/10.3390/cancers7030851>
- Coskun, V., Wu, H., Bianchi, B., Tsao, S., Kim, K., Zhao, J., Biancotti, J. C., Hutnick, L., Krueger, R. C., Fan, G., de Vellis, J., & Sun, Y. E. (2008). CD133+ neural stem cells in the ependyma of mammalian postnatal forebrain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(3), 1026–1031. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710000105>
- De Vadder, F., Grasset, E., Mannerås Holm, L., Karsenty, G., Macpherson, A. J., Olofsson, L. E., & Bäckhed, F. (2018). Gut microbiota regulates maturation of the adult enteric nervous system via enteric serotonin networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(25), 6458–6463. <https://doi.org/10.1073/pnas.1720017115>
- Degirmenci, B., Valenta, T., Dimitrieva, S., Hausmann, G., & Basler, K. (2018). GLI1-expressing mesenchymal cells form the essential Wnt-secreting niche for colon stem cells. *Nature*, 558(7710), 449–453. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0190-3>
- Delling, M., Indzhukulian, A. A., Liu, X., Li, Y., Xie, T., Corey, D. P., & Clapham, D. E. (2016). Primary cilia are not calcium-responsive mechanosensors. *Nature*, 531(7596), 656–660.
<https://doi.org/10.1038/nature17426>
- Du, E., Lu, C., Sheng, F., Li, C., Li, H., Ding, N., Chen, Y., Zhang, T., Yang, K., & Xu, Y. (2018). Analysis of potential genes associated with primary cilia in bladder cancer. *Cancer Management and Research*, 10, 3047–3056. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S175419>
- Egeberg, D. L., Lethan, M., Manguso, R., Schneider, L., Awan, A., Jørgensen, T. S., Byskov, A. G., Pedersen, L. B., & Christensen, S. T. (2012). Primary cilia and aberrant cell signaling in epithelial ovarian cancer. *Cilia*, 1(1), 15. <https://doi.org/10.1186/2046-2530-1-15>
- Egorova, A. D., van der Heiden, K., Poelmann, R. E., & Hierck, B. P. (2012). Primary cilia as biomechanical sensors in regulating endothelial function. *Differentiation*, 83(2), S56–S61.

<https://doi.org/10.1016/j.diff.2011.11.007>

- Eguether, T., & Hahne, M. (2018). Mixed signals from the cell's antennae: primary cilia in cancer. *EMBO Reports*, *19*(11), e46589. <https://doi.org/10.15252/embr.201846589>
- Encinas, J. M., Michurina, T. V., Peunova, N., Park, J. H., Tordo, J., Peterson, D. A., Fishell, G., Koulakov, A., & Enikolopov, G. (2011). Division-coupled astrocytic differentiation and age-related depletion of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell*, *8*(5), 566–579. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.03.010>
- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A., & Gage, F. H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Medicine*, *4*(11), 1313–1317. <https://doi.org/10.1038/3305>
- Fabbri, L., Bost, F., & Mazure, N. (2019). Primary Cilium in Cancer Hallmarks. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(6), 1336. <https://doi.org/10.3390/ijms20061336>
- Falk, N., Lösl, M., Schröder, N., & Gießl, A. (2015). Specialized Cilia in Mammalian Sensory Systems. *Cells*, *4*(3), 500–519. <https://doi.org/10.3390/cells4030500>
- Farina, F., Gaillard, J., Guérin, C., Couté, Y., Sillibourne, J., Blanchoin, L., & Théry, M. (2016). The centrosome is an actin-organizing centre. *Nature Cell Biology*, *18*(1), 65–75. <https://doi.org/10.1038/ncb3285>
- Fei, D. L., Sanchez-Mejias, A., Wang, Z., Flaveny, C., Long, J., Singh, S., Rodriguez-Blanco, J., Tokhunts, R., Giambelli, C., Briegel, K. J., Schulz, W. A., Gandolfi, A. J., Karagas, M., Zimmers, T. A., Jorda, M., Bejarano, P., Capobianco, A. J., & Robbins, D. J. (2012). Hedgehog Signaling Regulates Bladder Cancer Growth and Tumorigenicity. *Cancer Research*, *72*(17), 4449–4458. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-4123>
- Feron, O. (2009). Pyruvate into lactate and back: From the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. *Radiotherapy and Oncology*, *92*(3), 329–333. <https://doi.org/10.1016/j.radonc.2009.06.025>
- Ferri, G.-L., Probert, L., Cocchia, D., Michetti, F., Marangos, P. J., & Polak, J. M. (1982). Evidence for the presence of S-100 protein in the glial component of the human enteric nervous system. *Nature*, *297*(5865), 409–410. <https://doi.org/10.1038/297409a0>
- Findakly, S., Choudhury, A., Daggubati, V., Pekmezci, M., Lang, U. E., & Raleigh, D. R. (2020). Meningioma cells express primary cilia but do not transduce ciliary Hedgehog signals. *Acta Neuropathologica Communications*, *8*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s40478-020-00994-7>
- Fliegeauf, M., Benzing, T., & Omran, H. (2007). When cilia go bad: Cilia defects and ciliopathies. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *8*(11), 880–893. <https://doi.org/10.1038/nrm2278>
- Foerster, P., Daclin, M., Asm, S., Faucourt, M., Boletta, A., Genovesio, A., & Spassky, N. (2017). mTORC1 signaling and primary cilia are required for brain ventricle morphogenesis. *Development*, *144*(2), 201–210. <https://doi.org/10.1242/dev.138271>
- Fondrevelle, M. E., Kantelip, B., Reiter, R. E., Chopin, D. K., Thiery, J. P., Monnien, F., Bittard, H., & Wallerand, H. (2009). The expression of Twist has an impact on survival in human bladder cancer and is influenced by the smoking status. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, *27*(3), 268–276. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2007.12.012>

- Forsyth, R., & Gunay-Aygun, M. (2020). Bardet-Biedl Syndrome Overview. In *GeneReviews*[®]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>
- Fu, M., Chi, V., Lui, H., Sham, M. H., Pachnis, V., Kwong, P., & Tam, H. (2004). Sonic hedgehog regulates the proliferation, differentiation, and migration of enteric neural crest cells in gut. *Journal of Cell Biology*, *166*(5), 673–684. <https://doi.org/10.1083/jcb.200401077>
- Fu, W., Asp, P., Canter, B., & Dynlacht, B. D. (2014). Primary cilia control hedgehog signaling during muscle differentiation and are deregulated in rhabdomyosarcoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(25), 9151–9156. <https://doi.org/10.1073/pnas.1323265111>
- Furness, J. B. (2012). The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, *9*(5), 286–294. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.32>
- Furness, J. B., & Stebbing, M. J. (2018). The first brain: Species comparisons and evolutionary implications for the enteric and central nervous systems. *Neurogastroenterology & Motility*, *30*(2), e13234. <https://doi.org/10.1111/nmo.13234>
- Gabella, G. (1981). Ultrastructure of the nerve plexuses of the mammalian intestine: The enteric glial cells. *Neuroscience*, *6*(3), 425–436. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(81\)90135-4](https://doi.org/10.1016/0306-4522(81)90135-4)
- Gabriel, E., Wason, A., Ramani, A., Gooi, L. M., Keller, P., Pozniakovsky, A., Poser, I., Noack, F., Telugu, N. S., Calegari, F., Šarić, T., Hescheler, J., Hyman, A. A., Gottardo, M., Callaini, G., Alkuraya, F. S., & Gopalakrishnan, J. (2016). CPAP promotes timely cilium disassembly to maintain neural progenitor pool. *The EMBO Journal*, *35*(8), 803–819. <https://doi.org/10.15252/emj.201593679>
- Garcia-Gonzalo, F. R., & Reiter, J. F. (2012). Scoring a backstage pass: Mechanisms of ciliogenesis and ciliary access. *Journal of Cell Biology*, *197*(6), 697–709. <https://doi.org/10.1083/jcb.201111146>
- Garcia-Gonzalo, F. R., & Reiter, J. F. (2017). Open Sesame: How transition fibers and the transition zone control ciliary composition. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *9*(2). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028134>
- Garcia-Gonzalez, D., Murcia-Belmonte, V., Esteban, P., Ortega, F., Díaz, D., Sánchez-Vera, I., Lebrón-Galán, R., Escobar-Castañondo, L., Martínez-Millán, L., Weruaga, E., García-Verdugo, J. M., Berninger, B., & de Castro, F. (2016). Anosmin-1 over-expression increases adult neurogenesis in the subventricular zone and neuroblast migration to the olfactory bulb. *Brain Structure and Function*, *221*, 239–260. <https://doi.org/10.1007/s00429-014-0904-8>
- Gerdes, J. M., & Katsanis, N. (2008). Chapter 7 Ciliary Function and Wnt Signal Modulation. *Current Topics in Developmental Biology*, *85*(08), 175–195. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(08\)00807-7](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(08)00807-7)
- Gerhardt, C., Lier, J. M., Burmüh, S., Struchtrup, A., Deutschmann, K., Vetter, M., Leu, T., Reeg, S., Grune, T., & Rüter, U. (2015). The transition zone protein Rpgrip 1l regulates proteasomal activity at the primary cilium. *Journal of Cell Biology*, *210*(1), 115–133. <https://doi.org/10.1083/jcb.201408060>
- Gershon, M. D. (1997). Genes and lineages in the formation of the enteric nervous system.

- Current Opinion in Neurobiology*, 7(1), 101–109. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(97\)80127-4](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(97)80127-4)
- Gershon, M. D. (1998). *The Second Brain* (Harper Col).
- Gilula, N. B., & Satir, P. (1972). the Ciliary Necklace. *The Journal of Cell Biology*, 53(2), 494–509. <https://doi.org/10.1083/jcb.53.2.494>
- Goldring, S. R., Roelke, M. S., Petrisson, K. K., & Bhan, A. K. (1987). Human giant cell tumors of bone. Identification and characterization of cell types. *Journal of Clinical Investigation*, 79(2), 483–491. <https://doi.org/10.1172/JCI112838>
- Gomez-pinilla, P. J., Gibbons, S. J., Bardsley, M. R., Lorincz, A., Pozo, M. J., Pasricha, P. J., Rijn, M. Van De, West, R. B., Sarr, M. G., Kendrick, M. L., Cima, R. R., Dozois, E. J., Larson, D. W., Ordog, T., & Farrugia, G. (2009). Ano1 is a selective marker of interstitial cells of Cajal in the human and mouse gastrointestinal tract. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 296, 1370–1381. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00074.2009>.
- Gonzalez, D. M., & Medici, D. (2014). Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Science Signal*, 7(344), re8. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005189>.Signaling
- Gradilone, S. A., Radtke, B. N., Bogert, P. S., Huang, B. Q., Gajdos, G. B., & Larusso, N. F. (2014). HDAC6 inhibition restores ciliary expression and decreases tumor growth. *Cancer R*, 73(7), 2259–2270. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2938>.HDAC6
- Guen, V. J., Chavarria, T. E., Kröger, C., Ye, X., Weinberg, R. A., & Lees, J. A. (2017). EMT programs promote basal mammary stem cell and tumor-initiating cell stemness by inducing primary ciliogenesis and Hedgehog signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201711534. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711534114>
- Gulbransen, B. D., & Sharkey, K. A. (2012). Novel functional roles for enteric glia in the gastrointestinal tract. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 9(11), 625–632. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.138>
- Han, S. J., Jung, J. K., Im, S., Lee, S., Jang, B., Park, K. M., & Kim, J. I. (2018). Deficiency of primary cilia in kidney epithelial cells induces epithelial to mesenchymal transition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 496(2), 450–454. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.01.079>
- Han, Y.-G., Spassky, N., Romaguera-Ros, M., Garcia-Verdugo, J.-M., Aguilar, A., Schneider-Maunoury, S., & Alvarez-Buylla, A. (2008). Hedgehog signaling and primary cilia are required for the formation of adult neural stem cells. *Nature Neuroscience*, 11(3), 277–284. <https://doi.org/10.1038/nn2059>
- Han, Y. G., Kim, H. J., Dlugosz, A. A., Ellison, D. W., Gilbertson, R. J., & Alvarez-Buylla, A. (2009). Dual and opposing roles of primary cilia in medulloblastoma development. *Nature Medicine*, 15(9), 1062–1065. <https://doi.org/10.1038/nm.2020>
- Hanahan, D., & Coussens, L. M. (2012). Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell*, 21(3), 309–322. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.022>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5),

- 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hansen, C. G., Moroishi, T., & Guan, K. L. (2015). YAP and TAZ: A nexus for Hippo signaling and beyond. *Trends in Cell Biology*, *25*(9), 499–513. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.05.002>
- Hassounah, N. B., Nagle, R., Saboda, K., Roe, D. J., Dalkin, B. L., & McDermott, K. M. (2013). Primary Cilia Are Lost in Preinvasive and Invasive Prostate Cancer. *PLoS ONE*, *8*(7), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068521>
- Heider, M. R., & Munson, M. (2012). Exorcising the Exocyst Complex. *Traffic*, *13*(7), 898–907. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2012.01353.x>
- Higginbotham, H., Guo, J., Yokota, Y., Umberger, N. L., Su, C., Li, J., Verma, N., Hirt, J., Ghukasyan, V., Caspary, T., & Anton, E. S. (2013). Arl13b-regulated cilia activities are essential for polarized radial glial scaffold formation. *Nature Neuroscience*, *16*(8), 1000–1007. <https://doi.org/10.1038/nn.3451>
- Hirota, S. (1998). Gain-of-Function Mutations of c-kit in Human Gastrointestinal Stromal Tumors. *Science*, *279*(5350), 577–580. <https://doi.org/10.1126/science.279.5350.577>
- Hoang-Minh, L. B., Deleyrolle, L. P., Nakamura, N. S., Parker, A. K., Martuscello, R. T., Reynolds, B. A., & Sarkisian, M. R. (2016). PC1 Depletion Inhibits Glioblastoma Cell Ciliogenesis and Increases Cell Death and Sensitivity to Temozolomide. *Translational Oncology*, *9*(5), 392–402. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2016.08.006>
- Hoff, S., Zeller, F., Von Weyhern, C. W. H., Wegner, M., Schemann, M., Michel, K., & Rühl, A. (2008). Quantitative assessment of glial cells in the human and guinea pig enteric nervous system with an anti-Sox8/9/10 antibody. *Journal of Comparative Neurology*, *509*(4), 356–371. <https://doi.org/10.1002/cne.21769>
- Horvai, A. E., Roy, R., Borys, D., & O'Donnell, R. J. (2012). Regulators of skeletal development: A cluster analysis of 206 bone tumors reveals diagnostically useful markers. *Modern Pathology*, *25*(11), 1452–1461. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2012.110>
- Hossain, D., & Tsang, W. Y. (2018). The role of ubiquitination in the regulation of primary cilia assembly and disassembly. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, *September*, 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2018.09.005>
- Ihrie, R. A., Shah, J. K., Harwell, C. C., Levine, J. H., Guinto, C. D., Lezameta, M., Kriegstein, A. R., & Alvarez-Buylla, A. (2011). Persistent Sonic Hedgehog Signaling in Adult Brain Determines Neural Stem Cell Positional Identity. *Neuron*, *71*(2), 250–262. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.018>
- Inoko, A., Matsuyama, M., Goto, H., Ohmuro-Matsuyama, Y., Hayashi, Y., Enomoto, M., Ibi, M., Urano, T., Yonemura, S., Kiyono, T., Izawa, I., & Inagaki, M. (2012). Trichoplein and Aurora A block aberrant primary cilia assembly in proliferating cells. *Journal of Cell Biology*, *197*(3), 391–405. <https://doi.org/10.1083/jcb.201106101>
- Iruzubieta, P., Monzón, M., Castiella, T., Ramírez, T., & Junquera, C. (2020). Hedgehog signalling pathway activation in gastrointestinal stromal tumours is mediated by primary cilia. *Gastric Cancer*, *23*(1), 64–72. <https://doi.org/10.1007/s10120-019-00984-2>
- Ishikawa, H., & Marshall, W. F. (2011). Ciliogenesis: Building the cell's antenna. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *12*(4), 222–234. <https://doi.org/10.1038/nrm3085>

- Ishikawa, H., & Marshall, W. F. (2014). Mechanobiology of ciliogenesis. *BioScience*, *64*(12), 1084–1091. <https://doi.org/10.1093/biosci/biu173>
- Ishikawa, H., & Marshall, W. F. (2017). Intraflagellar transport and ciliary dynamics. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *9*(3). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021998>
- Islam, S. S., Mokhtari, R. B., Noman, A. S., Uddin, M., Rahman, M. Z., Azadi, M. A., Zlotta, A., van der Kwast, T., Yeager, H., & Farhat, W. A. (2016). Sonic hedgehog (Shh) signaling promotes tumorigenicity and stemness via activation of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in bladder cancer. *Molecular Carcinogenesis*, *55*(5), 537–551. <https://doi.org/10.1002/mc.22300>
- Izawa, I., Goto, H., Kasahara, K., & Inagaki, M. (2015). Current topics of functional links between primary cilia and cell cycle. *Cilia*, *4*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13630-015-0021-1>
- Jászai, J., Thamm, K., Karbanová, J., Janich, P., Fargeas, C. A., Huttner, W. B., & Corbeil, D. (2020). Prominins control ciliary length throughout the animal kingdom: New lessons from human prominin-1 and zebrafish prominin-3. *Journal of Biological Chemistry*, *295*(18), 6007–6022. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011253>
- Jenkins, D., & Hernandez-Hernandez, V. (2015). Advances in the understanding of the BBSome complex structure and function. *Research and Reports in Biology*, 191. <https://doi.org/10.2147/rrb.s65700>
- Jenks, A. D., Vyse, S., Wong, J. P., Kostaras, E., Keller, D., Burgoyne, T., Shoemark, A., Tsalikis, A., de la Roche, M., Michaelis, M., Cinatl, J., Huang, P. H., & Tanos, B. E. (2018). Primary Cilia Mediate Diverse Kinase Inhibitor Resistance Mechanisms in Cancer. *Cell Reports*, *23*(10), 3042–3055. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.05.016>
- Jeong, A. L., Ka, H. I., Han, S., Lee, S., Lee, E., Soh, S. J., Joo, H. J., Sumiyasuren, B., Park, J. Y., Lim, J., Park, J. H., Lee, M. S., & Yang, Y. (2018). Oncoprotein CIP2A promotes the disassembly of primary cilia and inhibits glycolytic metabolism. *EMBO Reports*, *19*(5), 1–15. <https://doi.org/10.15252/embr.201745144>
- Jessen, K. R., Thorpe, R., & Mirsky, R. (1984). Molecular identity, distribution and heterogeneity of glial fibrillary acidic protein: an immunoblotting and immunohistochemical study of Schwann cells, satellite cells, enteric glia and astrocytes. *Journal of Neurocytology*, *13*(2), 187–200. <https://doi.org/10.1007/BF01148114>
- Jevans, B., McCann, C. J., Thapar, N., & Burns, A. J. (2018). Transplanted enteric neural stem cells integrate within the developing chick spinal cord: implications for spinal cord repair. *Journal of Anatomy*, *233*(5), 592–606. <https://doi.org/10.1111/joa.12880>
- Jin, G., Lee, S. W., Zhang, X., Cai, Z., Gao, Y., Chou, P. C., Rezaeian, A. H., Han, F., Wang, C. Y., Yao, J. C., Gong, Z., Chan, C. H., Huang, C. Y., Tsai, F. J., Tsai, C. H., Tu, S. H., Wu, C. H., Sarbassov, D. D., Ho, Y. S., & Lin, H. K. (2015). Skp2-Mediated RagA Ubiquitination Elicits a Negative Feedback to Prevent Amino-Acid-Dependent mTORC1 Hyperactivation by Recruiting GATOR1. *Molecular Cell*, *58*(6), 989–1000. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.010>
- Johnson, C. A., & Collis, S. J. (2016). Ciliogenesis and the DNA damage response: a stressful relationship. *Cilia*, *5*(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s13630-016-0040-6>
- Jones, C., & Chen, P. (2008). Chapter Eight Primary Cilia in Planar Cell Polarity Regulation of the

- Inner Ear. *Current Topics in Developmental Biology*, 85(08), 197–224.
[https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(08\)00808-9](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(08)00808-9)
- Joseph, N. M., He, S., Quintana, E., Kim, Y., Núñez, G., & Morrison, S. J. (2011). Enteric glia are multipotent in culture but primarily form glia in the adult rodent gut. *Journal of Clinical Investigation*, 121(9), 3398–3411. <https://doi.org/10.1172/JCI58186>
- Jung, C. H., Ro, S. H., Cao, J., Otto, N. M., & Kim, D. H. (2010). MTOR regulation of autophagy. *FEBS Letters*, 584(7), 1287–1295. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.01.017>
- Junquera, C., Cantarero, I., Luesma, M. J., Soriano-Navarro, M., Martínez-Ciriano, C., Castiella, T., & García-Verdugo, J. M. (2011). The primary cilium: A relevant characteristic in interstitial cells of rat duodenum enteric plexus. *Histology and Histopathology*, 26(4), 461–470. <https://doi.org/10.14670/HH-26.461>
- Junquera, C., Castiella, T., Muñoz, G., Fernández-Pacheco, R., Luesma, M. J., & Monzón, M. (2016). Biogenesis of a new type of extracellular vesicles in gastrointestinal stromal tumors: ultrastructural profiles of spherosomes. *Histochemistry and Cell Biology*, 146(5), 557–567. <https://doi.org/10.1007/s00418-016-1460-5>
- Junquera, C., Martínez-Ciriano, C., Castiella, T., Serrano, P., Azanza, M. J., & Ramón y Cajal Junquera, S. (2007). Immunohistochemical and ultrastructural characteristics of interstitial cells of Cajal in the rabbit duodenum. Presence of a single cilium. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 11(4), 776–787. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2007.00064.x>
- Kandel, E., Schwartz, J., Jessell, T., Siegelbaum, S., & Hudspeth, A. (2013). *Principles of Neural Science* (5th ed.). McGraw Hill.
- Katoh, Y., & Katoh, M. (2009). Hedgehog Target Genes: Mechanisms of Carcinogenesis Induced by Aberrant Hedgehog Signaling Activation. *Current Molecular Medicine*, 9(7), 873–886. <https://doi.org/10.2174/156652409789105570>
- Kempermann, G., Gage, F. H., Aigner, L., Song, H., Curtis, M. A., Thuret, S., Kuhn, H. G., Jessberger, S., Frankland, P. W., Cameron, H. A., Gould, E., Hen, R., Abrous, D. N., Toni, N., Schinder, A. F., Zhao, X., Lucassen, P. J., & Frisén, J. (2018). Human Adult Neurogenesis: Evidence and Remaining Questions. *Cell Stem Cell*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.04.004>
- Khan, S., & Scholey, J. M. (2018). Assembly, Functions and Evolution of Archaelia, Flagella and Cilia. *Current Biology*, 28(6), R278–R292. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.085>
- Khatri, P., Obernier, K., Simeonova, I. K., Hellwig, A., Holzl-Wenig, G., Mandl, C., Scholl, C., Wölf, S., Winkler, J., Gaspar, J. A., Sachinidis, A., & Ciccolini, F. (2013). Proliferation and cilia dynamics in neural stem cells prospectively isolated from the SEZ. *Scientific Reports*, 4(3803), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep03803>
- Kim, J., Dabiri, S., & Seeley, E. S. (2011). Primary Cilium Depletion Typifies Cutaneous Melanoma In Situ and Malignant Melanoma. *PLoS ONE*, 6(11), e27410. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027410>
- Kim, S., Zaghloul, N. A., Bubenshchikova, E., Oh, E. C., Rankin, S., Katsanis, N., Obara, T., & Tsiokas, L. (2011). Nde1-mediated inhibition of ciliogenesis affects cell cycle re-entry. *Nature Cell Biology*, 13(4), 351–362. <https://doi.org/10.1038/ncb2183>

- Kindblom, L. G., Remotti, H. E., Aldenborg, F., & Meis-Kindblom, J. M. (1998). Gastrointestinal pacemaker cell tumor (GIPACT): gastrointestinal stromal tumors show phenotypic characteristics of the interstitial cells of Cajal. *The American Journal of Pathology*, *152*(5), 1259–1269.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1858579&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Kitagawa, K., Shigemura, K., Sung, S.-Y., Chen, K.-C., Huang, C.-C., Chiang, Y.-T., Liu, M.-C., Huang, T.-W., Yamamichi, F., Shirakawa, T., & Fujisawa, M. (2019). Possible correlation of sonic hedgehog signaling with epithelial–mesenchymal transition in muscle-invasive bladder cancer progression. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, *145*(9), 2261–2271. <https://doi.org/10.1007/s00432-019-02987-z>
- Komori, T. (2019). Regulation of Proliferation, Differentiation and Functions of Osteoblasts by Runx2. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(7), 1694.
<https://doi.org/10.3390/ijms20071694>
- Kondo, A., & Kaestner, K. H. (2019). Emerging diverse roles of telocytes. *Development*, *146*(14), 1–9. <https://doi.org/10.1242/dev.175018>
- Kowal, T. J., & Falk, M. M. (2015). Primary cilia found on HeLa and other cancer cells. *Cell Biology International*, *39*(11), 1341–1347. <https://doi.org/10.1002/cbin.10500>
- Kulkarni, S., Micci, M.-A., Leser, J., Shin, C., Tang, S.-C., Fu, Y.-Y., Liu, L., Li, Q., Saha, M., Li, C., Enikolopov, G., Becker, L., Rakhilin, N., Anderson, M., Shen, X., Dong, X., Butte, M. J., Song, H., Southard-Smith, E. M., ... Pasricha, P. J. (2017). Adult enteric nervous system in health is maintained by a dynamic balance between neuronal apoptosis and neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(18), E3709–E3718.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1619406114>
- Kumamoto, N., Gu, Y., Wang, J., Janoschka, S., Takemaru, K. I., Levine, J., & Ge, S. (2012). A role for primary cilia in glutamatergic synaptic integration of adult-born neurons. *Nature Neuroscience*, *15*(3), 399–405. <https://doi.org/10.1038/nn.3042>
- Labour, M. N., Riffault, M., Christensen, S. T., & Hoey, D. A. (2016). TGFβ1-induced recruitment of human bone mesenchymal stem cells is mediated by the primary cilium in a SMAD3-dependent manner. *Scientific Reports*, *6*(September), 1–13.
<https://doi.org/10.1038/srep35542>
- Lake, J. I., & Heuckeroth, R. O. (2013). Enteric nervous system development: migration, differentiation, and disease. *AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology*, *305*(1), G1–G24.
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00452.2012>
- Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *National Review Molecular Cell Biology*, *15*(3), 178–196.
<https://doi.org/10.1038/nrm3758>.Molecular
- Laranjeira, C., Sandgren, K., Kessaris, N., Richardson, W., Potocnik, A., Vanden Berghe, P., & Pachnis, V. (2011). Glial cells in the mouse enteric nervous system can undergo neurogenesis in response to injury. *Journal of Clinical Investigation*, *121*(9), 3412–3424.
<https://doi.org/10.1172/JCI58200>
- Lee, J., Park, K. C., Sul, H. J., Hong, H. J., Kim, K. H., Kero, J., & Shong, M. (2021). Loss of primary cilia promotes mitochondria-dependent apoptosis in thyroid cancer. *Scientific Reports*,

- 11(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83418-3>
- Lee, J., Yi, S., Chang, J. Y., Kim, J. T., Sul, H. J., Park, K. C., Zhu, X., Cheng, S. Y., Kero, J., Kim, J., & Shong, M. (2019). Loss of primary cilia results in the development of cancer in the murine thyroid gland. *Molecules and Cells*, 42(2), 113–122. <https://doi.org/10.14348/molcells.2018.0430>
- Lee, J., Yi, S., Won, M., Song, Y. S., Yi, H.-S., Park, Y. J., Park, K. C., Kim, J. T., Chang, J. Y., Lee, M. J., Sul, H. J., Choi, J. E., Kim, K. S., Kero, J., Kim, J., & Shong, M. (2018). Loss-of-function of IFT88 determines metabolic phenotypes in thyroid cancer. *Oncogene*, 37(32), 4455–4474. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0211-6>
- Lee, K., & Ko, H. W. (2018). Repeated restraint stress promotes hippocampal neuronal cell ciliogenesis and proliferation in mice. *Laboratory Animal Research*, 34(4), 203. <https://doi.org/10.5625/lar.2018.34.4.203>
- Lee, K. L., Guevarra, M. D., Nguyen, A. M., Chua, M. C., Wang, Y., & Jacobs, C. R. (2015). The primary cilium functions as a mechanical and calcium signaling nexus. *Cilia*, 4(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13630-015-0016-y>
- Li, X., Wu, C., Chen, N., Gu, H., Yen, A., Cao, L., Wang, E., & Wang, L. (2016). PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and targeted therapy for glioblastoma. *Oncotarget*, 7(22), 33440–33450. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7961>
- Liedberg, F., Hagberg, O., Holmäng, S., Hosseini Aliabad, A., Jancke, G., Ljungberg, B., Malmström, P. U., Åberg, H., & Jahnsen, S. (2015). Local recurrence and progression of non-muscle-invasive bladder cancer in Sweden: A population-based follow-up study. *Scandinavian Journal of Urology*, 49(4), 290–295. <https://doi.org/10.3109/21681805.2014.1000963>
- Lienkamp, S., Ganner, A., & Walz, G. (2012). Inversin, Wnt signaling and primary cilia. *Differentiation*, 83(2), 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2011.11.012>
- Lim, D. A., & Alvarez-buylla, A. (2016). The Adult Ventricular – Subventricular Zone (V-SVZ) and Olfactory Bulb (OB) Neurogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8, 1–34.
- Lim, D. A., & Alvarez-Buylla, A. (2014). Adult neural stem cells stake their ground. *Trends in Neurosciences*, 37(10), 563–571. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.08.006>
- Liu, H., Kiseleva, A. A., & Golemis, E. A. (2018). Ciliary signalling in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 18(8), 511–524. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0023-6>
- Liu, M.-T., Kuan, Y.-H., Wang, J., Hen, R., & Gershon, M. D. (2009). 5-HT4 Receptor-Mediated Neuroprotection and Neurogenesis in the Enteric Nervous System of Adult Mice. *Journal of Neuroscience*, 29(31), 9683–9699. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1145-09.2009>
- Liu, M., Geddis, M. S., Wen, Y., Setlik, W., & Gershon, M. D. (2005). Expression and function of 5-HT 4 receptors in the mouse enteric nervous system. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 289, 1148–1163. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00245.2005>
- Liu, Y. P., Tsai, I. C., Morleo, M., Oh, E. C., Leitch, C. C., Massa, F., Lee, B. H., Parker, D. S., Finley, D., Zaghoul, N. A., Franco, B., & Katsanis, N. (2014). Ciliopathy proteins regulate paracrine signaling by modulating proteasomal degradation of mediators. *Journal of Clinical Investigation*, 124(5), 2059–2070. <https://doi.org/10.1172/JCI71898>

- Lo, P., Hawrot, H., & Georgiou, M. (2012). Apicobasal polarity and its role in cancer progression. *Biomolecular Concepts*, 3(6), 505–521. <https://doi.org/10.1515/bmc-2012-0020>
- Long, F., Chung, U., Ohba, S., McMahon, J., Kronenberg, H., & McMahon, A. (2004). Ihh signaling is directly required for the osteoblast lineage in the endochondral skeleton. *Development*, 131(6), 1309–1318. <https://doi.org/10.1242/dev.01006>
- Luesma, M. J., Cantarero, I., Castiella, T., Soriano, M., Garcia-Verdugo, J. M., & Junquera, C. (2013). Enteric neurons show a primary cilium. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 17(1), 147–153. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2012.01657.x>
- Luo, J., Chen, X., Pan, Y. W., Lu, S., Xia, Z., & Storm, D. R. (2015). The type 3 adenylyl cyclase is required for the survival and maturation of newly generated granule cells in the olfactory bulb. *PLoS ONE*, 10(3), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122057>
- Lyu, R., & Zhou, J. (2017). The Multifaceted Roles of Primary Cilia in the Regulation of Stem Cell Properties and Functions. *Journal of Cellular Physiology*, 232(5), 935–938. <https://doi.org/10.1002/jcp.25683>
- Maeda, H., Yamagata, A., Nishikawa, S., Yoshinaga, K., Kobayashi, S., Nishi, K., & Nishikawa, S. (1992). Requirement of c-kit for development of intestinal pacemaker system. *Development (Cambridge, England)*, 116(2), 369–375. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(93\)90054-L](https://doi.org/10.1016/0168-9525(93)90054-L)
- Mahuzier, A., Shihavuddin, A., Fournier, C., Lansade, P., Faucourt, M., Menezes, N., Meunier, A., Garfa-Traoré, M., Carlier, M. F., Voituriez, R., Genovesio, A., Spassky, N., & Delgehr, N. (2018). Ependymal cilia beating induces an actin network to protect centrioles against shear stress. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04676-w>
- Malicki, J. J., & Johnson, C. A. (2017). The Cilium: Cellular Antenna and Central Processing Unit. *Trends in Cell Biology*, 27(2), 126–140. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.08.002>
- Marican, N. H. J., Cruz-Migoni, S. B., & Borycki, A. G. (2016). Asymmetric distribution of primary cilia allocates satellite cells for self-renewal. *Stem Cell Reports*, 6(6), 798–805. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.04.004>
- Martín-Guerrero, E., Tirado-Cabrera, I., Buendía, I., Alonso, V., Gortázar, A. R., & Ardura, J. A. (2020). Primary cilia mediate parathyroid hormone receptor type 1 osteogenic actions in osteocytes and osteoblasts via Gli activation. *Journal of Cellular Physiology*, 235(10), 7356–7369. <https://doi.org/10.1002/jcp.29636>
- Maskey, D., Marlin, M. C., Kim, S., Kim, S., Ong, E., Li, G., & Tsiokas, L. (2015). Cell cycle-dependent ubiquitylation and destruction of NDE 1 by CDK 5- FBW 7 regulates ciliary length. *The EMBO Journal*, 34(19), 2424–2440. <https://doi.org/10.15252/embj.201490831>
- Massagué, J., & Gomis, R. R. (2006). The logic of TGF β signaling. *FEBS Letters*, 580(12), 2811–2820. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.04.033>
- Mazo, G., Soplop, N., Wang, W. J., Uryu, K., & Tsou, M. F. B. (2016). Spatial Control of Primary Ciliogenesis by Subdistal Appendages Alters Sensation-Associated Properties of Cilia. *Developmental Cell*, 39(4), 424–437. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.10.006>
- McGlashan, S. R., Jensen, C. G., & Poole, C. A. (2006). Localization of extracellular matrix

- receptors on the chondrocyte primary cilium. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 54(9), 1005–1014. <https://doi.org/10.1369/jhc.5A6866.2006>
- Metzger, M., Bareiss, P. M., Danker, T., Wagner, S., Hennenlotter, J., Guenther, E., Obermayr, F., Stenzl, A., Koenigsrainer, A., Skutella, T., & Just, L. (2009). Expansion and Differentiation of Neural Progenitors Derived From the Human Adult Enteric Nervous System. *Gastroenterology*, 137(6), 2063–2073. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.06.038>
- Metzger, M., Caldwell, C., Barlow, A. J., Burns, A. J., & Thapar, N. (2009). Enteric Nervous System Stem Cells Derived From Human Gut Mucosa for the Treatment of Aganglionic Gut Disorders. *Gastroenterology*, 136(7), 2214–2225.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.02.048>
- Miettinen, M., Wang, Z. F., & Lasota, J. (2009). DOG1 antibody in the differential diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: A study of 1840 cases. *American Journal of Surgical Pathology*, 33(9), 1401–1408. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3181a90e1a>
- Mirvis, M., Stearns, T., & Nelson, W. J. (2018). Cilium structure, assembly, and disassembly regulated by the cytoskeleton. *Biochemical Journal*, 475(14), 2329–2353. <https://doi.org/10.1042/BCJ20170453>
- Mirzadeh, Z., Merkle, F. T., Soriano-Navarro, M., Garcia-Verdugo, J. M., & Alvarez-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(3), 265–278. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.07.004>
- Mitchison, H. M., & Valente, E. M. (2017). Motile and non-motile cilia in human pathology: from function to phenotypes. *Journal of Pathology*, 241(2), 294–309. <https://doi.org/10.1002/path.4843>
- Mizushima, N., & Komatsu, M. (2011). Autophagy: Renovation of cells and tissues. *Cell*, 147(4), 728–741. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.026>
- Mohler, J. (1988). Requirements for Hedgehog, a Segmental Polarity Gene, in Patterning Larval and Adult Cuticle of *Drosophila*. In *Genetics* (Vol. 120, Issue December, pp. 1061–1072). <https://doi.org/PMC1203569>
- Molla-Herman, A., Ghossoub, R., Blisnick, T., Meunier, A., Serres, C., Silbermann, F., Emmerson, C., Romeo, K., Bourdoncle, P., Schmitt, A., Saunier, S., Spassky, N., Bastin, P., & Benmerah, A. (2010). The ciliary pocket: an endocytic membrane domain at the base of primary and motile cilia. *Journal of Cell Science*, 123(10), 1785–1795. <https://doi.org/10.1242/jcs.059519>
- Moser, J. J., Fritzier, M. J., & Rattner, J. B. (2009). Primary ciliogenesis defects are associated with human astrocytoma/glioblastoma cells. *BMC Cancer*, 9(1), 448. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-448>
- Moser, J. J., Fritzier, M. J., & Rattner, J. B. (2014). Ultrastructural characterization of primary cilia in pathologically characterized human glioblastoma multiforme (GBM) tumors. *BMC Clinical Pathology*, 14(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1472-6890-14-40>
- Moss, J., Gebara, E., Bushong, E. A., Sánchez-Pascual, I., O’Laoi, R., El M’Ghari, I., Kocher-Braissant, J., Ellisman, M. H., & Toni, N. (2016). Fine processes of Nestin-GFP–positive radial glia-like stem cells in the adult dentate gyrus ensheath local synapses and

- vasculature. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(18), E2536–E2545. <https://doi.org/10.1073/pnas.1514652113>
- Nagy, N., & Goldstein, A. M. (2017). Seminars in Cell & Developmental Biology Enteric nervous system development : A crest cell ' s journey from neural tube to colon. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 66, 94–106. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.01.006>
- Nakashiba, T., Cushman, J. D., Pelkey, K. A., Renaudineau, S., Buhl, D. L., McHugh, T. J., Barrera, V. R., Chittajallu, R., Iwamoto, K. S., McBain, C. J., Fanselow, M. S., & Tonegawa, S. (2012). Young Dentate Granule Cells Mediate Pattern Separation, whereas Old Granule Cells Facilitate Pattern Completion. *Cell*, 149(1), 188–201. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.046>
- Natale, G., Pasquali, L., Paparelli, A., & Fornai, F. (2011). Parallel manifestations of neuropathologies in the enteric and central nervous systems. *Neurogastroenterology and Motility*, 23(12), 1056–1065. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2011.01794.x>
- Nauli, S. M., Alenghat, F. J., Luo, Y., Williams, E., Vassilev, P., Li, X., Elia, A. E. H., Lu, W., Brown, E. M., Quinn, S. J., Ingber, D. E., & Zhou, J. (2003). Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nature Genetics*, 33(2), 129–137. <https://doi.org/10.1038/ng1076>
- Nguyen, A. M., Young, Y. N., & Jacobs, C. R. (2015). The primary cilium is a self-adaptable, integrating nexus for mechanical stimuli and cellular signaling. *Biology Open*, 4(12), 1733–1738. <https://doi.org/10.1242/bio.014787>
- Niinuma, T., Suzuki, H., & Sugai, T. (2018). Molecular characterization and pathogenesis of gastrointestinal stromal tumor. *Translational Gastroenterology and Hepatology*. <https://doi.org/10.21037/tgh.2018.01.02>
- O'Toole, S. A., Machalek, D. A., Shearer, R. F., Millar, E. K. A., Nair, R., Schofield, P., McLeod, D., Cooper, C. L., McNeil, C. M., McFarland, A., Nguyen, A., Ormandy, C. J., Qiu, M. R., Rabinovich, B., Martelotto, L. G., Vu, D., Hannigan, G. E., Musgrove, E. A., Christ, D., ... Swarbrick, A. (2011). Hedgehog Overexpression Is Associated with Stromal Interactions and Predicts for Poor Outcome in Breast Cancer. *Cancer Research*, 71(11), 4002–4014. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3738>
- O'Toole, S. M., Watson, D. S., Novoselova, T. V., Romano, L. E. L., King, P. J., Bradshaw, T. Y., Thompson, C. L., Knight, M. M., Sharp, T. V., Barnes, M. R., Srirangalingam, U., Drake, W. M., & Chapple, J. P. (2019). Oncometabolite induced primary cilia loss in pheochromocytoma. *Endocrine-Related Cancer*, 26(1), 165–180. <https://doi.org/10.1530/ERC-18-0134>
- Oeckinghaus, A., Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2011). Crosstalk in NF-κB signaling pathways. *Nature Immunology*, 12(8), 695–708. <https://doi.org/10.1038/ni.2065>
- Olins, D. E., & Olins, A. L. (2009). Nuclear envelope-limited chromatin sheets (ELCS) and heterochromatin higher order structure. *Chromosoma*, 118(5), 537–548. <https://doi.org/10.1007/s00412-009-0219-3>
- Ortiz-Álvarez, G., Daclin, M., Shihavuddin, A., Lansade, P., Fortoul, A., Faucourt, M., Clavreul, S., Lalioti, M., Taraviras, S., Hippenmeyer, S., Livet, J., Meunier, A., Genovesio, A., & Spassky, N. (2019). Adult Neural Stem Cells and Multiciliated Ependymal Cells Share a Common Lineage Regulated by the Geminin Family Members. *Neuron*, 102(1), 159-172.e7.

- <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.01.051>
- Pagan, J., Seto, T., Pagano, M., & Cittadini, A. (2013). Role of the ubiquitin proteasome system in the heart. *Circulation Research*, *112*(7), 1046–1058. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.300521>
- Pala, R., Alomari, N., & Nauli, S. M. (2017). Primary cilium-dependent signaling mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(11). <https://doi.org/10.3390/ijms18112272>
- Pampliega, O., & Cuervo, A. M. (2016). Autophagy and primary cilia: Dual interplay. *Current Opinion in Cell Biology*, *39*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.01.008>
- Pampliega, O., Orhon, I., Patel, B., Sridhar, S., Díaz-Carretero, A., Beau, I., Codogno, P., Satir, B. H., Satir, P., & Cuervo, A. M. (2013). Functional interaction between autophagy and ciliogenesis. *Nature*, *502*(7470), 194–200. <https://doi.org/10.1038/nature12639>
- Patel, S. S., Tomar, S., Sharma, D., Mahindroo, N., & Udayabanu, M. (2017). Targeting sonic hedgehog signaling in neurological disorders. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *74*, 76–97. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.01.008>
- Pattabiraman, D. R., & Weinberg, R. A. (2014). Tackling the cancer stem cells-what challenges do they pose? *Nature Reviews Drug Discovery*, *13*(7), 497–512. <https://doi.org/10.1038/nrd4253>
- Pattyn, A., Morin, X., Cremer, H., Goridis, C., & Brunet, J.-F. (1999). The homeobox gene *Phox2b* is essential for the development of autonomic neural crest derivatives. *Nature*, *399*(6734), 366–370. <https://doi.org/10.1038/20700>
- Pino, A., Fumagalli, G., Bifari, F., & Decimo, I. (2017). New neurons in adult brain: distribution, molecular mechanisms and therapies. *Biochemical Pharmacology*, *141*, 4–22. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2017.07.003>
- Pópulo, H., Lopes, J. M., & Soares, P. (2012). The mTOR signalling pathway in human cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(2), 1886–1918. <https://doi.org/10.3390/ijms13021886>
- Prieto-García, E., Díaz-García, C. V., García-Ruiz, I., & Agulló-Ortuño, M. T. (2017). Epithelial-to-mesenchymal transition in tumor progression. *Medical Oncology*, *34*(7). <https://doi.org/10.1007/s12032-017-0980-8>
- Qu, W., Li, D., Wang, Y., Wu, Q., & Hao, D. (2018). Activation of Sonic Hedgehog Signaling Is Associated with Human Osteosarcoma Cells Radioresistance Characterized by Increased Proliferation, Migration, and Invasion. *Medical Science Monitor*, *24*, 3764–3771. <https://doi.org/10.12659/MSM.908278>
- Ramón y Cajal, S. (1892). Nota sobre el plexo de Auerbach de la rana. *Trabajos Del Laboratorio de Histología de La Facultad de Medicina de Barcelona*, *23*(8).
- Ramsbottom, S., & Pownall, M. (2016). Regulation of Hedgehog Signalling Inside and Outside the Cell. *Journal of Developmental Biology*, *4*(3), 23. <https://doi.org/10.3390/jdb4030023>
- Rao, M., Nelms, B. D., Dong, L., Salinas-Rios, V., Rutlin, M., Gershon, M. D., & Corfas, G. (2015). Enteric glia express proteolipid protein 1 and are a transcriptionally unique population of glia in the mammalian nervous system. *Glia*, *63*(11), 2040–2057.

- <https://doi.org/10.1002/glia.22876>
- Rausch, V., & Hansen, C. G. (2019). The Hippo Pathway, YAP/TAZ, and the Plasma Membrane. *Trends in Cell Biology*, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.10.005>
- Robbins, D. J., Fei, D. L., & Riobo, N. A. (2012). The Hedgehog Signal Transduction Network. *Science Signaling*, 5(246), re6–re6. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2002906>
- Rohatgi, R., Milenkovic, L., & Scott, M. P. (2007). Patched1 Regulates Hedgehog Signaling at the Primary Cilium. *Science*, 317(5836), 372–376. <https://doi.org/10.1126/science.1139740>
- Rosengren, T., Larsen, L. J., Pedersen, L. B., Christensen, S. T., & Møller, L. B. (2018). TSC1 and TSC2 regulate cilia length and canonical Hedgehog signaling via different mechanisms. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(14), 2663–2680. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2761-8>
- Ruppertsburg, C. C., & Hartzell, H. C. (2014). The Ca²⁺-activated Cl⁻ channel ANO1/TMEM16A regulates primary ciliogenesis. *Molecular Biology of the Cell*, 25(11), 1793–1807. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-10-0599>
- Rutkovskiy, A., Stensløkken, K.-O., & Vaage, I. J. (2016). Osteoblast Differentiation at a Glance. *Medical Science Monitor Basic Research*, 22, 95–106. <https://doi.org/10.12659/MSMBR.901142>
- Saponara, M., Urbini, M., Astolfi, A., Indio, V., Ercolani, G., Del Gaudio, M., Santini, D., Pirini, M. G., Fiorentino, M., Nannini, M., Lolli, C., Mandrioli, A., Gatto, L., Brandi, G., Biasco, G., Pinna, A. D., & Pantaleo, M. A. (2015). Molecular characterization of metastatic exon 11 mutant gastrointestinal stromal tumors (GIST) beyond KIT/PDGFRalpha genotype evaluated by next generation sequencing (NGS). *Oncotarget*, 6(39), 1–15. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6278>
- Sarkisian, M. R., & Semple-Rowland, S. L. (2019). Emerging Roles of Primary Cilia in Glioma. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13(February), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00055>
- Sarkisian, M. R., Siebzehnrubl, D., Hoang-Minh, L., Deleyrolle, L., Silver, D. J., Siebzehnrubl, F. A., Guadiana, S. M., Srivinasan, G., Semple-Rowland, S., Harrison, J. K., Steindler, D. A., & Reynolds, B. A. (2014). Detection of primary cilia in human glioblastoma. *Journal of Neuro-Oncology*, 117(1), 15–24. <https://doi.org/10.1007/s11060-013-1340-y>
- Satir, P., Pedersen, L. B., & Christensen, S. T. (2010). The primary cilium at a glance. *Journal of Cell Science*, 123(4), 499–503. <https://doi.org/10.1242/jcs.050377>
- Satir, Peter, & Christensen, S. T. (2006). Overview of Structure and Function of Mammalian Cilia. *Annual Review of Physiology*, 69(1), 377–400. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.040705.141236>
- Satir, Peter, Mitchell, D. R., & Jékely, G. (2008). Chapter 3 How Did the Cilium Evolve? In *Current Topics in Developmental Biology* (1st ed., Vol. 85, Issue 08, pp. 63–82). Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(08\)00803-X](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(08)00803-X)
- Scales, S. J., & de Sauvage, F. J. (2009). Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30(6), 303–312. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.03.007>

- Schneider, L., Cammer, M., Lehman, J., Nielsen, S., Guerra, C., Veland, I., Stock, C., Hoffmann, E., Yoder, B., Schwab, A., Satir, P., & Christensen, S. (2010). Directional Cell Migration and Chemotaxis in Wound Healing Response to PDGF-AA are Coordinated by the Primary Cilium in Fibroblasts. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *25*(2–3), 279–292. <https://doi.org/10.1159/000276562>
- Schraml, P., Frew, I. J., Thoma, C. R., Boysen, G., Struckmann, K., Krek, W., & Moch, H. (2009). Sporadic clear cell renal cell carcinoma but not the papillary type is characterized by severely reduced frequency of primary cilia. *Modern Pathology*, *22*(1), 31–36. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2008.132>
- Seeger-Nukpezah, T., Little, J. L., Serzhanova, V., & Golemis, E. A. (2013). Cilia and cilia-associated proteins in cancer. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, *10*(3–4), e135–e142. <https://doi.org/10.1016/j.ddmec.2013.03.004>
- Seri, B., Garcia-Verdugo, J. M., Collado-Morente, E. L., McEwen, B. S., & Alvarez-Buylla, A. (2004). Cell Types, Lineage, and Architecture of the Germinal Zone in the Adult Dentate Gyrus. *The Journal of Comparative Neurology*, *378*(April), 359–378. <https://doi.org/10.1002/cne.20288>
- Shibue, T., & Weinberg, R. A. (2017). EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nature Reviews Clinical Oncology*, *14*, 611–629. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.44>
- Shin, K., Lim, A., Odegaard, J. I., Honeycutt, J. D., Kawano, S., Hsieh, M. H., & Beachy, P. A. (2014). Cellular origin of bladder neoplasia and tissue dynamics of its progression to invasive carcinoma. *Nature Cell Biology*, *16*(5), 469–478. <https://doi.org/10.1038/ncb2956>
- Shin, K., Lim, A., Zhao, C., Sahoo, D., Pan, Y., Spiekerkoetter, E., Liao, J. C., & Beachy, P. A. (2014). Hedgehog Signaling Restrains Bladder Cancer Progression by Eliciting Stromal Production of Urothelial Differentiation Factors. *Cancer Cell*, *26*(4), 521–533. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.09.001>
- Singer, D., Thamm, K., Zhuang, H., Karbanová, J., Gao, Y., Walker, J. V., Jin, H., Wu, X., Coveney, C. R., Marangoni, P., Lu, D., Grayson, P. R. C., Gulsen, T., Liu, K. J., Ardu, S., Wann, A. K., Luo, S., Zamboni, A. C., Jetten, A. M., ... Hu, B. (2018). Prominin-1 controls stem cell activation by orchestrating ciliary dynamics. *The EMBO Journal*, *38*(2), e99845. <https://doi.org/10.15252/embj.201899845>
- Sohal, G. S., Ali, M. M., & Farooqui, F. A. (2002). A second source of precursor cells for the developing enteric nervous system and interstitial cells of Cajal. *International Journal of Developmental Neuroscience*, *20*(8), 619–626. [https://doi.org/10.1016/S0736-5748\(02\)00103-X](https://doi.org/10.1016/S0736-5748(02)00103-X)
- Song, D. K., Choi, J. H., & Kim, M. (2018). Primary Cilia as a Signaling Platform for Control of Energy Metabolism. *Diabetes & Metabolism Journal*, *42*(2), 117. <https://doi.org/10.4093/dmj.2018.42.2.117>
- Sorokin, S. P. (1968). Centriole formation and ciliogenesis. *Aspen Emphysema Conference*, *11*, 213–216. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5751848>
- Sorrells, S. F., Paredes, M. F., Cebrian-Silla, A., Sandoval, K., Qi, D., Kelley, K. W., James, D., Mayer, S., Chang, J., Auguste, K. I., Chang, E. F., Gutierrez, A. J., Kriegstein, A. R., Mathern,

- G. W., Oldham, M. C., Huang, E. J., Garcia-Verdugo, J. M., Yang, Z., & Alvarez-Buylla, A. (2018). Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature*, *555*(7696), 377–381. <https://doi.org/10.1038/nature25975>
- Spasic, M., & Jacobs, C. R. (2017). Primary cilia: Cell and molecular mechanosensors directing whole tissue function. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, *71*, 42–52. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.08.036>
- Spassky, N., Han, Y.-G., Aguilar, A., Strehl, L., Besse, L., Laclef, C., Romaguera Ros, M., Garcia-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (2008). Primary cilia are required for cerebellar development and Shh-dependent expansion of progenitor pool. *Developmental Biology*, *317*(1), 246–259. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.02.026>
- Stemple, D. L., & Anderson, D. J. (1992). Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. *Cell*, *71*(6), 973–985. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90393-Q](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90393-Q)
- Stiff, T., Casar Tena, T., O'Driscoll, M., Jeggo, P. A., & Philipp, M. (2016). ATR promotes cilia signalling: links to developmental impacts. *Human Molecular Genetics*, *25*(8), 1574–1587. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw034>
- Stiles, J., & Jernigan, T. L. (2010). The Basics of Brain Development. *Neuropsychology Review*, *20*(4), 327–348. <https://doi.org/10.1007/s11065-010-9148-4>
- Suárez-Rodríguez, R., & Belkind-Gerson, J. (2004). Cultured Nestin-Positive Cells from Postnatal Mouse Small Bowel Differentiate Ex Vivo into Neurons, Glia, and Smooth Muscle. *Stem Cells*, *22*(7), 1373–1385. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2003-0049>
- Takeishi, S., & Nakayama, K. I. (2014). Role of Fbxw7 in the maintenance of normal stem cells and cancer-initiating cells. *British Journal of Cancer*, *111*(6), 1054–1059. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.259>
- Tamada, H., & Kiyama, H. (2016). Suppression of c-Kit signaling induces adult neurogenesis in the mouse intestine after myenteric plexus ablation with benzalkonium chloride. *Scientific Reports*, *6*(1), 32100. <https://doi.org/10.1038/srep32100>
- Tang, C.-M., Lee, T. E., Syed, S. A., Burgoyne, A. M., Leonard, S. Y., Gao, F., Chan, J. C., Shi, E., Chmielecki, J., Morosini, D., Wang, K., Ross, J. S., Kendrick, M. L., Bardsley, M. R., De Siena, M., Mao, J., Harismendy, O., Ordog, T., & Sicklick, J. K. (2016). Hedgehog pathway dysregulation contributes to the pathogenesis of human gastrointestinal stromal tumors via GLI-mediated activation of KIT expression. *Oncotarget*, *7*(48). www.impactjournals.com/oncotarget%5Cnwww.impactjournals.com/oncotarget/
- Tang, N., & Marshall, W. F. (2012). Centrosome positioning in vertebrate development. *Journal of Cell Science*, *125*(21), 4951–4961. <https://doi.org/10.1242/jcs.038083>
- Tang, Z., Lin, M. G., Stowe, T. R., Chen, S., Zhu, M., Stearns, T., Franco, B., & Zhong, Q. (2013). Autophagy promotes primary ciliogenesis by removing OFD1 from centriolar satellites. *Nature*, *502*(7470), 254–257. <https://doi.org/10.1038/nature12606>
- Taschner, M., & Lorentzen, E. (2016). The intraflagellar transport machinery. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *8*(10). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028092>
- Teperino, R., Amann, S., Bayer, M., McGee, S. L., Loipetzberger, A., Connor, T., Jaeger, C., Kammerer, B., Winter, L., Wiche, G., Dalgaard, K., Selvaraj, M., Gaster, M., Lee-Young, R.

- S., Febbraio, M. A., Knauf, C., Cani, P. D., Aberger, F., Penninger, J. M., ... Esterbauer, H. (2012). Hedgehog Partial Agonism Drives Warburg-like Metabolism in Muscle and Brown Fat. *Cell*, *151*(2), 414–426. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.021>
- Tewari, D., Patni, P., Bishayee, A., Sah, A. N., & Bishayee, A. (2019). Natural products targeting the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway in cancer: A novel therapeutic strategy. In *Seminars in Cancer Biology* (Issue September). <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2019.12.008>
- Tiet, T. D., & Alman, B. A. (2003). Developmental pathways in musculoskeletal neoplasia: Involvement of the Indian hedgehog-parathyroid hormone-related protein pathway. *Pediatric Research*, *53*(4), 539–543. <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000054688.93486.18>
- Tobin, J. L., Di Franco, M., Eichers, E., May-Simera, H., Garcia, M., Yan, J., Quinlan, R., Justice, M. J., Hennekam, R. C., Briscoe, J., Tada, M., Mayor, R., Burns, A. J., Lupski, J. R., Hammond, P., & Beales, P. L. (2008). Inhibition of neural crest migration underlies craniofacial dysmorphology and Hirschsprung's disease in Bardet-Biedl syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(18), 6714–6719. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707057105>
- Toda, T., & Gage, F. H. (2017). Review: adult neurogenesis contributes to hippocampal plasticity. *Cell and Tissue Research*, 1–17. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2735-4>
- Tong, C. K., Han, Y.-G., Shah, J. K., Obernier, K., Guinto, C. D., & Alvarez-Buylla, A. (2014). Primary cilia are required in a unique subpopulation of neural progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(34), 12438–12443. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321425111>
- Torihashi, S., Nishi, K., Tokutomi, Y., Nishi, T., Ward, S., & Sanders, K. M. (1999). Blockade of kit signaling induces transdifferentiation of interstitial cells of Cajal to a smooth muscle phenotype. *Gastroenterology*, *117*(1), 140–148. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(99\)70560-3](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(99)70560-3)
- Tornillo, L. (2014). Gastrointestinal Stromal Tumor - An Evolving Concept. *Frontiers in Medicine*, *1*. <https://doi.org/10.3389/fmed.2014.00043>
- Tsang, W. Y., Bossard, C., Khanna, H., Peränen, J., Swaroop, A., Malhotra, V., & Dynlacht, B. D. (2008). CP110 Suppresses Primary Cilia Formation through Its Interaction with CEP290, a Protein Deficient in Human Ciliary Disease. *Developmental Cell*, *15*(2), 187–197. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.07.004>
- Tummala, P., Arnsdorf, E. J., & Jacobs, C. R. (2010). The role of primary cilia in mesenchymal stem cell differentiation: A pivotal switch in guiding lineage commitment. *Cellular and Molecular Bioengineering*, *3*(3), 207–212. <https://doi.org/10.1007/s12195-010-0127-x>
- Turn, R. E., Linnert, J., Gigante, E. D., Wolfrum, U., Caspary, T., & Kahn, R. A. (2021). Roles for ELMOD2 and Rootletin in ciliogenesis. *Molecular Biology of the Cell*, *32*(8), 800–822. <https://doi.org/10.1091/mbc.E20-10-0635>
- Utrilla, J., Gordillo-Martínez, F., Gómez-Pascual, A., Fernández-Santos, JM Garnacho, C., Vázquez-Román, V., Morillo-Bernal, J., García-Marín, R., Jiménez-García, A., & Martín-Lacave, I. (2015). Comparative study of the primary cilia in thyrocytes of adult mammals. *Journal of Anatomy*, *4*(July), 550–560. <https://doi.org/10.1111/joa.12360>

- Vanderwinden, J. M., Gillard, K., De Laet, M. H., Messam, C. A., & Schiffmann, S. N. (2002). Distribution of the intermediate filament nestin in the muscularis propria of the human gastrointestinal tract. *Cell and Tissue Research*, *309*(2), 261–268. <https://doi.org/10.1007/s00441-002-0590-3>
- Veland, I. R., Lindbæk, L., & Christensen, S. T. (2014). Linking the primary cilium to cell migration in tissue repair and brain development. *BioScience*, *64*(12), 1115–1125. <https://doi.org/10.1093/biosci/biu179>
- Vertii, A., Hung, H. F., Hehnly, H., & Doxsey, S. (2016). Human basal body basics. *Cilia*, *5*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13630-016-0030-8>
- Vézina, A., Vaillancourt-Jean, E., Albarao, S., & Annabi, B. (2014). Mesenchymal stromal cell ciliogenesis is abrogated in response to tumor necrosis factor- α and requires NF- κ B signaling. *Cancer Letters*, *345*(1), 100–105. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.11.021>
- Viallard, C., & Larrivé, B. (2017). Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis*, *20*(4), 409–426. <https://doi.org/10.1007/s10456-017-9562-9>
- Villumsen, B. H., Danielsen, J. R., Povlsen, L., Sylvestersen, K. B., Merdes, A., Beli, P., Yang, Y. G., Choudhary, C., Nielsen, M. L., Mailand, N., & Bekker-Jensen, S. (2013). A new cellular stress response that triggers centriolar satellite reorganization and ciliogenesis. *EMBO Journal*, *32*(23), 3029–3040. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.223>
- Vogelstein, B., Lane, D., & Levine, A. J. (2000). *Surfing the p53 network*. *408*(November).
- Volta, F., Scerbo, M. J., Seelig, A., Wagner, R., O'Brien, N., Gerst, F., Fritsche, A., Häring, H., Zeigerer, A., Ullrich, S., & Gerdes, J. M. (2019). Glucose homeostasis is regulated by pancreatic β -cell cilia via endosomal EphA-processing. *Nature Communications*, *10*(1), 5686. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12953-5>
- Wang, D., Kong, X., Li, Y., Qian, W., Ma, J., Wang, D., Yu, D., & Zhong, C. (2017). Curcumin inhibits bladder cancer stem cells by suppressing Sonic Hedgehog pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *493*(1), 521–527. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.08.158>
- Wang, S., Livingston, M. J., Su, Y., & Dong, Z. (2015). Reciprocal regulation of cilia and autophagy via the MTOR and proteasome pathways. *Autophagy*, *11*(4), 607–616. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1023983>
- Wang, S., Wei, Q., Dong, G., & Dong, Z. (2013). ERK-mediated suppression of cilia in cisplatin-induced tubular cell apoptosis and acute kidney injury. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1832*(10), 1582–1590. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.05.023>
- Wann, A. K. T., Chapple, J. P., & Knight, M. M. (2014). The primary cilium influences interleukin-1 β -induced NF κ B signalling by regulating IKK activity. *Cellular Signalling*, *26*(8), 1735–1742. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.04.004>
- Wann, A. K. T., Zuo, N., Haycraft, C. J., Jensen, C. G., Poole, C. A., McGlashan, S. R., & Knight, M. M. (2012). Primary cilia mediate mechanotransduction through control of ATP-induced Ca²⁺ signaling in compressed chondrocytes. *FASEB Journal*, *26*(4), 1663–1671. <https://doi.org/10.1096/fj.11-193649>

- Ware, S. M., Aygun, M. G., & Hildebrandt, F. (2011). Spectrum of Clinical Diseases Caused By Disorders of Primary Cilia. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 8(5), 444–450. <https://doi.org/10.1513/pats.201103-025SD>
- Wheway, G., Nazlamova, L., & Hancock, J. T. (2018). Signaling through the Primary Cilium. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6(February), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00008>
- Wiegering, A., R  ther, U., & Gerhardt, C. (2019). The Role of Primary Cilia in the Crosstalk between the Ubiquitin–Proteasome System and Autophagy. *Cells*, 8(3), 241. <https://doi.org/10.3390/cells8030241>
- Wilkinson, S. E., Furic, L., Buchanan, G., Larsson, O., Pedersen, J., Frydenberg, M., Risbridger, G. P., & Taylor, R. A. (2013). Hedgehog signaling is active in human prostate cancer stroma and regulates proliferation and differentiation of adjacent epithelium. *The Prostate*, 73(16), 1810–1823. <https://doi.org/10.1002/pros.22720>
- Wloga, D., Joachimiak, E., Louka, P., & Gaertig, J. (2017). Posttranslational modifications of Tubulin and cilia. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028159>
- Wong, S. Y., Seol, A. D., So, P. L., Ermilov, A. N., Bichakjian, C. K., Epstein, E. H., Dlugosz, A. A., & Reiter, J. F. (2009). Primary cilia can both mediate and suppress Hedgehog pathway-dependent tumorigenesis. *Nature Medicine*, 15(9), 1055–1061. <https://doi.org/10.1038/nm.2011>
- Wu, T., & Dai, Y. (2017). Tumor microenvironment and therapeutic response. *Cancer Letters*, 387, 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.01.043>
- Wülling, M., Delling, G., & Kaiser, E. (2003). The Origin of the Neoplastic Stromal Cell in Giant Cell Tumor of Bone. *Human Pathology*, 34(10), 983–993. [https://doi.org/10.1053/S0046-8177\(03\)00413-1](https://doi.org/10.1053/S0046-8177(03)00413-1)
- Yarandi, S. S., Kulkarni, S., Saha, M., Sylvia, K. E., Sears, C. L., & Pasricha, P. J. (2020). Intestinal Bacteria Maintain Adult Enteric Nervous System and Nitrergic Neurons via Toll-like Receptor 2-induced Neurogenesis in Mice. *Gastroenterology*, 159(1), 200-213.e8. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.03.050>
- Yasar, B., Linton, K., Slater, C., & Byers, R. (2017). Primary cilia are increased in number and demonstrate structural abnormalities in human cancer. *Journal of Clinical Pathology*, 70(7), 571–574. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2016-204103>
- Youn, Y. H., & Han, Y. G. (2018). Primary Cilia in Brain Development and Diseases. *American Journal of Pathology*, 188(1), 11–22. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.08.031>
- Yuan, K., Frolova, N., Xie, Y., Wang, D., Cook, L., Kwon, Y. J., Steg, A. D., Serra, R., & Frost, A. R. (2010). Primary cilia are decreased in breast cancer: Analysis of a collection of human breast cancer cell lines and tissues. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 58(10), 857–870. <https://doi.org/10.1369/jhc.2010.955856>
- Yuan, S., Li, J., Diener, D. R., Choma, M. A., Rosenbaum, J. L., & Sun, Z. (2012). Target-of-rapamycin complex 1 (Torc1) signaling modulates cilia size and function through protein synthesis regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(6), 2021–2026. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112834109>

- Yun, S. J., & Kim, W. (2013). Role of the Epithelial-Mesenchymal Transition in Bladder Cancer: From Prognosis to Therapeutic Target. *Korean Journal of Urology*, *54*(10), 645. <https://doi.org/10.4111/kju.2013.54.10.645>
- Zeisberg, M., & Neilson, E. G. (2009). Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *Journal of Clinical Investigation*, *119*(6), 1429–1437. <https://doi.org/10.1172/JCI36183>
- Zhan, T., Rindtorff, N., & Boutros, M. (2017). Wnt signaling in cancer. *Oncogene*, *36*(11), 1461–1473. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.304>
- Zhao, C., Deng, W., & Gage, F. H. (2008). Mechanisms and Functional Implications of Adult Neurogenesis. *Cell*, *132*(4), 645–660. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.033>
- Zhong, M., Zhao, X., Li, J., Yuan, W., Yan, G., Tong, M., Guo, S., Zhu, Y., Jiang, Y., Liu, Y., & Jiang, Y. (2016). Tumor suppressor folliculin regulates mTORC1 through primary cilia. *Journal of Biological Chemistry*, *291*(22), 11689–11697. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.719997>
- Zingg, D., Debbache, J., Peña-Hernández, R., Antunes, A. T., Schaefer, S. M., Cheng, P. F., Zimmerli, D., Haeusel, J., Calçada, R. R., Tuncer, E., Zhang, Y., Bossart, R., Wong, K.-K., Basler, K., Dummer, R., Santoro, R., Levesque, M. P., & Sommer, L. (2018). EZH2-Mediated Primary Cilium Deconstruction Drives Metastatic Melanoma Formation. *Cancer Cell*, *34*(1), 69-84.e14. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.06.001>

ANEXOS

ANEXO 1. OTRAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN RELACIONADAS CON EL CILIO PRIMARIO.

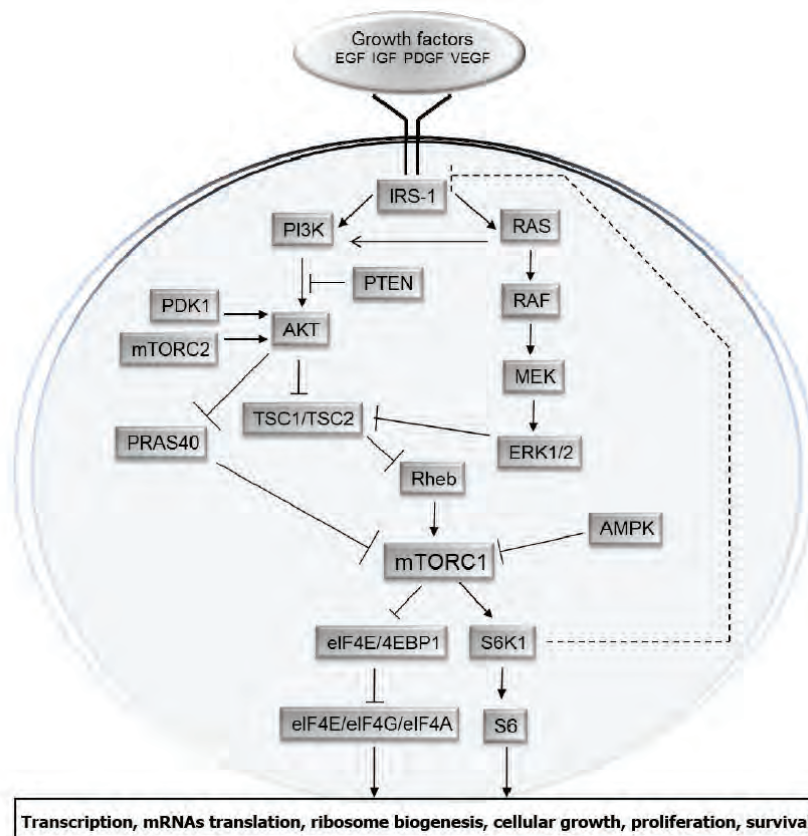
Vía mTOR

Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) es una proteína fundamental en la integración de señales, control de la supervivencia y regulación del crecimiento y metabolismo celular. mTOR forma dos complejos con funciones diferentes: mTORC1 (relacionado fundamentalmente con la síntesis de proteínas y el metabolismo celular) y mTORC2 (asociado a supervivencia celular, regulación del citoesqueleto de actina y migración). Alteraciones en esta vía se han relacionado con patologías donde el crecimiento y supervivencia celular se ven alterados, por ejemplo, diferentes tipos de cáncer (Pópulo et al., 2012).

La activación de mTOR se produce a partir de la unión de factores de crecimiento a receptores tirosín quinasa que producen la liberación de la parte catalítica de la Fosfatidil Inositol 3 Kinasa (PI3K) que regula el paso de Fosfatidil Inositol 3,4 bifosfato (PIP2) a Fosfatidil Inositol 3,4,5 trifosfato (PIP3). PIP3 recluta Akt (*Protein Kinase B*) y permite su activación por PDK1 (*Phosphoinositide-Dependent protein Kinase 1*) y por el complejo mTORC2. Akt produce la inhibición de las proteínas TSC (*Tuberous Sclerosis Complex*), llamadas hamartina y tuberina, que actúan como GTPasas y, en consecuencia, inhibidoras de las proteínas G monómeras Rheb (*Ras homolog enriched in brain*). Estas proteínas Rheb, a su vez activan al complejo mTORC1 que fosforila y activa las proteínas S6K (*Ribosomal Protein S6 Kinasa*), eIF4E (*eukaryotic Initiation Factor 4E*) y 4EBP1 (*Eukaryotic Binding Protein 1*) produciendo el aumento en la síntesis proteica, biogénesis ribosomal y supervivencia celular (Pópulo et al., 2012; Li et al., 2016; Rosengren et al., 2018) (**Fig. A1**).

mTORC1 se ha relacionado de manera inversa con la autofagia. Así, ante una situación de privación de nutrientes, se produce la inhibición de mTORC1 mientras que en situaciones ricas en nutrientes (y, concretamente, aminoácidos) mTORC1 provoca la inhibición de proteínas necesarias para la formación del autofagosoma (Jung et al., 2010).

El cilio primario mantiene una estrecha relación con la vía mTOR (Malicki and Johnson, 2017) (**Fig A2**). Así, la vía de mTORC1 regula la longitud del cilio de manera que la activación de mTOR produce una elongación del cilio mediada por la síntesis de proteínas inducida a través de S6K (Jin et al., 2015; S. Yuan et al., 2012). Del mismo modo, la inhibición de TSC1 (que se localiza en estrecha relación con el cuerpo basal del cilio) también produce un aumento de la longitud del axonema mientras que la de TSC2 parece provocar una disminución (Yuan et al., 2012; Rosengren et al., 2018). Además, el silenciamiento de TSC1 y TSC2 genera alteraciones en la activación de la vía Hh, provocando una disminución de la expresión de Gli1, en un proceso mediado no solo por mTOR sino también por la vía TGF β (*Transforming Growth Factor β* , ver más adelante) (Rosengren et al., 2018). Estos resultados destacan la intercomunicación entre diferentes vías de señalización, resaltando la importancia del cilio como nodo físico donde los diferentes componentes de estas vías pueden interactuar directamente.



Transcription, mRNAs translation, ribosome biogenesis, cellular growth, proliferation, survival

Fig A1. Vía de mTOR. La activación de receptores tirosín quinasa produce la activación de la PI3K que, a su vez, activa AKT (junto con PDK1 y mTORC2). Akt inhibe el complejo TSC que produce la inhibición (vía Rheb) de mTORC1. mTORC1 actúa sobre proteínas como S6K y 4EBP1 produciendo un aumento de la síntesis proteica y supervivencia celular. Extraído de Pópulo et al., 2012.

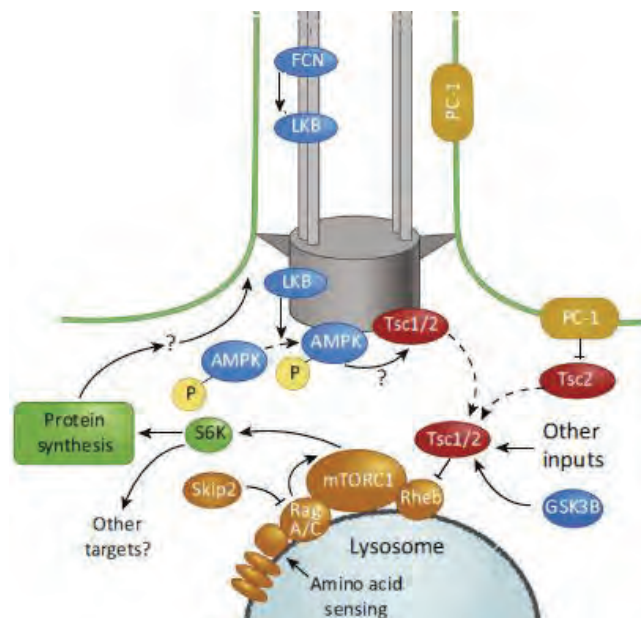


Fig. A2. Vía mTOR y cilio primario. La relación de la vía mTOR y el cilio primario es bidireccional. Así, por una parte, la activación de mTOR (y consecuentemente de S6K) produce vía síntesis de proteínas una elongación del cilio primario. Por otra parte, diferentes proteínas, implicadas fundamentalmente en la inhibición de mTOR (Foliculina –FCN–, LKB, AMPK o TSC1/2), se localizan en el cilio primario y provocan (ante situación de flujo activo y su consecuente mecanotransducción) la inhibición de la vía. Por otra parte, PC1 inhibe directamente TSC2. Modificado de Malicki and Johnson 2017.

Otras proteínas localizadas en el cilio primario que regulan la vía de mTOR son Foliculina, LKB (*Liver Kinase B*) y AMPK (*Adenosin MonoPhosphate Kinase*). Estas proteínas están implicadas en la inhibición de mTOR mediada por el cilio. Así, ante situaciones de flujo en el que se activa la mecanotransducción ciliar, se produce la activación de Foliculina, LKB y AMPK y la consecuente inhibición de mTOR (Boehlke et al., 2010; Zhong et al., 2016). Otra proteína relacionada con la mecanotransducción ciliar, PC1, interacciona con TSC y sus mutaciones se han implicado directamente con una sobreactivación de mTOR (Whewey et al., 2018).

Vía Wnt

La vía Wnt (*Wingless-related integration site*) está compuesta por varios ligandos (compuestos por las lipoproteínas Wnt) y por los receptores Frizzled. Cuando el ligando se une al receptor se pueden activar dos rutas diferentes de la vía Wnt: la canónica (o β -catenina dependiente) o la no-canónica (o β -catenina independiente). La activación de una u otra vía, depende tanto de las isoformas concretas de los ligandos como de la de los receptores, así como de diferentes proteínas que actúan como co-receptores (Gerdes and Katsanis, 2008; Zhan et al., 2017) (**Fig. A3).**

En lo referente a la ruta canónica, en ausencia del ligando se produce la fosforilación de β -catenina (y su consecuente degradación por el proteasoma) por un complejo de destrucción compuesto por las proteínas estructurales Axin y APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) y por las kinasas CK1 y GSK3 β . En estas circunstancias, TCF/LEF (*T-cell transcription factor /lymphoid enhancer-binding factor 1*) y Groucho, represores de la vía Wnt, inhiben la transcripción de los genes diana a través de HDAC (*Hystone Deacetylase*). Cuando las lipoproteínas Wnt se unen a Frizzled y a co-receptores específicos (como LRP -*Low density lipoprotein Related Protein*-), la vía canónica se activa, produciéndose la polimerización de la proteína *Dishevelled* (Dvl) que inactiva el complejo de destrucción de la β -catenina, permitiendo su traslocación al núcleo, su unión al complejo TCF/LEF y la activación de la transcripción de los genes diana (**Fig. A3.A**). Esta ruta activa mecanismos de supervivencia, proliferación y diferenciación celular (Gerdes and Katsanis, 2008; Zhan et al., 2017; Anvarian et al., 2019).

Por otra parte, la ruta no canónica (menos entendida y estudiada que la anterior) activa vías independientes de β -catenina a través de la unión de Wnt a co-receptores específicos como ROR2 (*Receptor Tyrosin kinase-like Orphan Receptor 2*). Esto produce la activación de Dvl, desencadenando rutas como la de la proteína G monomérica Rho, JNK (*c-Jun N-terminal Kinases*) o la vía de señalización del calcio (**Fig. A3.B**). Esta ruta se ha relacionado estrechamente con la polaridad celular plana muy relacionada con la morfología celular y la migración celular (Gerdes and Katsanis, 2008; Zhan et al., 2017; Anvarian et al., 2019).

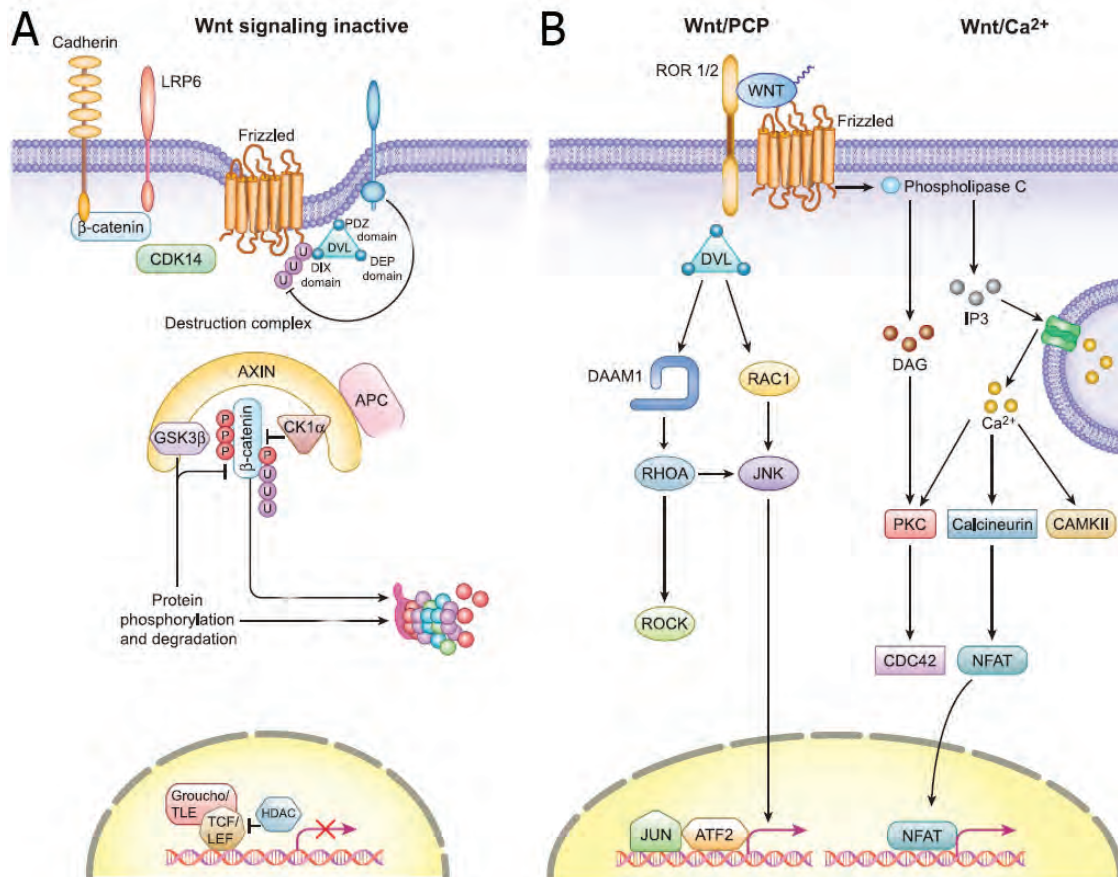


Fig. A3. Vía Wnt. A) En la ruta canónica (β -catenina dependiente), cuando no se activa la ruta se produce la fosforilación de β -catenina por el complejo de destrucción compuesto por Axin, APC, GSK3 β y CK1 α . Esta fosforilación marca la degradación de β -catenina. Mientras tanto, a las zonas de respuesta a β -catenina del genoma se unen las proteínas TCF/LEF y Groucho que, vía HDAC, provocan la inhibición de la transcripción de los genes diana. Cuando Wnt se une al receptor, se produce la polimerización de Dvl y la inhibición del complejo de destrucción de β -catenina. Esta se trasloca al núcleo donde activa la transcripción de los genes diana. B) En la ruta Wnt no canónica, Dvl provoca la activación de cascadas diferentes de β -catenina como la de Rho, la de JNK o la señalización del calcio (a partir de la fosfolipasa C). El calcio activa rutas específicas como CAMK (Calcium/Calmodulin Kinase), PKC (Proteína Kinase C) o Calcineurin. Simplificado de Zhan et al., 2017.

A pesar de haberse localizado en el cilio primario proteínas fundamentales de la vía Wnt (como Frizzled, β -catenina o elementos del complejo destructor), el papel de este orgánulo en esta ruta de señalización no se comprende aún y se han obtenido resultados controvertidos (Gerdes and Katsanis, 2008; Anvarian et al., 2019). Parece demostrado que las proteínas que componen la zona de transición, tanto del complejo NPHP (NPHP2 o inversina, NPHP3, NPHP4 o RPGRIP1) como del MKS (Joubertin o TMEM67 -*Transmembrane protein 67*-) influyen en la señalización de Wnt. Joubertin, por ejemplo, realiza efectos antagónicos según la integridad estructural del cilio primario, de manera que en ausencia del cilio inhibe la degradación de β -catenina y favorece su expresión nuclear mientras que en presencia de cilio produce un efecto inhibitorio de la vía canónica. Parte del efecto inhibitorio de las proteínas NPHP se debe a su interacción con la proteína Jade1, que media la degradación de β -catenina tanto citoplasmática como nuclear. Por otra parte, TMEM67 interactúa con la proteína ROR2, activando la ruta no canónica de Wnt (Gerdes and Katsanis, 2008; Anvarian et al., 2019). Simplificando, la mayoría de proteínas ciliares afectan a la vía produciendo cierta represión de la vía canónica mientras que favorecen la activación de la ruta no canónica, que afecta a la

polaridad plana, resaltando el papel del cilio primario en este proceso (ver apartado específico) (Fig. A4).

Por otra parte, la vía Wnt parece regular la ciliogénesis (especialmente de cilios móviles) a través de la vía no canónica fundamentalmente al regular la polaridad celular plana, cuyos efectores son necesarios para la correcta orientación y anclaje del cuerpo basal (Lienkamp et al., 2012).

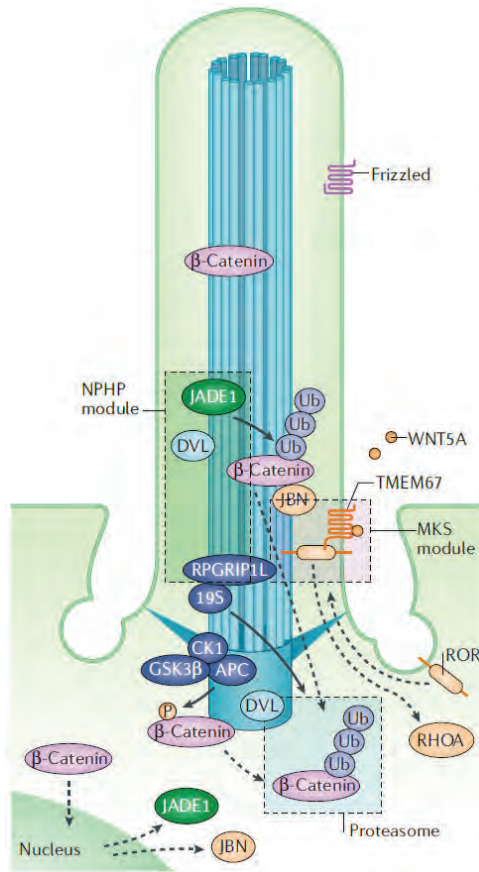


Fig. A4. Vía Wnt y cilio primario. Componentes de la vía Wnt se localizan en el cilio primario, especialmente en el cuerpo basal (incluidos Frizzled, β-catenina, APC, Dvl, GSK3β o CK1). Se ha observado que diferentes proteínas de la zona de transición ciliar (tanto del complejo NPHP como del MKS) regulan la vía Wnt, de manera que tienden a inhibir la ruta canónica (a través de proteínas que producen la degradación de β-catenina, como Jade1); mientras que favorecen la ruta no canónica dependiente del co-receptor ROR2 y de proteínas como Rho. Extraído de Anvarian et al. 2019.

Vía TGFβ

La vía de TGFβ regula, entre otros, mecanismos de diferenciación celular y se relaciona con procesos mesenquimales, incluida la transición epitelio-mesenquimal, la síntesis de matriz extracelular y la fibrosis. El receptor clásico TGFβ está compuesto por un heterodímero (TGFβRI y TGFβRII) con un dominio serina/treonina kinasa que produce una fosforilación cruzada. Esto produce el reclutamiento, fosforilación y activación de las proteínas Smad (fundamentalmente Smad2/3). Smad 2/3 se oligomeriza entonces con Smad4 y se transloca al núcleo donde produce la activación y regulación de la transcripción de los genes diana. Esta ruta es controlada por otras proteínas, como Smad7 que inhibe la vía evitando una activación excesiva (Massagué and Gomis, 2006; Alberts et al., 2010; Christensen et al., 2017;)(Fig. A5.A).

Los componentes que forman la ruta de TGFβ, incluyendo los receptores y las proteínas Smad, se localizan en el cilio primario. Cuando se une el ligando, el receptor TGFβ pasa de la punta del axonema a la base ciliar donde se acumula en vesículas recubiertas de clatrina, cerca del bolsillo ciliar. Ahí, se produce la fosforilación de las proteínas Smad y su activación (Clement et

al., 2013; Labour et al., 2016; Christensen et al., 2017) (**Fig. A5.B**). Esta activación de la vía TGF β dependiente de cilio es fundamental para la diferenciación de los cardiomiocitos (Clement et al., 2013) y la migración de células madre mesenquimales (Labour et al., 2016).

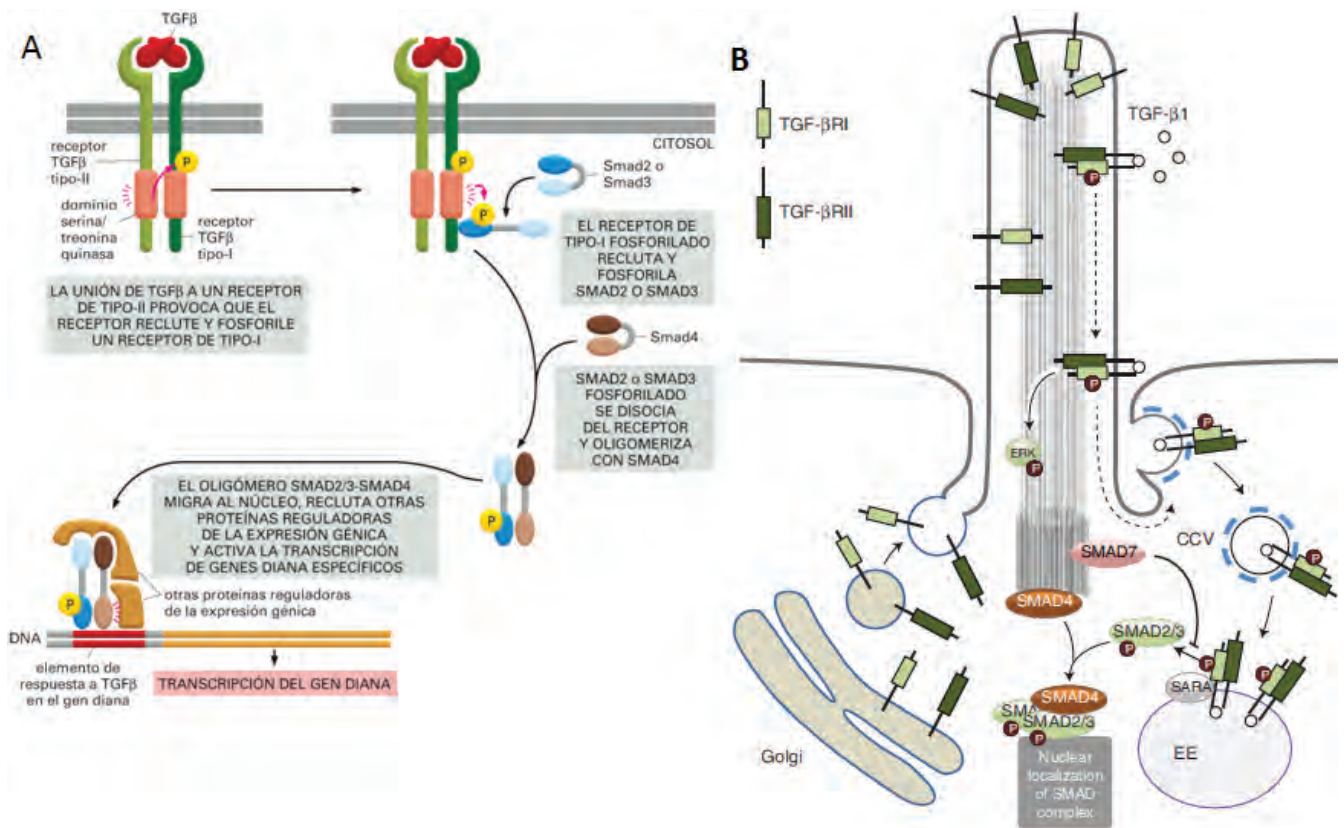


Fig. A5. Cilio primario y vía TGF β . A) La vía TGF β se activa al unirse el ligando a un heterodímero con acción serina/treonina quinasa. Esto produce la fosforilación del receptor y el consecuente reclutamiento y activación de las proteínas Smad2 y 3. Estas se unen a Smad4 y se unen a determinados patrones del DNA para activar la transcripción de diferentes genes. Extraído de Alberts et al. 2010. B) El receptor TGF β se localiza en la punta del cilio primario cuando permanece inactivo. Ante la presencia del ligando, se produce su transporte a la base del cilio, próximo al bolsillo ciliar, desde donde se produce su endocitosis en vesículas recubiertas de clatrina. Esto facilita su acumulación y la fosforilación y activación de las proteínas Smad2/3 (que también se localizan en la base ciliar). Extraído de Christensen et al. 2017.

Vía Notch

Notch es una vía relacionada con gran variedad de procesos fisiológicos como el mantenimiento de células madre quiescentes, el correcto desarrollo del árbol vascular y de tejidos neuroectodérmicos, así como en el crecimiento y proliferación de tejidos adultos (Pala et al., 2017; Whewey et al., 2018). Del mismo modo, se ha relacionado esta vía con diferentes tipos de cáncer (Liu et al., 2018). En mamíferos, existen cuatro receptores (Notch1- 4) y dos familias de ligandos: *Delta-Like Ligand* (compuesta por DLL1, DLL3 y DLL4) y *Jagged* (JAG1 y JAG2) (Bray, 2016). Estos ligandos son proteínas transmembrana que al interactuar con el receptor Notch producen un cambio conformacional que genera la exposición de una región que es reconocida e hidrolizada por la metaloproteasa ADAM10 (A *Disentigrin and Metalloprotease 10*). Una segunda escisión por un complejo γ -secretasa produce que el dominio intracelular de Notch quede liberado y se transloque al núcleo celular donde, junto

con proteínas co-activadoras, produce la transcripción de los genes diana (Bray, 2016) (**Fig A6.A**).

En lo referente al cilio primario, se ha detectado la presencia del receptor Notch3 en la membrana ciliar, así como de proteínas que forman y regulan el complejo γ -secretasa (como la presenilina-2) en el cuerpo basal (**Fig. A6.B**). De esta forma, se ha observado una disminución de la activación de esta vía al bloquear la ciliogénesis. Del mismo modo, la activación de Notch incrementa la longitud del cilio y la activación de la vía Hh en el neuroepitelio del tubo neural durante el desarrollo embrionario (Pala et al., 2017; Wheway et al., 2018).

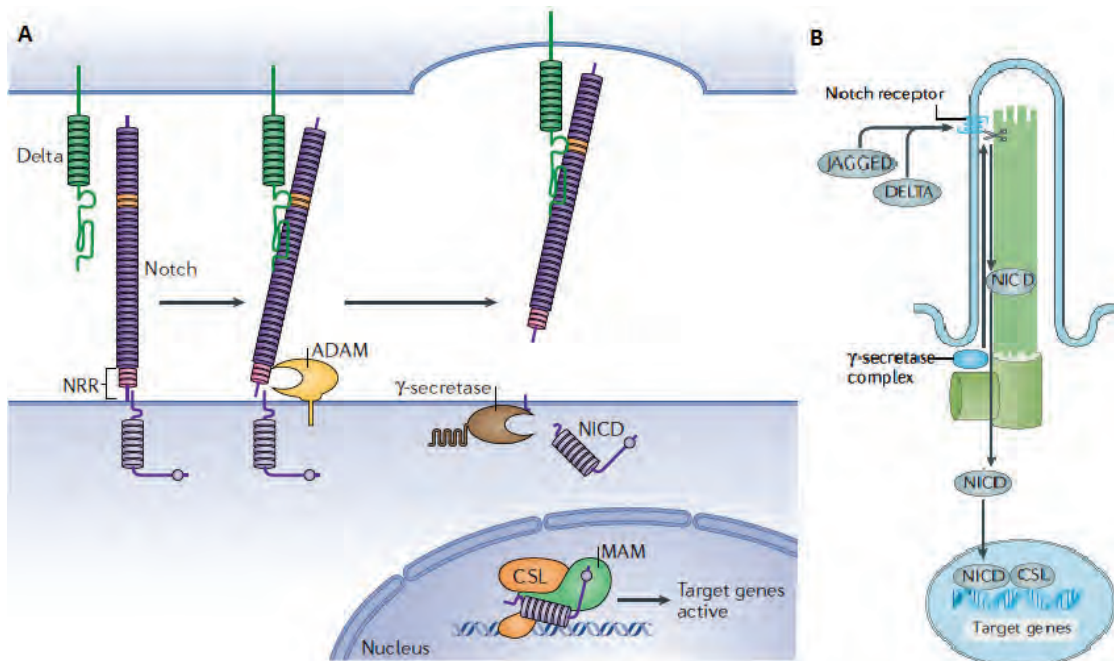


Fig. A6. Vía Notch y cilio primario. A) Cuando uno de los ligandos transmembrana (Delta o Jagged) se une a Notch, se produce un cambio conformacional del receptor que produce que se exponga una región reconocida por la metaloproteasa ADAM. Esta produce una primera escisión en Notch liberando la parte extracelular. Una γ -secretasa realiza una segunda escisión que libera el dominio intracelular de Notch (NICD), que es traslocado al interior nuclear donde junto a proteínas como CSL (CBF1-Suppressor of Hairless-LAG1) o MAM (Mastemind) activa la transcripción de los genes diana. Extraído de Bray 2016. B) Se ha descrito la localización de Notch3 en la membrana ciliar y del complejo γ -secretasa en el cuerpo basal. Extraído de Liu et al., 2018.

Vía PDGFR y otros receptores tirosín kinasa

El Receptor del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGFR, por sus singlas en inglés) es un receptor tirosín kinasa que media gran variedad de procesos celulares fisiológicos, especialmente en células mesenquimales. Del mismo modo, su alteración se ha relacionado con diversas enfermedades relacionadas con tumorigénesis y procesos de fibrosis. Se han descrito dos isoformas de este receptor: PDGFR α y PDGFR β que forman homo y heterodímeros. PDGFR α ha sido localizado en la membrana ciliar de fibroblastos y otros tipos celulares donde, a través de las rutas de kinasas como Akt o la cascada MEK (*Mitogen-activated protein kinase kinase*)/ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinase*), regulan el ciclo celular o la migración celular ante determinadas señales activadoras (Schneider et al., 2010; Christensen et al., 2012;) (**Fig A7**).

Del mismo modo, otras rutas tirosín kinasa como la del Factor de Crecimiento Epitelial (EGF), el Factor de Crecimiento de Fibroblastos (FGF) o el Factor de Crecimiento Insulina-Like (IGF) también han sido descritas en estrecha relación con el cilio primario (Christensen et al., 2012) (**Fig A7**).

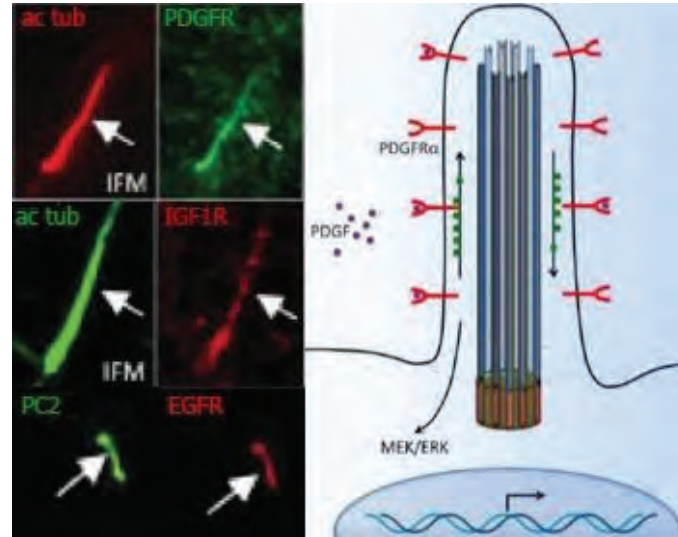


Fig A7. Receptores Tirosín Kinasa en la membrana ciliar. PDGFR α se ubica en la membrana ciliar donde, ante el ligando PDGF, produce la activación de una serie de kinasas generando la activación de la transcripción de los genes diana. Otros receptores como IGF1R o EGFR también se concentran en la membrana ciliar. Modificado a partir de Christensen et al., 2012; Pala et al., 2017.

Vía Hippo

La vía Hippo ha sido relacionada con procesos de diferenciación y proliferación celular, así como con procesos regenerativos y de tumorigénesis. Esta vía mantiene una estrecha relación con diferentes estructuras de la membrana plasmática, incluido el cilio primario (Hansen et al., 2015; Rausch and Hansen, 2019).

La vía Hippo se divide en dos módulos: el módulo con función kinasa y el transcripcional. En el módulo con función kinasa se encuentran las proteínas MST1/2 (*Mammalian STE20-like protein kinase 1 y 2*) y su activador SAV1 (*Salvador 1*) que fosforila y activa a LATS1/2 (*Large Tumor Suppressor 1 y 2*). LATS1/2 fosforila a su vez a las proteínas YAP (*Yes Associated Protein*) y TAZ (*Transcriptional coactivator with a PDZ-binding domain*). Esta fosforilación produce su secuestro en el citoplasma por parte de la proteína 14-3-3 y su degradación. Cuando la vía está inactiva, sin embargo, YAP/TAZ pasa al núcleo donde se une con TEAD (*TEA domain family members*) y activa la transcripción de los genes diana (Hansen et al., 2015; Rausch and Hansen, 2019) (**Fig. A8.A**).

La vía Hippo y el cilio primario mantiene una estrecha relación (**Fig A8.B**). Así, las proteínas de la zona de transcripción NPHP3, NPHP4 y NPHP9 aumentan la actividad de YAP/TAZ mediante diferentes mecanismos, como la inhibición de LATS1/2 o la competición con 14-3-3. Además, otras vías relacionadas con el cilio (especialmente Hh) activan la transcripción y actividad de YAP/TAZ. Por el contrario, las proteínas YAP/TAZ inhiben la ciliogénesis y activan el desensamblaje ciliar a través de diferentes mecanismos entre los que destaca la activación y

síntesis de la Aurora Kinasa A. MST1/2, sin embargo, inactiva directamente esta kinasa y facilita el transporte de diferentes proteínas ciliares hacia el cuerpo basal (Hansen et al., 2015; Rausch and Hansen, 2019).

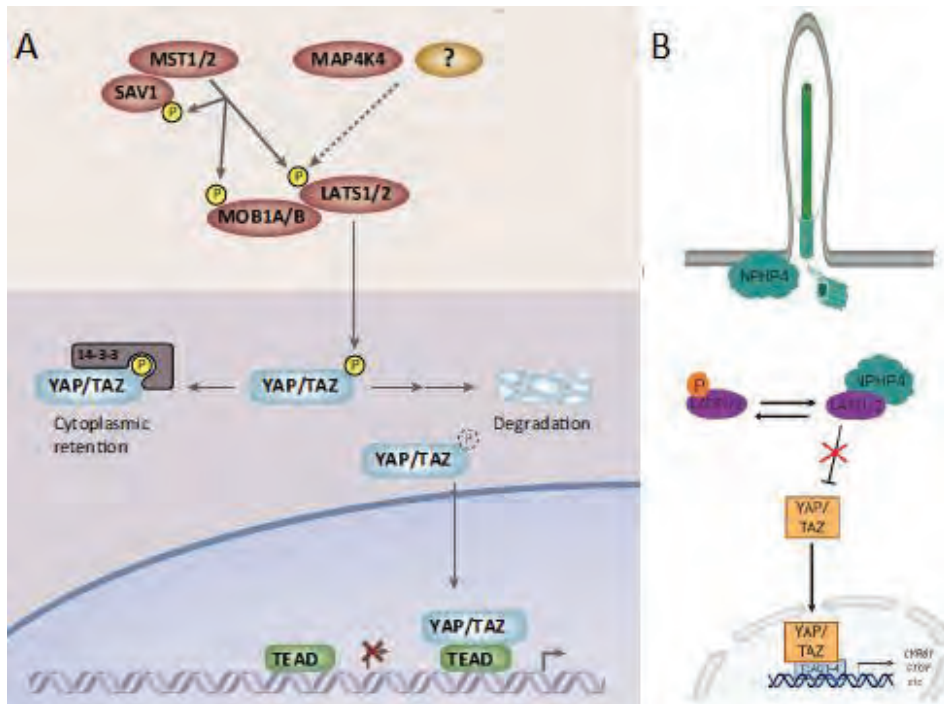


Fig. A8. Vía Hippo y cilio primario. A) La activación de MST1/2 a través de SAV1 fosforila y activa LATS1/2 que se une a MOB1A/B (Mps One Binder Kinase Activator-Like 1B) para fosforilar YAP/TAZ. Esto produce su secuestro en el citoplasma por la proteína 14-3-3 y su degradación. Cuando YAP/TAZ no está fosforilada, se trasloca al núcleo donde interactúa con TEAD y activa la transcripción de diferentes genes. Extraído de Hansen et al., 2015. B) El cilio primario influye en esta vía a través de proteínas de la zona de transcripción como NPHP4 que inhibe LATS1/2 produciéndose la activación de YAP/TAZ. Extraído de Rausch and Hansen 2019.

NF- kB

La vía de NF-kB (*Nuclear Factor kB*) está compuesta por diferentes factores de transcripción (cinco en mamíferos) que se unen, en forma de dímeros, a elementos de transcripción kB presentes en el genoma. Cuando la vía está inactiva, estos factores de transcripción son inhibidos por proteínas IκB (Inhibidores kB). Esta ruta juega un papel fundamental como reguladora de la respuesta inmune, la respuesta al estrés celular, la apoptosis y la diferenciación. La alteración de esta vía ha sido estrechamente relacionada con patología autoinmunes, enfermedades metabólicas o cáncer (Oeckinghaus et al., 2011).

Aunque esta vía no se ha relacionado tan estrechamente con el cilio primario, existen diferentes estudios que relacionan la importancia del cilio con la correcta señalización NF-kB. Así, la eliminación del cilio primario se ha relacionado con una disminución de la fosforilación y degradación de las IκB y una disminución de la activación de la vía NF-kB (Wann et al., 2014; Baek et al., 2017). Por el contrario, la activación de la vía NF-kB por TNFα (*Tumor Necrosis Factor α*) provoca el desensam

blaje ciliar (Vézina et al., 2014).

GPCR

Los receptores asociados a proteínas G (GPCR, por sus siglas en inglés) son receptores con siete dominios transmembrana que regulan la activación de proteínas G triméricas y de diferentes rutas dependientes de estas. Aunque ya hemos hablado previamente de algunos de ellos integrados en vías de señalización propias (como Smo en Hh), existen muchas otras GPCR que han sido halladas en la membrana del cilio primario, fundamentalmente en determinadas neuronas (**Tabla A1**) (Anvarian et al., 2019)

Tabla A1. Receptores GPCR localizados en el cilio primario. Extraído de Anvarian et al., 2019

G protein-coupled receptor	Cell type
β_2 -adrenergic receptor (β_2 -AR)	Neurons
G protein-coupled bile acid receptor 1 (GPBAR1)	Cholangiocytes
Dopamine D ₁ receptor	Neurons
Dopamine D ₃ receptor	Vascular endothelial cells and renal epithelial cells
Galanin receptor 3 (GALR3)	Neurons
GPR19	Neurons and glial cells
GPR83	Neurons
GPR161	Neurons and mouse embryonic fibroblasts
GPR175	Mouse fibroblasts
Kisspeptin receptor 1 (KISS1R)	Neurons
Melanin-concentrating hormone receptor 1 (MCHR1)	Neurons
Melanocortin 4 receptor (MC4R)	Neurons
Muscarinic acetylcholine receptor 3 (M3R)	Olfactory sensory neurons
Neuropeptide Y receptor subtype 2 (NPY2R)	Neurons
Neuropeptide Y receptor subtype 5 (NPY5R)	Neurons
Parathyroid hormone receptor 1 (PTH1R)	Nucleus pulposus cells
Prokineticin receptor 1 (PROKR1)	Human trophoblast cells and human placental tissue
Prolactin-releasing hormone receptor (PRLHR)	Glial cells
Prostaglandin E receptor 4 (EP4)	Human retinal pigment epithelial cells
Purinergic receptor P2Y ₁₂ (P2RY ₁₂)	Cholangiocytes
Pyroglutamylated RF-amide peptide receptor (QRFP)	Neurons
Serotonin receptor 6 (5-HT ₆)	Neurons
Somatostatin receptor subtype 3 (SSTR3)	Neurons
Trace amine-associated receptor 1 (TAAR1)	Thyroid epithelial cells
Type 2 vasopressin receptor (V2R)	Renal epithelial cells

ROLE OF PRIMARY CILIA IN ENTERIC NERVOUS SYSTEM DEVELOPMENT

Informe de la estancia realizada en “l’Institute de Biologie de l’École Normale Supérieure” de París en el laboratorio de la Dra. Nathalie Spassky en abril del 2019.

Previous studies have shown the presence of primary cilia in Enteric Nervous System (ENS) [1–3] although their exact function remains elusive. Regarding Central Nervous System, primary cilia play an important role in both embryo and adult neurogenesis [4–6]. Studying the role of primary cilia in ENS development was aimed during my stage.

Using the Cre-loxP system, a transgenic mouse lacking primary cilia in ENS precursor cells was developed. Phox2b is expressed by enteric neural stem cells and adult enteric neurons and it is essential for ENS (and other autonomic nervous system components) development [7]. On the other hand, Kif3a is required for proper ciliogenesis [5]. Crossings were performed in order to get Cre-Phox2b, Kif3a KO/loxP mice resulting in mice lacking primary cilia selectively in ENS precursor cells (**Fig. 1**).

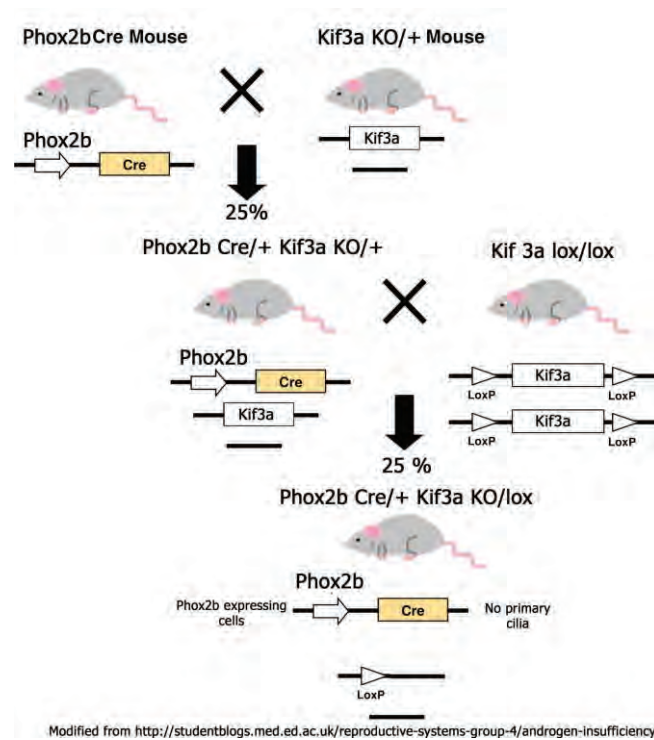


Fig.1. Crossings performed.

First of all, we studied the presence of primary cilia in intestine, performing immunofluorescence experiments for different primary cilia markers (acetylated tubulin - 611B-, polyglutaminated tubulin -GT335- and Arl13b) (Fig. 2). As Arl13b was the most specific and the most sensitive marker, it was used as a primary cilia marker in following experiments.

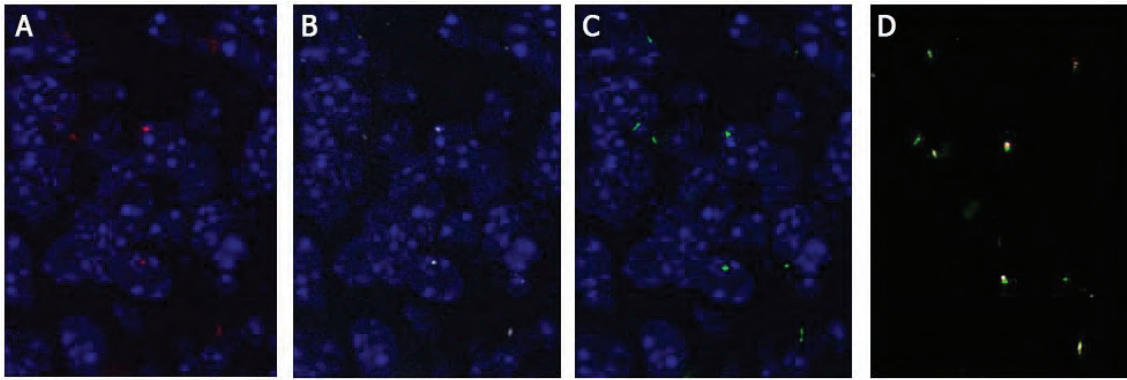


Fig. 2. Primary cilia markers in intestine samples. A) Acetylated tubulin (red), B) polyglutaminated tubulin (white) and C) Arlb13b (green). D is the composite of the three markers.

We only got one Cre-Phox2b, Kif3a loxP mouse from the litter. Transgenic and control guts were dissected and ileon and colon were differentially processed in cryostat blocks and studied. Serial sections were used for immunofluorescence experiments. In the ileon, Phox2b+ cells showed primary cilia in wildtype mouse (**Fig. 3**) while they specifically lacked primary cilia in the transgenic one (**Fig. 4**). The same was detected in colon sections (**Fig. 5**). Quantitative analyses were performed (**Fig. 6**).

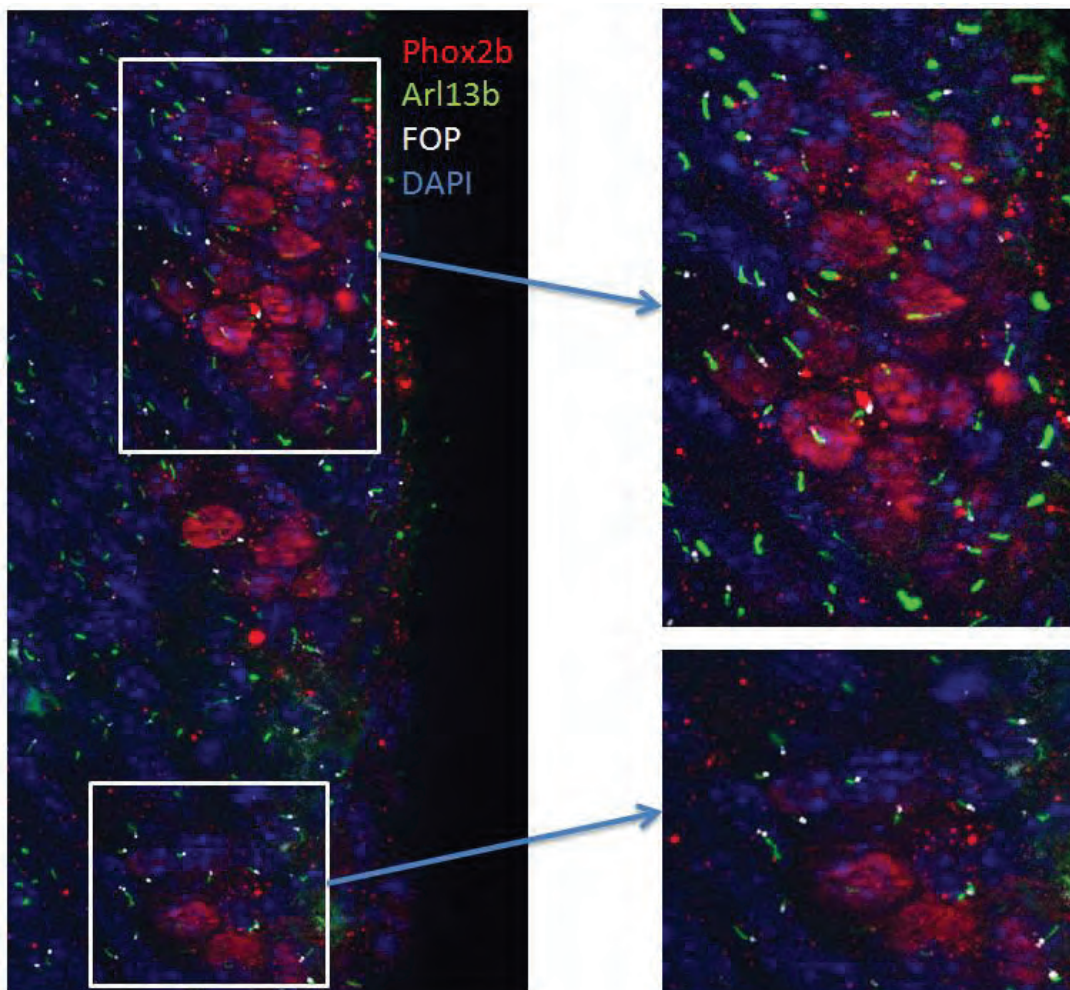


Fig. 3. Phox2b+ cells showed primary cilia in wt ileon. FOP is a specific marker for centrioles and cilia basal body.

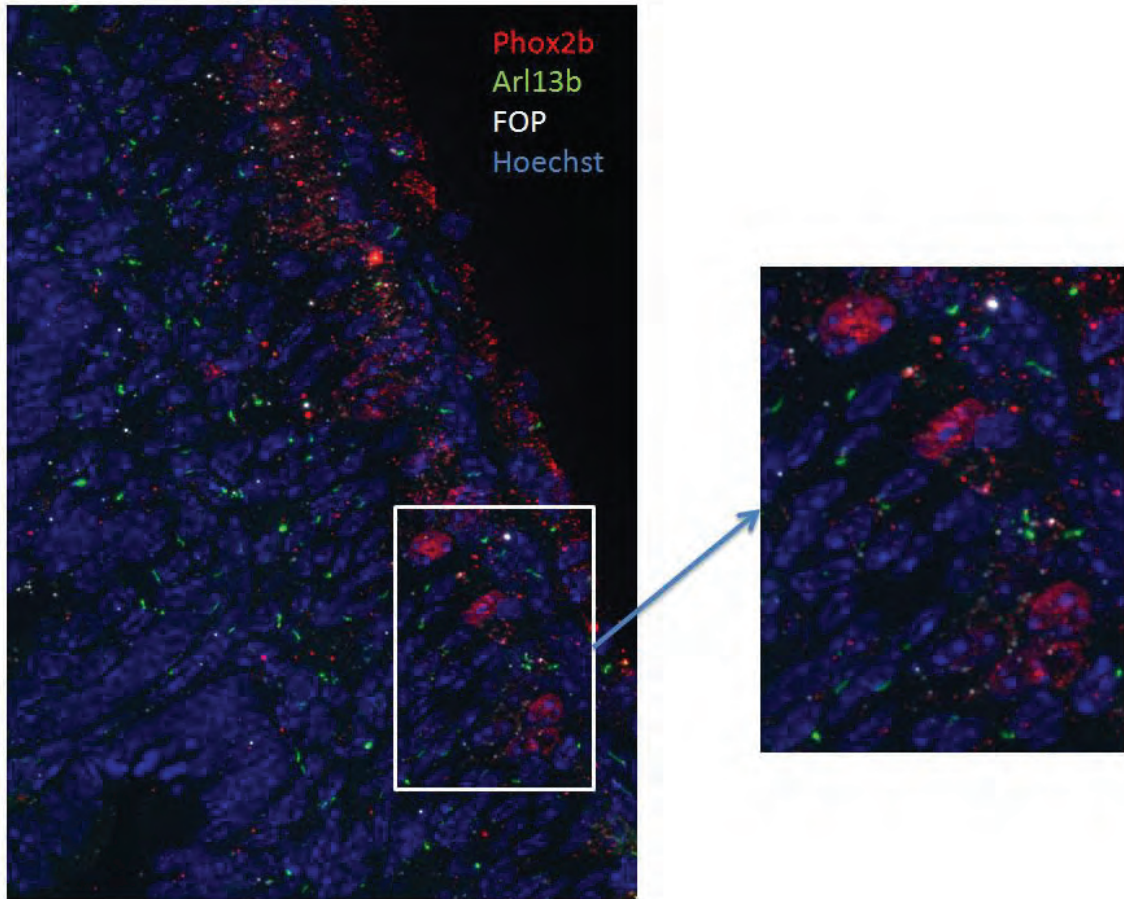


Fig. 4. *Phox2b*⁺ cells lacked primary cilia in mutant ileon.

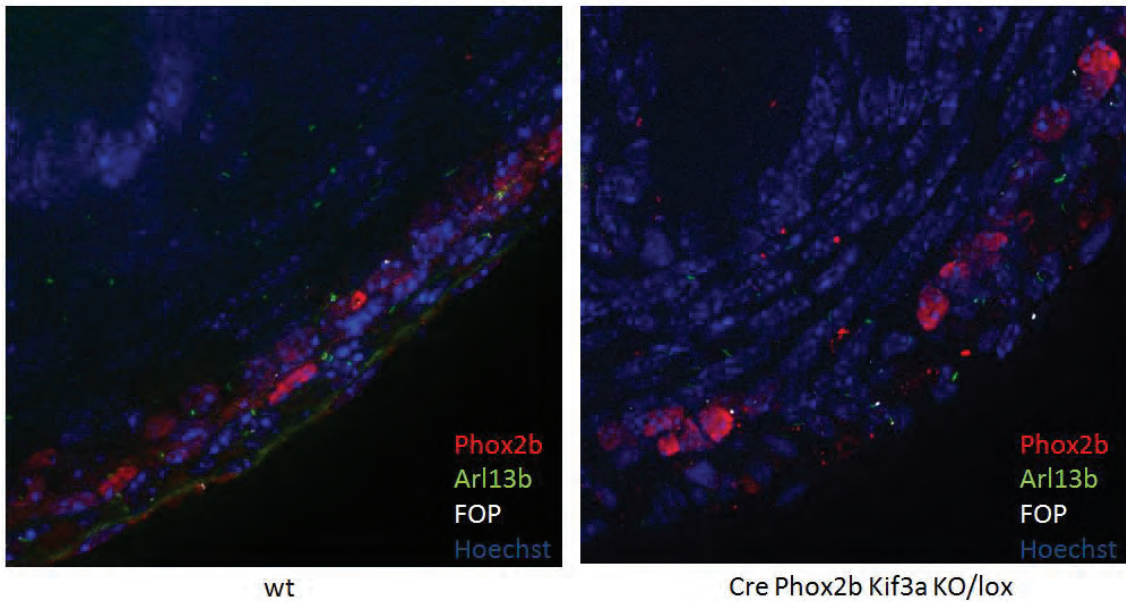


Fig. 5. *Phox2b*⁺ cells express primary cilia in wt colon but not in the transgenic colon

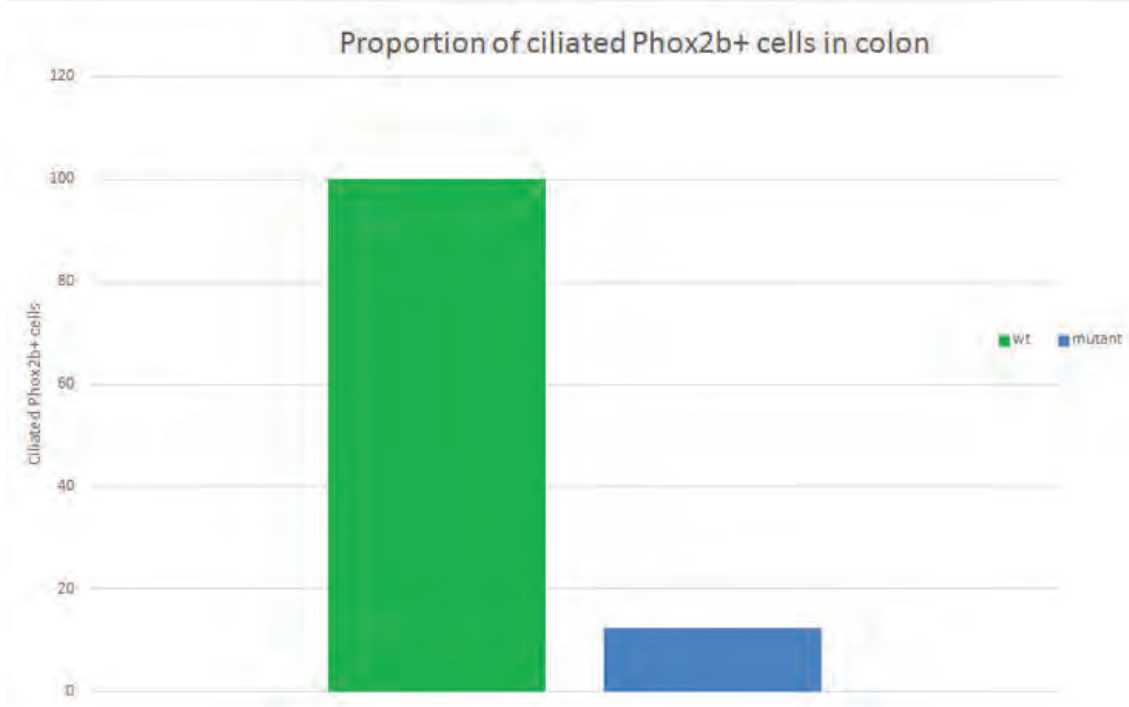
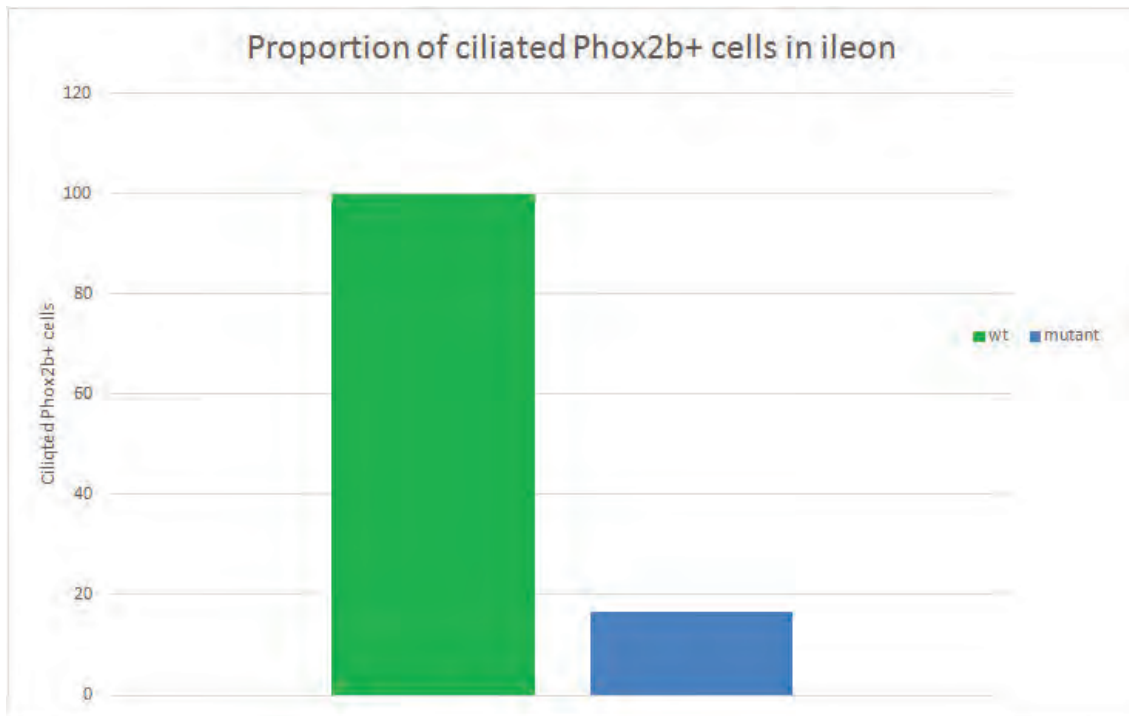


Fig. 6. Proportion of ciliated *Phox2b*⁺ cells in wt (green) and mutant (blue) mice. The presence of few ciliated *Phox2b*⁺ cells in mutants could be explain by counting imprecision more than the actual presence of primary cilia in mutant ENS cells. It has to been considered that *Phox2b* is a nuclear marker and the exact relation between cilia and nuclei is not always easy to determine.

These results were supported by Transmission Electron Microscopy (TEM), performed in the Faculty of Medicine of Zaragoza (Spain). Early-formed ganglia were composed by neuron-like (characterized by voluminous nuclei and prominent peripheral nucleolus) and glial-like cells (smaller and with no prominent nucleolus but a condensed peripheral heterochromatin) surrounded by interstitial cells of Cajal and some mitotic figures (Fig. 7). Normal primary cilia were found in neural cells (Fig. 8).

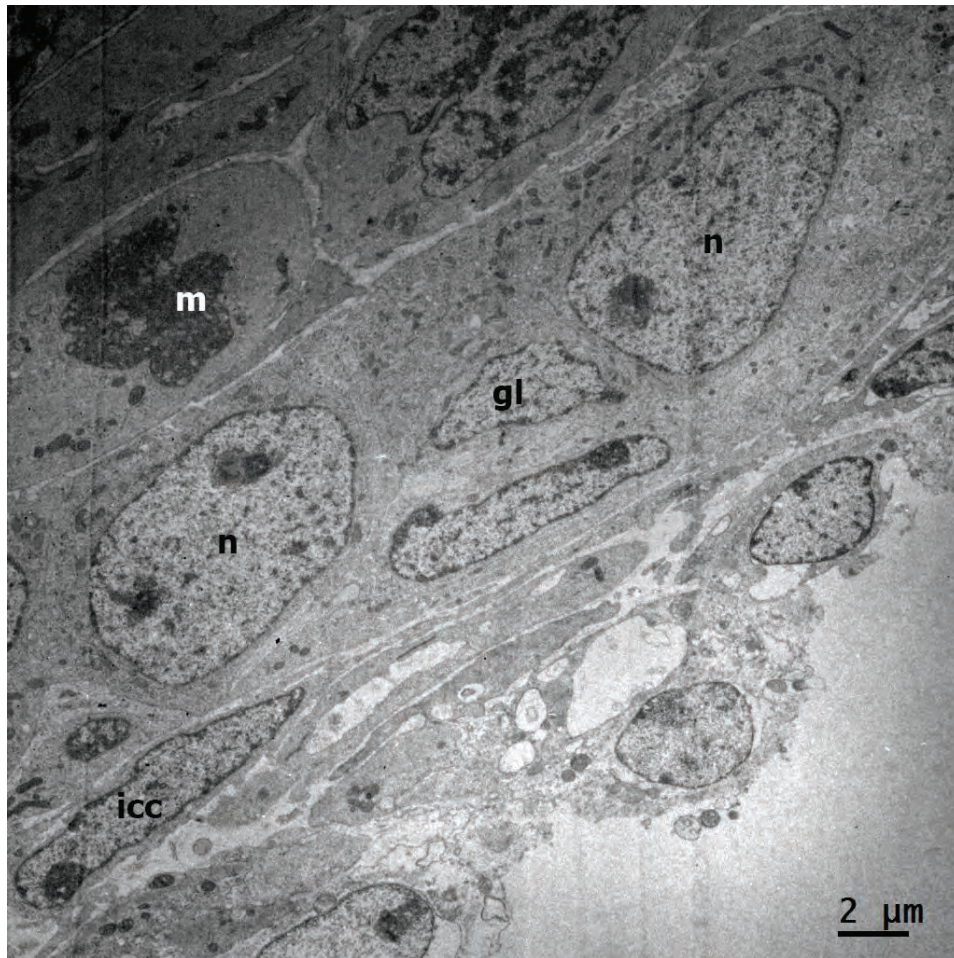


Fig. 7. Enteric ganglia composed by few neurons (n) and glial cells (gl) surrounded by interstitial Cells of Cajal (icc) and mitotic figures (m).

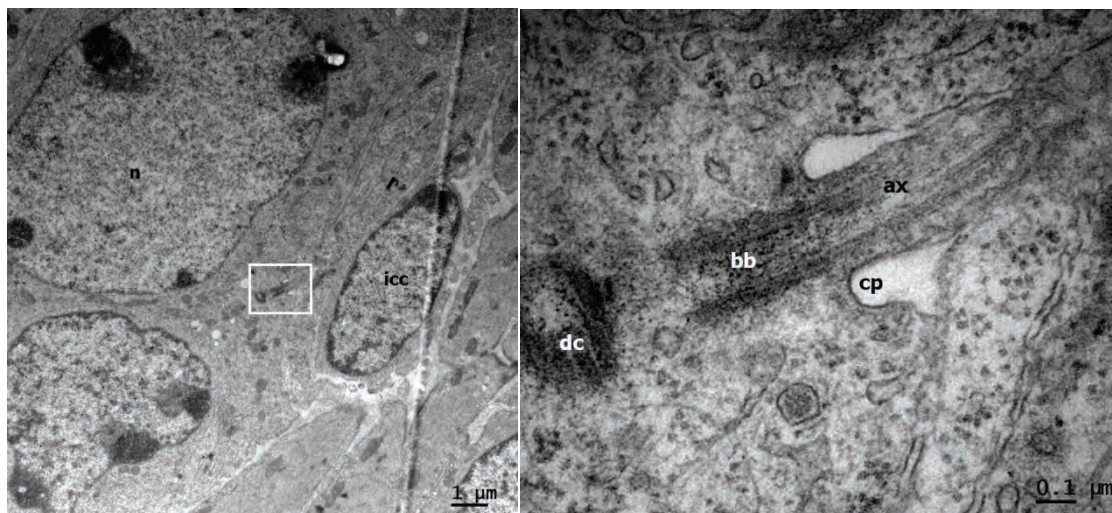


Fig. 8. Neural enteric cells express primary cilia. Some neurons (n) showed primary cilia (square magnified at right). Primary cilia were structurally normal, formed of basal body (bb) and an axoneme (ax) protruding outside the cell membrane, generating a membrane depression around the axoneme called ciliary pocket (cp). Icc = Interstitial cell of Cajal. Cp = ciliary pocket.

On the other hand, TEM study of mutant mice showed similar ganglia although they express altered primary cilia (**Fig. 9**). According to the role of Kif3a, essential for intraflagellar transport and consequently, for the correct axoneme assembly; aberrant cilia appeared. Thus, we were able to identify basal bodies anchored to cell membrane without any axoneme protruding and vesicles accumulating on top of basal body (**Fig. 10**).

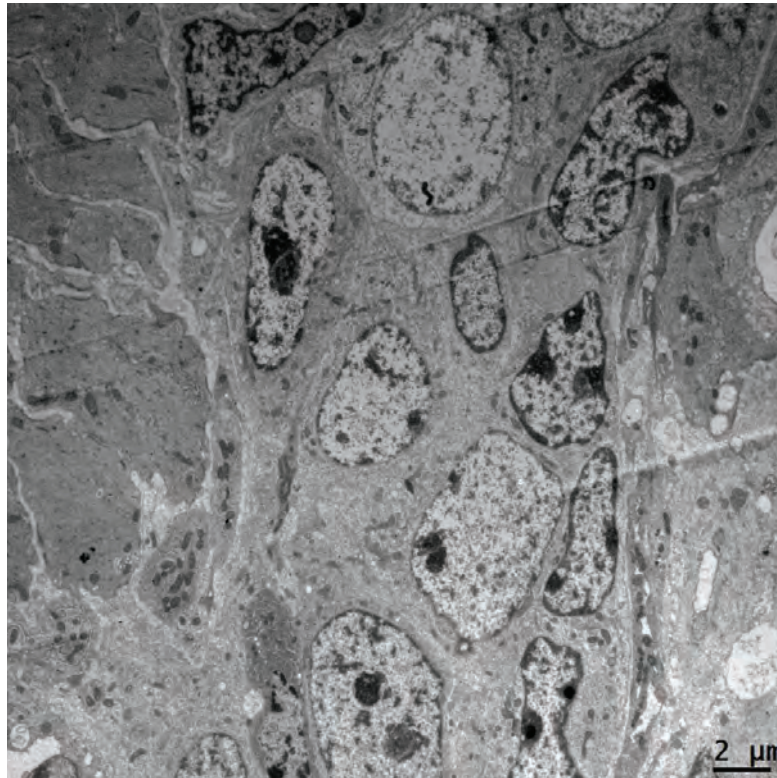


Fig. 9. Enteric ganglia of Phox2b Cre Kif3a KO/lox P mouse.

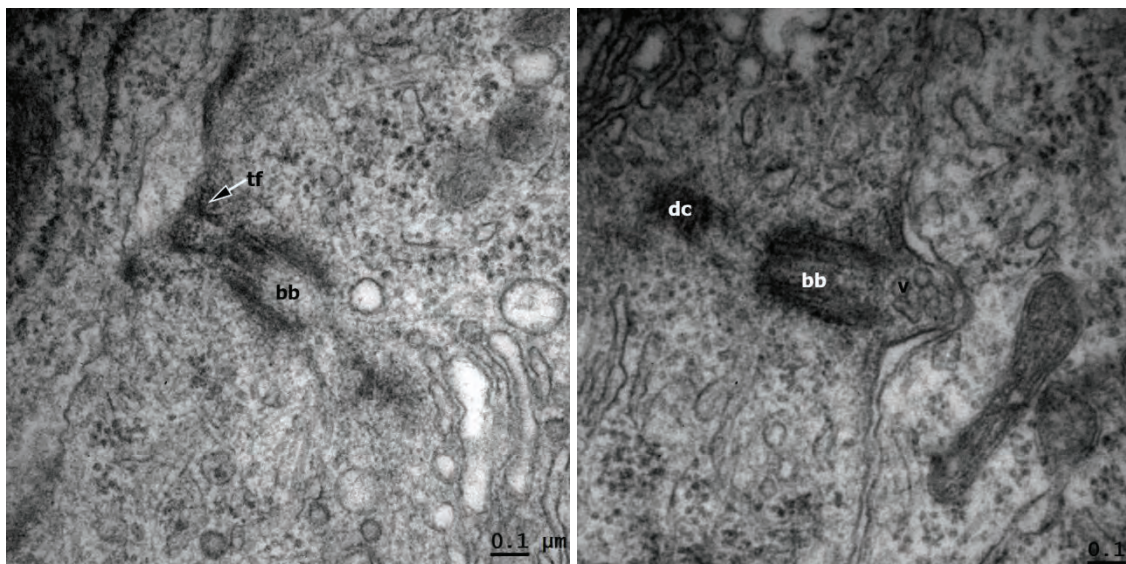


Fig. 10. Aberrant primary cilia in mutant neural cells. Altered cilia appeared as result of ciliogenesis impairment. We found basal bodies (bb) anchored to cell membrane by transition fibers (tf) with no axoneme and vesicles (v) accumulating on top of basal bodies. Dc = daughter centriole.

Then, we compared the number of Phox2b+ cells in wt and mutant. A decreased number of Phox2b+ cells were found in mutant samples (**Fig. 11 and 12**). Interestingly, the lost of Phox2b+ cells in colon was even more drastic (around 45% of Phox2b+ cells) than in ileon (20%). (**Fig. 13**).

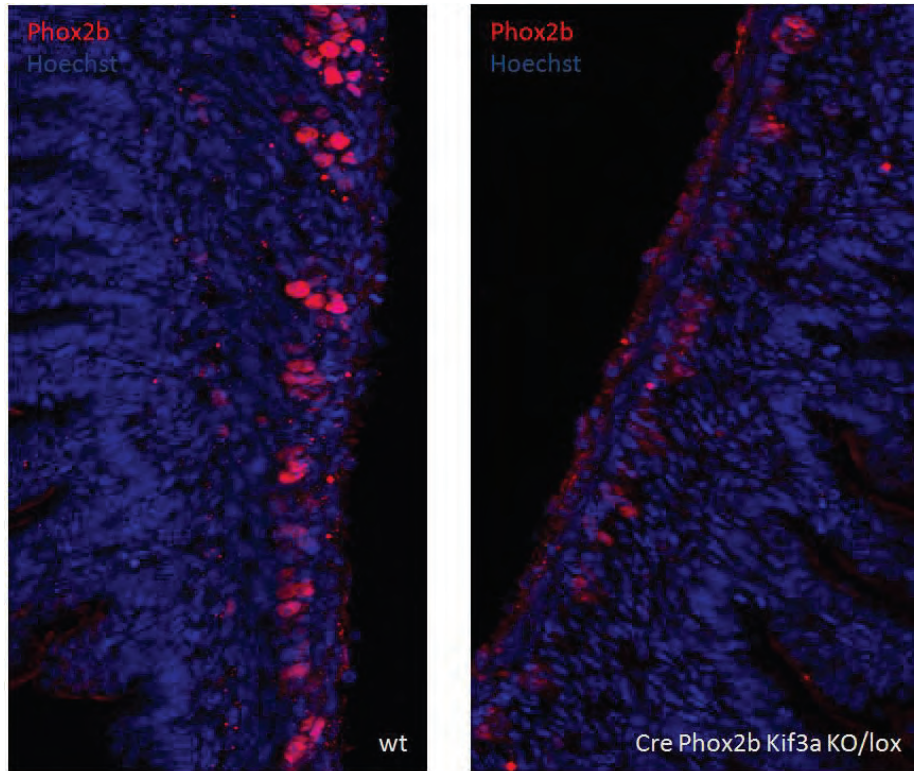


Fig. 11. Phox2b+ cells in ileon.

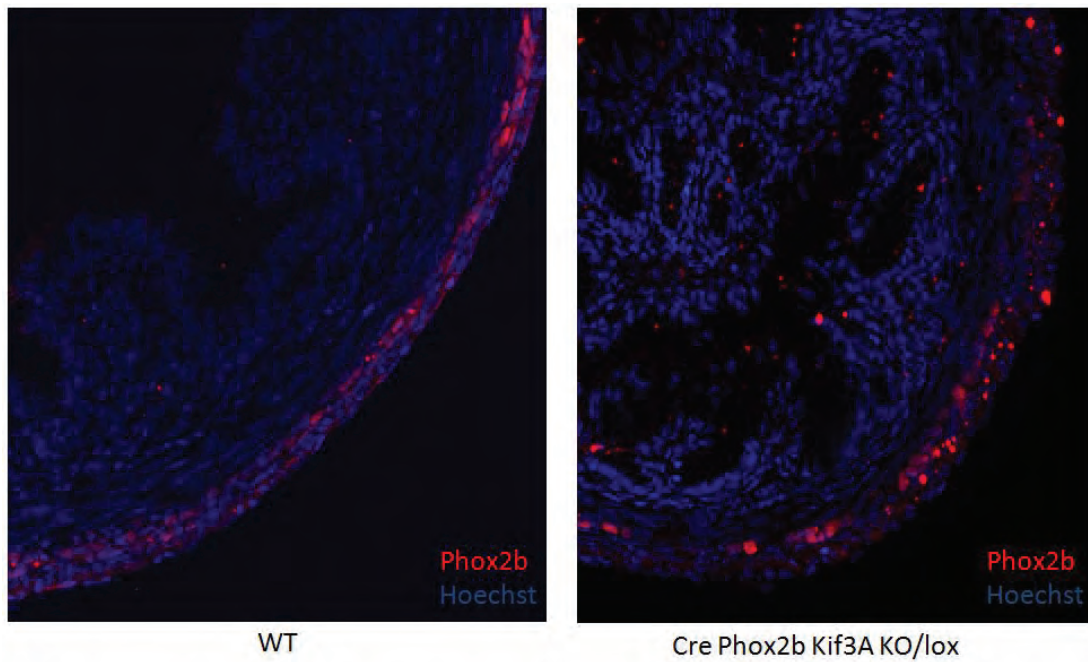


Fig. 12. Phox2b+ cells in colon.

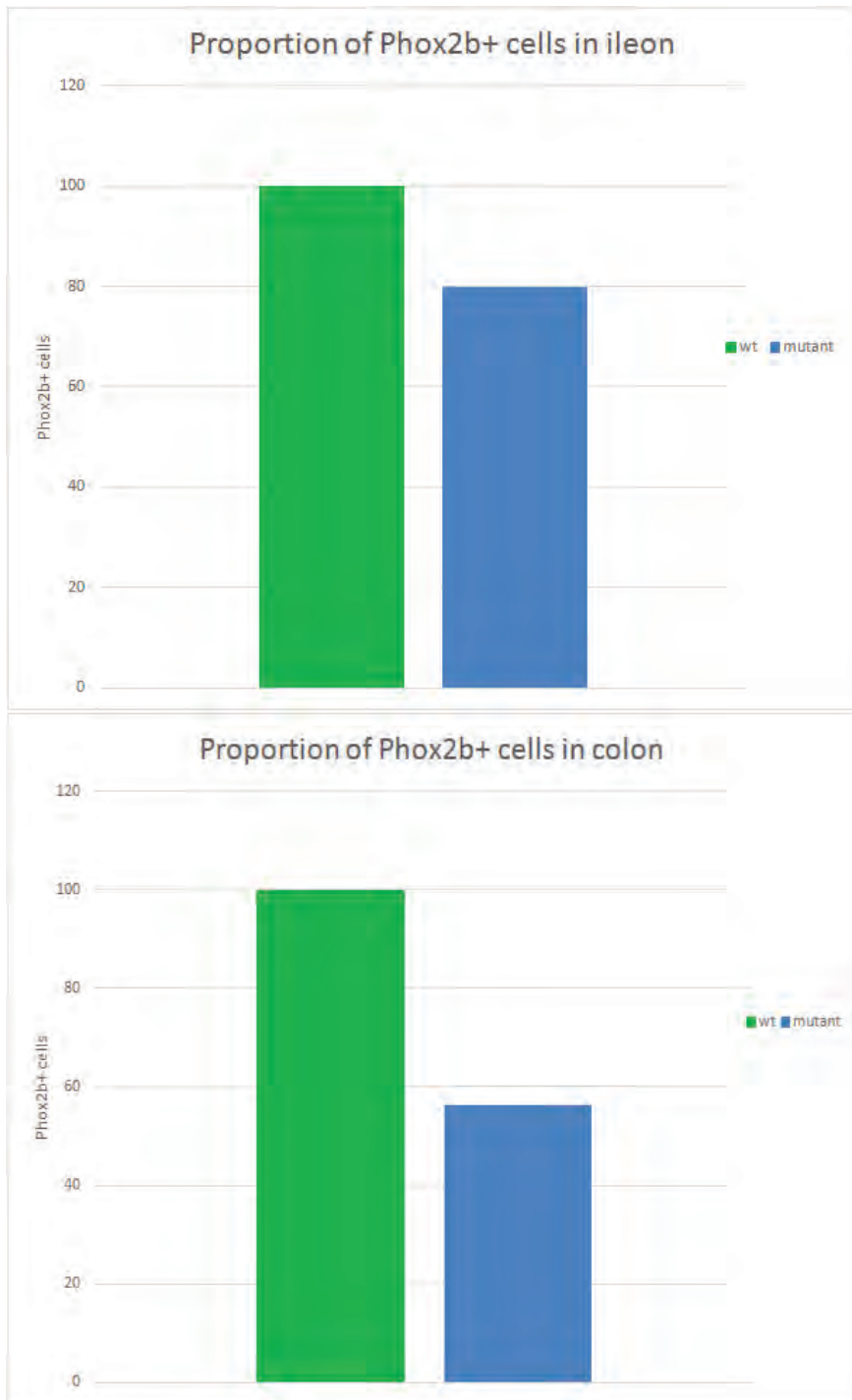


Fig. 13. Proportion of Phox2b+ in wt and transgenic samples. A loss of 20% of Phox2b+ cells was found in ileon while it reaches the 45% in colon.

Thinking about how primary cilia could affect ENS development (especially in distal areas), we considered four reasons: an increment of apoptosis or differentiation (as differentiated neurons has a reduced migration) or a fall of proliferation or migration.

We tried to study the presence of a decreased proliferation by immunofluorescence co-localization of Ki67 (a marker of cell cycle activation) and Phox2b. We found few cells Phox2b+ Ki67+ (Figs. 14 and 15) and, an apparent light decrease of the proportion of Ki67+ Phox2b+ in transgenic mice regarding controls (Fig. 16).

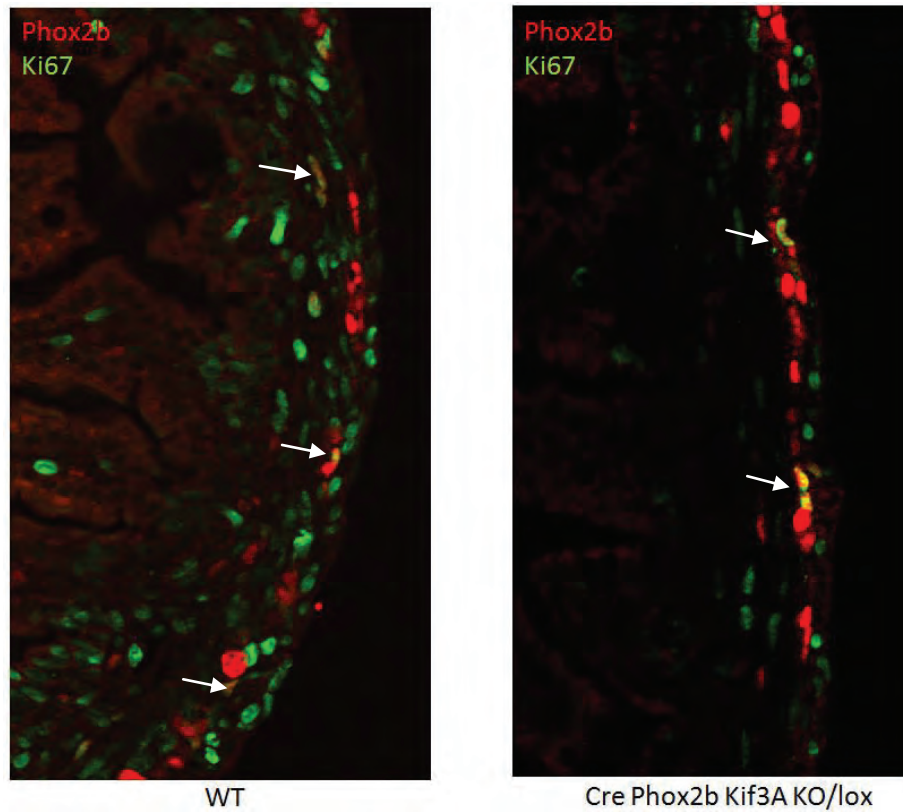


Fig. 14. Ki67 and Phox2b co-localization in ileon.

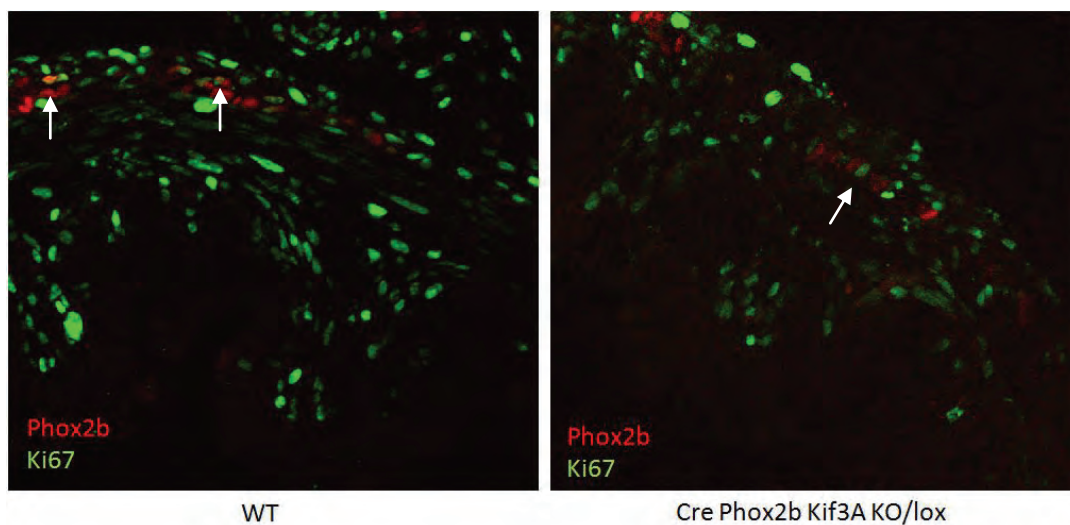


Fig. 15. Ki67 and Phox2b co-localization in colon.

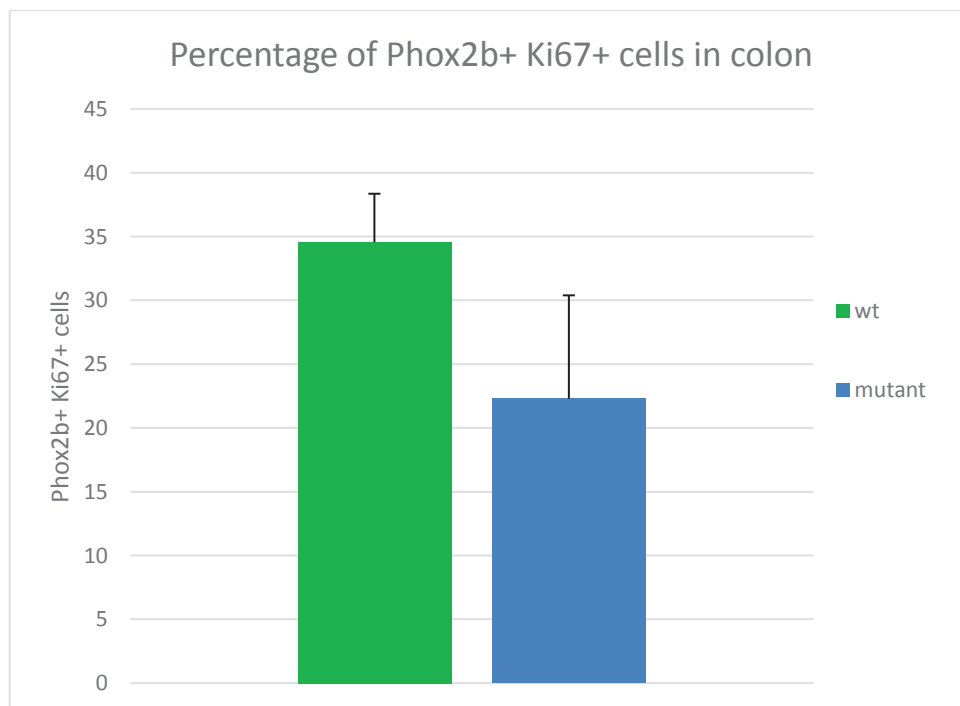
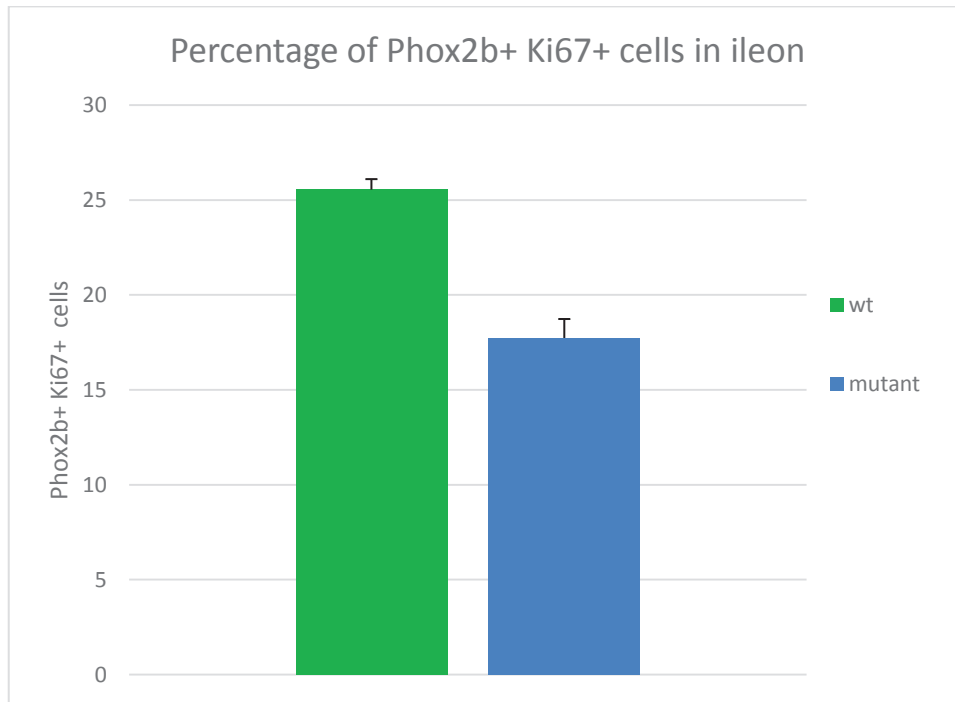


Fig. 16. Percentage of Phox2b+ cells expressing Ki67

Conclusions:

- Phox2b+ cells express primary cilia.
- Phox2b Cre Kif3a KO/Lox mice lack primary cilia in Phox2b+ cells.
- Primary cilia ablation reduced the number of Phox2b+ cells, especially in distal areas.
- There is a reduction in the number of Phox2b+/Ki67+ cells showing a reduced proliferation rate.

BIBLIOGRAPHY

1. Junquera C, Martínez-ciriano C, Castiella T (2007) Immunohistochemical and ultrastructural characteristics of interstitial cells of Cajal in the rabbit duodenum . Presence of a single cilium. 11:776–787. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2007.00064.x>
2. Junquera C, Cantarero I, Luesma MJ, et al (2011) The primary cilium: A relevant characteristic in interstitial cells of rat duodenum enteric plexus. *Histol Histopathol* 26:461–470
3. Luesma MJ, Cantarero I, Jose M, Verdugo MG (2013) Enteric neurons show a primary cilium. 17:147–153. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2012.01657>
4. Spassky N, Han Y-G, Aguilar A, et al (2008) Primary cilia are required for cerebellar development and Shh-dependent expansion of progenitor pool. *Dev Biol* 317:246–259. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.02.026>
5. Han Y-G, Spassky N, Romaguera-Ros M, et al (2008) Hedgehog signaling and primary cilia are required for the formation of adult neural stem cells. *Nat Neurosci* 11:277–284. <https://doi.org/10.1038/nn2059>
6. Youn YH, Han YG (2018) Primary Cilia in Brain Development and Diseases. *Am J Pathol* 188:11–22. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.08.031>
7. Pattyn A, Morin X, Cremer H, et al (1999) The homeobox gene *Phox2b* is essential for the development of autonomic neural crest derivatives. *Nature* 399:366–370. <https://doi.org/10.1038/20700>

Histology and Histopathology

From Cell Biology to Tissue Engineering

Volume 34 (Supplement 9, 2019)

<http://www.hh.um.es>

**XX CONGRESO DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE HISTOLOGÍA E
INGENIERÍA TISULAR**

**VIII INTERNATIONAL CONGRESS OF HISTOLOGY AND TISSUE
ENGINEERING**

VI CONGRESO IBEROAMERICANO DE HISTOLOGÍA

September 4-6, 2019, Murcia, Spain

Congreso
SEHIT2019
4-6 septiembre · Murcia



Organizan:

Patrocina:

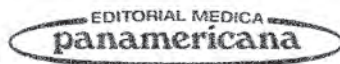


SeNeCa

Apoya:



Colaboran:



Index

Plenary Conferences	S1
<i>Opening Congerence</i>	S3
<i>Plenary Conference</i>	S4
<i>Closing Conference</i>	S5
Symposium	S7
<i>Histology Applied to Experimental Pathology</i>	S9
<i>Histology and Animal Reproduction</i>	S15
<i>Histology and Aging</i>	S21
<i>Histology in Regenerative Medicine and Tissue Engineering</i>	S27
<i>Innovation in Histology Teaching</i>	S33
Oral Presentations	S39
<i>Session 1 (Thursday 12-14 h)</i>	S41
Room A	S43
Room B	S49
Room C	S57
Room D	S64
<i>Session 2 (Thursday 18-19 h)</i>	S69
Room A	S71
Room B	S74
Room C	S77
Room D	S81
<i>Session 3 (Friday 16-18 h)</i>	S85
Room A	S87
Room B	S92
Room C	S99
Room D	S105
Poster Presentations	S113
<i>Session 1 (Thursday)</i>	S115
Tissue Biology	S117
Histology of Organs and Systems	S129
Histopathology	S144
Teaching	S176
Tissue Engineering	S177
<i>Session 2 (Friday)</i>	S179
Teaching	S181
Comparative Histology	S192
Plant Histology	S198
Tissue Engineering	S203
Techniques	S236
Tissue Biology	S241

Primary cilia and spherosomes biogenesis in low grade glioma

Iruzubieta P.¹, Castiella T.², Monzón M.¹, Monleon E.¹, Berga C.¹, Gracia-Llanes J.¹ and Junquera C.¹

¹Departamento de Anatomía e Histología Humanas, Universidad de Zaragoza, España, ²Departamento de Anatomía Patológica, Medicina Legal y Forense y Toxicología, Universidad de Zaragoza, España.

Primary cilium is a microtubule-based subcellular structure that protrudes out of the cell and plays different roles in cellular processes, including cell cycle, cytoskeleton regulation, signaling pathways or autophagy (Malicki et al. 2016). Normal astrocytes show primary cilium and they have been related to cell proliferation and differentiation (Sterpka et al. 2018). Even more, primary cilia have been found in several tumours, included brain tumours such as glioblastoma and medulloblastoma (Moser et al. 2014, Han et al. 2009).

On the other hand, spherosomes represent a new type of production of extracellular vesicles that may play a fundamental role in tumorogenesis (Junquera et al. 2016). Here we described for the first time primary cilia and spherosomes in low grade glioma.

Histological, immunohistochemical, immunofluorescence and ultrastructural techniques were performed in a case of diagnosed low grade glioma provided by the Pathology Department of Hospital Clínico Lozano Blesa.

Conventional H&E study showed an increased number of fusiform cells with a predominant fibrillar component, few mitosis and important vascularization with normal endothelial cells. These findings support the diagnosis of low grade glioma (likely a diffuse astrocytoma, WHO grade II), GFAP staining confirms the astrocytic nature of tumoral tissue. Electron microscope showed abundant gliofilaments and aberrant accumulation, acquiring a characteristic concentric disposition. Primary cilia were found in low grade glioma using immunofluorescence and ultrastructural experiments. Furthermore, electron microscope analyses allow us to track the ciliogenesis process through tumoral cells. First of all, activation of one of the centrioles (the so-called mother centriole) occurs. Activation can be detected by the formation of subdistal appendages, cargo traffic into the centriole and Golgi-derived vesicles accumulating near the distal pole. These vesicles fuse in a big ciliary vesicle (which will form the ciliary membrane) anchored to the mother centriole by transition fibers. Then, 9+0 primary cilia axoneme starts to grow protruding in the ciliary vesicle. Finally, ciliary vesicle binds the plasma membrane and the full-length axoneme is exposed to the extracellular medium. Sometimes, aberrant cilia were found, showing alterations in structural components such as the ciliary pocket or the axonemal microtubules. Spherosomes were also detected in relation to tumoral cells. Thus, multivesicular spheres originating from evagination of cellular membrane were showed. These multivesicular spheres fill up with spherosomes and are released to the extracellular medium by strangling plasmatic membrane.

Our ultrastructural and immunofluorescence experiments show that low grade gliomas present primary cilia and secrete spheromas. Regarding these results, an increased number of spherosomes have been detected in low grade GIST compared to high grade (Junquera et al. 2016), suggesting that this structure may play an important role in early steps of tumorogenesis.

Authors would like to acknowledge the use of Servicio General de Apoyo a la Investigación-SAI, University of Zaragoza. This research received financial support from Diputación General de Aragón (DGA, T23_17R).

PRIMARY CILIA AND SPHEROSOMES BIOGENESIS IN LOW GRADE GLIOMA

Iruzubieta P¹, Castiella T², Monzón M¹, Monleon E¹, Berga C¹, Gracia-Llanes J¹, Junquera C¹

¹ Departamento de Anatomía e Histología Humanas, Universidad de Zaragoza, España

² Departamento de Anatomía Patológica, Medicina Legal y Forense y Toxicología, Universidad de Zaragoza, España.



SEHIT 2019 MURCIA

LA ASOCIACIÓN DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE HISTOLOGÍA Y ANATOMÍA HUMANA
HA ORGANIZADO EL CONGRESO DE HISTOLOGÍA Y ANATOMÍA HUMANA
EN COLABORACIÓN CON EL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA DE MURCIA



Universidad Zaragoza

INTRODUCTION

Primary cilium is a microtubule-based subcellular structure that protrudes out of the cell and plays different roles in cellular processes, including cell cycle, cytoskeleton regulation, signaling pathways or autophagy (Malicki et al. 2016). Normal astrocytes show primary cilium and they have been related to cell proliferation and differentiation (Sterpka et al. 2018). Even more, primary cilia have been found in several tumours, included brain tumours such as glioblastoma and medulloblastoma (Moser et al. 2014, Han et al. 2009).

On the other hand, spherosomes represent a new type of production of extracellular vesicles that may play a fundamental role in tumorigenesis (Junquera et al. 2016).

Here we described for the first time primary cilia and spherosomes in low grade glioma.

MATERIAL AND METHODS

Historical, immunohistochemical, immunofluorescence and ultrastructural techniques were performed in a case of diagnosed low grade glioma provided by the Pathology Department of Hospital Clínico Lozano Blesa from Zaragoza.

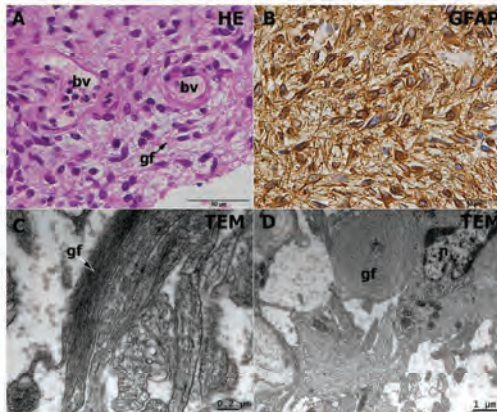


Fig. 1. General histological, immunohistochemical and ultrastructural study of a low grade glioma. 1A: increased cellularity with predominant gliofibrillar (gf) component. Blood vessels (bv) show non-hyperplastic endothelial cells. 1B: Positive staining for GFAP. Electronmicroscopy showed abundant gliofibrils (gf), sometimes acquiring a characteristic concentric shape (1D). n=nucleus.

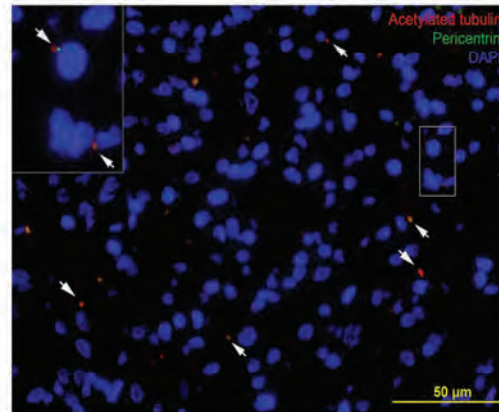


Fig. 2. Primary cilia presence by immunofluorescence. Acetylated tubulin (red) is a marker of cilia axoneme while pericentrin (green) is present in centrioles (including basal bodies). Colocalization of both markers show clearly the presence of primary cilia. Sometimes, staining can appear overlapped (yellow) due to oblique cuts of primary cilia.

RESULTS

Conventional H&E study (Fig. 1A) showed an increased number of fusiform cells with a predominant fibrillar component, few mitosis and important vascularization with normal endothelial cells. These findings support the diagnosis of low grade glioma. GFAP staining (Fig. 1B) confirms the astrocytic nature of tumoral tissue. Electron microscope showed abundant gliofibrils (Fig. 1C) and aberrant accumulation, acquiring a characteristic concentric disposition (Fig. 1D). Primary cilia were found in low grade glioma using immunofluorescence (Fig. 2) and ultrastructural experiments (Fig. 3). Furthermore, electron microscope analyses allow us to track the ciliogenesis process through tumoral cells (Fig. 3). Sometimes, aberrant cilia were found, showing alterations in structural components such as the ciliary pocket or the axonemal microtubules (Fig. 4).

Spherosomes were also detected in relation to tumoral cells (Fig. 5). Thus, multivesicular spheres originating from evagination of cellular membrane were showed (Fig. 5A). These multivesicular spheres fill up with spherosomes (Fig. 5B) and are released to the extracellular medium by strangling plasmatic membrane (Fig. 5C-D).

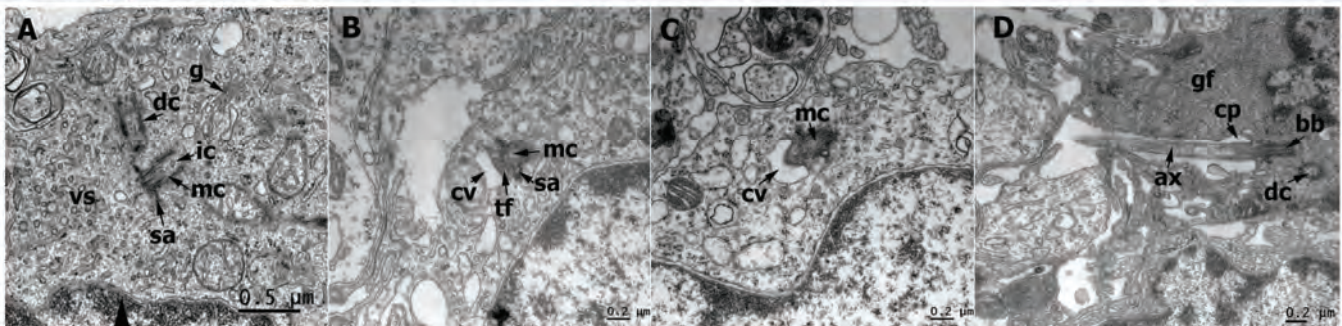


Fig. 3. Primary ciliogenesis. 3A: activated mother centriole (mc) showing subdistal appendages (sa), intracentriolar cargo (ic) and abundant vesicles (vs) in the distal pole probably originated in Golgi dictyosomes (g). dc = daughter centriole. 3B: vesicles fuse and form the ciliary vesicle (cv) anchored to mother centriole (mc) by transition fibers (tf). 3C: axoneme starts to grow protruding in the ciliary vesicle (cv). 3D: once the ciliary vesicle binds the plasmatic membrane, cilia axoneme projects to extracellular medium. cp = ciliary pocket, dc=daughter centriole, gf = gliofibrils.

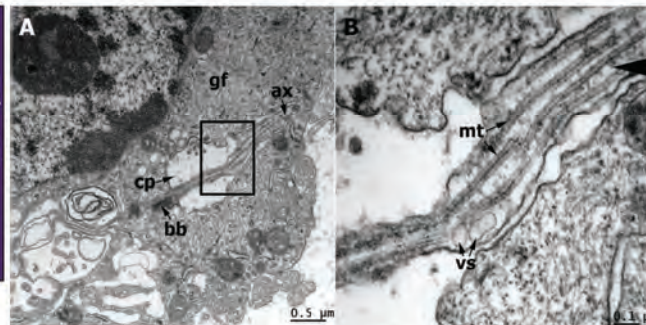


Fig. 4. Aberrant cilia. Some primary cilia showed structural alterations. Thus, ciliary pocket (cp) can be found dilated and an unstructured axoneme (ax). 4B is a magnification of the squared area in 4A. bb = basal body, gf = gliofibrils, mt = microtubules, vs = vesicles.

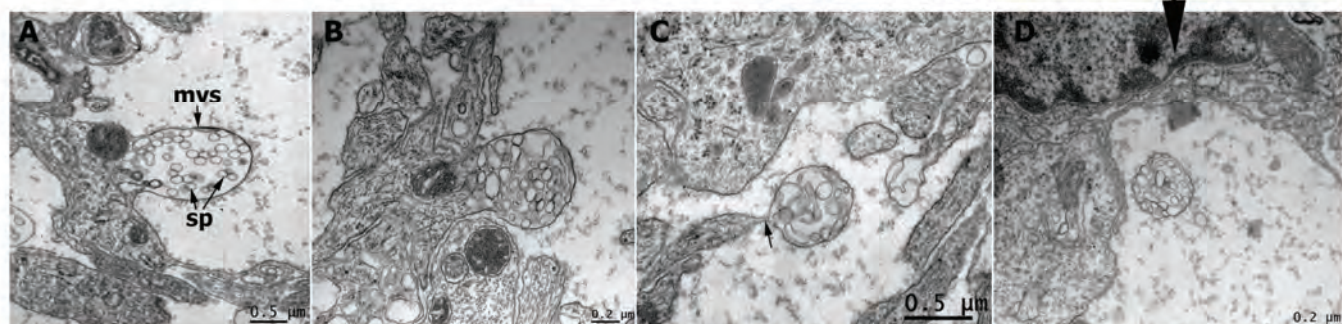


Fig. 5. Spherosome biogenesis. 5A: a membrane evagination originates the multivesicular sphere (mvs) that starts to fill up with spherosomes (sp) until the multivesicular sphere is plenty (5B). Then the cell release the mvs by strangling the plasmatic membrane (arrow in 5C). Finally spherosomes are released to the extracellular medium (5D).

CONCLUSION

Our ultrastructural and immunofluorescence experiments show that low grade gliomas present primary cilia and secrete spherosomes. Regarding these results, an increased number of spherosomes have been detected in low grade GIST compared to high grade (Junquera et al. 2016), suggesting that this structure may play an important role in early steps of tumorigenesis.

ACKNOWLEDGEMENTS AND FUNDING

Authors would like to acknowledge the use of Servicio General de Apoyo a la Investigación-SAI, University of Zaragoza. This research received financial support from Dirección General de Aragón (DGA, T23_17R).

ANEXO 4. CARTA DE ACEPTACIÓN DEL TRABAJO PENDIENTE DE PUBLICACIÓN

From: paolo.bianchini@iit.it
To: pablo.iruzubieta@hotmail.es
Subject: Microscopy Research and Technique - Decision on Manuscript ID MRT-21-195.R1
Body: 29-Aug-2021

Dear Mr. Iruzubieta,

We recognise that the impact of the COVID-19 pandemic may affect your ability to return your revised manuscript to us within the requested timeframe. If this is the case, please let us know.

Manuscript ID MRT-21-195.R1 entitled "STROMAL CELLS OF GIANT CELL TUMOUR OF BONE SHOW PRIMARY CILIA" which you submitted to Microscopy Research and Technique, has been reviewed. The comments of the referee(s) are included at the bottom of this letter.

The referee(s) have recommended publication, but also suggest some minor revisions to your manuscript. Moreover, please correct and improve the English.

Thank you for submitting your manuscript to Microscopy Research and Technique. I look forward to receiving your revision.

Sincerely,
Dr. Paolo Bianchini
Review Editor, Microscopy Research and Technique
paolo.bianchini@iit.it

ANEXO 5. FACTOR DE IMPACTO DE LAS PUBLICACIONES QUE COMPONEN ESTA TESIS Y ÁREAS TEMÁTICAS.

1) Article: Supporting evidence of human ENS adult neurogenesis: presence of primary cilia and adult neurogenesis markers.

Journal: Cellular and Molecular Neurobiology. 2020. FI 5,046. Q2 Neurosciences, Q2 Cell Biology (2020)

2) Article: Hedgehog signalling pathway activation in Gastrointestinal Stromal Tumours is mediated by primary cilia

Journal: Gastric Cancer. 2020. FI 7,37 Q1 Oncology, Q1 Gastroenterology & Hepatology (2020).

3) Article: Stromal cells of giant cell tumor of bone show primary cilia.

Journal: Microscopy Research and Technique. 2021. FI 2,769 Q1 Anatomy & Histology, Q2 Microscopy, Q2 Biology (2020).

4) Article: Primary cilia presence and implications in bladder cancer progression and invasiveness.

Journal: Histochemistry and Cell Biology. 2021. FI 4,304. Q1 Microscopy, Q3 Cell Biology (2020)

El doctorando ha participado activamente en todos estos trabajos, realizando una parte importante de la actividad experimental (basadas en técnicas de inmunohistoquímica, inmunofluorescencia y microscopía electrónica) y también de los procesos de organización, redacción y publicación de los artículos.

