



Universidad
Zaragoza

CILIO PRIMARIO Y CÁNCER



Alumna: Ana Gómez Martínez
Tutora: Concepción Junquera Escribano
6º Medicina - TFG

*DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA E HISTOLOGÍA HUMANAS.
FACULTAD DE MEDICINA.
UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA.*

TRABAJO FIN DE GRADO

CILIO PRIMARIO Y CÁNCER

**Ana Gómez Martínez
Zaragoza, 2015.**

ABSTRACT

The primary cilium is a non-motile organelle whose axoneme is made of nine peripheral doublets of microtubules (9+0). Primary cilia (PC) are found in many differentiated cells, it acts as sensory cellular antennae that could co-ordinate some cellular signalling pathways. The finding that PC is linked to cell cycle regulation has led to suggestion that it may play a role in tumor formation. Hedgehog can promote cell proliferation, and excessive signaling can lead to cancer. We investigated PC in two different model of tumors, with mesenchymal (gastrointestinal stromal tumor, GIST) and epithelial (vesical urothelial carcinoma) origins, using multiple cancer biopsies. They were processed following standard TEM protocol. All samples were provided by the Hospital Clínico Lozano Blesa from Zaragoza. In bladder carcinoma, tumoral cells presenting PC located just on top of basal lamina. The beginning of the ciliogenesis is observed in some epithelial cells where centrioles have moved and lost their typical perpendicular layout. The cilium appears to grow within the cell body. The axoneme lacks the central pair of microtubules and extends to the outer surface of the membrane in a short length (100 - 200 nm), making really difficult to locate this nanostructure. On the other hand, a high percentage of tumoral cells from GISTs present PC (1 - 2 μ m length) projected into the extracellular space and emerged close to nucleus. The axoneme is a direct extension of a typical basal body. In conclusion, while cilia have been reported to be absent in most cancers to date, many tumors harboring primary cilia are now being found. Currently, new lines of research have been developed to investigate the role of primary cilia.

Keywords: primary cilia, Hedgehog, bladder carcinoma, gastric gastrointestinal stromal tumors, ultrastructure.

RESUMEN

El cilio primario es una organela no móvil formada por un axonema constituido por nueve dobletes de microtúbulos periféricos con estructura 9+0. El cilio primario (CP) se encuentra en células diferenciadas, actúa como antena celular sensorial coordinando vías de señalización celular. El hallazgo de que el CP esté relacionado con la regulación del ciclo celular sugiere que éste pueda participar en la formación de tumores. La vía Hedgehog puede promover la proliferación celular y su excesiva señalización puede conducir al cáncer. Investigamos el CP en dos tumores diferentes, uno de origen mesenquimal (tumor del estroma gastrointestinal, GIST) y otro de origen epitelial (carcinoma urotelial de vejiga), usando múltiples muestras de biopsias. Fueron procesadas mediante protocolos estándar de microscopía electrónica de transmisión. Todas las muestras fueron proporcionadas por el Hospital Clínico Lozano Blesa de Zaragoza. En el carcinoma de vejiga, las células tumorales que presentan CP están situadas justo en la parte superior de la lámina basal. El comienzo de la ciliogénesis se observa en algunas células epiteliales donde los centríolos se han desplazado y han perdido su disposición perpendicular típica. El cilio aparentemente crece sin cuerpo basal. El axonema carece de par central de microtúbulos y protruye al espacio extracelular con una longitud corta (100-200 nm), siendo realmente difícil localizar esta nanoestructura. Un gran número de células del tumor GIST presentan CP con una longitud de 1 - 2 μ m, proyectan al espacio extracelular y emergen cercanos al núcleo. El axonema es una extensión directa de un cuerpo basal típico. En conclusión, se ha descubierto que numerosos tumores presentan cilio primario. Actualmente, nuevas líneas de investigación han sido desarrolladas para investigar el papel del cilio primario.

Palabras clave: Cilio primario, Hedgehog, carcinoma de vejiga, tumores del estroma gastrointestinal, ultraestructura.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. CILIO PRIMARIO.

1.1.1. Antecedentes e historia.

1.1.2. Estructura del cilio: Cilio motor y cilio primario.

1.1.3. Biogénesis del cilio primario.

1.1.4. Cilio primario y ciclo celular.

1.1.5. Funciones del cilio primario.

1.2. IMPORTANCIA DEL CILIO PRIMARIO EN MEDICINA: Ciliopatías.

1.3. RELACIÓN ENTRE CILIO PRIMARIO Y CÁNCER.

1.3.1. Vías de señalización en las que está implicado el cilio primario: Hedgehog.

1.3.2. Vías de señalización Hedgehog y cáncer.

1.3.3. Carcinomas uroteliales.

1.3.4. Tumores del estroma gastrointestinal (GIST).

2. OBJETIVOS.

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

4. RESULTADOS.

5. DISCUSIÓN.

6. CONCLUSIONES.

7. BIBLIOGRAFÍA.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. CILIO PRIMARIO.

1.1.1. Antecedentes e historia.

El cilio es considerado una organela que comenzó a conocerse en la década de 1950 gracias a la microscopía electrónica. En 1954 Fawcett y Porter consiguieron, tras numerosas observaciones, definir la estructura ciliar. Posteriormente en 1956, De Robertis descubrió que en algunas células, como por ejemplo los fotorreceptores de los mamíferos, existía un tipo de cilio diferente al cilio conocido hasta entonces, carente del doblete de microtúbulos central en el axonema y sin función motora. Sería en la década de 1960 cuando se denominase a esta nueva estructura “cilio primario”. Varios trabajos (Barnes en 1961, Sorokin en 1962, Grillo y Palay en 1963), corroboraron la existencia del cilio primario y localizaron esta organela en diferentes tipos de células en los tejidos del organismo de los mamíferos. (1)

Aunque inicialmente el cilio primario fue considerado una organela vestigial, Poole et al en 1985 propone la hipótesis de que el cilio primario podría actuar como “sensor” químico-mecánico implicado en distintas vías de señalización celular. (1)

En el momento actual, numerosas investigaciones han incrementado el conocimiento que tenemos acerca de este cilio y de su importancia en patología. (1)

1.1.2. Estructura del cilio: Cilio motor y cilio primario.

El cilio, generalmente conocido como cilio motor, es una organela celular filiforme constituida por haces de microtúbulos en su interior y limitada por la membrana celular. Se compone de dos elementos principales: El axonema y el cuerpo basal. (2)

El axonema crece desde el cuerpo basal y está formado por nueve dobletes de microtúbulos periféricos que rodean a un par de microtúbulos centrales. Cada doblete presenta un microtúbulo completo y la mitad de otro fusionado, de tal forma que cada doblete tiene una pared tubular común en la que comparten protofilamentos. Esta disposición se mantiene gracias a la existencia de conexiones proteicas internas. La unión estable de los microtúbulos externo e interno que constituyen los dobletes periféricos, corre a cargo de la acción de la proteína nexina. Especial relevancia tiene también la proteína dineína, encargada de la acción motora del cilio, que se encuentra presente en los microtúbulos externo e interno de cada doblete. Éste axonema, se origina a partir de un centríolo, constituyendo el cuerpo basal del cilio. La estructura del cuerpo basal está formada por nueve tripletes de microtúbulos periféricos con morfología cilíndrica cuya distribución guarda simetría con la organización del axonema. Igual que ocurre en

el axonema, en el cuerpo basal los microtúbulos comparten protofilamentos. (2)(3)(Figura 1)

Entre el cuerpo basal y el axonema existe una zona de transición, llamada placa basal, que presenta una estructura formada por nueve dobletes de microtúbulos periféricos y una zona electrodensa central donde se encuentran las tubulinas que darán lugar al par de microtúbulos centrales. (2)(3)(Figura 1)

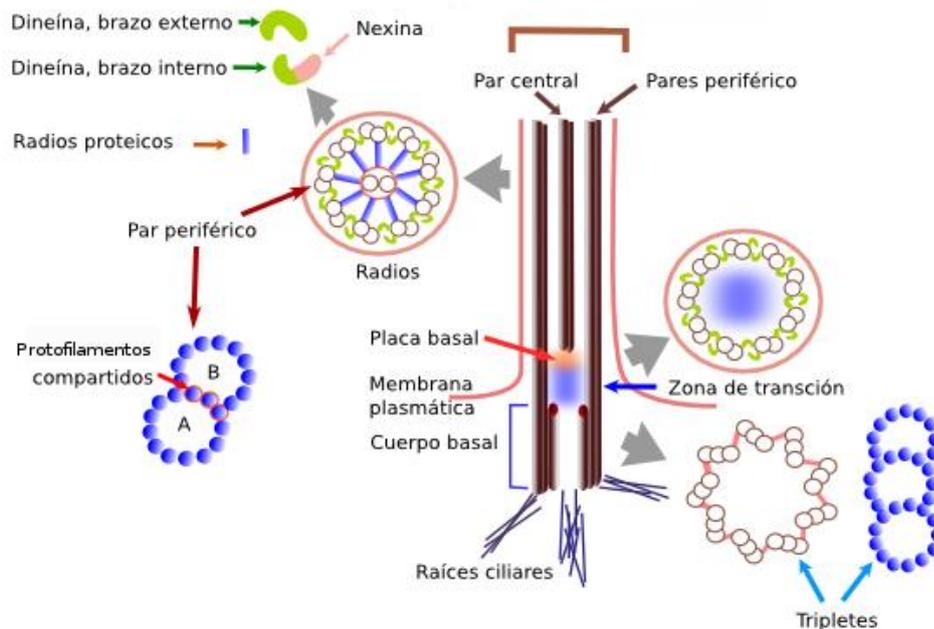


Fig. 1.- Esquema de la estructura del cilio motor

Una vez conocida la estructura del cilio motor, podemos compararla con la del cilio primario. El cilio primario está formado por un cuerpo basal sobre el que protruye el axonema. Ambos elementos también están unidos gracias a la existencia de una zona de transición, igual que ocurre en el cilio motor. (1)

El cuerpo basal se forma a partir del “centríolo madre”. Su estructura está constituida por nueve tripletes de microtúbulos periféricos, similar a la del cilio motor. En su porción más distal los tripletes de microtúbulos periféricos están asociados a fibras transicionales, que enlazan éstos con la membrana plasmática; a este nivel se observa con una zona electrodensa central conocida como placa terminal. El axonema también emerge desde el cuerpo basal, pero en este caso presentará una estructura diferente: Nueve pares de microtúbulos periféricos con ausencia del par de microtúbulos central que encontrábamos en el cilio motor. Entre el axonema y el cuerpo basal se encuentra la zona de transición que contiene nueve dobletes de microtúbulos periféricos rodeados de una estructura característica derivada de la membrana ciliar conocida como collar ciliar (“ciliary necklace”). Además del collar ciliar, encontramos otra región característica de la membrana conocida como bolsa ciliar (“ciliary pocket”). Ambas estructuras son regiones específicas de la membrana del cilio primario que actúan como barrera funcional selectiva estableciendo el límite entre la membrana plasmática celular y la

membrana ciliar. Por una parte encontramos el collar ciliar, que es un dominio específico de la membrana visualizado a microscopio electrónico como varias filas de partículas intramembranas. Esta estructura se unirá a los dobletes periféricos que se localizan en esta zona de transición gracias a la existencia de unas fibras conectoras con forma de “Y”. El collar ciliar presenta proteínas transportadoras cercanas a la zona de anclaje de las fibras en forma de “Y” que actúan permitiendo el paso de moléculas al interior del cilio. Por otra parte encontramos la bolsa ciliar. Ésta también es un dominio específico de la membrana ciliar que aparece, como veremos más adelante, cuando se forma el cilio primario y se origina a partir de una vesícula procedente del Aparato de Golgi. Esta estructura podría actuar como interfaz con la actina del citoesqueleto y participar en el tráfico vesicular asociado al cilio primario. Además de estas dos regiones, la membrana ciliar presenta otras características. Es una membrana que se extiende hasta llegar a fusionarse con la membrana plasmática de la célula. Se encuentra altamente especializada y posee receptores específicos para distintas moléculas señal, implicadas en diferentes vías de señalización celular. (1)(4)(Figura 2)(Figura 3)

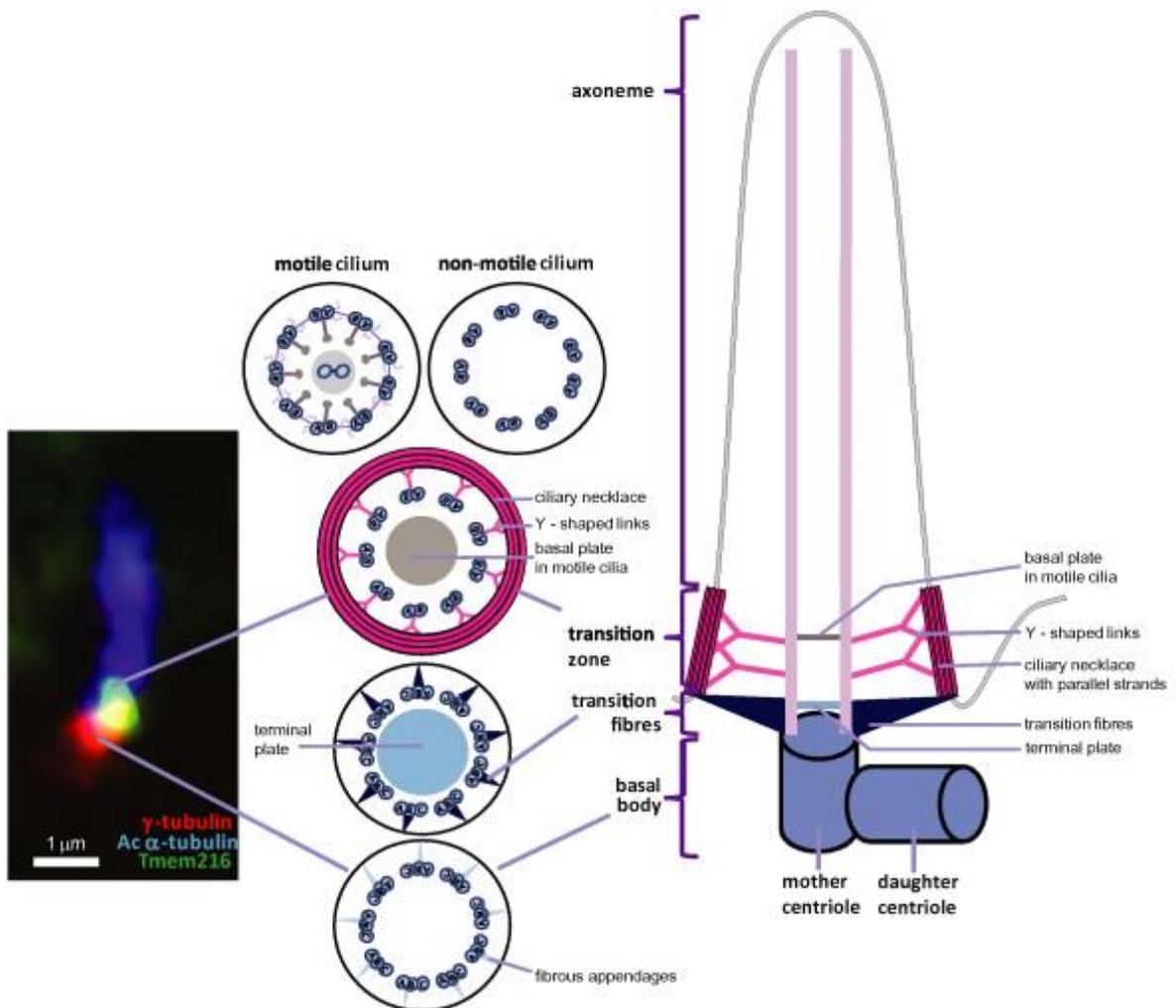


Fig. 2.- Esquema de la estructura del cilio primario

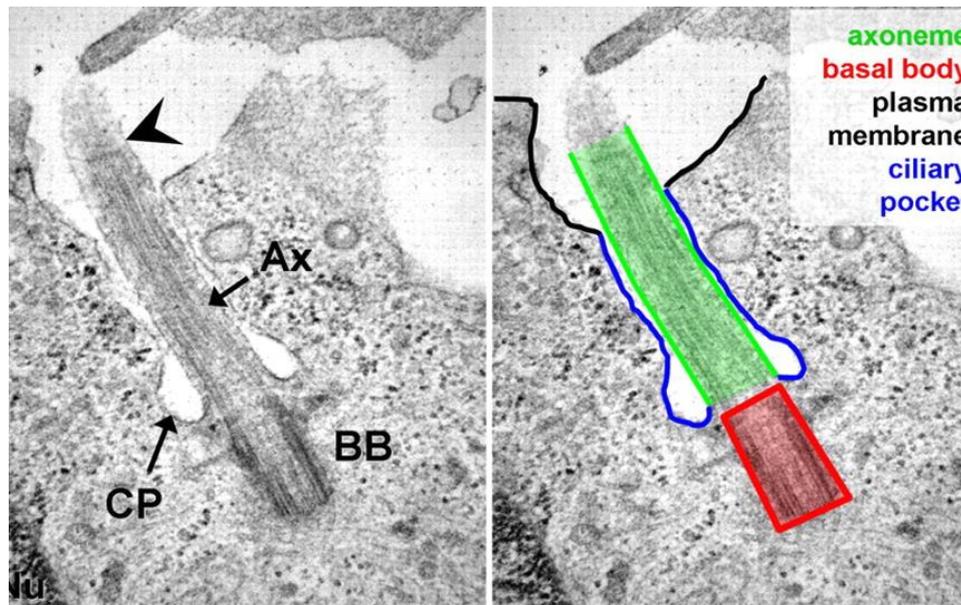


Fig. 3.- Estructura del cilio primario en microscopía electrónica

Además de todo lo mencionado anteriormente acerca de la estructura del cilio primario, hay que destacar que se produce la pérdida de las dineínas entrecruzadas presentes en los microtúbulos externo e interno de cada doblete, responsables de la motilidad ciliar (3). Sin embargo, el cilio primario sí que conserva las dineínas citoplasmáticas asociadas a los dobletes externos que participan en el proceso de transporte intraflagelar. (1)(Figura 3)

En lo relativo a la localización también existen diferencias entre el cilio primario y el cilio motor. El cilio motor tiende a localizarse en células epiteliales (por ejemplo: células del epitelio respiratorio, células endimarias o células de la trompa de Falopio). Sin embargo, el cilio primario se encuentra tanto en células epiteliales (por ejemplo: células del túbulo renal) como en células no epiteliales (por ejemplo: fibroblastos). (1)

Otra diferencia significativa entre ambos cilios es que cuantitativamente el cilio motor genera un mayor número de copias dentro de las células del organismo, siendo por tanto una organela múltiple. Por el contrario, el cilio primario es una estructura única. Ambos cilios presentan también funciones diferentes. La motilidad es una característica esencial del cilio motor, ausente en el cilio primario. Pero el cilio primario se comporta como un sensor que recibe estímulos de distinta naturaleza y participa en vías de comunicación celular. (1)

El mantenimiento y génesis del cilio para poder llevar a cabo sus distintas funciones tiene lugar gracias al transporte intraflagelar (TIF). El TIF constituye un proceso en el cual se produce el movimiento bidireccional entre el axonema y la membrana de partículas a través de los dobletes de microtúbulos externos del axonema del cilio. Las partículas que participan en este proceso son conocidas como partículas del TIF o complejo TIF. Están formadas por dos subcomplejos A y B, que a su vez están constituidos por distintas proteínas TIF. En el subcomplejo tipo A encontramos las proteínas TIF144, TIF140 e TIF139 entre otras. Mientras

que en el subcomplejo B encontramos las proteínas TIF172, TIF88, TIF81, etc. El complejo TIF se adentra en el cilio a través de las fibras transicionales del cuerpo basal y el collar ciliar, y se une a la proteína kinesina II localizada en un doblete de microtúbulos periférico. Se vehiculiza de forma anterógrada dicho complejo con su precursor del axonema que contiene proteínas específicas hasta el extremo axonémico, donde se producirá el ensamblaje de las proteínas del TIF al axonema para mantener la estructura del cilio. Una vez se produce el ensamblaje y el aumento de tamaño del axonema, tiene lugar el recambio de productos de desecho y proteínas antiguas mediante los complejos TIF. Los complejos transportan productos a través de otro doblete de microtúbulos periférico cuando se unen a la proteína dineína 1b y se vehiculizan retrógradamente hacia la base del cilio, donde son enviados al citoplasma. El cilio necesita un aporte continuo de proteínas para mantener su estructura, siendo necesario el funcionamiento permanente del mecanismo de TIF. Cuando dicho mecanismo es deficiente no se consigue mantener la estructura ciliar y el axonema tiende a acortarse, incluso llegando a desaparecer. El malfuncionamiento del TIF también puede traducirse en la aparición de un cilio no funcionando que condicione el desarrollo de ciertas patologías. Otra función de este mecanismo es el transporte de proteínas que participan en distintas vías de señalización celular, como por ejemplo la vía Hedgehog cuya alteración también supone la aparición de distintas enfermedades. (5)(Figura 4)

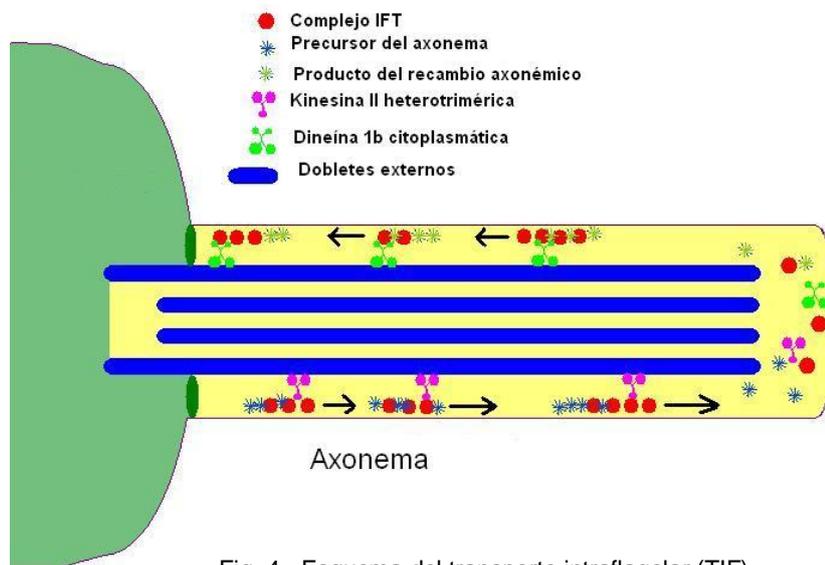


Fig. 4.- Esquema del transporte intraflagelar (TIF)

1.1.3. Biogénesis del cilio primario.

La formación del cilio primario ocurre cuando la célula se encuentra en el período de interfase dentro del ciclo celular. Su biogénesis tiene lugar a partir de un centríolo madre que formará el cuerpo basal del cilio, y que se encuentra migrando hacia la superficie celular. Se produce el reclutamiento de una vesícula de Golgi que encapsulará el extremo distal de este centríolo. Desde el cuerpo basal, comienzan a crecer los microtúbulos gracias al TIF que permitirá el paso de

proteínas al interior del cilio para elongar esta estructura. Al mismo tiempo se forma el collar ciliar rodeando los dobletes de microtúbulos. El collar ciliar regulará la interacción entre la vesícula primaria y el centriolo. Esta vesícula primaria crecerá gracias a la fusión de vesículas secundarias que se deformarán dando lugar a una membrana invaginada. Más adelante tendrá lugar la interacción de esta membrana neoformada con las fibras transicionales del centriolo formando la estructura conocida como bolsa ciliar. Además, el axonema seguirá formándose y creciendo gracias al correcto funcionamiento del TIF. Finalmente la membrana ciliar distal acabará por fusionarse con la membrana plasmática apical permitiendo al cilio protruir hacia el espacio extracelular. (6)(Figura 5)(Figura 6)

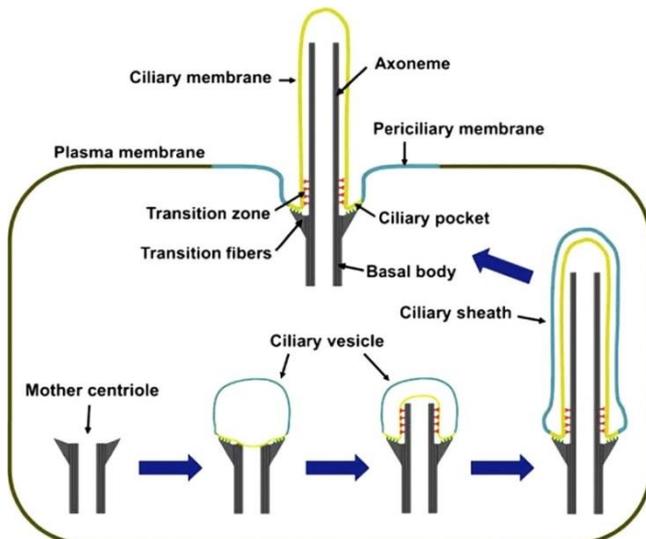


Fig. 5.- Esquema de biogénesis del cilio primario



Fig. 6.- Imagen de microscopía electrónica de la formación del cilio primario

1.1.4. Cilio primario y ciclo celular.

El cilio primario participa activamente dentro del ciclo celular. El ciclo celular es un proceso de división y replicación de material genético complejo que comprende distintas etapas. Los dos períodos esenciales son: La interfase, que engloba las fases G1, S y G2, durante la cual se produce un aumento del tamaño celular así como la duplicación del centrosoma y la replicación de DNA, y la fase de mitosis, durante la cual se produce la división celular propiamente. (7)(8)

El cilio primario, en las células que existe, actúa desempeñando diferentes funciones en dependencia del momento del ciclo en el que se encuentre la célula. Durante la interfase, suele estar en el citoplasma localizado en la periferia celular actuando como sensor captando estímulos. Cuando la célula inicia su división, el cilio primario se reabsorbe y se libera el centrosoma para poder formar el huso mitótico implicado en proceso de mitosis. Una vez la célula se ha dividido en dos células hijas idénticas el centrosoma migra hacia la periferia celular y el centriolo madre inicia el proceso de biogénesis del cilio primario. (7)(Figura 7)

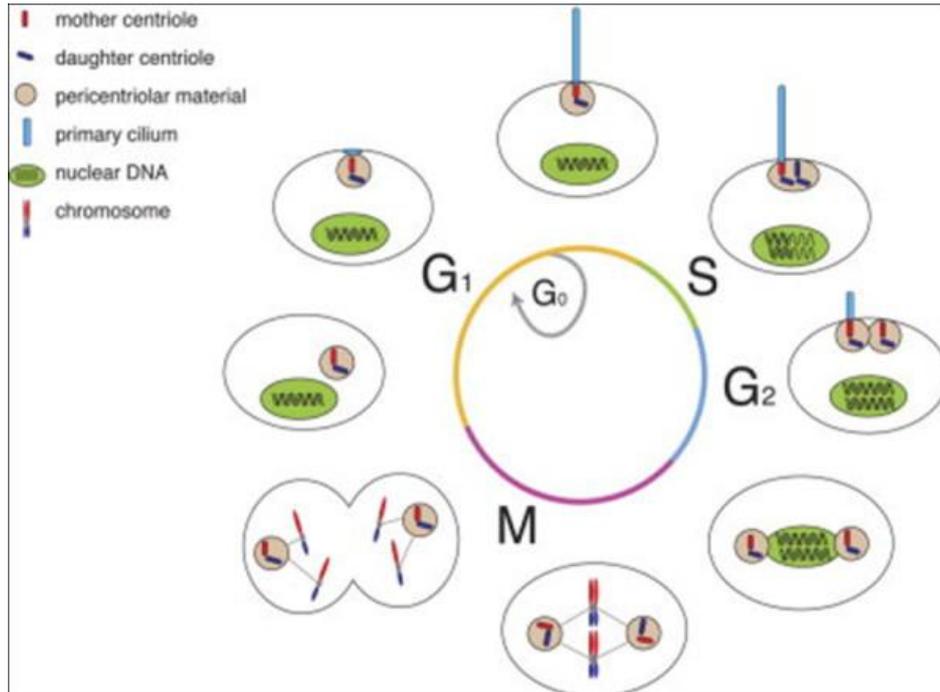


Fig. 7.- Esquema del cilio primario en relación con el ciclo celular en cuanto al doble papel de los centríolos: En el ciclo y en la formación del cilio primario.

1.1.5. Funciones del cilio primario.

El cilio primario puede considerarse como una “antena sensorial” que coordina un gran número de vías de comunicación celular. Actúa como receptor de estímulos químicos y/o mecánicos generando señales que enviará al interior de la célula. (2)

La membrana del cilio primario presenta receptores y canales iónico-proteícos específicos como son el receptor Patched o PTC (implicado en la vía Hedgehog), el receptor del factor de crecimiento asociado a plaquetas o PDGF, el receptor Frizzled o Fzd (que participa en la vía Wnt) y PC1 y PC2 (que actúan como receptores que aumentarán el calcio intracelular) entre otros. No todos los cilios primarios presentan todos los receptores en su membrana. Esto dependerá del tipo de célula (2)(9). Los distintos receptores de membrana desencadenarán diferentes vías de señalización al unirse con sus respectivos ligandos determinando distintas funciones dentro de la célula relativas a la proliferación y diferenciación celular, la organogénesis, y el mantenimiento y remodelación de los tejidos. Es importante la posible implicación del cilio en el proceso de oncogénesis y en el envejecimiento celular. La relación de esta organela con la formación de tumores se basa tanto en la sobreexpresión de ciertas moléculas señal, que se unen a receptores activando vías de señalización que ordenan la división celular incontrolada, como en la alteración de la estructura ciliar por mutaciones en los genes que codifican las proteínas ciliares y alteración de alguna vía de comunicación celular. (9)(Figura 8)

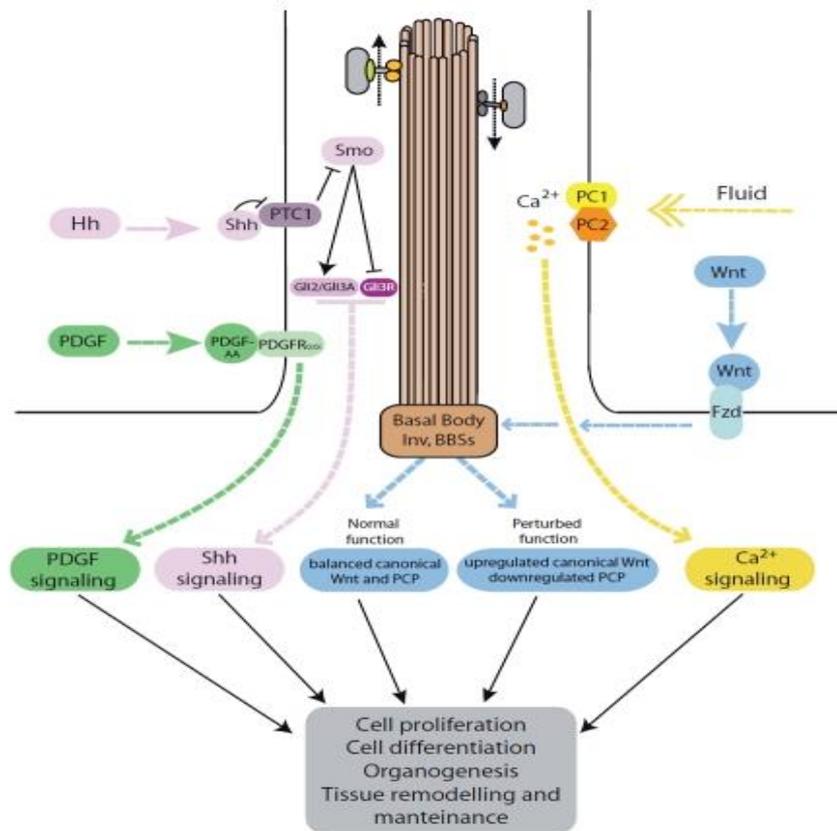


Fig. 8.- Esquema sobre las funciones del cilio primario

También hay que hacer mención a otro papel importante desempeñado por el cilio como es su participación en el proceso de embriogénesis. Durante las primeras fases del desarrollo, el cilio primario determina la simetría izquierda-derecha en el organismo. (10)

1.2. IMPORTANCIA DEL CILIO PRIMARIO EN MEDICINA: Ciliopatías.

La importancia del cilio primario desde el punto de vista médico radica en su relación con el proceso de enfermedad (2). Las ciliopatías comprenden un conjunto de trastornos genéticos variados, generalmente de herencia autosómica recesiva, que aparecen tanto por alteración de las funciones del cilio primario como por la disrupción de la estructura ciliar. Las ciliopatías derivan de un espectro de mutaciones acontecidas en muchos genes distintos con localización muy variable, motivo por el cual son patologías con una amplia variabilidad clínica. (11)

La gravedad y el pronóstico de enfermedad están supeditados a la intensidad de la lesión y al momento de aparición de la alteración ciliar durante el desarrollo, que puede ir desde la fase prenatal a la postnatal. Dentro del conjunto de ciliopatías las entidades que habitualmente quedan englobadas dentro de este tipo de patología son el síndrome de Bardet-Biedl, la obesidad y la diabetes mellitus, la degeneración retiniana, la discapacidad intelectual, la malformación de las vías urinarias, la enfermedad quística renal y la polidactilia entre otras. Además de estas enfermedades, la alteración del cilio primario presenta un importante papel en enfermedades de tipo cardíaco, endocrinas y en el cáncer. (11)

La primera patología que pudo asociarse a la alteración del cilio primario fue la poliquistosis renal (1). La poliquistosis renal es una patología de origen autosómico dominante o recesivo. En el trastorno quístico renal de origen autosómico dominante, la formación de los quistes renales tiene lugar en cualquier segmento del túbulo colector o de la nefrona; mientras que el origen de los quistes de herencia autosómica recesiva, tiene lugar en el túbulo colector exclusivamente. Las mutaciones que condicionan la aparición de esta patología son también heterogéneas. En el trastorno autosómico dominante las más frecuentes son las alteraciones de los genes PKD1 y PKD2 que codifican proteínas conocidas como policistinas. Estas proteínas se localizan en la membrana un cilio primario que actúa como sensor de flujo en las células epiteliales de los túbulos renales. La Policistina-2, codificada por el gen PKD2, es un canal de calcio que permite el ingreso de iones calcio en las células. La Policistina-1 que es codificada por el gen PKD1, se cree que está asociada con la proteína Policistina-2 y que ésta regula la actividad del canal. Los iones calcio son mensajeros celulares muy importantes por lo que el funcionamiento incorrecto de estas proteínas propicia una disregulación del calcio con el desencadenamiento de la enfermedad. Las células epiteliales que recubren los conductos urinarios que detectan el flujo de la orina fallan en la detección provocando apoptosis de estas células epiteliales renales, lo que conduce a la formación típica de estos quistes. En el trastorno autosómico recesivo los genes mutados implicados en el desarrollo de enfermedad codifican proteínas conocidas como fibrocistinas (9). Clínicamente ambos trastornos presentan semejanzas y diferencias. La entidad de origen autosómico recesivo se caracteriza por la asociación de dilataciones quísticas de los túbulos colectores renales, fibrosis hepática congénita y en ciertas ocasiones incluso dilatación no obstructiva de los conductos biliares. Sin embargo, en la enfermedad autosómica dominante la enfermedad quística es de tipo sistémico, con formación de quistes en múltiples órganos que asocia manifestaciones extrarrenales graves como por ejemplo hipertensión arterial, insuficiencia renal, etc. Con respecto al diagnóstico de dicha enfermedad, la prueba de elección es la ecografía renal. En el trastorno de tipo autosómico recesivo la ecografía muestra la presencia de dilataciones dentro del órgano y unos riñones de pequeño tamaño hiperecogénicos, siendo la diferencia principal con respecto al trastorno de tipo autosómico dominante dicho tamaño renal. En este último caso, la ecografía renal mostrará riñones aumentados de tamaño que asociarán dilataciones quísticas. El tratamiento de ambos tipos de trastornos es de tipo sintomático principalmente, y va encaminado a evitar complicaciones y a enlentecer la progresión para así controlar la evolución de la enfermedad en la medida de lo posible. Es importante la detección precoz y el tratamiento de manifestaciones como la hipertensión arterial mediante IECAs o ARAll, fármacos antihipertensivos que actúan sobre el sistema renina-angiotensina-aldosterona. Con respecto al tratamiento de la insuficiencia renal, éste dependerá del grado de insuficiencia del paciente llegando incluso a medidas como diálisis o trasplante renal. (12)

La poliquistosis renal es por tanto una ciliopatía a tener en cuenta dada su gravedad en los casos más extremos y a su repercusión en la calidad de vida del paciente en casos no tan extremos. A través de dicha entidad se puede decir que

las ciliopatías son enfermedades cuya base molecular es un tema relevante. Por este motivo el conocimiento clínico de la enfermedad, el conocimiento de la base genética, así como el avance tecnológico referente a las técnicas de screening de enfermedad, deberían permitir identificar el defecto molecular precozmente en los pacientes afectados con el fin de plantear nuevos tratamientos más eficaces. En un futuro se espera que se expanda nuestro conocimiento sobre la base biológica del cilio primario con el fin de causar un gran impacto que mejore el diagnóstico, tratamiento y pronóstico de las distintas ciliopatías. (13)

1.3. RELACIÓN ENTRE CILIO PRIMARIO Y CÁNCER.

El descubrimiento de la implicación del cilio primario en la progresión y regulación del ciclo celular ha planteado la posibilidad de que esta organela esté implicada en la génesis del cáncer. Esta hipótesis ha sido aceptada por varios estudios, realizados con muestras de distintos tipos de tumores con el fin de determinar la existencia del cilio primario en células tumorales. El cilio primario juega un doble papel dentro de la génesis de un tumor, ya que puede aparecer como cilio funcional en el cual se altere una vía de comunicación que desencadene una proliferación celular continua y descontrolada, o presentar una disfunción ciliar que pueda incluso hacer desaparecer dicha organela. (14)

1.3.1. Vías de señalización en las que está implicado el cilio primario: Hedgehog.

La vía de señalización Hedgehog (Hh) es una vía de comunicación celular que actúa regulando el crecimiento y desarrollo de las células; en condiciones basales se encuentra inactivada. Esto ocurre cuando tiene lugar la ausencia de ligando Hh. El ligando Hh es un péptido secretado por células del entorno que actúa como molécula señalizadora. Existen diferentes ligandos Hh entre los que encontramos: Sonic Hh (Shh), Indian Hh (Ihh) y Desert Hh (Dhh). El cilio primario está relacionado con esta vía dado que alberga en su membrana receptores de esta molécula señal o ligando (15). Este ligando es responsable del inicio de la cascada de señalización al unirse con su correspondiente receptor Patched (PTC). Cuando dicha unión no tiene lugar, el receptor PTC bloquea Smoothed (SMO), inhibiendo su activación. SMO es una proteína G que actúa como transductor, responsable de enviar señales al interior de la célula y que puede encontrarse secuestrado en una vesícula intracelular alejado de la superficie o insertarse en la membrana plasmática. Cuando se produce el bloqueo de SMO a través de PTC no se envía ninguna señal intracelular y por tanto no hay continuidad de la vía. (15) (Figura 9)

La vía Hedgehog se inicia cuando el ligando Hh se une a PTC, eliminando su efecto inhibitorio sobre SMO. SMO que se encontraba en el interior de una vesícula, es fosforilado, llega a la superficie celular y se produce su traslocación al cilio primario. SMO se desbloquea e inicia la cascada intracelular. (16)(Figura 7)

La proteína G activada (SMO) estimulará la adenilato ciclasa que actuará aumentando la concentración de AMP cíclico (AMP-c). A su vez se producirá la activación de la proteína quinasa dependiente de AMP-c (PKA). Esta enzima actúa catalizando la transferencia del grupo fosfato terminal desde el ATP a un residuo específico de ciertas proteínas diana, determinando de esta forma su actividad concreta. (15)(Figura 9)

Llegados a este punto la PKA actúa activando a su vez los factores de transcripción Gli. Los factores de transcripción Gli más frecuentemente involucrados en esta vía de señalización celular son Gli1, Gli2 y Gli3. La proteína Supresor of Fused (SUFU) participa en el proceso de formación de las formas activadoras e inhibitoras de los factores Gli, en dependencia de la presencia o ausencia de Hh en la vía de señalización. Estos factores Gli en su forma activada se adentran en el núcleo celular y permiten la expresión de genes diana Hh que favorecen la proliferación y diferenciación celular. (2)(15)(Figura 9).

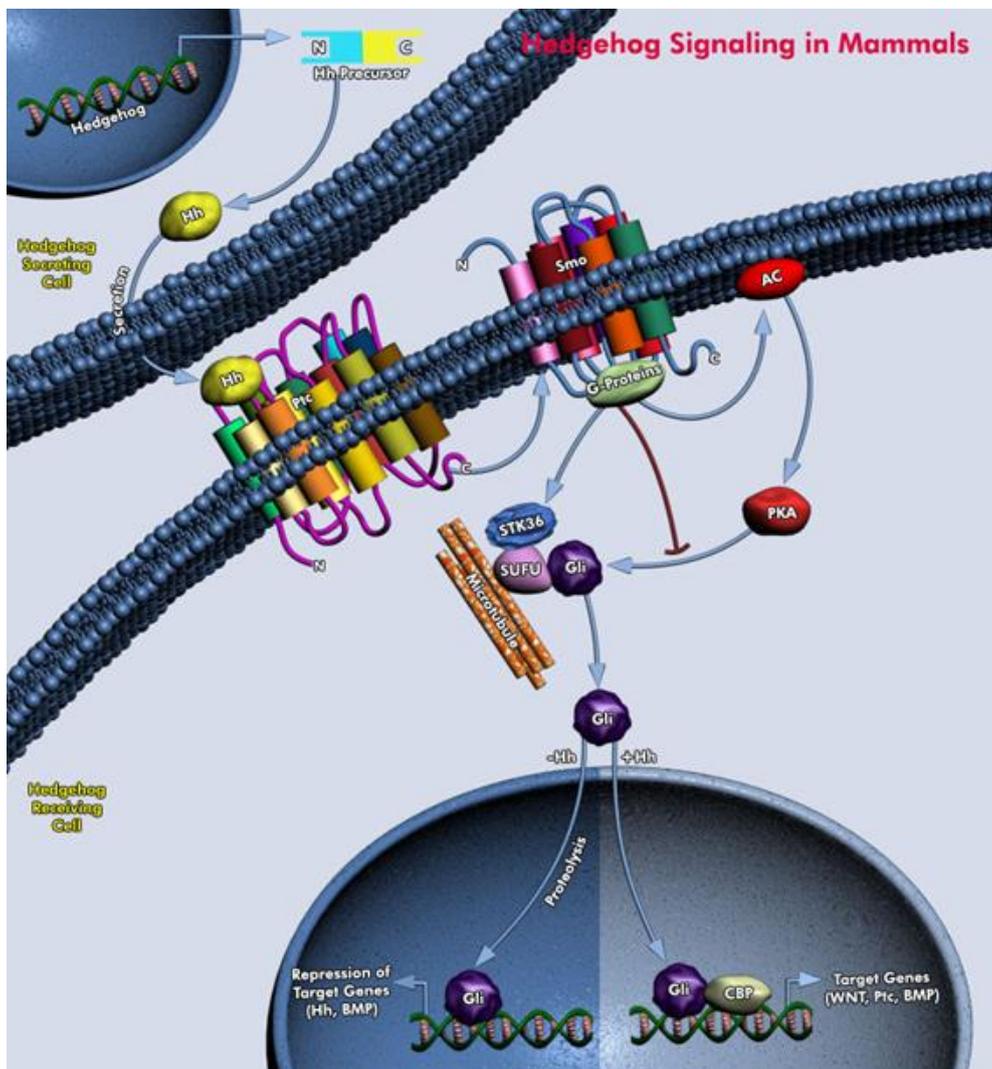


Fig. 9.- Esquema de funcionamiento de la vía Hedgehog

Una vez conocido el funcionamiento de la vía Hh, hablaremos acerca del papel del cilio primario dentro de ella. Ciertos componentes de la vía están localizados en el cilio primario y su regulación depende de esta organela. La alteración de estos componentes supondrá el anormal funcionamiento de este mecanismo de comunicación celular. Las consecuencias de la alteración de la vía Hh son múltiples. Puede provocar malformaciones durante la fase de desarrollo en la embriogénesis, y la codificación de proteínas anómalas que se traducirá en la aparición de distintas patologías. (14)

1.3.2. Vía de señalización Hedgehog y cáncer.

El mecanismo de producción del cáncer a consecuencia de la alteración de la vía Hh es doble. Puede ocurrir tanto por sobreexpresión de ligandos Hh como por mutación de proteínas que componen la vía. La alteración de la vía puede tener lugar a nivel de factores de transcripción Gli. En ciertos estudios realizados con ratones genéticamente modificados, se demostraba que en ausencia del cilio primario, SMO era incapaz de activar la vía Hh y los tumores eran incapaces de formarse. Sin embargo, cuando se activaba la vía de forma artificial o “ectópica” mediante la expresión de un factor Gli activado, la ausencia del cilio asociada a la acción de dicho factor Gli en su forma activadora se traducía en un incremento de la génesis del tumor. Otros estudios centrados en la forma represora del factor de transcripción Gli demostraron que la presencia de cilio primario es responsable de la génesis de este factor. El factor Gli represor podría actuar equilibrando la acción llevada a cabo por su factor opuesto activador, enlenteciendo el crecimiento tumoral. En ausencia del cilio primario, esta forma represora no era suficiente para contrarrestar la acción de su forma activadora, generando incluso un aumento del crecimiento del tumor. Además de todo esto, el anormal funcionamiento de la vía Hh también puede ocurrir por alteración de cualquier otro nivel de la misma. SMO puede presentar mutaciones que activen la vía de señalización sin regulación alguna, actuando como un oncogen que desencadene procesos tumorales. Componentes como son PTC y SUFU presentan también una regulación cilio-dependiente, hecho por el cuál son susceptibles de sufrir alteraciones y condicionar el correcto funcionamiento de la vía Hedgehog. (14)(15)

1.3.3. Carcinomas uroteliales.

El carcinoma de vejiga es la patología maligna más frecuente del tracto urinario. Actualmente se clasifica de dos formas diferentes. La primera clasificación es la clasificación TNM habitual según tamaño, afectación ganglionar y metástasis a distancia, y la segunda es según su grado de diferenciación tumoral. Esta última clasificación se desarrolló en 2004 y definió nuevas categorías entre lesiones planas y papilares, donde encontramos neoplasias papilares uroteliales con bajo potencial de malignidad y los carcinomas uroteliales de bajo y alto grado. El grado intermedio quedó excluido de esta nueva clasificación. Ambos sistemas tienen valor pronóstico, siendo el pronóstico global de la enfermedad variable en dependencia

del estadio en que se encuentre el tumor. Por lo general su tasa de mortalidad es de 1,1-4/100.000 habitantes, en dependencia del sexo del paciente. (17)

1.3.4. Tumores del estroma gastrointestinal (GIST).

Los tumores GIST son los tumores mesenquimales más frecuentes que afectan al tracto gastrointestinal. Presentan en su mayoría marcadores c-Kit y CD34 positivos y se piensa que derivan de las células intersticiales de Cajal (ICC) o de sus células progenitoras. En un estudio de microscopía electrónica (ME), se observa que las células tumorales presentan características ultraestructurales similares a las de las células de Cajal. Las ICC tienen cilio primario, hecho por el cual se ha planteado la posibilidad de que algunas células neoplásicas del GIST puedan presentar cilio primario en su interior. (18)

2. OBJETIVOS.

Los objetivos de este trabajo fin de grado son diversos y se resumen en:

- 1) Realizar una amplia revisión bibliográfica sobre el cilio primario y su relación con el cáncer.
- 2) Conocer las técnicas de ME necesarias para observar esta organela.
- 3) Realizar la búsqueda del cilio primario en células de carcinoma de vejiga.
- 4) Sobre imágenes de ME previamente obtenidas, realizar un estudio comparado de la morfología y localización del cilio primario en dos tipos de tumores, uno de origen mesenquimal, tumor del estroma gastrointestinal (GIST) y otro de origen epitelial, carcinoma de vejiga.

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

Para realizar nuestra pequeña investigación hemos utilizado biopsias de los dos tipos de tumores, GIST gástrico y carcinoma urotelial de vejiga, que cumplieran criterios histológicos de inclusión. Las muestras de tejido tumoral fueron obtenidas del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza. Una vez tomadas las biopsias, las distintas muestras sufren un proceso específico de preparación para visualizado a microscopio electrónico de transmisión en sucesivos días. Inicialmente la muestra es tallada y luego se realiza un proceso de fijación mediante inmersión en el fijador toda una noche a temperatura ambiente. El fijador de elección es el Glutaraldehído al 2% en el Búfer Fosfato Salino (PBS), de acción inmediata, actúa creando puentes entrecruzados en las proteínas de las membranas. Luego, se realizan tres lavados durante 5 minutos de la muestra en una solución tampón PBS, para después comenzar el proceso de inclusión. Se elimina el último lavado y se añade la solución de Tetróxido de Osmio al 2% en PB 0,1M. El osmio es uno de los metales pesados que se utilizan ya que tienen doble función, por una parte fijan los lípidos y por otra se unen en las zonas hidrofílicas de las células proporcionándoles densidad al paso

de los electrones. Cuando la solución de Tetróxido de Osmio comienza a adquirir un color vino se retira inmediatamente. En este momento la muestra se lava con agua y se procede a su deshidratación. Para deshidratar se utilizan cetonas o alcoholes de concentración creciente hasta alcanzar el 100% de concentración. Cuando se alcanza el 70% de concentración, la muestra se contrasta con Acetato de Uranilo. Una vez se completa el proceso de deshidratación y se elimina el agua de la muestra, se lava con Óxido de Propileno a temperatura ambiente. El agua extraída de la muestra será sustituida por un polímero plástico que aumentará la consistencia el tejido conocido como Araldita. Una vez la muestra está embebida de Araldita se coloca en un molde a 70°C; tras 48-72h de polimerización obtenemos un bloque. Una vez retallado en el piramidotomo con cuchillas de vidrio, se realizan los cortes mediante un ultramicrotomo, con cuchilla de diamante. Los cortes realizados pueden ser semifinos o ultrafinos en función del grosor de las secciones. Los cortes semifinos se recogen en portaobjetos, se tiñen con azul de Toluidina y se observan en el microscopio óptico. Los cortes ultrafinos se recogen en rejillas y se contrastan con Nitrato de Plomo. En este momento las muestras están preparadas para verlas en el microscopio electrónico de transmisión (MET).

4. RESULTADOS.

Para estudiar el cilio primario hemos utilizado dos tumores diferentes, uno de origen mesenquimal (tumor del estroma gastrointestinal, GIST) y otro de origen epitelial (carcinoma urotelial de vejiga). Gracias a nuestra pequeña investigación, en los tumores uroteliales de bajo grado, se evidencia la existencia de una hiperplasia de las células epiteliales. Éstas aparecen ordenadas en un plano perpendicular al eje de la papila de la vejiga pero con su espesor aumentado, presentan entre dieciséis y veinte capas, que cuantitativamente difieren de las ocho capas que suele presentar el urotelio normal (Figura 10).

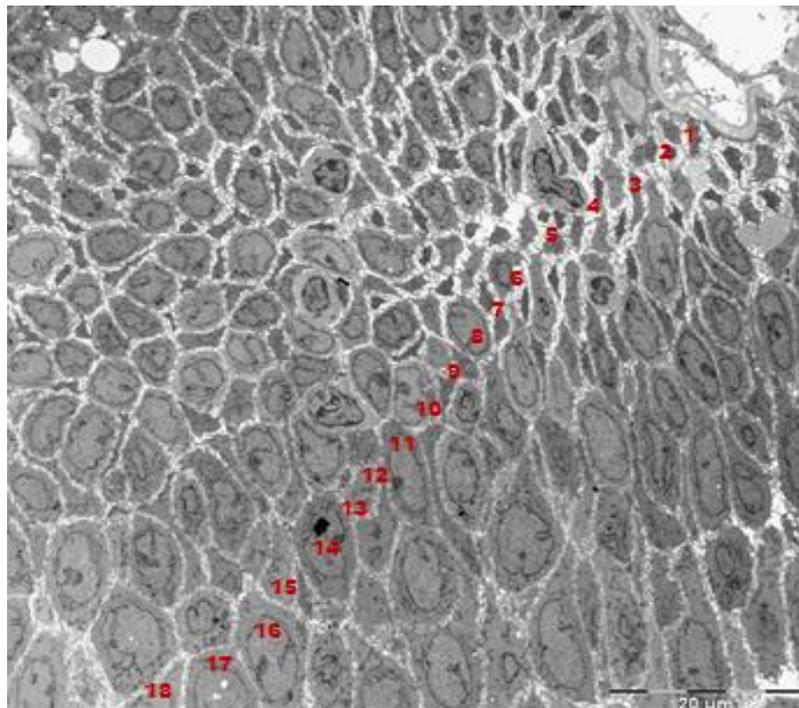


Fig. 10.- MET: Hiperplasia celular del urotelio en carcinomas de vejiga de bajo grado. Se aprecia aumento del número de hileras celulares.

En la muestra de tejido se observan dos tipos de células neoplásicas dentro del mismo tumor. Las primeras son células que se caracterizan por presentar un núcleo ovalado y voluminoso con eucromatina muy desespiralizada, lo que nos hace pensar que existe actividad transcripcional importante dentro de ellas. Asocian heterocromatina marginal que perfila la envoltura nuclear. Esta envoltura presenta profundas invaginaciones que pueden incluso llegar de un lado al opuesto de la célula (Figura 11A). Su nucléolo es característico, muy prominente con estructura fibrilar (Figura 11B). Podríamos decir que el citoplasma es escaso y con una electrodensidad media (Figura 11C), en él vemos sáculos de retículo endoplásmico granular próximos a dictiosomas y abundantes polirribosomas libres que sólo pueden verse a gran aumento. Las células se encuentran contactando entre sí a través de prolongaciones digitiformes y desmosomas puntiformes (Figura 11C). De especial interés es la presencia de cuerpos multivesiculares conteniendo vesículas de diferentes tamaños (Figura 11D). En el citoplasma es notable también la presencia de abundantes filamentos. (Figura 11D)

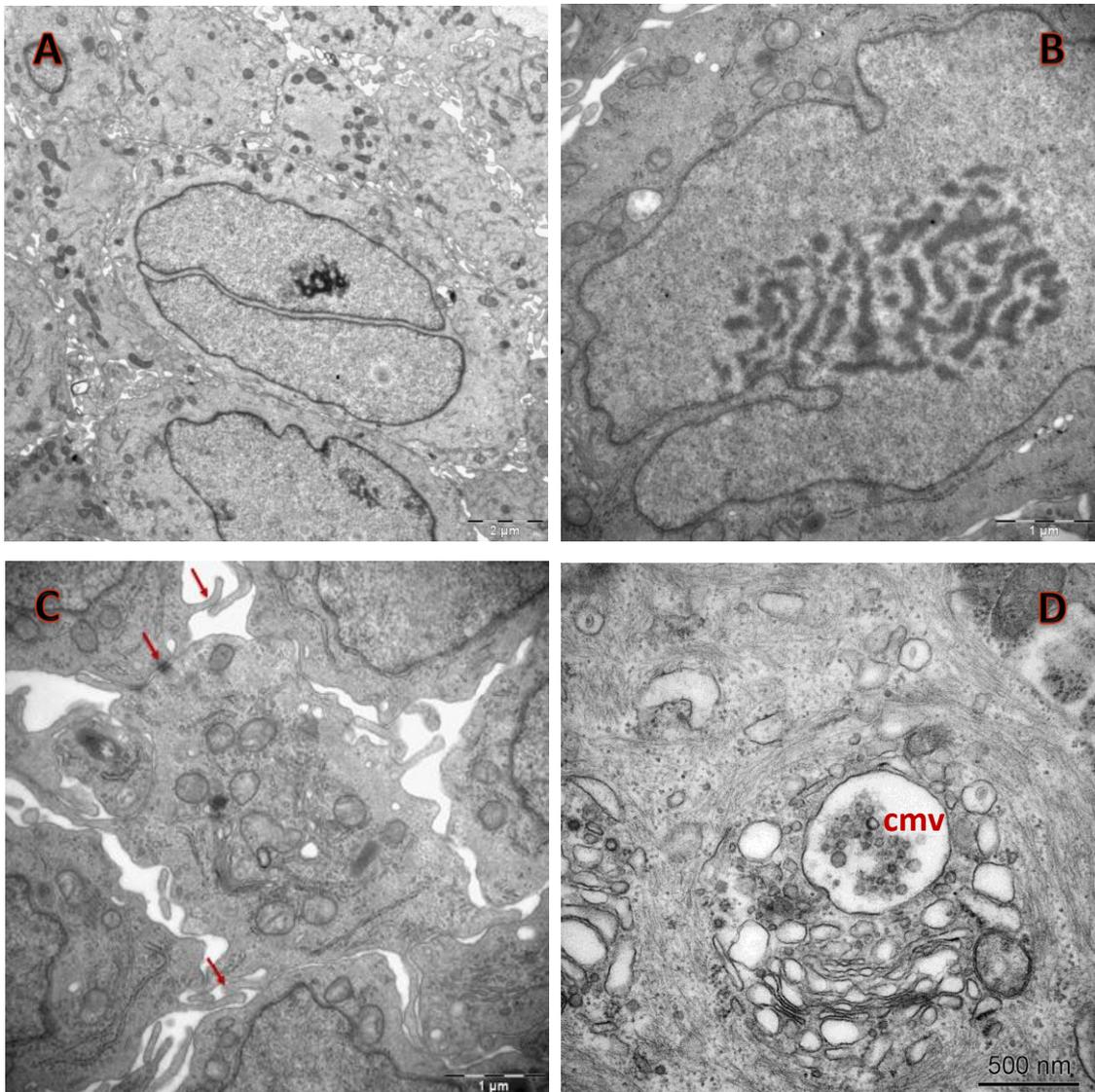


Fig. 11.- MET. Características ultraestructurales de las células epiteliales (tipo 1) del carcinoma urotelial de bajo grado. (A). Profunda invaginación en la envoltura nuclear de una célula epitelial. (B). Nucléolo característico. (C). Citoplasma de célula epitelial con mitocondrias, sáculos de retículo endoplásmico, dictiosomas. Se muestran prolongaciones digitiformes y desmosomas que ponen en contacto unas células con otras. (D). Cuerpo multivesicular y filamentos en el citoplasma.

En menor proporción y entremezcladas aleatoriamente encontramos el segundo tipo de células que mencionamos previamente. Difieren en sus características de las primeras, ya que presentan un núcleo más electrodenso con aumento de la cantidad de heterocromatina condensada (Figura 12A). El citoplasma es menos electrodenso y presenta un citosol con aspecto floculado (Figura 12B). Estas células presentan una distribución de orgánulos similar a las primeras, sin embargo, destaca la presencia de un mayor número de mitocondrias todas ellas con mayor electrodensidad de las crestas mitocondriales (Figura 12B). En la proximidad del núcleo encontramos los centriolos con su localización habitual.

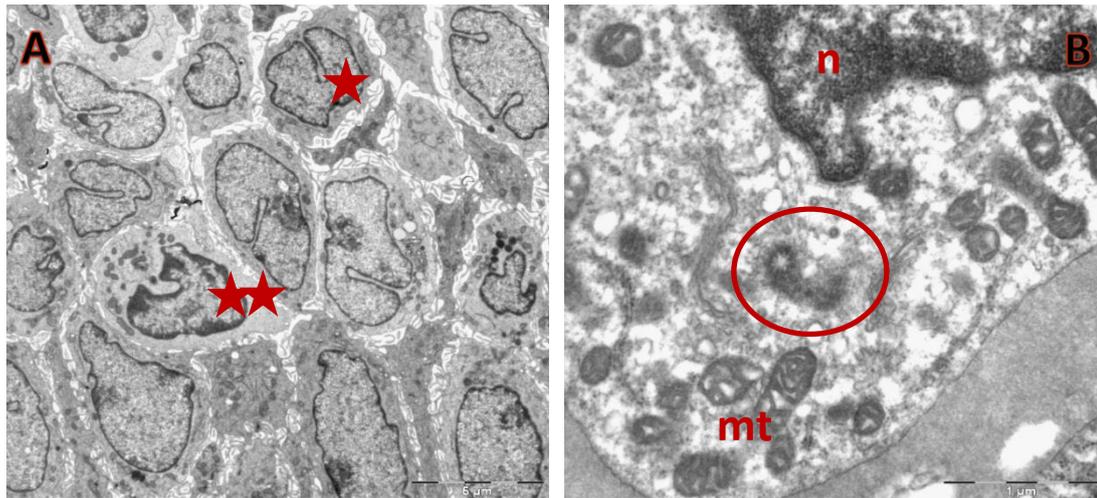


Fig. 12.- MET (A). Células del carcinoma urotelial: Unas con citoplasma de electrodensidad media y nucléolo característico (*), otras con citoplasma de menor electrodensidad y aumento de heterocromatina condensada en el núcleo (**). (B). Detalle de célula con citosol floculado, mitocondrias, núcleo con heterocromatina muy condensada y centriolos.

El cilio primario se localiza en las células uroteliales descritas en primer lugar. En este estudio se constata que en dichas células ocurre un proceso de activación de los centriolos: Los dos centriolos abandonan su posición perpendicular, y se colocan siguiendo un eje paralelo uno a continuación del otro, ambos migrando hacia la periferia del citoplasma celular (Figura 13A y 13B). Las células en las que hay cilio primario se encuentran en contacto con la lámina basal (Figura 13C). Cuando se activan los centriolos para formar el cilio primario aparecen las fibras transicionales que unen el cuerpo basal a la membrana plasmática de la célula (Figura 13D). En ocasiones esta activación se observa también en centriolos cercanos al núcleo en los que se observan satélites pericentriolares y cómo desde el corpúsculo basal se origina el cilio primario por polimerización de los dobletes de microtúbulos (Figura 13E y 13F). En algún corte, en el cuerpo basal, se observan pequeñas vesículas que llegan desde el Golgi, lo que demuestra la relación existente entre estos dos orgánulos a través del transporte intraflagelar (Figura 13F). En sólo algunas ocasiones se puede observar como desde el cuerpo basal proyecta el axonema hacia el espacio extracelular (Figura 14A y 14B) pero tiene un tamaño muy reducido de 100-200 nm. En corte transversal observamos la estructura de los dobletes de microtúbulos del cilio primario en su axonema (Figura 14C y 14D); concéntrica a la membrana ciliar se observa la membrana plasmática de la célula, entre ambas membranas se encuentra el espacio delimitado por la bolsa ciliar.

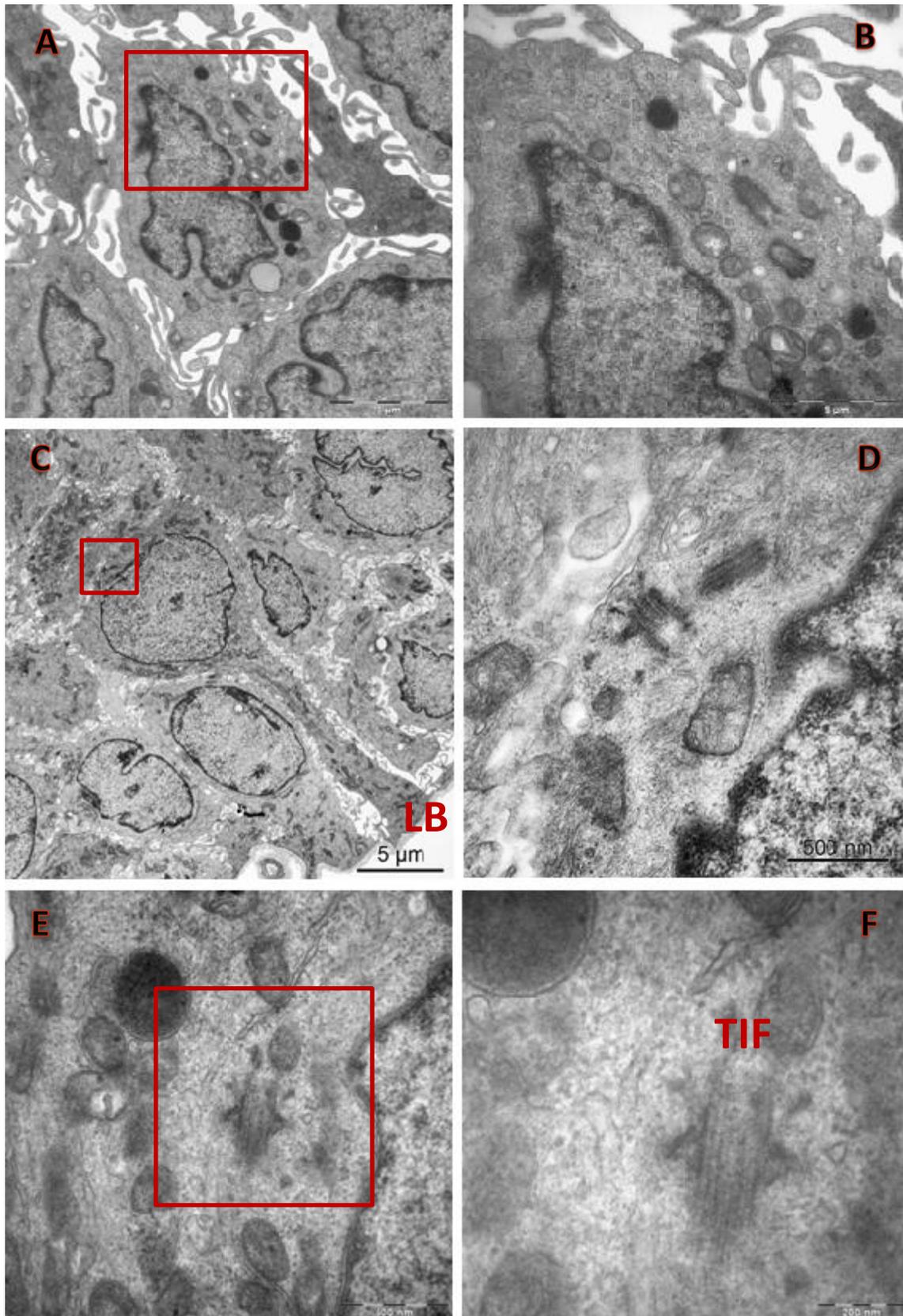


Fig. 13.- MET. (A). Activación de los centriolos en la célula tumoral. (B). Detalle de la imagen 13(A): Se observa el abandono de la posición perpendicular de los centriolos y su migración a la periferia celular. (C). Cilio primario localizado en células que se apoyan en la lámina basal. (D). Detalle de la imagen 13(C) donde se observa el cilio primario con las fibras transicionales. (E). Centríolo con fibras transicionales y satélites en el citoplasma celular. (F). Detalle de la imagen 13(E). Se aprecian vesículas del Golgi durante el proceso de transporte intraflagelar.

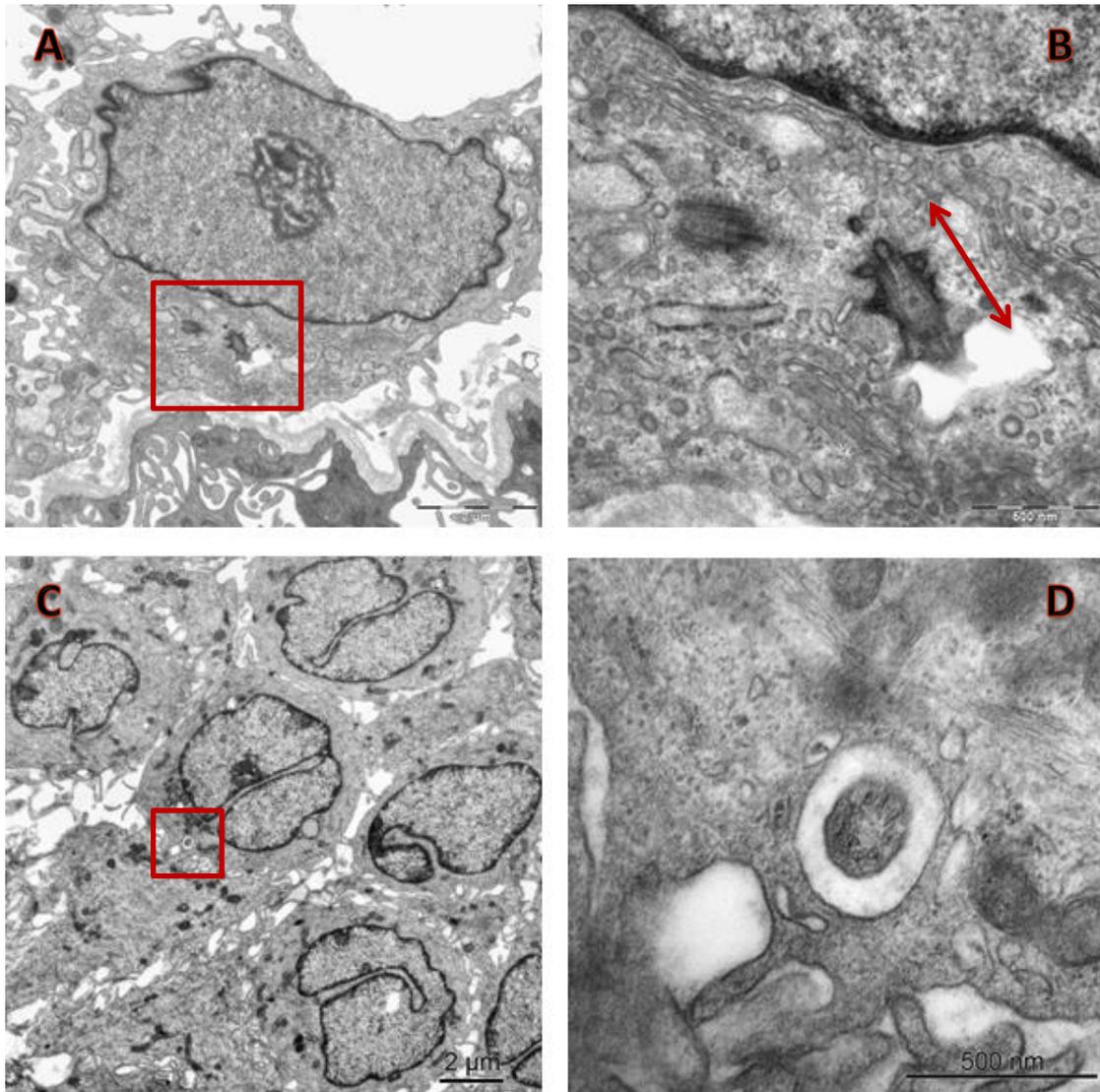


Fig. 14.- MET (A). Cilio primario protruyendo a espacio extracelular. (B) Detalle de imagen 14(A). Se observa pequeño tamaño ciliar. (C). Célula carcinoma urotelial con cilio primario en periferia celular. (D). Detalle de imagen 14(C). Se observa la estructura de microtúbulos del axonema con nueve dobletes de microtúbulos periféricos.

Para comparar la estructura del cilio primario hemos elegido como modelo de tumor de origen mesenquimal los tumores del estroma gastrointestinal (GIST). Hemos utilizado imágenes que obtuvimos en el microscopio electrónico buscando esta estructura en rejillas que ya habían sido estudiadas para una publicación anterior. En esta publicación se demuestra una amplia variabilidad en cuanto a las células tumorales del GIST gástrico gracias al examen ultraestructural de material obtenido de este tumor. Se evidencia tras una exhaustiva búsqueda la presencia de cilio primario en algunas de las células tumorales que componen el GIST, pero no en su totalidad. En las muestras del tumor GIST se visualizan dos tipos de células tumorales: Epitelioides y fusiformes. Las de tipo epitelioides se caracterizan por presentar una morfología redondeada y pequeño tamaño que tienden a distribuirse formando grupos celulares. (Figura 15A y 15B)(18)

Estas células están conectadas entre sí mediante pequeñas interdigitaciones y por alguna unión de tipo puntiforme (Figura 15C). Presentan mitocondrias y abundantes polirribosomas y filamentos intermedios. Especialmente llamativos son los microtúbulos observados en el citoplasma y la presencia de cuerpos multivesiculares (Figura 15D). Es característico de estas células que próximo al núcleo aparezca una vacuola de gran tamaño (Figura 15E), y que su retículo endoplásmico granular derivado del aparato de Golgi se organice de forma concéntrica. (Figura 15F)(18)

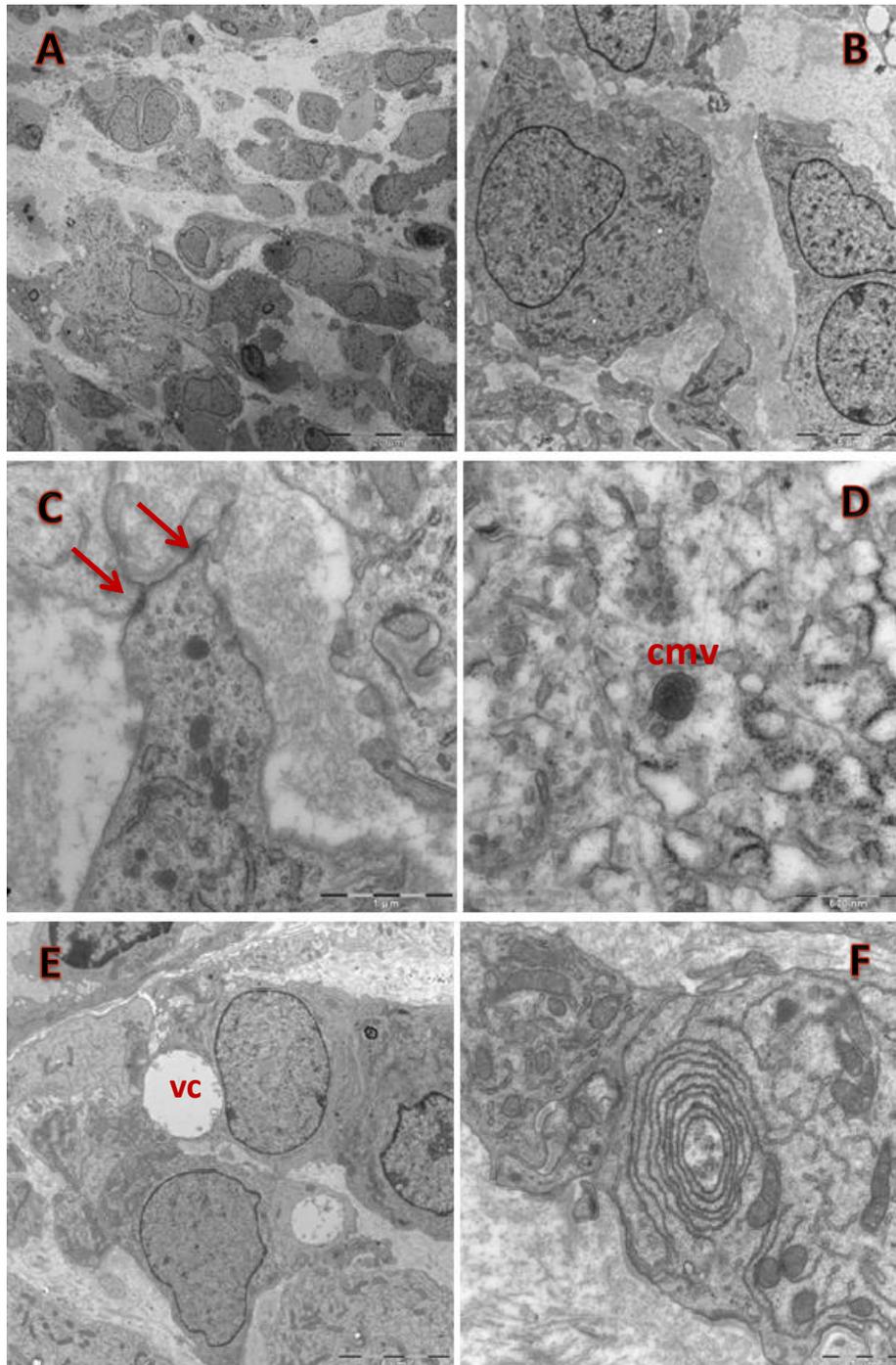


Fig. 15.- MET (A). Tumor GIST con células epitelioides redondeadas y distribuidas en grupos celulares. (B).Detalle de células epitelioides con citoplasma y núcleo de electrodensidad media. (C). Células epitelioides conectadas entre sí a través de uniones de tipo puntiforme. (D). Cuerpo multivesicular dentro del citoplasma junto con microtúbulos y filamentos. (E). Gran vacuola próxima al núcleo celular. (F). Retículo endoplásmico concéntrico.

El cilio primario en estas células proyecta hacia el exterior (Figura 16A). En algunos cortes podemos observarlo bien formado, con todos sus elementos, aunque según el nivel de corte, en ocasiones, solo podemos ver el centríolo madre que lo formará (Figura 16B). Se realizan mediciones de este cilio que indican que presenta una longitud de en torno a 1-2 μm (Figura 16C y 16D)(18).

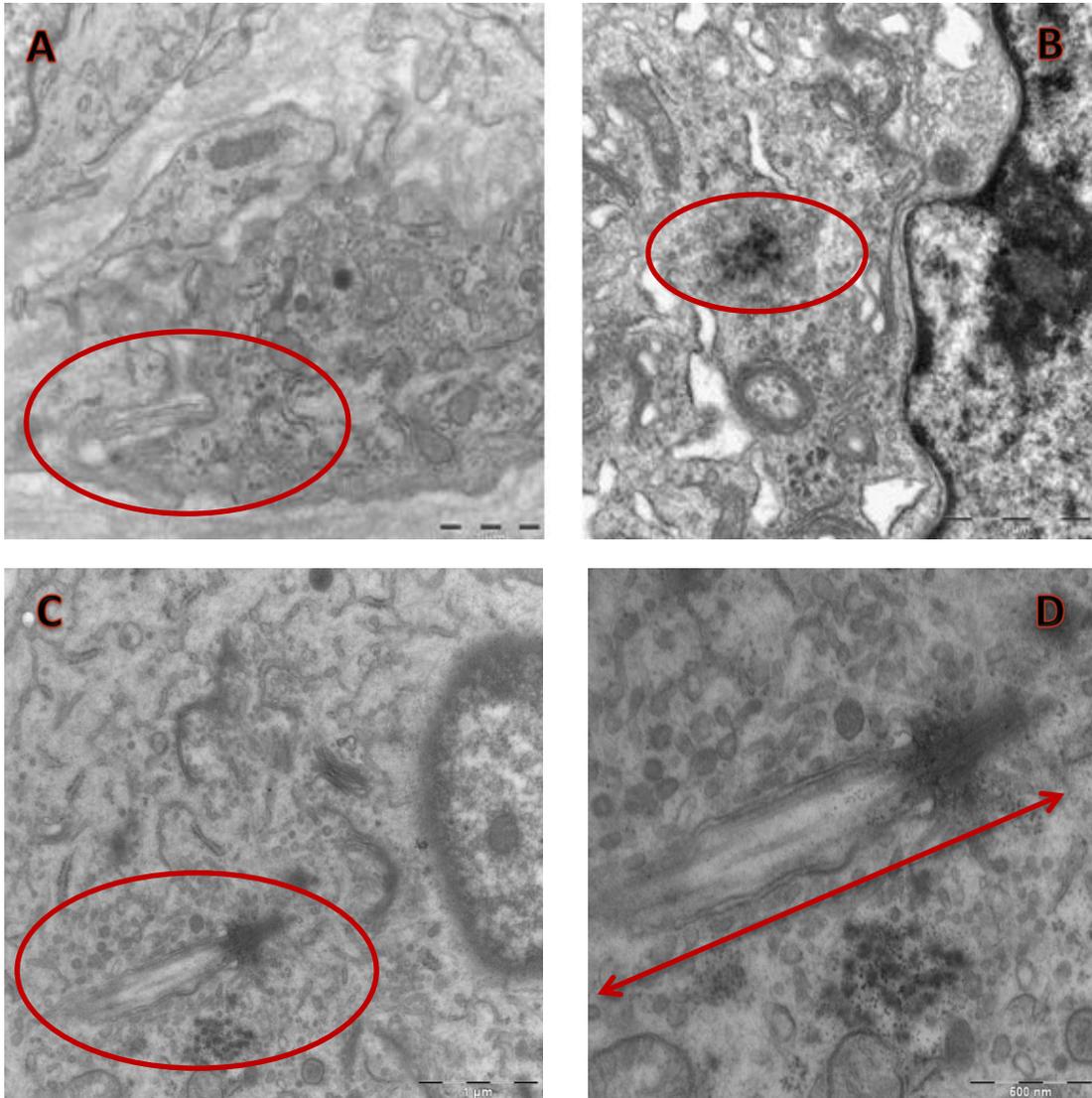


Fig. 16.- MET. (A). Cilio primario protruyendo hacia el exterior de la célula formado con sus elementos. (B). Corte transversal del centríolo madre que constituirá el cilio primario. (C) Cilio primario con sus elementos: Axonema que emerge desde el cuerpo basal. Se observa la bolsa ciliar. (D). Detalle de imagen 16(C) donde se mide el cilio primario presentando una longitud de 1-2 μm .

La otra variante tumoral del GIST está constituida por células de tipo fusiforme. Son células de morfología más alargada (Figura 17A y 17B). También establecen contacto unas con otras gracias a la existencia de prolongaciones digitiformes y desmosomas. Las características citoplasmáticas son similares a las de las células epitelioides. Sin embargo, el retículo presenta una disposición normal distinta a la disposición concéntrica que presentaban las células anteriores. También contienen cilio primario protruyendo hacia el espacio extracelular. (Figura 17C y 17D)(18)

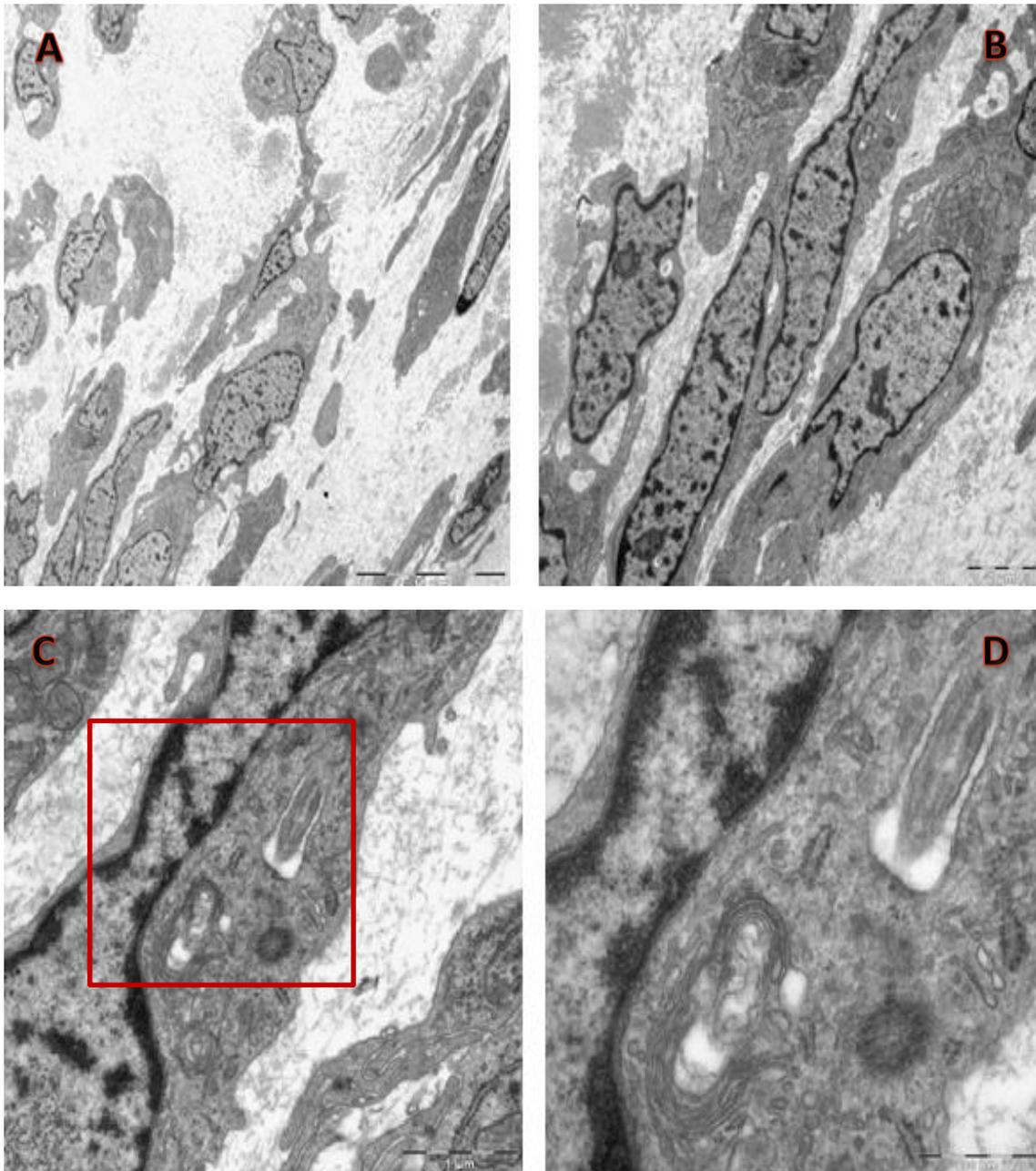


Fig. 17.- MET (A). Células fusiformes agrupadas. (B). Detalle de células fusiformes. En contacto unas con otras a través de prolongaciones citoplasmáticas. Con núcleo alargado y mayor tamaño que las células epitelioides. (C). Cilio primario localizado en periferia citoplasmática. (D). Detalle de imagen 17(C) donde se observa el cilio primario con sus elementos y el centriolo hijo en eje perpendicular.

Los resultados de esta investigación demostraron la existencia de cilio primario en células neoplásicas del GIST. También refieren que la presencia del cilio primario parece ser importante para el mantenimiento del proceso de diferenciación celular. El cilio primario necesariamente desaparece cuando la célula inicia la mitosis para poder formar el huso mitótico, motivo por el cual se piensa que la pérdida de este cilio primario en los tumores GIST puede ser determinante en el proceso de proliferación celular. (18)

5. DISCUSIÓN.

Sólo un número limitado de estudios ha examinado la expresión de los cilios primarios de células tumorales en humanos. En algunos de estos estudios se observa que en ciertos tumores, como ocurre en el carcinoma renal de células claras, se produce una disminución de la frecuencia del cilio en sus células. En las lesiones intraepiteliales pancreáticas, las células tumorales también están desprovistas de cilios primarios (14). Sin embargo, otros tumores presentan diferentes características. Por ejemplo los de sistema nervioso, que también son objeto de estudio en la actualidad. El glioblastoma es muy agresivo y es considerado el tumor maligno más frecuente en la edad adulta del sistema nervioso central. Tiene un predominio mayor en varones y su supervivencia es inferior al año o año y medio de vida. A través de técnicas inmunohistoquímicas y gracias a la microscopía electrónica se ha podido conocer la existencia del cilio primario en células neoplásicas que forman este tumor (15). En el caso del meduloblastoma encontramos tanto ausencia como presencia de cilios primarios en sus células tumorales que tienden a correlacionarse con distintas variantes anatomopatológicas del tumor. Cuando el cilio primario está presente en células del meduloblastoma, se ha observado que éste suele ser de tipo desmoplásico. Sin embargo, los meduloblastomas cuyas células neoplásicas carecen de cilio primario se asocian a la variante anaplásica, con peor pronóstico. Estos estudios plantean la idea de que la disfunción ciliar es un evento común que tiene lugar en las fases tempranas de formación de un tumor y que éste cilio puede desaparecer en etapas posteriores del desarrollo tumoral. (14)

En nuestro estudio hemos analizado la presencia del cilio primario en dos variantes tumorales y hemos constatado que esta organela presenta características diferentes en cada uno de los tumores. Hemos puesto de manifiesto que en el carcinoma urotelial la aparición del cilio primario se produce en las primeras fases del desarrollo, cuando es manifiesta una hiperplasia celular. El cilio primario sólo se encuentra en células con una localización próxima a la lámina basal. Por el contrario en los GIST el cilio primario se encuentra ampliamente distribuido y su presencia no depende de la fase de desarrollo del tumor. Existen diferencias en cuanto a la frecuencia de aparición del cilio primario en las células neoplásicas, siendo más numerosos los cilios primarios localizados en los tumores GIST que en los carcinomas uroteliales. Las características ultraestructurales de ambos tipos de cilios han sido descritas en los resultados mostrando diferencias notables en la longitud y en la proyección del axonema hacia el espacio extracelular. Los cilios tienen distintos tamaños, son mucho más pequeños los presentes en las células neoplásicas del carcinoma urotelial de vejiga con una longitud de en torno a 100-200 nm, en comparación con los de las células tumorales del GIST que presentan una longitud de 1 - 2 μm . Además el cilio primario en los tumores GIST presenta un axonema que está principalmente expuesto hacia el espacio extracelular, mientras que en los carcinomas uroteliales el axonema del cilio escasamente protruye. Por tanto, la visualización del cilio primario en las células neoplásicas es especialmente complicada, dado su reducido tamaño. Por otra parte, también difieren en cuanto a las funciones desempeñadas por el cilio en los dos tipos de tumores; en los tumores GIST el cilio primario probablemente sería un receptor de señales de proliferación

celular, mientras que los carcinomas uroteliales presentarían un cilio con funciones relacionadas con el proceso de migración celular.

A pesar de que el cilio primario es una organela celular común a las células neoplásicas, presentan diferencias significativas en cuanto a su morfología, localización, funciones y en definitiva, relativas a su comportamiento en dependencia del tumor en la que esté presente. La literatura actual considera que el cilio primario podría tener un papel relevante en el proceso de oncogénesis dado que guarda una estrecha relación con el ciclo celular y además modula vías de comunicación celular. A pesar de todo esto, es necesario continuar con la investigación de esta organela con el fin de incrementar nuestro conocimiento acerca de esta estructura. (2)

6. CONCLUSIONES.

- Con este trabajo hemos demostrado la presencia del cilio primario en células tumorales de carcinoma urotelial.
- Hemos contrastado las diferencias ultraestructurales y funcionales del cilio primario con relación a los GIST y a los carcinomas uroteliales.
- Un mayor conocimiento del cilio primario y de su comportamiento en diferentes células tumorales podrá proporcionar en el futuro una nueva diana terapéutica sobre la que poder actuar para detener el crecimiento tumoral.

7. BIBLIOGRAFÍA.

1. **Satir P., Tvorup Christensen S.** Structure and function of mammalian cilia. *Cell Biol.* 2008; 129: 687-693.
2. **Satir P., Tvorup Christensen S.** Overview of Structure and Function of Mammalian Cilia. *Annu. Rv. Physiol.* 2007; 69: 377-400.
3. **Alberts B.** *Biología molecular de la célula.* 4º ed. Barcelona: Omega. 2004; 966-967.
4. **Benmerah A.** The ciliary pocket. *Current Opinion in Cell Biol.* 2013 Feb; 25(1): 78-84.
5. **Rosenbaum J.L., Witman GB.** Intraflagellar transport. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002; 3(11): 813-25.
6. **Rohatgi R., Snell W.J.** The ciliary membrane. *Current Opinion in Cell Biology.* 2010; 22: 541-546.
7. **Alberts B.** *Biología molecular de la célula.* 4º ed. Barcelona: Omega. 2004; 984-985.
8. **Alberts B.** *Biología molecular de la célula.* 4º ed. Barcelona: Omega. 2004; 1034-1035.
9. **Irigoin F., Badano J.L.** Keeping the balance between proliferation and differentiation: the primary cilium. *Curr Genom.* 2011; 12: 285-297.
10. **Berberi N.F., O'Connor A.K., Haycraft C.J., Yoder B.K.** The primary cilium as a complex signaling center. *Curr. Biol.* 2009; 19: 526-535.
11. **Madhivanan K., Aguilar R.C.** Ciliopathies: the trafficking connection. *Traffic.* 2014; 15(10):1031-56.
12. **Farreras P., Roozman C.** *Medicina interna.* 17º ed. Barcelona. Elsevier. 2012; Vol 1: 899-900.
13. **M Fry A., Leaper M.J., Bayliss R.** The primary cilium. Guardian of organ development and homeostasis. *Organogenesis.* 2014; 10 (1): 62-68.
14. **Hassounah, N.B., Bunch, T.A., McDermott, K.M.** Molecular pathways: the role of primary cilia in cancer progression and therapeutics with a focus on Hedgehog signaling. *Clin. Cancer Res.* 2012; 18: 2429-2435.

15. **Basten S.G., Giles R.H.** Functional aspects of primary cilia in signaling, cell cycle and tumorigenesis. *Cilia*. 2013; 2: 6.
16. **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.** Detection of primary cilia in human glioblastoma. *J Neurooncol*. 2014; 117(1):15-24.
17. **Babjuka M., Oosterlinck W., Sylvester R., Kaasinend E., Böhlee A., Palou-Redortaf J., Rouprêt M.** Guía clínica del carcinoma urotelial de vejiga no músculo-invasivo de la Asociación Europea de Urología. Actualización de 2011. *Actas Urol Esp*. 2012; 36(7): 389-402.
18. **Castiella T., Muñoz G., Luesma M. J., Santander S., Soriano M., Junquera C.** Primary cilia in gastric Gastrointestinal Stromal Tumours (GISTs): an ultrastructural study. *J. Cell. Mol. Med*. 2013; 17: 844-853.

ANEXOS

Figura 1. Atlas de Histología vegetal y animal. Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Biología. Universidad de Vigo.

Figura 2. Beales P.L., Jackson P.K. *Cilia journal*. Disponible en: <http://www.ciliajournal.com/content/figures/2046-2530-1-10-1.jpg>

Figura 3. Molla-Herman A., Ghossoub R., Blisnick T., Meunier A., Serres C., Silbermann F., Emmerson C., Romeo K., Bourdoncle P., Schmitt A. et al. The ciliary pocket: an endocytic membrane domain at the base of primary and motile cilia *J. Cell Sci.* 2010; 123: 1785–1795.

Figura 4. Wikipedia. Disponible en: http://es.wikipedia.org/wiki/Transporte_intraflagelar

Figura 5. Garcia-Gonzalo F. R., Reiter, J. F. Scoring a backstage pass: mechanisms of ciliogenesis and ciliary access. *J. Cell Biol.* 2012; 197: 697-709. Disponible en: <http://jcb.rupress.org/content/197/6/697.figures-only>

Figura 6. Satir P., Tvorup Christensen S. Overview of Structure and Function of Mammalian Cilia. *Annu. Rv. Physiol.* 2007; 69: 377-400.

Figura 7. Beales P.L., Jackson P.K. *Cilia journal*. Disponible en: <http://www.ciliajournal.com/content/1/1/9/figure/F9>

Figura 8. F. Irigoien, J.L. Badano. Keeping the balance between proliferation and differentiation: the primary cilium. *Curr Genom.* 2011; 12: 285-297.

Figura 9. Quiagen. Disponible en: <https://www.quiagen.com/es/products/genes%20and%20pathways/pathway%20details.aspx?pwid=220>.

Figuras 10-20. Imágenes de microscopía electrónica pertenecientes al archivo del Grupo de investigación B-83. Durante la realización de este trabajo revisamos dos rejillas y obtuve imágenes en el MET. .