



**POLITÉCNICA**



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID**

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA**

**AGRONÓMICA, ALIMENTARIA Y DE BIOSISTEMAS**

**GRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA-BIOLOGÍA VEGETAL**

***Estudio de los receptores Notch en células perivasculares durante la angiogénesis del sistema nervioso central en *Mus musculus****

**TRABAJO FIN DE GRADO**

Autor/a: Silvia Gómez-Caro López

Tutor/a: Dra. Elena Carrió González

Cotutor/a: Dra. Henar Cuervo Grajal

**Junio de 2025**



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID**  
**Escuela Técnica Superior De**  
**Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas**

**GRADO DE BIOTECNOLOGÍA**

**ESTUDIO DE LOS RECEPTORES NOTCH EN CÉLULAS PERIVASCULARES  
DURANTE LA ANGIOGÉNESIS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL EN *MUS  
MUSCULUS***

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**Silvia Gómez-Caro López**

**MADRID, 2025**

Tutor: Elena Carrió González

Dpto de Biotecnología-Biología Vegetal

Cotutor: Henar Cuervo Grajal

Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (F.S.P.)



**TÍTULO DEL TFG- ESTUDIO DE LOS RECEPTORES NOTCH EN CÉLULAS  
PERIVASCULARES DURANTE LA ANGIOGÉNESIS DEL SISTEMA NERVIOSO  
CENTRAL EN *MUS MUSCULUS***

**Memoria presentada por SILVIA GÓMEZ-CARO LÓPEZ para la obtención del  
título de Graduado en Biotecnología por la Universidad Politécnica de Madrid**

**Fdo: Silvia Gómez-Caro López**

**VºBº Tutor y Director del TFG**

**Dra. Elena Carrió González  
Profesor Contratado Doctor  
Dpto de Biotecnología-Biología Vegetal  
ETSIAAB-Universidad Politécnica de Madrid**



**VºBº Cotutor**

**Dra. Henar Cuervo Grajal  
Investigador contratado Doctor  
Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III  
(F.S.P.)**

**Madrid 23 de junio 2025**

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, agradecer al grupo de investigación de Genética Molecular de la Angiogénesis del CNIC y, en especial, a mi tutora Henar Cuervo Grajal por darme la oportunidad de realizar en este centro mi trabajo fin de grado y por su orientación y confianza durante todo el proceso. Agradecer también a mis compañeros Rocío Fabia Serrano Blanco, Francisco José Cantero Molina y Alejandra Cordero Cantos por su infinita ayuda a lo largo de estos meses.

Gracias también a mi familia por su apoyo y cariño. Especialmente a mi madre, por escucharme en todo momento, aún sin saber qué era un pericito o una vSMC, y por acompañarme con paciencia y ánimo incluso en los días más largos.

# ÍNDICE

<b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS .....</b>	<b>1</b>
1.1. Angiogénesis en el sistema nervioso central .....	1
1.2. Células perivasculares y su papel en la vasculatura: pericitos y células del músculo liso vascular .....	3
1.3. La vía de señalización Notch: estructura, funcionamiento y relevancia vascular .....	4
1.4. Implicación de los receptores Notch en células murales y enfermedades asociadas.....	5
1.5. Justificación del estudio y objetivos.....	8
<b>CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>9</b>
<b>CAPÍTULO 3: RESULTADOS .....</b>	<b>12</b>
3.1. Alteraciones en la arquitectura vascular y densidad vascular .....	12
3.2. Modificaciones en la cobertura mural: pericitos y células del músculo liso vascular.....	15
3.3. Comparación de los efectos de la pérdida de función de Notch en retina y cerebro.....	23
<b>CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN .....</b>	<b>24</b>
<b>CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES.....</b>	<b>26</b>
<b>CAPÍTULO 6: BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>27</b>

## **LISTA DE FIGURAS**

<b><u>Figura 1:</u></b> Representación de los órganos analizados: retina y cerebro.....	1
<b><u>Figura 2:</u></b> Distribución de las células perivasculares en los vasos sanguíneos. ....	3
<b><u>Figura 3:</u></b> Esquema de activación de la vía de señalización Notch.....	5
<b><u>Figura 4:</u></b> Representación esquemática de una malformación arterio-venosa (AVM). ....	6
<b><u>Figura 5:</u></b> Esquema del diseño genético utilizado para eliminar Notch en células perivasculares...9	
<b><u>Figura 6:</u></b> Representación de las distintas regiones vasculares de la retina postnatal.....	11
<b><u>Figura 7:</u></b> Densidad vascular en el plexo capilar de retina a P6.....	13
<b><u>Figura 8:</u></b> Densidad vascular en el plexo angiogénico de retina a P6.....	13
<b><u>Figura 9:</u></b> Diámetro vascular en el plexo capilar y angiogénico de retina a P6. ....	14
<b><u>Figura 10:</u></b> Diámetro vascular en arterias y venas de retina a P6. ....	15
<b><u>Figura 11:</u></b> Células perivasculares recombinadas en el plexo capilar de retina a P6 .....	16
<b><u>Figura 12:</u></b> Células perivasculares recombinadas en el plexo angiogénico de retina a P6 .....	17
<b><u>Figura 13:</u></b> Cobertura perivascular en el plexo capilar de retina a P6.....	18
<b><u>Figura 14:</u></b> Cobertura perivascular en el plexo angiogénico de retina a P6.....	18
<b><u>Figura 15:</u></b> Expresión de $\alpha$ -SMA en las arterias de la retina a P6.....	19
<b><u>Figura 16:</u></b> Expresión de $\alpha$ -SMA en las venas de la retina a P6. ....	20
<b><u>Figura 17:</u></b> Células perivasculares recombinadas en la corteza cerebral a P14. ....	21
<b><u>Figura 18:</u></b> Cobertura perivascular en la corteza cerebral a P14.....	22
<b><u>Figura 19:</u></b> Expresión de $\alpha$ -SMA en las arterias de la corteza cerebral a P14. ....	23

## **LISTA DE SÍMBOLOS**

<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>%</b>	Porcentaje
<b>n</b>	Número de réplicas
<b>p</b>	Valor de significancia estadística
<b>P6/P14</b>	Día postnatal 6/14

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

- $\alpha$ -SMA** Actina  $\alpha$  del músculo liso
- AVM** Malformación arteriovenosa
- BBB** Barrera hematoencefálica
- CD13** Aminopeptidasa N, marcador de pericitos
- CNS** Sistema nervioso central
- CreERT2** Recombinasa Cre fusionada a un receptor de estrógenos modificado
- Dll** Delta-like ligand (familia de ligandos Notch)
- FITC** Isotiocianato de fluoresceína
- HIF-1 $\alpha$**  Factor inducible por hipoxia 1 alfa
- iSuRe-HadCre** Sistema de recombinación genética con reporte fluorescente
- NICD** Dominio intracelular de Notch
- NG2** Condroitín sulfato proteoglicano 4, marcador de pericitos
- P6 / P14** Día postnatal 6 / 14
- PBS** Tampón fosfato salino
- PDGF-B** Factor de crecimiento derivado de plaquetas B
- PDGFR $\beta$**  Receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas
- RBPJ** Proteína de unión a señal de recombinación J kappa
- tdTomato** Proteína fluorescente roja
- VEGF-A** Factor de crecimiento endotelial vascular A
- vSMCs** Células del músculo liso vascular (Vascular Smooth Muscle Cells)

## **ABSTRACT**

The vascular development in the central nervous system (CNS) depends on a tightly regulated interaction between endothelial and perivascular cells. Perivascular cells, also known as mural cells, including pericytes and vascular smooth muscle cells (vSMCs), provide structural support and regulate blood flow. Among the different signalling pathways involved in the process, Notch pathway plays an important role in this cell-to-cell communication, acting as a key regulator in cell differentiation, vascular organization and stability. The main purpose of this study was to evaluate the effects of perivascular Notch receptor loss on vascular structure in the CNS, analyse how the loss of Notch 1, Notch 2 and Notch 3 influence pericyte coverage and vSMC identity and to compare the phenotypic outcomes of the different Notch knock-outs combinations.

For this purpose, the retina and the brain cortex of *Mus musculus* were analysed. Each organ was examined at different postnatal stages to ensure the optimal stage for vessel formation analysis: The retina at postnatal day 6 (P6) and the cerebral cortex at day 14 (P14). The deletion of Notch receptors in perivascular cells was achieved using the genetic Cre-LoxP system. The Cre-recombinase was expressed under the PDGFR $\beta$  promoter and was inducible by 4OH-Tamoxifen (PDGFR $\beta$ -P2A-CreERT), combined with the iSuRe-HadCre reporter system, which includes tdTomato as a fluorescent reporter for recombination.

The results show a central role of Notch 1 and Notch 3 in pericyte development and the contribution of Notch 1, Notch 2 and Notch 3 in vascular smooth muscle cell (vSMC) identity, particularly in arteries. No significant changes were observed in de vascular density or diameter. The results and defects observed in the different genotypes were due to a target disruption in perivascular cells rather than secondary alterations due to defects in the vasculature.

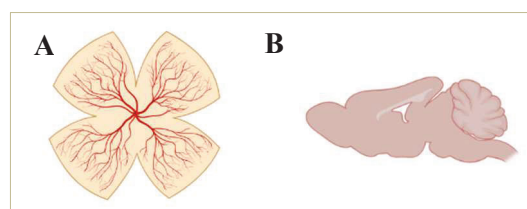
# CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

## 1.1. Angiogénesis en el sistema nervioso central

La angiogénesis es el proceso fisiológico implicado en la formación de los vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, mediante la proliferación, migración y diferenciación de las células endoteliales que conforman el sistema cardiovascular (Betsholtz, 2018). La vasculatura está compuesta principalmente por células endoteliales y células murales, entre las cuales encontramos los pericitos y las células del músculo liso vascular (vSMCs) (Liu et al., 2009). Los pericitos, están embebidos en una matriz extracelular donde interactúan y se coordinan con las células endoteliales mediante distintas señales.

En modelos murinos, la vascularización del cerebro comienza en la etapa embrionaria, alrededor de E7.5 en la región ventral del tubo neural. Posteriormente, alrededor de E9.5, los capilares siguen desarrollándose por el neuroepitelio, guiados por un gradiente de factores de crecimiento como VEGF. (Vallon et al., 2014). En estadios como P14, el cerebro es un modelo relevante para estudiar la angiogénesis debido a su maduración vascular y estabilización.

En la retina, el proceso ocurre de forma postnatal, siguiendo un patrón bien definido y concéntrico que comienza en el nervio óptico y progresa hacia la periferia, constituyendo un modelo ampliamente utilizado para el estudio de la angiogénesis. En el desarrollo, los vasos nacientes del nervio óptico van proliferando y creando una red bidimensional hasta su completa maduración alrededor de la tercera semana postnatal (Betsholtz, 2018). El desarrollo sigue una conformación radial con venas y arterias intercaladas y con la diferenciación temprana de dos plexos: El plexo capilar, más cercano al nervio óptico y el primero en desarrollarse y el plexo angiogénico donde la red vascular está en desarrollo (Betsholtz, 2018).



**Figura 1:** Representación de los órganos analizados: retina y cerebro. **A.** Análisis vascular en retina (P6). **B** Análisis vascular en la corteza cerebral (P14).

En ambos casos, la angiogénesis está estrechamente regulada por señales moleculares y celulares que aseguran la correcta formación de las distintas redes vasculares adaptadas a las necesidades fisiológicas y metabólicas de cada tejido.

Uno de los principales reguladores de este proceso es el factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A). Su expresión, está regulada a nivel transcripcional por diversas señales, entre las cuales, destaca la hipoxia, siendo una señal clave del ambiente y actuando a través del factor de transcripción HIF-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor 1 alpha) (Benedito et al., 2009). VEGF activa receptores presentes en las células endoteliales, activando cascadas intracelulares que promueven su supervivencia, proliferación, aumento de la permeabilidad y migración dirigida hacia el gradiente de VEGF (Rattner et al., 2019). En el cerebro, durante las etapas embrionarias, VEGF-A guía el crecimiento de los brotes vasculares desde el plexo perineural hacia el neuroepitelio, mientras que, en la retina, durante las etapas postnatales, el gradiente se establece desde el nervio óptico hacia la periferia. (Vallon et al., 2014)

Además de VEGF-A, diversas señales moleculares ayudan a coordinar la angiogénesis en el sistema nervioso central. Entre ellas, destaca la vía de señalización Notch que actúa como un regulador clave en este proceso. Por otro lado, la vía TGF- $\beta$  interviene tanto en la diferenciación como en la proliferación de las células perivasculares (Baeten & Lilly, 2017).

En este contexto, el factor de crecimiento derivado de plaquetas B (PDGF-B) es secretado desde las células endoteliales angiogénicas hasta su unión a los receptores PDGFR  $\beta$  de la superficie de los pericitos y de las células del músculo liso vascular en desarrollo, promoviendo su migración y proliferación hacia los nuevos brotes vasculares. (Baeten & Lilly, 2017)

Numerosos estudios han demostrado que la pérdida de señalización mediada por PDGF-B/PDGFR- $\beta$ , por ejemplo por mutaciones knock-out en el mismo gen, conducen a una deficiencia de cobertura de pericitos en los capilares (Betsholtz, 2018). Esta deficiencia se asocia a dos características: una pérdida en el control del diámetro capilar, que se vuelve irregular y dilatado, y un aumento de la permeabilidad vascular que da lugar a la formación de edemas.

Tras la fase inicial de crecimiento, los vasos recién formados pasan por un proceso de maduración en el que se refuerzan y consolidan las uniones celulares y las uniones entre las células endoteliales y las células murales. El proceso de maduración es especialmente relevante en el sistema nervioso central ya que alteraciones en cualquiera de las etapas del proceso angiogénico pueden tener consecuencias significativas y desembocar en enfermedades vasculares graves. En el cerebro, defectos en la angiogénesis contribuyen a la aparición de patologías como el ictus isquémico, el ictus hemorrágico o los accidentes isquémicos transitorios (Betsholtz, 2018), mientras que en la retina se ha asociado a patologías como la retinopatía diabética o la degeneración macular relacionada con la

edad (Armulik et al., 2011). Por estos motivos, comprender los mecanismos que regulan el proceso angiogénico es fundamental no solo para profundizar en el conocimiento del desarrollo vascular, sino también para el diseño de estrategias terapéuticas dirigidas a la prevención y tratamiento de estas patologías.

## 1.2. Células perivasculares y su papel en la vasculatura: pericitos y VSMCs

Aunque los pericitos y las células del músculo liso vascular (vSMCs) se agrupan dentro del término de células perivasculares, ambos tipos presentan diferencias morfológicas y funcionales dentro de la red vascular. Las células del músculo liso vascular se encuentran principalmente rodeando las arterias, formando capas de células contráctiles que regulan el flujo sanguíneo y tono vascular (Baeten & Lilly, 2017). En cambio, los pericitos se encuentran mayoritariamente en capilares y venas (Armulik et al., 2011), regulando funciones como la permeabilidad vascular, el diámetro capilar y en la formación de la barrera hematoencefálica.(Cai et al., 2016)

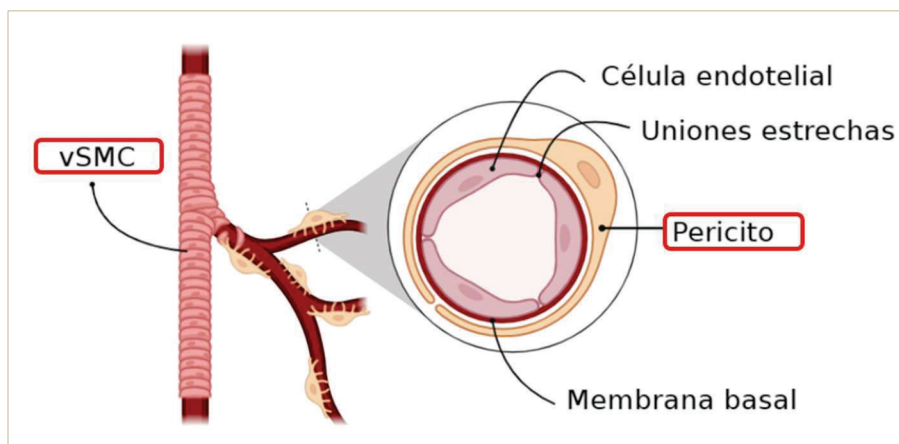


Figura 2: Distribución de las células perivasculares en los vasos sanguíneos. Representación de las células del músculo liso vascular (vSMC) alrededor de la arteria y de los pericitos en los capilares.

A pesar de compartir ciertos marcadores, como PDGFR- $\beta$  o NG2, ambas células siguen programas de diferenciación distintos y responden a señales específicas según su contexto fisiológico. Cabe destacar que la identificación experimental de los pericitos sigue siendo un reto hoy en día ya que no existe un marcador único y específico para este grupo celular. Su detección suele estar basada en la combinación de ciertos marcadores junto con criterios morfológicos y diferentes tinciones. Entre los marcadores más utilizados, se encuentran PDGFR- $\beta$ , NG2, CD13, y desmina (Armulik et al., 2011). Por otro lado, encontramos el marcador de la  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), que constituye uno de los marcadores más representativos para identificar células del músculo liso vascular, debido a su expresión estable en condiciones fisiológicas.

Las células murales cumplen funciones esenciales para el correcto funcionamiento de toda la vasculatura. Estas funciones son especialmente relevantes en el sistema nervioso central, donde la vasculatura presenta la mayor densidad de pericitos de todos los órganos. En este tejido, aunque existe una relación de una a tres células endoteliales por cada pericito, estos recubren una proporción muy elevada de la superficie capilar (Armulik et al., 2011).

Esta elevada densidad se asocia a funciones especializadas, como el mantenimiento de la estabilidad vascular, la regulación de la permeabilidad y, especialmente, la formación de la barrera hematoencefálica (Blood Brain Barrier, BBB) (Armulik et al., 2010). Esta última constituye una estructura clave en el control del intercambio molecular entre la sangre y el tejido cerebral, y su correcto funcionamiento depende en gran medida de la interacción funcional entre los pericitos y las células endoteliales. Esta función especializada está estrechamente relacionada con la complejidad del entorno celular del sistema nervioso central, donde los vasos sanguíneos se encuentran en estrecho contacto no solo con células vasculares, sino también con astrocitos, microglía y neuronas, que participan activamente en la regulación del ambiente cerebrovascular (Cai et al., 2016).

### **1.3. La vía de señalización Notch: estructura, funcionamiento y relevancia vascular**

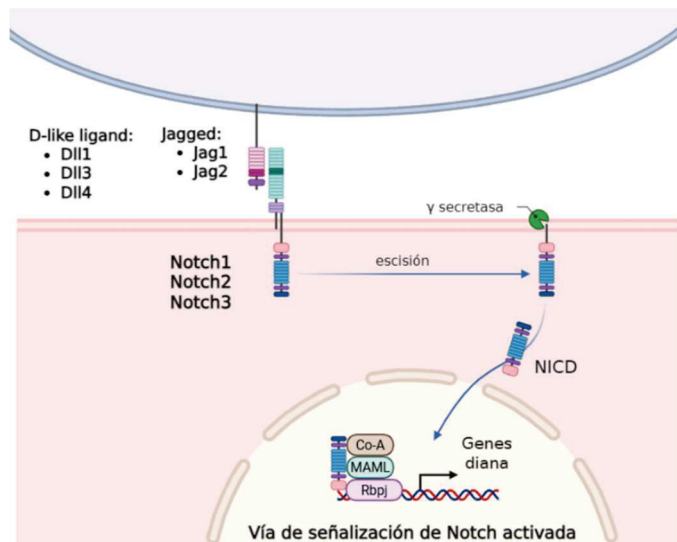
Entre las distintas vías de señalización que regulan el desarrollo angiogénico, la vía Notch tiene especial relevancia por su papel en la comunicación intercelular durante la formación y maduración de la red vascular.

La vía de señalización de Notch, originalmente descubierta en *Drosophila melanogaster*, (Morgan, 1917) es una vía altamente conservada entre especies, esencial durante el desarrollo embrionario. Una de sus funciones principales es la regulación de distintos procesos fisiológicos. Su importancia reside en el desarrollo y funcionalidad de la red vascular, donde participa activamente en: La interacción entre células endoteliales y perivasculares, la especialización de arterias y venas y la organización del patrón vascular (Xiao et al., 2009).

La vía de señalización canónica de Notch se basa en la interacción de un ligando con un receptor anclado en la membrana de células adyacentes. Esta interacción resulta en la escisión del dominio intracelular de Notch (Notch Intracellular Domain, NICD) el cuál, una vez translocado en el núcleo, actuará como un cofactor transcripcional. A diferencia de otras vías de señalización, la vía canónica de Notch no depende de segundos mensajeros intracelulares ni de cascadas enzimáticas complejas. Su activación se basa en interacciones célula-célula y en un procesamiento proteolítico que permite

una respuesta transcripcional directa, rápida y altamente dependiente del contexto celular (Kopan & Ilagan, 2009).

En mamíferos hay cuatro receptores Notch (1-4) y cinco ligandos transmembrana (Jagged 1, Jagged 2, Delta-like 1, Delta-like 3 y Delta-like 4). El mecanismo de señalización se inicia mediante la interacción del ligando con el receptor, lo cual induce una serie de eventos proteolíticos que resultan en la liberación del NICD, permitiendo su translocación al núcleo. Allí, NICD se une al factor de transcripción RBPJ (Recombination signal Binding Protein for immunoglobulin kappa J region), estimulando el reclutamiento de otros coactivadores transcripcionales, entre ellos, las proteínas Matermind-Like (MAML). Todo el complejo (NICD–RBPJ–MAML) se une al ADN y promueve la transcripción de los genes dianas de Notch. entre los que destacan la familia de genes Hes y Hey, claves en la regulación de la diferenciación endotelial y el mantenimiento de la vasculatura (Baeten & Lilly, 2017).

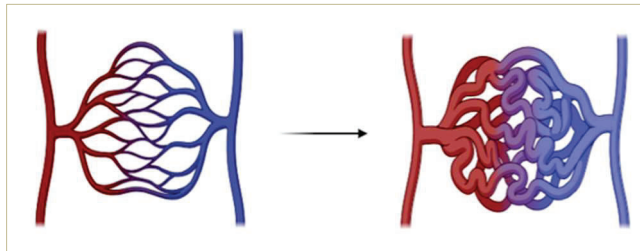


**Figura 3:** Esquema de activación de la vía de señalización Notch. La interacción de los ligandos de la familia Delta-like (Dll1, Dll3, Dll4) o Jagged (Jag1, Jag2) con los receptores Notch 1, Notch 2 o Notch 3, desencadena la escisión del dominio intracelular de Notch (NICD). Tras su translocación al núcleo, el NICD forma un complejo transcripcional con Rbpj, MAML y coactivadores (Co-A) que activa los genes diana implicados en esta vía.

## 1.4. Implicación de los receptores Notch en células murales y enfermedades asociadas

El papel de los distintos receptores Notch en las células del músculo liso vascular y pericitos, ha sido abordado de forma individual y combinada en diversos estudios, revelando funciones tanto complementarias entre sí como divergentes. Cabe destacar que disfunciones en estas vías de

señalización se han vinculado a diversas enfermedades humanas como las malformaciones arterio-venosas (AVMs) (Solomon & Connolly, 2017), la arteriopatía CADASIL (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy) o el ductus arterioso persistente (DAP).



**Figura 4:** Representación esquemática de una malformación arterio-venosa (AVM). La imagen muestra la transición de una red capilar normal, con una conexión progresiva entre las arterias y las venas hacia una red vascular alterada y anómala, característica de una AVM.

### **Notch1 y Notch3 en la diferenciación y función de los pericitos**

En pericitos, se ha descrito la expresión de los receptores Notch 1 y Notch 3, al igual que algunos niveles de Notch 2. Aunque la función de Notch en pericitos no está tan ampliamente caracterizada como en las células del músculo liso vascular, existen evidencias que respaldan el papel clave de Notch en el desarrollo de estas células. Esta señalización también se ha asociado con la prevención de anomalías en la morfología y arquitectura vascular (Nadeem et al., 2020). En modelos murinos con deficiencias combinadas de Notch 1 y Notch 3, se han observado malformaciones arteriovenosas (AVMs) en la retina. Estas malformaciones están caracterizadas por uniones anómalas entre las arterias y las venas donde los capilares adquieren formas irregulares y disfuncionales (Kofler et al., 2015). Estos hallazgos refuerzan la idea de la implicación clave de Notch en la interacción de los distintos tipos de células murales (Kofler et al., 2015).

Estudios en modelos murinos con deficiencia combinada de Notch 1 y 3 han demostrado, además, una disminución en la cobertura pericitaria en la vasculatura de la retina, lo cual indica una pérdida de función de la estabilidad que aportan las células murales (Kofler et al., 2015).

Por otro lado, alteraciones en la función de Notch 3 han sido relacionadas con CADASIL (Arteriopatía Cerebral Autosómica Dominante con Infartos Subcorticales y Leucoencefalopatía), una enfermedad genética autosómica dominante caracterizada por deterioro cognitivo progresivo, episodios isquémicos y acumulación de material granular osmiófilo (GOM) (Baeten & Lilly, 2017).

Si bien es cierto que este fenotipo se ha observado en ratones con genotipos Notch1+/-; Notch3-/-, esta patología no se ha observado presente en ratones con pérdida exclusiva de Notch 3, lo cual sugiere que Notch 1 puede compensar parcialmente la ausencia del Notch 3 en determinados

contextos biológicos. (Kofler et al., 2015)

### **Notch2 y Notch3 en la diferenciación y maduración de vSMCs**

En las células del músculo liso vascular (vSMCs), los receptores Notch 2 y Notch 3 desempeñan funciones complementarias durante el desarrollo. Ambos receptores promueven la diferenciación de estas células en el proceso angiogénico (Baeten & Lilly, 2015). Estudios con mutaciones combinadas en ambos receptores conllevan a defectos cardiovasculares severos debido a la falta de diferenciación de estas células (Baeten et al., 2015). Además, cuando hay una pérdida conjunta de ambos genes, esto deriva en hemorragias, en el colapso de los vasos sanguíneos, y en letalidad embrionaria (Baeten et al., 2015). Al estudiar su función por separado se ha observado que la pérdida de Notch2 retrasa ligeramente la diferenciación, aunque la presencia de Notch3 puede mantener la integridad vascular. Por el contrario, en ausencia de Notch3, la expresión de Notch2 es suficiente para iniciar el proceso de diferenciación, pero no para completar las etapas finales de maduración mural. (Wang et al., 2012)

También tiene importancia en la contracción funcional de los vasos sanguíneos. En particular, la pérdida combinada de Notch 2 y Notch 3 ha sido asociada con el desarrollo de la patología de ductus arterioso persistente (DAP). Este conducto, que conecta la arteria pulmonar con la aorta, es transitorio en el feto y es el responsable de desviar la sangre de los pulmones fetales. Tras el nacimiento, el ducto se cierra, pero en este tipo de patologías el cierre no se completa adecuadamente, generando esta malformación cardiovascular (Baeten et al., 2015).

En conjunto estos datos destacan la importancia de los receptores Notch 2 y Notch 3 no solo en las primeras fases de diferenciación sino en la maduración completa y funcional de las células del músculo liso vascular. Las funciones complementarias de ambos receptores permiten mantener la integridad de las paredes vasculares.

### **Notch1, Notch2 y Notch3: Consecuencias de su pérdida total**

Un estudio llevado a cabo en ratones con 6 semanas demostró el papel clave de los receptores Notch para el correcto desarrollo vascular. Para eliminar la funcionalidad completa de todos los receptores Notch se realizó una delección específica del factor de transcripción Rbpj, proteína clave del complejo de transcripción de Notch. Esta eliminación, equiparable a la pérdida de los todos los receptores Notch, mostró una pérdida significativa en la cobertura de pericitos y de células del músculo liso vascular, un ensanchamiento en el diámetro de las venas y la aparición de malformaciones arteriovenosas (Nadeem et al., 2020)

## **1.5. Justificación del estudio y objetivos**

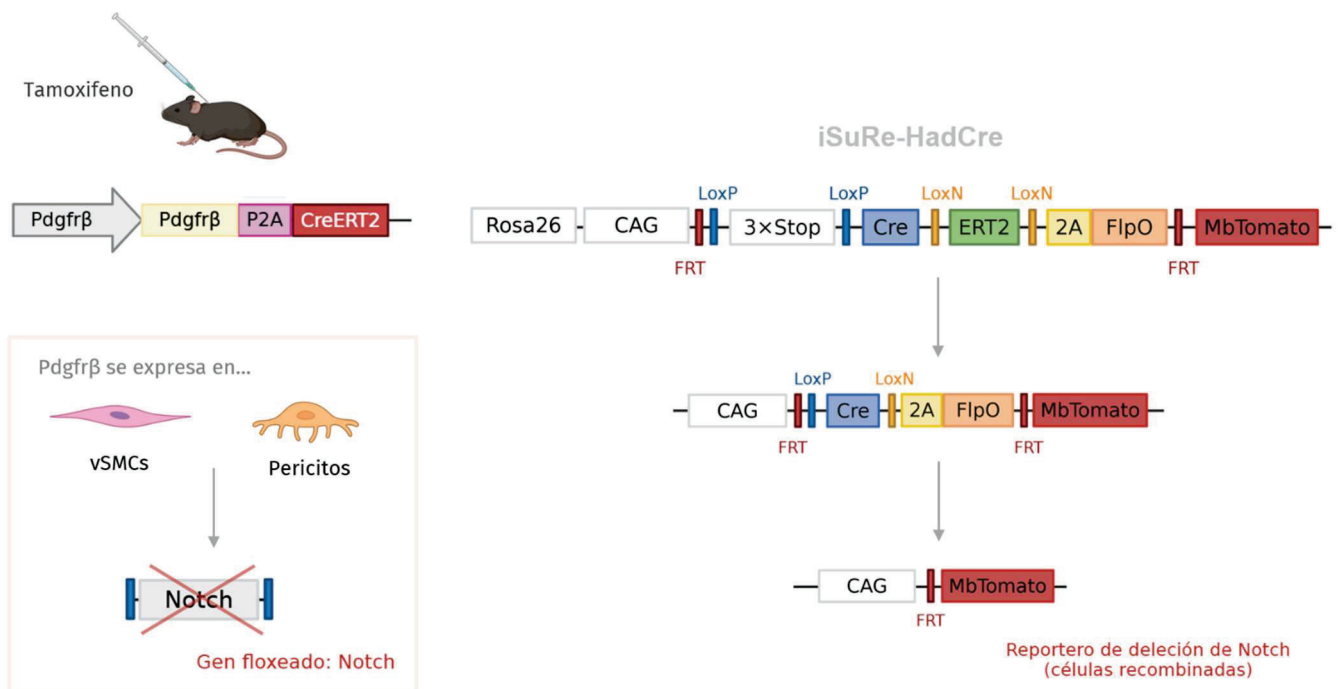
Este trabajo tiene como objetivo evaluar en modelos murinos, en la retina y en el cerebro, en distintos estadios postnatales (P6 y P14) las consecuencias de la pérdida de función de los receptores Notch 1, Notch 2 y Notch 3 en células perivasculares. En los estudios previos, se ha demostrado la importancia que tiene Notch 1 y Notch 3 para los pericitos y Notch 2 y Notch 3 para las células del músculo liso vascular (vSMCs). Sin embargo, aunque ya sabemos parte de la contribución de los distintos receptores de Notch a las distintas poblaciones perivasculares, todavía no se ha contemplado el papel que puede tener Notch 2 en los pericitos ni Notch 1 en las células vasculares del músculo liso. Por estas razones, este trabajo incluye un estudio exhaustivo de las distintas contribuciones de los receptores Notch a las diferentes células perivasculares.

Además, se analiza su impacto sobre la arquitectura y la densidad vascular, así como sobre el diámetro de los vasos sanguíneos y se busca caracterizar las alteraciones en pericitos y vSMCs asociadas a la disrupción de esta vía, con el objetivo de entender el papel específico que desempeña cada uno de los receptores Notch en la regulación y el mantenimiento de las células perivasculares.

## CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

### Líneas genéticas utilizadas

El estudio se llevó a cabo con ratones *Mus Musculus*. Las líneas genéticas utilizadas fueron: PDGFR $\beta$ -P2A-CreERT2 (Cuervo et al., 2017), que permite la expresión inducible por 4OH-Tamoxifeno de la recombinasa Cre en células perivasculares, cruzados con ratones iSuRe-HadCre, una línea modificada que contiene en el locus Rosa26 un casete con CreERT2, FlpO y el gen reportero fluorescente MbTomato. Esta herramienta genética, basada en el sistema Cre-LoxP, con ayuda del constructo genético de iSuRe-HadCre (García-González et al., 2024) permite que las células que han recombinado, y, por tanto, han eliminado de forma eficaz el gen floxeado, expresen una fluorescencia roja de forma estable. En este estudio, los genes floxeados corresponden a los receptores Notch 1, Notch 2 y Notch 3 según el grupo experimental.



**Figura 5:** Esquema del diseño genético utilizado para eliminar Notch en células perivasculares. Se representan las líneas PDGFR $\beta$ -P2A-CreERT2 e iSuRe-HadCre utilizadas en el modelo experimental, activadas mediante la administración de tamoxifeno.

La recombinación se indujo mediante la administración intraperitoneal de 4OH-tamoxifeno (25  $\mu$ L) en el primer día postnatal (P1). Para el estudio, fueron sacrificados a P6 para el análisis de retina y a P14 para el análisis cerebral. Se incluyeron los ratones de ambos sexos en todos los grupos experimentales, sin realizar distinción por sexo en el análisis.

### **Procesamiento de las muestras de retina**

Para los ojos, después de su extracción se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4% durante 25 minutos. Tras la fijación, se lavaron en PBS 1× y se procedió a la disección para extraer las retinas, que fueron cortadas en forma de flor para su análisis. Las retinas se fijaron nuevamente en PFA al 4% durante 35 minutos a 4°C, se lavaron con PBS 1× durante 5 minutos y, a continuación, se inició el protocolo de inmunotinción.

Se inició con una solución de bloqueo con FBS 3%+ Suero normal (Donkey Serum) 3% + PBS-Triton X-100 0,3% durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras el bloqueo, se incubó toda la noche a 4°C en agitación con Isolectina B4 (1:100) y con los anticuerpos primarios: anti smooth muscle actin-FITC (1:200), Rabbit anti-Ng2(1:500) diluidos en la misma solución de bloqueo. Al día siguiente, las retinas se lavaron cuatro veces durante 20 minutos con la solución de bloqueo diluida a la mitad con PBS 1×. Posteriormente, se incubaron con Estreptavidina Alexa405 (1:200) y con el anticuerpo secundario Donkey Anti-Rabbit IgG Alexa680 (1:400) diluidos en la misma solución durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalizada la incubación, las retinas fueron lavadas con PBS-Tritón X-100 0,15% tres veces durante 10 minutos y con PBS 1× durante 15 minutos. Las muestras se montaron con medio Fluoromount y se almacenaron a 4°C hasta su análisis.

### **Procesamiento de las muestras de cerebro**

Para los cerebros, una vez extraídos, se fijaron en PFA al 4% durante toda la noche a 4°C. A continuación, se incubaron en una solución de sacarosa al 30% con azida sódica (NaN<sub>3</sub>) durante 48 horas a 4°C para su crio protección. Posteriormente, los cerebros se congelaron en isopentano conservado a -80°C y se seccionaron en cortes sagitales de 40 µm de grosor utilizando un microtomo de congelación LEICA SM2010R. Los cortes se almacenaron a -20°C en una solución anticongelante hasta el procesamiento mediante inmunofluorescencia.

Para la inmunotinción los cortes sagitales del cerebro se lavaron con PBS 1× y se permeabilizaron y bloquearon con PBS-Triton X-100 0,3% + BSA 1% + Suero normal (Donkey Serum) 3% durante 2 horas en agitación a temperatura ambiente. La Lectina de tomate (1:150) y los anticuerpos primarios: anti smooth muscle actin-FITC (1:200), Rat anti-mouse CD13 (1:200) fueron diluidos en PBS-Triton X-100 0,3% + BSA 5% a 4°C en agitación durante toda la noche. Siguiendo la tinción con los anticuerpos primarios, los cortes sagitales fueron incubados con Estreptavidina Alexa405 (1:200) y con el anticuerpo secundario Donkey Anti-Rat IgG Alexa680 (1:400) diluidos en PBS-Triton X-100 0,3% + BSA 5%. durante dos horas en agitación a temperatura ambiente. Finalmente,

los cortes fueron lavados dos veces con PBS-Triton X-100 0,3% en agitación a temperatura ambiente durante 10 minutos y con PBS 1× otros diez minutos en agitación a temperatura ambiente. Tras la tinción, los cortes se montaron con medio de montaje Fluoromount a un portaobjetos. Las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente y se almacenaron a 4°C hasta su análisis.

### **Adquisición de imágenes, análisis y cuantificación de parámetros**

Las imágenes fueron obtenidas con un objetivo 10× y capturadas mediante el microscopio confocal Leica SP8 con módulo de navegación. Finalmente, las imágenes capturadas se analizaron utilizando el software FIJI. Los parámetros vasculares analizados fueron: la densidad vascular, el porcentaje de cobertura perivascular, el diámetro de los vasos, el porcentaje de recombinación y la expresión de  $\alpha$ -SMA. Las mediciones se realizaron en regiones específicas de la retina (plexo capilar y angiogénico, arterias y venas) y, en el caso del cerebro, en la corteza cerebral.

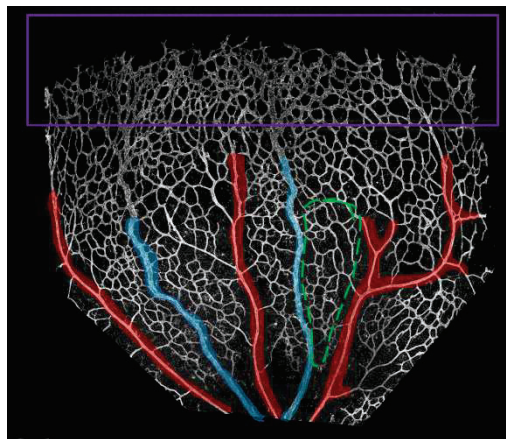


Figura 6: Representación de las distintas regiones vasculares de la retina postnatal. Arterias identificadas en rojo, venas en azul, plexo capilar delimitado en verde y plexo angiogénico delimitado en morado.

Las imágenes fueron creadas con BioRender.com. Los datos fueron representados mediante el programa estadístico GraphPad Prism. Las comparaciones entre los distintos grupos experimentales se realizaron mediante un one-way ANOVA, seguido de un post test de Bonferroni para las comparaciones múltiples. Para las comparaciones entre el grupo control y otro grupo se empleó el Student t-test. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas aquellas con valores de  $p < 0,05$ .

## CAPÍTULO 3: RESULTADOS

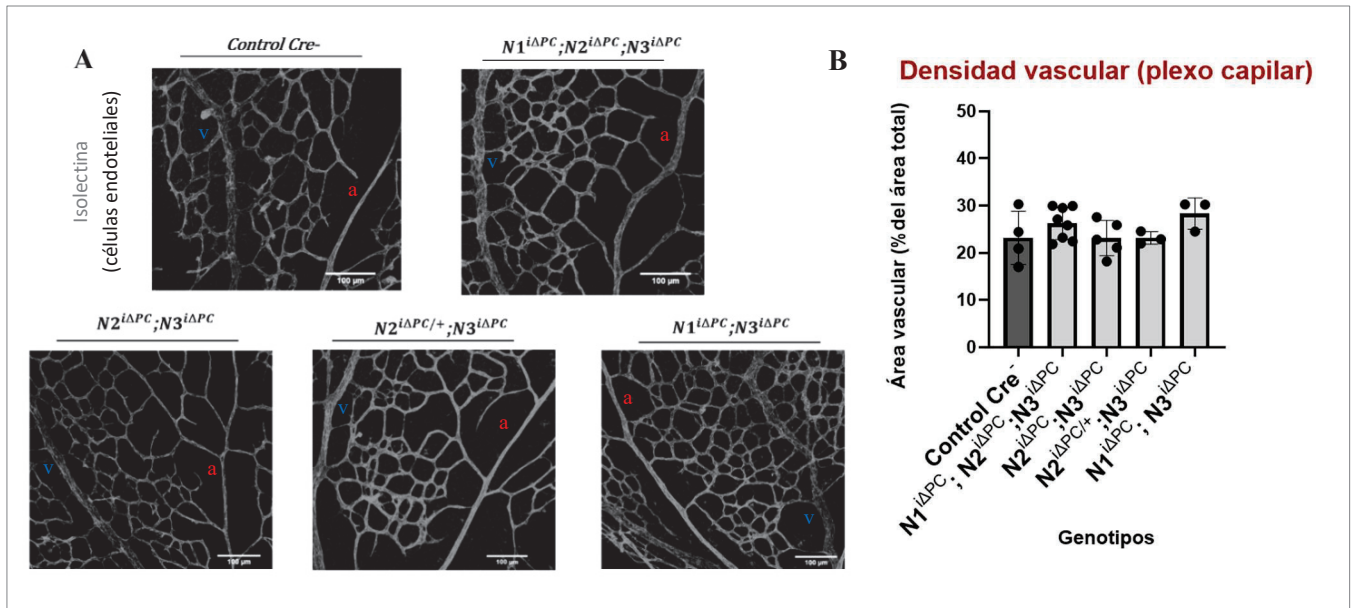
### 3.1 Alteraciones en la arquitectura vascular y densidad capilar

Estudios previos eliminando Notch en pericitos describen pérdida de células perivasculares y alteraciones en la arquitectura vascular y densidad capilar. Con el objetivo de evaluar posibles alteraciones en la arquitectura y densidad vascular debidas a la pérdida de función de los receptores Notch se analizaron muestras de retina a P6, centrándose en la densidad capilar de los plexos capilar y angiogénico y en el diámetro vascular de las arterias, de las venas y de ambos plexos. Estos parámetros fueron evaluados mediante la tinción con Isolectina, que, gracias a su capacidad de marcar células endoteliales, permite la visualización de la red vascular.

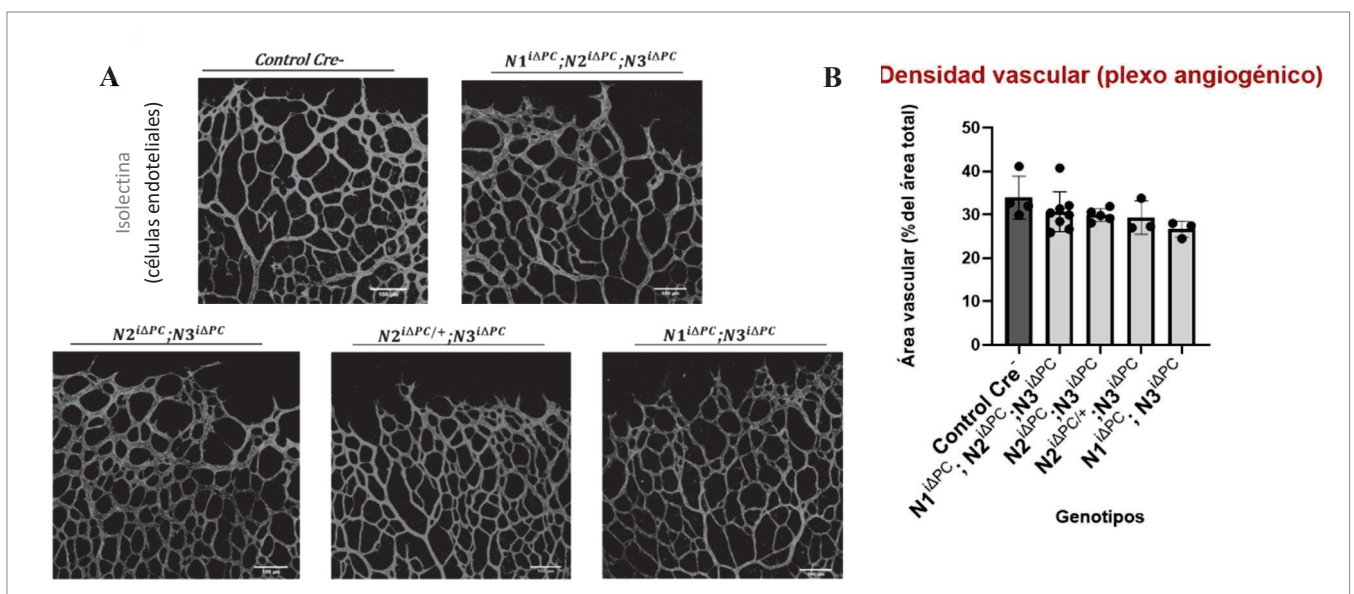
#### Análisis de parámetros en retina

##### La pérdida de Notch en células perivasculares no altera la densidad vascular del plexo capilar ni del plexo angiogénico

Al P6, en la retina, el plexo capilar representa formación y maduración de los capilares y su análisis esta más asociado con etapas tardías del desarrollo vascular. Por otro lado, el estudio del plexo angiogénico, todavía inmaduro, nos da información de las posibles alteraciones que ocurren en el desarrollo vascular más temprano de este estado postnatal, P6. La densidad vascular se cuantificó como el porcentaje de área vascular sobre el área total analizada mediante la tinción de Isolectina. La cuantificación del plexo capilar, observada en la Figura 7, no mostró diferencias significativas entre el grupo control Cre- y los distintos grupos con combinaciones de pérdida de función de Notch y la arquitectura vascular se mantuvo conservada en todos los grupos. En el plexo angiogénico, Figura 8, se observó una pequeña tendencia progresiva de reducción del área vascular en los grupos con Notch con pérdida de función. Esta disminución, aunque no es significativa, se puede observar ligeramente en las imágenes como el grupo con  $N1^{iAPC};N3^{iAPC}$  tiene una vasculatura menos densa aparente en comparación con la del grupo control.



**Figura 7:** Densidad vascular en el plexo capilar de retina a P6. **A.** Imágenes representativas del plexo capilar teñido con Isolectina en los distintos genotipos analizados. La barra de escala corresponde a 100μm. Imágenes de microscopía confocal adquiridas empleando el objetivo 10× a=arteria v=vena **B.** Cuantificación del área vascular (% respecto del área total) en el plexo capilar. La gráfica de barras representa el valor de la media y de la desviación estándar. Cada punto representa un animal analizado.



**Figura 8:** Densidad vascular en el plexo angiogénico de retina a P6. **A.** Imágenes representativas del plexo angiogénico teñido con Isolectina en los distintos genotipos analizados. La barra de escala corresponde a 100μm. Imágenes de microscopía confocal adquiridas empleando el objetivo 10× **B.** Cuantificación del área vascular (% respecto del área total) en el plexo angiogénico. La gráfica de barras representa el valor de la media y de la desviación estándar. Cada punto representa un animal analizado.

La pérdida de los receptores de Notch en células perivasculares no conduce a alteraciones en el diámetro de los plexos capilar o angiogénico

Para estudiar posibles dilataciones ocurridas en la red vascular debido a defectos en el remodelado vascular tras la delección de Notch en células perivasculares se midió el ancho transversal de los vasos en el plexo capilar y en el plexo angiogénico. Tras la cuantificación y la representación estadística mostradas en la Figura 9, se observó cómo no hay diferencias significativas entre la anchura de los vasos, todos muestran valores similares entre el control y los diferentes grupos experimentales.

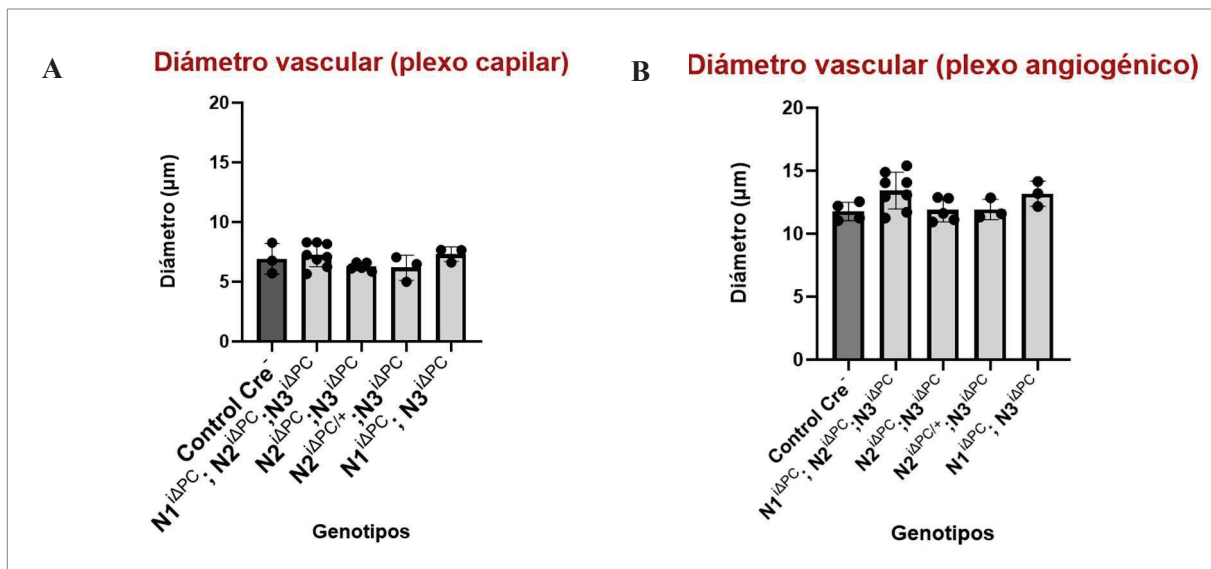
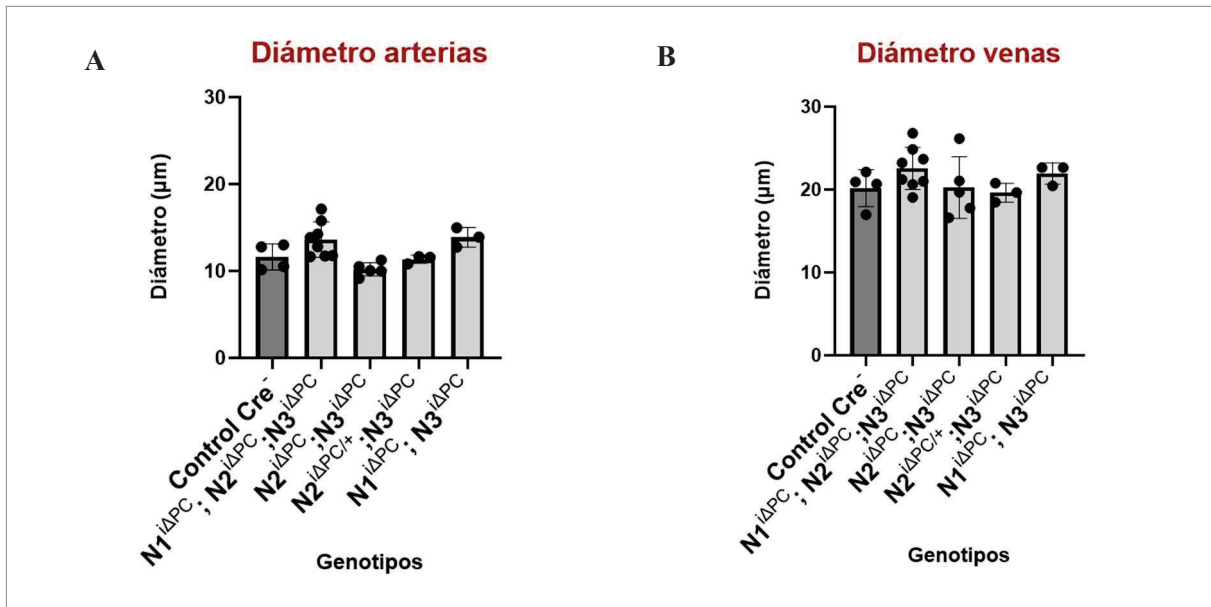


Figura 9: Diámetro vascular en el plexo capilar y angiogénico de retina a P6. **A.** Cuantificación del diámetro (µm) en el plexo capilar **B.** Cuantificación del diámetro (µm) en el plexo angiogénico. La gráfica de barras representa el valor de la media y de la desviación estándar. Cada punto representa un animal analizado.

La pérdida de los receptores de Notch en células perivasculares no conduce a alteraciones en el diámetro vascular de las arterias y las venas.

Además del análisis global de los plexos, se evaluó el diámetro de las arterias y las venas para detectar posibles alteraciones diferenciales. Tras medir el diámetro, en la Figura 10, en el caso de las arterias los valores obtenidos fueron homogéneos a lo largo de todos los grupos, con una ligera tendencia de aumento para el grupo con triple *knock-out* en los tres Notch (N1<sup>iAPC</sup>; N2<sup>iAPC</sup>; N3<sup>iAPC</sup>), sin embargo, no dió una diferencia significativa. En las venas, el caso es similar, siguiendo valores estándar sin grandes cambios significativos, aunque volvemos a ver como algunos grupos como el triple *knock-out* en los tres Notch o el grupo N1<sup>iAPC</sup>; N3<sup>iAPC</sup> presentan una ligera subida en el grosor.



**Figura 10:** Diámetro vascular en arterias y venas de retina a P6. **A.** Cuantificación del diámetro ( $\mu\text{m}$ ) en las arterias. **B.** Cuantificación del diámetro ( $\mu\text{m}$ ) en las venas. La gráfica de barras representa el valor de la media y de la desviación estándar. Cada punto representa un animal analizado.

### 3.2. Modificaciones en cobertura mural: pericitos y vSMCs

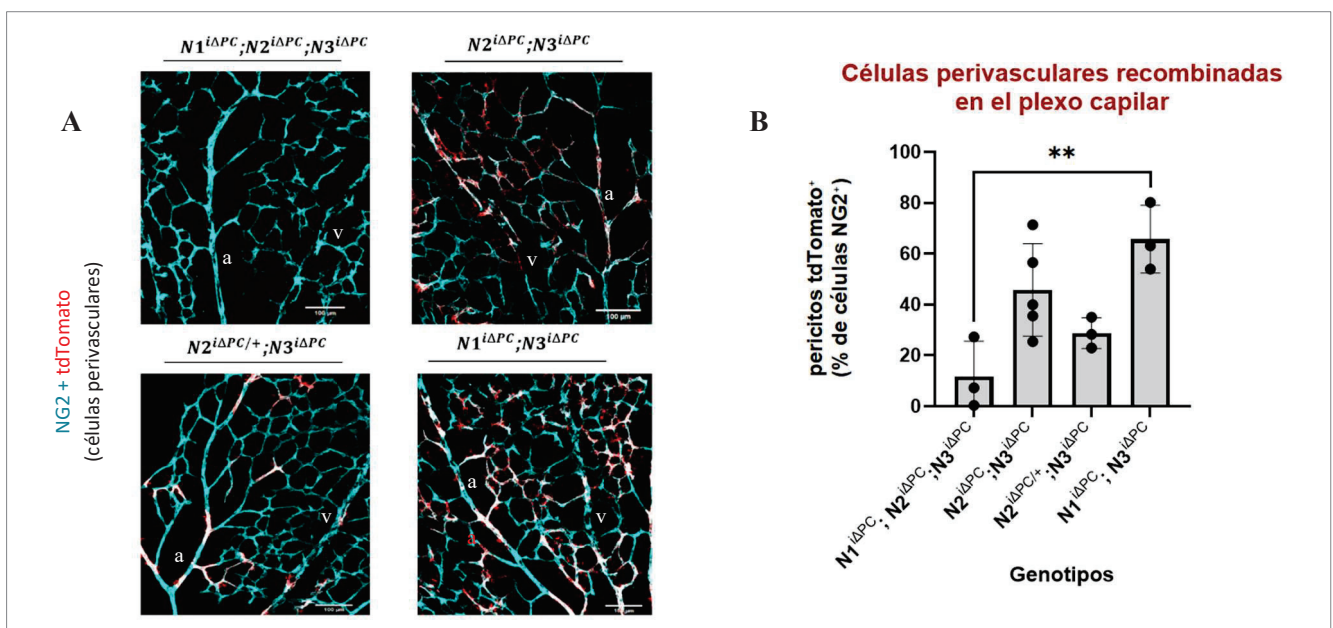
Las células murales, también conocidas como perivasculares, que incluyen a los pericitos y a las células del músculo liso vascular (vSMCs) son esenciales para el mantenimiento de la estructura y tono vascular. En estudios previos se ha observado la pérdida de células perivasculares, vSMCs cuando falta Notch 2 y Notch 3 y pericitos cuando falta Notch 1 y Notch 3. Por ello, debido a la importante función que tiene Notch en el desarrollo de estos tipos celulares, se analizaron los siguientes tres parámetros. El primero, el grado de recombinación perivascular, analizando la expresión del reportero fluorescente tdTomato en las células perivasculares marcadas con NG2 en la retina y con CD13 en cerebro. La recombinación ayuda a confirmar la eficiencia de la delección genética de Notch tras la administración de tamoxifeno y permite identificar visualmente las células que han recombinado. El segundo parámetro analizado, fue la cobertura pericitaria, como medida del grado de cobertura de pericitos en los plexos capilar y angiogénico en la retina y en el cerebro, en la zona de la corteza. Finalmente, se evaluó la cobertura de las células del músculo liso vascular mediante la expresión de  $\alpha$ -SMA, una proteína contráctil característica de este tipo celular en las arterias y las venas.

## Análisis de parámetros en retina

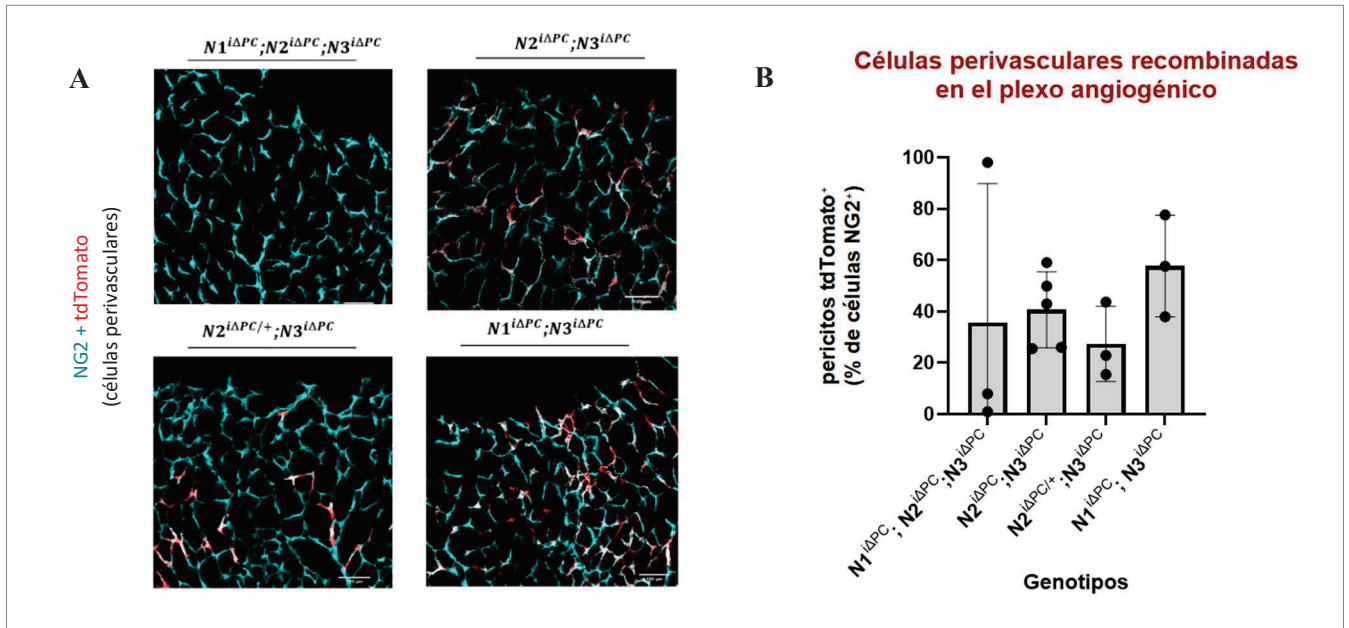
### La pérdida de los receptores de Notch en células perivasculares altera de forma diferencial la eficiencia de recombinación pericitaria

Para confirmar la eficacia de la delección génica analizamos el porcentaje de recombinación, definido como células tdTomato+/NG2+. En ambos plexos, plexo capilar en la Figura 11 y plexo angiogénico en la Figura 12, podemos observar como el porcentaje de casos de recombinación pericitaria es mayor en el grupo  $N1^{\Delta PC};N3^{\Delta PC}$ . Por el contrario, en el grupo del triple *knock-out*  $N1^{\Delta PC};N2^{\Delta PC};N3^{\Delta PC}$ , la recombinación obtuvo valores muy bajos respecto al resto de grupos experimentales. Esta disminución podría reflejar una menor eficiencia de recombinación o una posible pérdida de la viabilidad celular tras la delección simultánea de los tres receptores.

En el plexo capilar, estas diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ), lo que refuerza la fiabilidad del patrón observado.



**Figura 11:** Células perivasculares recombinadas en el plexo capilar de retina a P6. **A.** Imágenes representativas del plexo capilar teñido con NG2 y tdTomato en los distintos genotipos analizados. La barra de escala corresponde a 100 $\mu$ m. Imágenes de microscopía confocal adquiridas empleando el objetivo 10 $\times$  a=arteria v=vena **B.** Cuantificación del porcentaje de pericitos que expresan tdTomato (% de células NG2) en el plexo capilar. \*\* $p < 0,01$ . La gráfica de barras representa el valor de la media y de la desviación estándar. Cada punto representa un animal analizado.



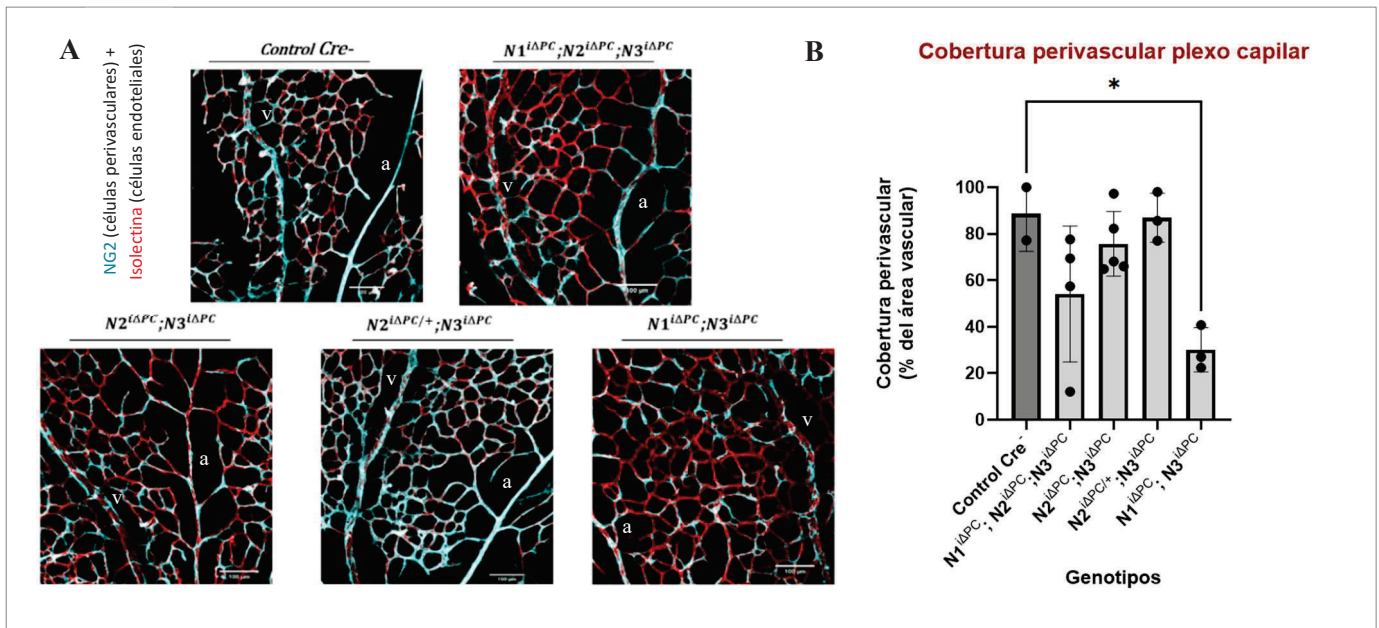
**Figura 12:** Células perivasculares recombinadas en el plexo angiogénico de retina a P6. **A.** Imágenes representativas del plexo angiogénico teñido con NG2 y tdTomato en los distintos genotipos analizados. La barra de escala corresponde a 100µm. Imágenes de microscopía confocal adquiridas empleando el objetivo 10×. **B.** Cuantificación del porcentaje de pericitos que expresan tdTomato (% de células NG2) en el plexo angiogénico. La gráfica de barras representa el valor de la media y de la desviación estándar. Cada punto representa un animal analizado.

La pérdida de los receptores Notch1 y Notch3 reduce significativamente la cobertura pericitaria.

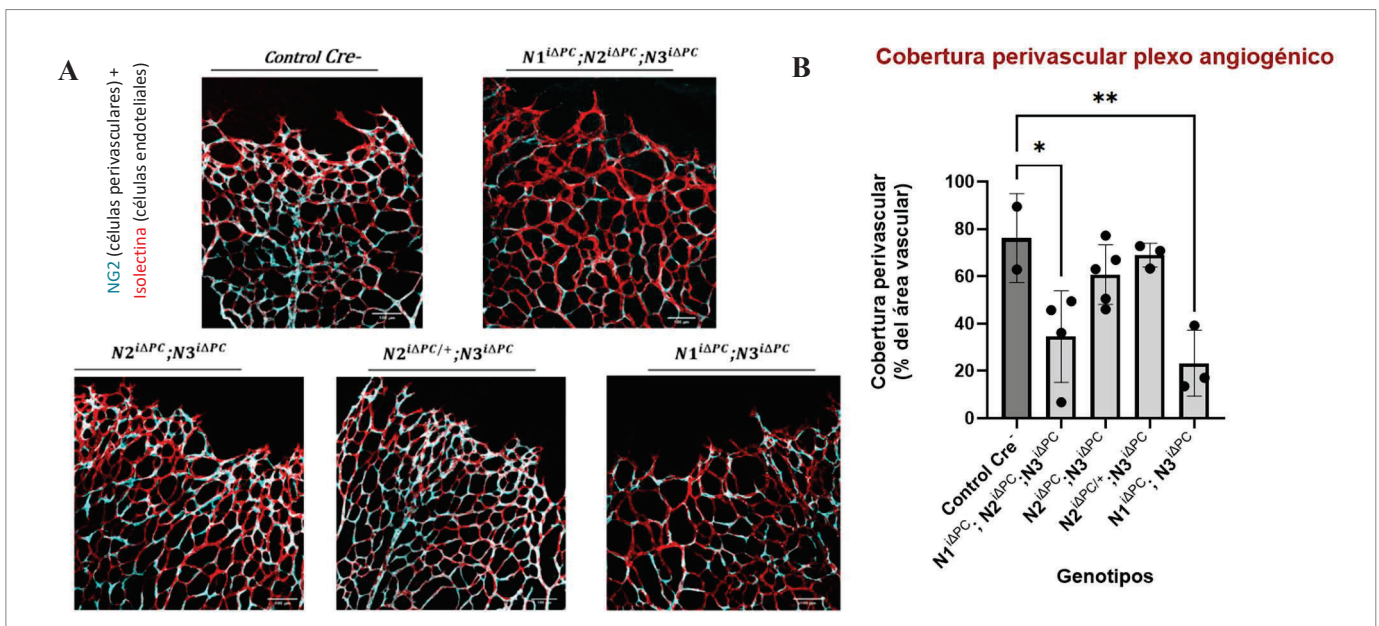
La cobertura pericitaria, cuantificada como el porcentaje de área ocupada por la señal de NG2, marcador de las células perivasculares, sobre el área total vascular marcada por Isolectina, se midió en ambos plexos, capilar y angiogénico. Este parámetro permite evaluar las posibles alteraciones que puede haber en la distribución o cobertura de pericitos tras la delección de Notch en estas células.

En el plexo capilar, Figura 13, el grupo control Cre- muestra una cobertura pericitaria elevada, mientras que en los grupos mutantes se observa como las diferentes combinaciones de Notch afectan negativamente el porcentaje de cobertura de pericitos. La disminución fue especialmente marcada en el grupo  $N1^{iAPC};N3^{iAPC}$ , donde la cobertura cayó por debajo del 30%. Esta diferencia fue estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) con respecto al control.

En el plexo capilar, Figura 14, se observó un patrón similar en las cuantificaciones, con una cobertura control elevada del grupo Cre- y una reducción significativa en el grupo  $N1^{iAPC};N2^{iAPC};N3^{iAPC}$  ( $p < 0,05$ ) y en el grupo  $N1^{iAPC};N3^{iAPC}$  ( $p < 0,01$ ).



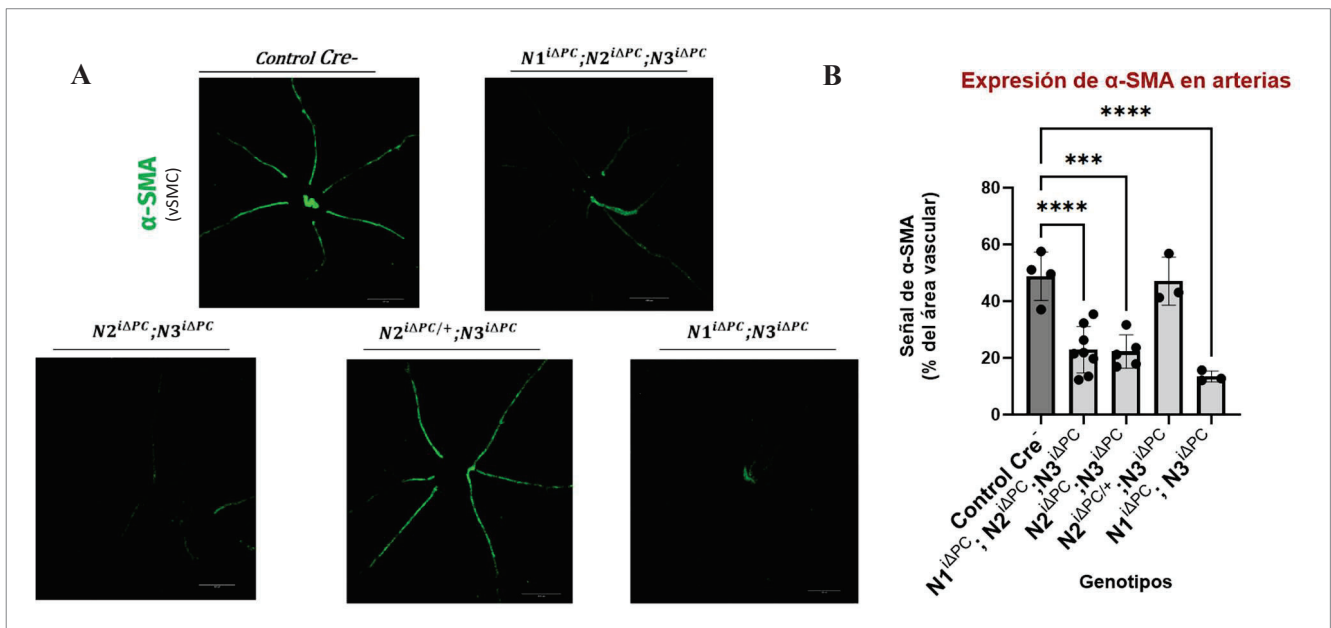
**Figura 13:** Cobertura perivascular en el plexo capilar de retina a P6. **A.** Imágenes representativas del plexo capilar teñido con Isolectina (células endoteliales) y NG2 (células perivasculares) en los distintos genotipos analizados. La barra de escala corresponde a 100µm. Imágenes de microscopía confocal adquiridas empleando el objetivo 10× a=arteria v=vena **B.** Cuantificación del porcentaje de cobertura perivascular (% del área vascular) en el plexo capilar. \**p*<0,05 La gráfica de barras representa el valor de la media y de la desviación estándar. Cada punto representa un animal analizado.



**Figura 14:** Cobertura perivascular en el plexo angiogénico de retina a P6. **A.** Imágenes representativas del plexo capilar teñido con Isolectina y NG2 en los distintos genotipos analizados. La barra de escala corresponde a 100µm. Imágenes de microscopía confocal adquiridas empleando el objetivo 10× **B.** Cuantificación del porcentaje de cobertura perivascular (% del área vascular) en el plexo angiogénico. \**p*<0,05 \*\**p*<0,01 La gráfica de barras representa el valor de la media y de la desviación estándar. Cada punto representa un animal analizado.

La pérdida de receptores Notch disminuye la cobertura de células de músculo liso vascular en arterias, pero en las venas no hay una disminución significativa.

La cobertura de células del músculo liso vascular (vSMCs) se evaluó mediante la señal de  $\alpha$ -SMA. En las arterias, Figura 15, el grupo control Cre- muestra un porcentaje alto de expresión de  $\alpha$ -SMA reflejando así una cobertura mural completa característica de las arterias. La reducción fue significativa en el grupo  $N2^{i\Delta PC};N3^{i\Delta PC}$  ( $p<0,01$ ), pero aún más significativa fue la reducción de la expresión de  $\alpha$ -SMA en los grupos  $N1^{i\Delta PC};N2^{i\Delta PC};N3^{i\Delta PC}$  y  $N1^{i\Delta PC};N3^{i\Delta PC}$  ( $p<0,0001$ ) respecto al control.



**Figura 15:** Expresión de  $\alpha$ -SMA en las arterias de la retina a P6. **A.** Imágenes representativas de las arterias teñidas con  $\alpha$ -SMA en los distintos genotipos analizados. La barra de escala corresponde a 300 $\mu$ m. Imágenes de microscopía confocal adquiridas empleando el objetivo 10 $\times$ . **B.** Cuantificación del porcentaje de señal de  $\alpha$ -SMA (% del área vascular) en las arterias. \*\*\* $p<0,001$  \*\*\*\* $p<0,0001$  La gráfica de barras representa el valor de la media y de la desviación estándar. Cada punto representa un animal analizado.

Por otro lado, las venas, Figura 16, presentan fisiológicamente una menor proporción de células del musculo liso vascular, por ello, la expresión y señal de  $\alpha$ -SMA es en general más baja en todos los grupos, sin diferencias apreciables ni significativas entre los distintos genotipos.

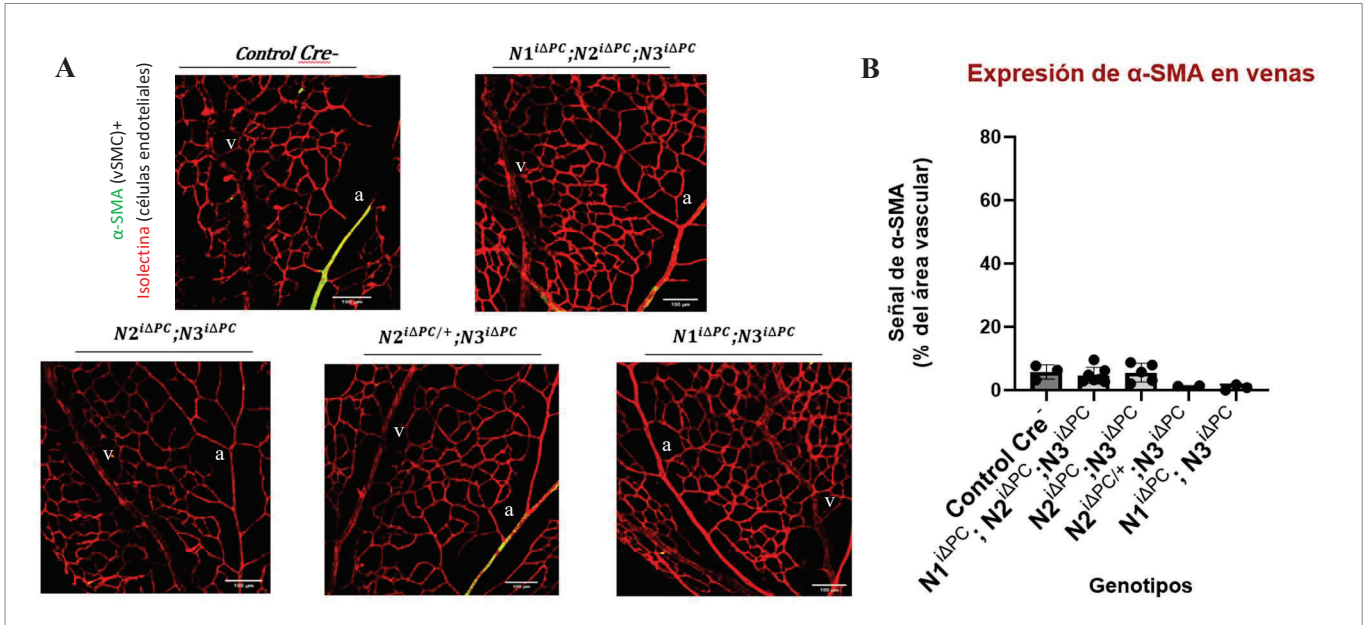


Figura 16: Expresión de  $\alpha$ -SMA en las venas de la retina a P6. **A.** Imágenes representativas de las venas teñidas con  $\alpha$ -SMA e Isolectina en los distintos genotipos analizados. La barra de escala corresponde a 100 $\mu$ m. Imágenes de microscopía confocal adquiridas empleando el objetivo 10 $\times$  a=arteria v=vena **B.** Cuantificación del porcentaje de señal de  $\alpha$ -SMA (% del área vascular) en las venas. La gráfica de barras representa el valor de la media y de la desviación estándar. Cada punto representa un animal analizado.

### Análisis de parámetros en cerebro

El análisis se realizó en el día postnatal 14. Cabe destacar la importancia de este análisis, ya que la mayoría de los estudios sobre la vía de señalización de Notch en células perivasculares se han centrado en el estudio de las redes vasculares en la retina, mientras que el cerebro ha sido menos estudiado. La tinción con el marcador Lectina de tomate resultó en una identificación y cuantificación inequívoca de las células endoteliales de los vasos, por lo que las conclusiones que se obtienen de este estudio son preliminares y serán validadas en experimentos futuros.

### La pérdida de los receptores de Notch en células perivasculares altera de forma diferencial la eficiencia de recombinación pericitaria

Para el análisis de la recombinación pericitaria, Figura 17, en la corteza cerebral se utilizó el marcador CD13 como marcador de las células perivasculares y el reportero fluorescente de tdTomato como indicativo de la recombinación. Como control tenemos el grupo heterocigoto de los

tres Notch. Nuevamente, al igual que los resultados de la retina vemos que el grupo triple *knock-out* muestra una baja tasa de recombinación, con una diferencia estadística significativa ( $p < 0,05$ ).

Por el contrario, el grupo  $N3^{i\Delta PC}$  mostro niveles más altos de recombinación mientras que en el grupo  $N1^{i\Delta PC} N3^{i\Delta PC}$  se observó una reducción intermedia.

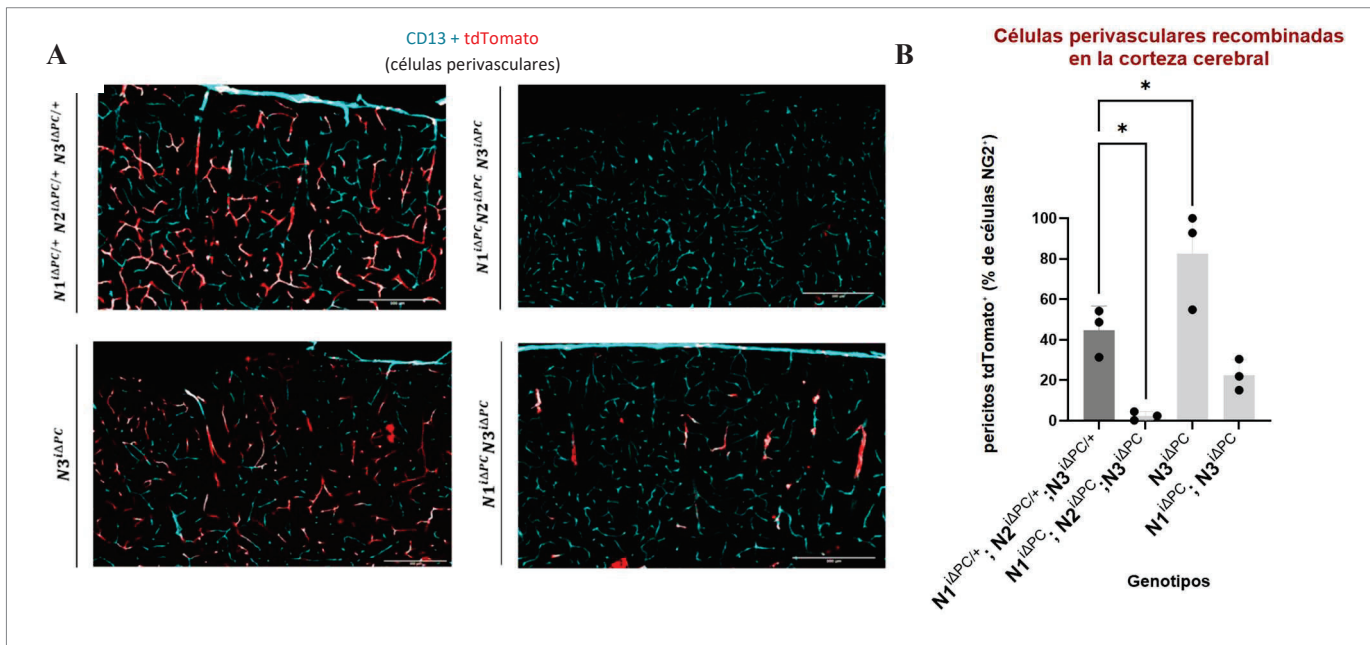
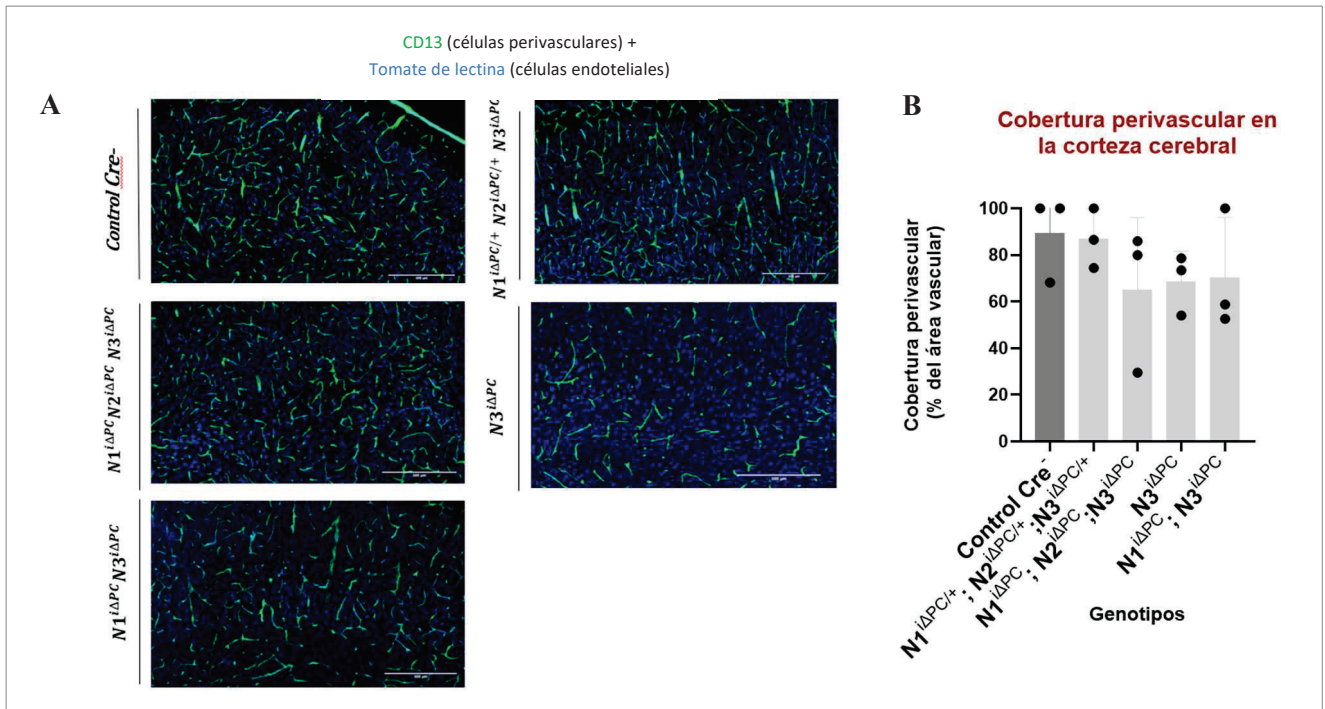


Figura 17: Células perivasculares recombinadas en la corteza cerebral a P14. **A.** Imágenes representativas de la corteza cerebral teñida con CD13 y tdTomato en los distintos genotipos analizados. La barra de escala corresponde a 300µm. Imágenes de microscopía confocal adquiridas empleando el objetivo 10× **B.** Cuantificación del porcentaje de células perivasculares que expresan tdTomato (% de células CD13) en la corteza cerebral. \* $p < 0,05$  La gráfica de barras representa el valor de la media y de la desviación estándar. Cada punto representa un animal analizado.

### La pérdida de receptores Notch no produce alteraciones significativas en la cobertura pericitaria en la corteza cerebral

La cobertura de pericitos en la corteza cerebral, Figura 18, se analizó mediante la señal de CD13, específica para las células perivasculares y la señal de Lectina de tomate. Los grupos control Cre- y  $N1^{i\Delta PC/+} N2^{i\Delta PC/+} N3^{i\Delta PC/+}$  mostraron unos niveles de cobertura similares. Los grupos mutantes sufrieron una pequeña reducción en la cobertura, en especial el triple mutante  $N1^{i\Delta PC} N2^{i\Delta PC} N3^{i\Delta PC}$ , pero ninguna de estas diferencias fue estadísticamente significativa.

Cabe destacar que la tinción con tomate de lectina presento un alto nivel de fondo inespecífico, especialmente a nivel nuclear, dificultando la cuantificación.



**Figura 18:** Cobertura perivascular en la corteza cerebral a P14. **A.** Imágenes representativas de la corteza cerebral teñida con Lectina de tomate y CD13 en los distintos genotipos analizados. La barra de escala corresponde a 300 $\mu$ m. Imágenes de microscopía confocal adquiridas empleando el objetivo 10 $\times$ . **B.** Cuantificación del porcentaje de cobertura perivascular (% del área vascular) en la corteza cerebral. La gráfica de barras representa el valor de la media y de la desviación estándar. Cada punto representa un animal analizado.

### La pérdida de receptores Notch disminuye la cobertura de células de músculo liso vascular en arterias de la corteza cerebral

Para evaluar la cobertura de células del músculo liso vascular en arterias se cuantificó el porcentaje de  $\alpha$ -SMA en las mismas, Figura 19. El control Cre- mostró una alta expresión de  $\alpha$ -SMA, reflejando una cobertura de vSMCs arterial intacta. Comparados con el control, el resto de los grupos sufrieron una reducción en los niveles de  $\alpha$ -SMA, especialmente marcada en el grupo con triple *knock-out*  $N1^{\Delta PC} N2^{\Delta PC} N3^{\Delta PC}$  cuya reducción fue estadísticamente significativa respecto al control ( $p < 0,05$ )

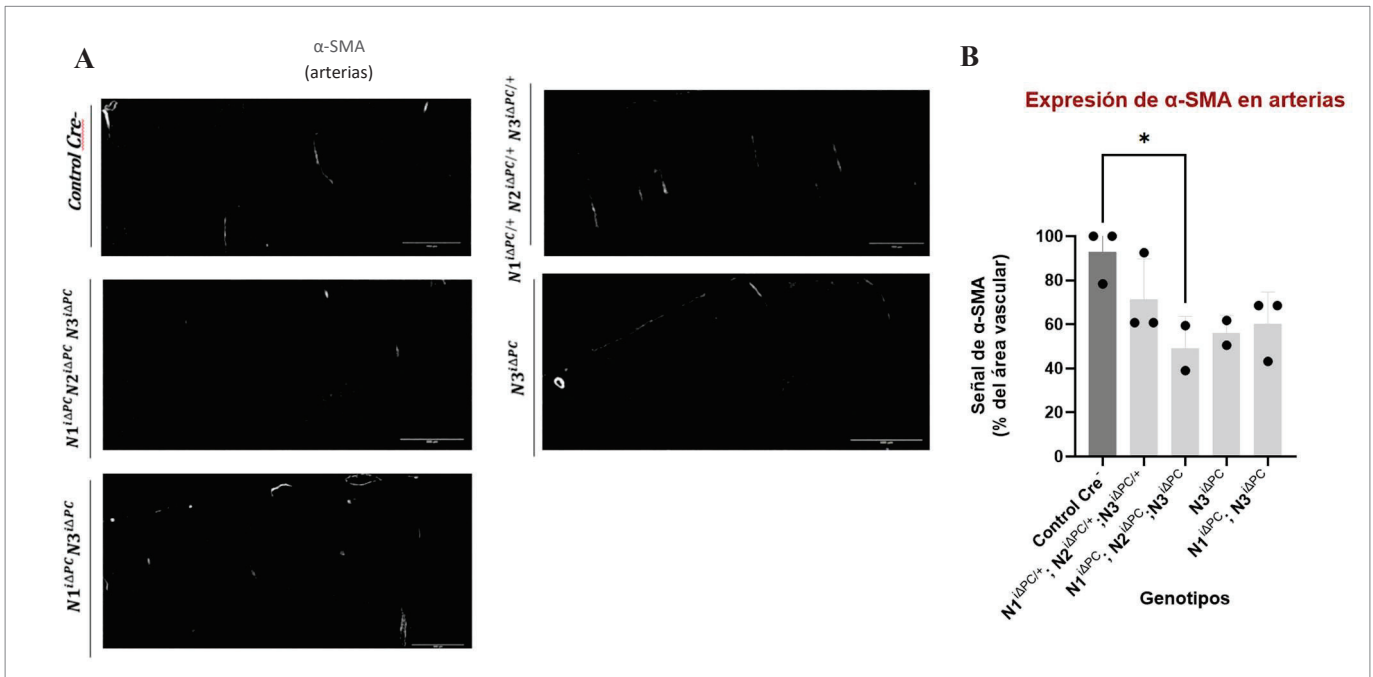


Figura 19: Expresión de  $\alpha$ -SMA en las arterias de la corteza cerebral a P14. **A.** Imágenes representativas de las arterias teñidas con  $\alpha$ -SMA en los distintos genotipos analizados. La barra de escala corresponde a 300 $\mu$ m. Imágenes de microscopía confocal adquiridas empleando el objetivo 10 $\times$  **B.** Cuantificación del porcentaje de señal de  $\alpha$ -SMA (% del área vascular) en las arterias de la corteza cerebral. \* $p < 0,05$  La gráfica de barras representa el valor de la media y de la desviación estándar. Cada punto representa un animal analizado.

### 3.3 Comparación de los efectos de la pérdida de función de Notch en retina y cerebro

En la retina, los efectos de la pérdida de funcionalidad de Notch fueron más fácilmente observables debido a que su análisis se realiza sobre montajes planos que permiten una visualización más completa de la arquitectura vascular. Por otro lado, en el cerebro, el estudio se realizó a partir de cortes histológicos de 40  $\mu$ m, limitando la visión global de la red vascular. Otro dato por destacar es que en modelos murinos el desarrollo vascular en retina ocurre en las etapas postnatales, lo que puede amplificar los efectos de la delección de Notch, mientras que, en el cerebro, gran parte de la vasculatura ya está establecida en el momento de la inducción con tamoxifeno.

## CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

A partir de los resultados obtenidos, se analizan a continuación los efectos de la pérdida de los receptores Notch en células perivasculares en retinas a P6 y en cerebros a P14.

En el análisis de las posibles alteraciones en la arquitectura vascular y densidad capilar se cuantificó la densidad vascular y el diámetro de los diferentes plexos, arterias y venas de la retina. Investigaciones anteriores han demostrado un progresivo aumento en este parámetro en retinas con estadios más avanzados (Nadeem et al., 2020). Sin embargo, tras los resultados obtenidos se demuestra que, en retinas a P6, no hay una diferencia significativa en la densidad vascular tras la pérdida de función de Notch en células perivasculares. Si bien es cierto que, en la gráfica de cuantificación de la densidad vascular, en el plexo angiogénico, se ve un descenso progresivo de la misma en comparación con el control, estos datos no presentan un cambio significativo.

Para el diámetro vascular, tampoco se observan grandes cambios en los diferentes genotipos para los plexos capilares y angiogénicos. En cuanto al diámetro en las venas y arterias, podemos ver como el triple *knock-out* de Notch1, Notch2 y Notch3 aumenta discretamente el tamaño arterial y venoso. A pesar de este pequeño aumento el incremento no es significativo y no es comparable a resultados de estudios previos donde en retinas en estadios de 6 semanas veían un aumento significativo del diámetro de las venas (Nadeem et al., 2020). Seguramente este fenotipo se desarrollaría a posteriores estadios, aunque a los primeros días postnatales (P6) no se observe con claridad este aumento.

Otro resultado cuantificado es el número de células perivasculares recombinadas en los diferentes plexos de la retina y en la corteza cerebral. La recombinación es un parámetro importante que cuantificar porque expresa la cantidad de células en las que la herramienta genética Cre-LoxP ha eliminado exitosamente los receptores Notch floxeados. El sistema Cre-LoxP induce una recombinación genética en mosaico. En nuestro sistema genético utilizado con las líneas genéticas PDGFR $\beta$ -P2A-CreERT y iSuRe-HadCre, obtenemos niveles control de recombinación de entre el 40% y el 60%. Valores significativamente por encima o por debajo de este rango pueden reflejar alteraciones en la funcionalidad de las células o indicar cambios en su distribución o viabilidad como consecuencia de la delección de los receptores Notch.

Es cierto que, al observar las gráficas de cuantificación en la retina, el porcentaje de recombinación más bajo es del triple *knock-out*. No obstante, esta observación podría no deberse a un menor grado de recombinación, sino a la probabilidad de que la eliminación de los tres receptores Notch comprometa la supervivencia y viabilidad celular en este contexto de desarrollo. De este modo, las células que habrían expresado tdTomato tras la recombinación podrían haber muerto como consecuencia de esta pérdida de funcionalidad de Notch, impidiendo así su detección en el análisis. En el cerebro, el análisis de porcentaje de recombinación pericitario respalda estos datos, siendo el

grupo homocigótico con la triple delección de Notch1, Notch2 y Notch 3 el más afectado y, el grupo control, con heterocigosis para los tres Notch, presentó un porcentaje adecuado de recombinación lo cual, indica la funcionalidad del sistema Cre-LoxP.

En la cobertura pericitaria en las retinas observamos una disminución significativa con la pérdida de funcionalidad de Notch 1 y Notch 3. Esto concuerda con la información bibliográfica obtenida en estudios previos que asocian a Notch 1 y Notch 3 como receptores clave para el correcto desarrollo de los pericitos (Kofler et al., 2015). En este estudio, se ha observado como ambos tienen un papel central en estas células, mientras que la pérdida de Notch2 no produce cambios significativos en este parámetro, lo cual muestra una menor implicación de este receptor en este contexto. En los resultados obtenidos en la corteza cerebral la cuantificación muestra resultados similares. Sin embargo, estos últimos datos han de ser interpretados con cautela debido a la mala tinción de los vasos cerebrales debido al gran fondo que dió el marcador para la vasculatura, la lectina de tomate.

Por último, para observar la cobertura de las células del músculo liso vascular (vSMCs) se cuantificó la señal de  $\alpha$ -SMA, marcador característico para valorar la cobertura de estas células. Comparando el porcentaje general de  $\alpha$ -SMA en arterias y venas se observa como las venas contienen de manera constante un menor grado de cobertura por vSMCs que las arterias. Esta diferencia es coherente con su fisiología. Las arterias requieren de capas más gruesas de células de músculo liso para resistir la presión arterial y regular el flujo sanguíneo. Por el contrario, las venas están adaptadas a menores presiones y presentan una pared con menos vSMCs. (Baeten & Lilly, 2017)

Evaluando los efectos de la pérdida de Notch concretamente en arterias, ya que las venas no muestran diferencias significativas, vemos como en este caso la delección de las diferentes combinaciones de Notch reduce significativamente esta cobertura con respecto al control. Si bien es cierto que, en la literatura descrita hasta el momento, la importancia en el desarrollo de las células vasculares del músculo liso se asocia más a los receptores Notch 2 y Notch 3 (Wang et al., 2012), en los datos obtenidos parece que los tres receptores Notch contribuyen a esta diferenciación. En el cerebro, los datos obtenidos concuerdan con los datos experimentales de la retina, viéndose una reducción en la expresión de  $\alpha$ -SMA al compararlo con el grupo control.

Finalmente, cabe destacar que en ninguno de los modelos se observaron malformaciones arteriovenosas evidentes, mientras que en anteriores estudios se ha demostrado la presencia de estas malformaciones a las 6 semanas tras la pérdida de funcionalidad de Notch (Nadeem et al., 2020). En retina esto podría deberse a que el análisis se realizó en un estadio postnatal temprano (P6), cuando aún no está plenamente desarrollada. En el cerebro, esta ausencia de alteraciones podría deberse a que la delección de Notch ocurre en etapas postnatales, cuando la arquitectura vascular ya está establecida y que, a diferencia de la retina, su desarrollo ocurre principalmente en estadios postnatales.

## CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

La vía de señalización Notch tiene un papel fundamental en el desarrollo de los pericitos y las células vasculares del músculo liso. Su pérdida de funcionalidad puede alterar el correcto desarrollo vascular al afectar la diferenciación de estas células. Con los resultados obtenidos podemos concluir que:

- 1) La pérdida de funcionalidad de los receptores Notch no afecta significativamente la densidad ni al diámetro vascular en retinas a P6.
- 2) Notch 1 y Notch 3 tienen un papel clave en la funcionalidad y correcto desarrollo de los pericitos. Notch 2 tiene una menor implicación en este contexto.
- 3) Notch 1, Notch 2 y Notch 3 contribuyen al desarrollo de las células del músculo liso vascular. Su pérdida de función reduce significativamente la cobertura de estas células en las arterias.
- 4) No se detectaron malformaciones vasculares evidentes ni en la retina a P6 ni en el cerebro a P14.
- 5) Las alteraciones observadas en este estudio se debieron a defectos específicos en las células perivasculares. No resultan de una degeneración vascular general, sino de una pérdida de señalización Notch en pericitos y células del músculo liso vascular, lo cual, resalta el papel fundamental de esta vía de señalización en el mantenimiento del sistema vascular.

## CAPÍTULO 6: BIBLIOGRAFÍA

- Armulik, A., Genové, G., & Betsholtz, C. (2011). Pericytes: Developmental, Physiological, and Pathological Perspectives, Problems, and Promises. In *Developmental Cell* (Vol. 21, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.07.001>
- Armulik, A., Genové, G., Mäe, M., Nisancioglu, M. H., Wallgard, E., Niaudet, C., He, L., Norlin, J., Lindblom, P., Strittmatter, K., Johansson, B. R., & Betsholtz, C. (2010). Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature*, *468*(7323). <https://doi.org/10.1038/nature09522>
- Baeten, J. T., Jackson, A. R., McHugh, K. M., & Lilly, B. (2015). Loss of Notch2 and Notch3 in vascular smooth muscle causes patent ductus arteriosus. *Genesis*, *53*(12). <https://doi.org/10.1002/dvg.22904>
- Baeten, J. T., & Lilly, B. (2015). Differential regulation of NOTCH2 and NOTCH3 contribute to their unique functions in vascular smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(26). <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.655548>
- Baeten, J. T., & Lilly, B. (2017). Notch Signaling in Vascular Smooth Muscle Cells. In *Advances in Pharmacology* (Vol. 78). <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2016.07.002>
- Benedito, R., Roca, C., Sörensen, I., Adams, S., Gossler, A., Fruttiger, M., & Adams, R. H. (2009). The Notch Ligands Dll4 and Jagged1 Have Opposing Effects on Angiogenesis. *Cell*, *137*(6). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.025>
- Betsholtz, C. (2018). Cell–cell signaling in blood vessel development and function. *EMBO Molecular Medicine*, *10*(3). <https://doi.org/10.15252/emmm.201708610>
- Cai, Z., Zhao, B., Deng, Y., Shanguan, S., Zhou, F., Zhou, W., Li, X., Li, Y., & Chen, G. (2016). Notch signaling in cerebrovascular diseases (Review). In *Molecular Medicine Reports* (Vol. 14, Issue 4). <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5641>
- Cuervo, H., Pereira, B., Nadeem, T., Lin, M., Lee, F., Kitajewski, J., & Lin, C. S. (2017). PDGFR $\beta$ -P2A-CreERT2 mice: a genetic tool to target pericytes in angiogenesis. *Angiogenesis*, *20*(4). <https://doi.org/10.1007/s10456-017-9570-9>
- Garcia-Gonzalez, I., Rocha, S. F., Hamidi, A., Garcia-Ortega, L., Regano, A., Sanchez-Muñoz,

- M. S., Lytvyn, M., Garcia-Cabero, A., Roig-Soucase, S., Schoofs, H., Castro, M., Sabata, H., Potente, M., Graupera, M., Makinen, T., & Benedito, R. (2024). iSuRe-HadCre is an essential tool for effective conditional genetics. *Nucleic acids research*, 52(13), e56. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae472>
- Kofler, N. M., Cuervo, H., Uh, M. K., Murtomäki, A., & Kitajewski, J. (2015). Combined deficiency of Notch1 and Notch3 causes pericyte dysfunction, models CADASIL, and results in arteriovenous malformations. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep16449>
- Kopan, R., & Ilagan, M. X. G. (2009). The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism. In *Cell* (Vol. 137, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.045>
- Liu, H., Kennard, S., & Lilly, B. (2009). NOTCH3 expression is induced in mural cells through an autoregulatory loop that requires Endothelial-expressed JAGGED1. *Circulation Research*, 104(4). <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.184846>
- Morgan, T. H. (1917). The theory of the gene. *The American Naturalist*, 51(609), 513–544. <https://doi.org/10.1086/279591>
- Nadeem, T., Bogue, W., Bigit, B., & Cuervo, H. (2020). Deficiency of Notch signaling in pericytes results in arteriovenous malformations. *JCI Insight*, 5(21). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.125940>
- Rattner, A., Williams, J., & Nathans, J. (2019). Roles of HIFs and VEGF in angiogenesis in the retina and brain. *Journal of Clinical Investigation*, 129(9). <https://doi.org/10.1172/JCI126655>
- Solomon, R. A., & Connolly, E. S., Jr. (2017). Arteriovenous malformations of the brain. *The New England Journal of Medicine*, 376(19), 1859–1866. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1607407>
- Vallon, M., Chang, J., Zhang, H., & Kuo, C. J. (2014). Developmental and pathological angiogenesis in the central nervous system. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 71, Issue 18). <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1625-0>
- Wang, Q., Zhao, N., Kennard, S., & Lilly, B. (2012). Notch2 and notch3 function together to regulate vascular smooth muscle development. *PLoS ONE*, 7(5).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037365>

Xiao, M. J., Han, Z., Shao, B., & Jin, K. (2009). Notch signaling and neurogenesis in normal and stroke brain. In *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology* (Vol. 1, Issue 2).