



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN (INR)

CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y ATENCIÓN DE QUEMADOS  
(CENIAQ)

LABORATORIO DE TEJIDO CONJUNTIVO



**LOCALIZACIÓN Y FUNCIÓN DEL FACTOR DE  
CRECIMIENTO TRANSFORMANTE-BETA 3 (TGF- $\beta$ 3)  
DURANTE LA REPARACIÓN DE UNA HERIDA DE  
ESPEJOR TOTAL EN LA OREJA DEL RATÓN.**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

VERA GÓMEZ EDUARDO

DIRECTOR DE TESIS

Dr. René Fernando Abarca Buis.

Asesor interno: M. en C. Rosalva Rangel Corona



MÉXICO, D.F. 2013



La Tesis se llevo acabo en el Laboratorio de Tejido Conjuntivo perteneciente al Instituto Nacional de Rehabilitación (Secretaria de Salud). Al Laboratorio de Tejido Conjuntivo y al proyecto de Ciencia Básica 84683 del CONACYT del Dr. David Garciadiego, les agradezco por brindarme los recursos necesarios y por el apoyo para realización de la misma.

## **Agradecimientos.**

A mis Padres como a mis hermanas, Elsa y Elizabeth y a toda mi familia, gracias por su apoyo, ayuda, comprensión y cariño que siempre mean brindado.

A mi tutor el Dr. Rene Abarca, por la orientación y ayuda que me brindo para la realización de mi tesis, su amistad y confianza.

A cada uno de mis amigos de la Universidad como a los del Laboratorio de Tejido Conjuntivo, gracias por su ayuda y amistad.

## ÍNDICE GENERAL

	Página
Resumen	9
Abstract	10
Introducción	11
Regeneración	11
<b>Tipos de Regeneración</b>	11
<i>Regeneración epimorfica</i>	11
Formación de la capa epidérmica apical	12
Desdiferenciación	12
Formación del blastema	12
Morfogénesis	13
Crecimiento	13
<i>Regeneración Morfolaxica</i>	14
<i>Regeneración Compensatoria</i>	15
<i>Regeneración Fisiológica</i>	15
Regeneración en Invertebrados	15
Regeneración en vertebrados	17
<b>Cicatrización</b>	19
<i>Inflamación</i>	20
<i>Proliferación</i>	21
<i>Remodelación</i>	22
<b>La Súperfamilia del Factor de Crecimiento Transformante-Beta (TGF-<math>\beta</math>)</b>	23
<b>Vía de la Señalización del TGF-<math>\beta</math> mediada por las SMADs</b>	24
<b>Receptores del TGF-<math>\beta</math></b>	25
<b>Proteínas Traductoras de Señal: las SMAD</b>	26
<b>Control de la Activación de la Vía de la Señalización de TGF-<math>\beta</math>/SMAD</b>	28
<b>La Señalización de TGF-<math>\beta</math> en la Cicatrización y en la Regeneración</b>	31

<b>TGF-β3 en la Reparación de una Herida</b>	33
<b>Modelo de Regeneración en la Oreja de Ratón</b>	35
<b>Planteamiento del problema</b>	36
<b>Hipótesis</b>	37
<b>Objetivo</b>	37
<b>Material y Método</b>	38
<i>Aplicación del TGF-β3 en la oreja del ratón</i>	38
<i>Registro fotográfico de las orejas</i>	40
<i>Análisis Histológico</i>	40
<i>Inmunolocalización del TGF-β3 y de la SMAD 2-3 durante la Regeneración y reparación de la Oreja del Ratón</i>	41
<i>Evaluación del TGF-β3</i>	41
<b>Resultados</b>	42
<i>Análisis Histológico</i>	44
<i>Localización y Distribución del TGF-β3</i>	54
<b>Discusión</b>	59
<b>Conclusión</b>	65
<b>Perspectivas</b>	66
<b>Bibliografía</b>	67

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Imagen.1.</b> Regeneración Epimorfica	13
<b>Imagen.2.</b> Regeneración Morfolaxica	14
<b>Imagen.3.</b> Fases de la cicatrización	19
<b>Imagen.4.</b> Súperfamilia de los TGF- $\beta$	23
<b>Imagen.5.</b> Vía de señalización del TGF- $\beta$	24
<b>Imagen.6.</b> Las diferentes proteínas SMAD	27
<b>Imagen.7.</b> Orejas de ratón de MRL y B6 que regeneran	35
<b>Imagen.8.</b> Esquema de la colocación de la perla de heparina en la oreja del ratón	39
<b>Imagen.9.</b> Representación del Procedimiento de Histología	40
<b>Figura.1.</b> Orejas de Ratón Perforadas	42
<b>Figura.2.</b> Graficas Comparativas del Cierre de la Herida	43
<b>Figura.3.</b> Crecimiento Apical del Nuevo Tejido	43
<b>Figura.4.</b> Tinción Histológica de Hematoxilina & Eosina de los 1-7 dpp	45
<b>Figura.5.</b> Tinción Histológica de Tricrómica de Masson de los 1-7 dpp	46
<b>Figura.6.</b> Tinción Histológica de Herovici de los 1-7 dpp	47
<b>Figura.7.</b> Tinciones Histológicas de la formación de nuevos folículos pilosos	48
<b>Figura.8.</b> Tinción Histológica de Hematoxilina & Eosina de los 14-35 dpp	50
<b>Figura.9.</b> Tinción Histológica de Tricrómica de Masson de los 14-35 dpp	52
<b>Figura.10.</b> Tinción Histológica de Herovici de los días 14-35 dpp	53
<b>Figura.11.</b> Inmunofluorescencia de la Localización del TGF- $\beta$ 3 de 1-7 dpp	55
<b>Figura.12.</b> Inmunofluorescencia de la Localización del TGF- $\beta$ 3 de 14 dpp	56
<b>Figura.13.</b> Inmunofluorescencia de la Localización del TGF- $\beta$ 3 de 21 dpp	57
<b>Figura.14.</b> Inmunofluorescencia de TGF- $\beta$ 3/SMAD 2-3	58

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Significado	Abreviatura
Capa ectodérmica apical	AEC
Células Madre mesénquimales	MSC
Colágena	Col
Días post coito	dpc
Días pos-perforación	dpp
Factor de Crecimiento de Fibroblastos	FGF
Factor de Crecimiento de Glial	GGF
Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas	PDGF
Factor de Crecimiento de Transformante-Beta	TGF- $\beta$
Factor de Crecimiento de Transformante-Alfa	TGF- $\alpha$
Factor de Crecimiento de Epidérmico	EGF
Factor de Necrosis Tumoral-Alfa	TNF- $\alpha$
Factor de Crecimiento Endotelial Vascolar	VEGF
Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos	GF-CSF
Factor Inhibinas Mulleriano	MIS
Factor Neurotrófico Derivado Glial	GDNF
Factor de Crecimiento Similar a Insulina	IGF
Interleucina	IL
Hormona juvenil	JH
Inhibidores de las Metaloproteinasas	TIMP
Matriz Extracelular	MEC
Metaloproteinasas	MMPs
Metaloproteinasas Unidas a la Membrana	MT-MMPs
Murphy Roths Large	MRL
Polimorfonucleares	PMN
Proteínas Morfogénica de Hueso	BMPs
Proteína Quimiotrayente de Monocitos-1	MCP-1
Señal de Localización Nuclear	NLS

## **Resumen.**

La señalización mediada por el Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- $\beta$ ) está involucrada en los diferentes procesos de reparación de una herida que comprende a la cicatrización y a la regeneración. El TGF- $\beta$ 1 en heridas de mamíferos adultos se encuentra presente durante todo el proceso de cicatrización y a niveles altos, promoviendo la cicatrización. Contrariamente, el TGF- $\beta$ 3 durante la reparación de heridas embrionarias, promueve la regeneración, ya que restaura el tejido dañado de manera similar al perdido ó lesionado, además de encontrarse a niveles altos. Para estudiar el papel del TGF-beta3 en la regeneración se aplicó exógenamente TGF- $\beta$ 3 por medio de perlas de heparina en una herida excisional de espesor total de 2 mm de diámetro en la oreja del ratón. Los resultados obtenidos mostraron que el TGF- $\beta$ 3 induce una respuesta regenerativa promoviendo la formación de nuevos anexos cutáneos a los 7dpp, la formación de un blastema de regeneración a los 14 dpp, un depósito de colágena más laxa y la formación de nuevos islotes de cartílago a los 28 dpp. Estudios realizados por inmunofluorescencia sugieren que el TGF- $\beta$ 3 promueve su propia expresión. La aplicación temprana de una sola dosis de TGF- $\beta$ 3 y la amplia gama de respuestas relacionadas a los procesos regenerativos sugieren que el TGF- $\beta$ 3 es un importante inductor del proceso de regeneración.

**Abstract.**

Signaling mediated by the Transforming Growth Factor Beta (TGF- $\beta$ ) is involved in different processes of wound healing and regeneration. TGF- $\beta$ 1, in adult mammals wound is present throughout the process of healing and at high levels, promoting healing. Conversely, the TGF- $\beta$ 3 during embryonic wound repair, promotes regeneration, since it restores the damaged tissue similar to the lost or injured, as well as be at high levels. To study the role of the TGF- $\beta$ 3 in regeneration, exogenous TGF- $\beta$ 3 through heparin beads in an excisional wound of total thickness of 2 mm diameter in the ear of a mouse was implanted. The results showed that the TGF- $\beta$ 3 induces a regenerative response promoting the formation of new cutaneous appendages the 7dpp, the formation of a blastema of regeneration to the 14 dpp, of over loose collagen a deposit and the formation of cartilage islets to the 28 dpp. Immunofluorescence studies suggest that TGF- $\beta$ 3 promotes its own expression. The early application of a single dose of TGF- $\beta$ 3 and the wide range of responses related to regenerative processes suggest that TGF- $\beta$ 3 is an important inducer of the regeneration process.

## INTRODUCCIÓN

Cuando se produce la pérdida de la integridad y de la continuidad de un tejido animal mediante un traumatismo mecánico se producirá una herida, esto desencadena eventos biológicos y bioquímicos complejos que son necesarios para la recuperación de este. Existen dos mecanismos por los cuales el organismo puede reparar una herida: la regeneración y la cicatrización. Los dos mecanismos tienen como principal objetivo, aunque en diferente grado, recuperar la funcionalidad y la arquitectura del tejido dañado<sup>1,2,3</sup>.

### **Regeneración.**

Se define a la regeneración como la capacidad de un organismo para restaurar o reconstituir una estructura perdida o lesionada por otra parte idéntica, que conserve la estructura y funcionalidad a la original.<sup>4, 5, 6</sup> En el siglo XVIII se empezaron a realizar los primeros estudios sobre la regeneración por Tremblay en la hidra, Reaumur en crustáceos y por último de Spallanzani en la salamandra.<sup>1</sup> La capacidad regenerativa se comporta de manera diferente en los animales invertebrados y en los vertebrados. Esta capacidad en vertebrados está muy disminuida o casi ausente en la mayoría de sus tejidos<sup>6</sup>.

### **Tipos de regeneración.**

La regeneración presenta tres diferentes mecanismos ó tipos: la regeneración epimorfica, la regeneración morfoláctica y la regeneración compensatoria<sup>4,6</sup>.

**Regeneración epimórfica.** El término Regeneración Epimorfica, fué acuñado por Thomas Hunt Morgan a principios del siglo XX<sup>8</sup>, para describir el tipo de regeneración donde el nuevo tejido adquiere la morfología y funcionalidad original al perdido mediante la desdiferenciación, proliferación y la formación de una blastema de regeneración<sup>6,7</sup>.

Específicamente, este tipo de fenómeno o de regeneración se caracteriza por la formación del blastema de regeneración que es un cumulo de células desdiferenciadas, que presenta interacciones epitelio mesénquima y expresa información intrínseca morfogenética que establecerá al nuevo tejido. El ejemplo más común de regeneración epimórfica es la extremidad del anfibio<sup>6</sup>. Los anfibios como la salamandra o el tritón son capaces de regenerar sus

extremidades por completo. En base a estudios realizados en estos modelos se han establecido cinco fases en la regeneración epimórfica<sup>4,6</sup> (**Imagen. 1**):

1. Formación de la capa epidérmica apical.
2. Desdiferenciación.
3. Formación del Blastema.
4. Morfogénesis.
5. Crecimiento.

**Formación de la capa epidérmica apical.** Después de que se produce la amputación en la extremidad hay una hemorragia proveniente del rompimiento de los vasos sanguíneos que es detenida por la contracción de las paredes vasculares, resultando en un coágulo dentro de las primeras horas. En cuestión de pocas horas las células epiteliales de los márgenes de la herida empiezan a migrar para cubrir la zona de la herida, formándose la epidermis de la herida. Esto puede tardar desde solo unas horas hasta un día o dos. Esta estructura epitelial prolifera hasta formar un epitelio engrosado denominado Capa Ectodérmica Apical (AEC, por sus siglas en inglés), y que es necesario para que la regeneración prosiga debido a la pérdida de un ambiente propicio para la interacción epitelio-mesénquima y la interrupción en la desdiferenciación de las células subyacentes del AEC<sup>4,6,8</sup>.

**Desdiferenciación.** La desdiferenciación ocurre cuando las células diferenciadas subyacentes a la AEC tales como las células óseas, las células cartilaginosas, los fibroblastos y los miocitos pierden sus características fenotípicas. Los genes como *mrf4* y *mrf5* disminuyen su expresión en las células musculares y empiezan a expresar el gen *msx1*, que está asociado a la indiferenciación del mesénquima en la zona de la extremidad embrionaria. Posteriormente se empieza a formar una masa de células proliferativas y desdiferenciadas que formarán al blastema de regeneración<sup>4,6</sup>.

**Formación del blastema de regeneración.** La formación del blastema de regeneración depende de corrientes eléctricas que son producidas por los nervios cercanos y que son conducidas a través del muñón. Singer, en 1954, demostró que las fibras nerviosas liberan factores para mantener e

incrementar la proliferación de las células del blastema. Los principales factores liberados son: Factor de Crecimiento de Fibroblastos-2 (FGF-2), Factor de Crecimiento Glial-2 (GGF-2), la sustancia P y la proteína transportadora de hierro (transferina), que están implicados en la proliferación de las células del blastema<sup>4,6,8,9</sup>.

Un blastema, en la extremidad de la salamandra en regeneración, puede ser reconocida como una zona blanquecina en el borde de la herida, subyacente a la AEC, posiblemente debido a la ausencia de células pigmentarias<sup>9</sup>. Y cabe destacar que el blastema de regeneración solo se encontrara presente en organismos que tengan una regeneración de tipo epimorfica.

**Morfogénesis.** Durante la Morfogénesis se puede observar la formación de novo de los diferentes tejidos a partir del blastema en una dirección próximodistal y anteroposterior. Al término de esta fase la extremidad es casi idéntica a la estructuralmente a la perdida.<sup>6</sup>

**Crecimiento.** La fase de crecimiento comienza, cuando la extremidad regenerada esta estructuralmente bien formada pero se encuentra de menor tamaño que la original, después de varias semanas, la extremidad que se regeneró empieza a crecer hasta alcanzar las dimensiones a las que tenía originalmente.<sup>6</sup>

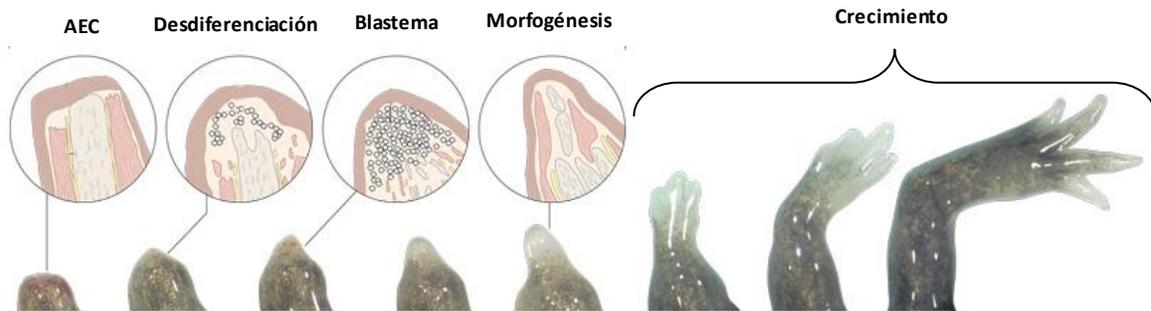


Imagen.1. Representación esquemática del proceso o etapas de la regeneración epimorfica en la extremidad de un anfibio (salamandra). *Makoto Suzuki, et al. 2006*

**Morfolaxis.** La Regeneración Morfoláxica se describe como un drástico remodelado de los tejidos preexistentes que contribuirán a la formación de los tejidos perdidos sin proliferar inicialmente. Se presenta en invertebrados y el nuevo organismo se forma sin la necesidad de que haya un blastema de regeneración. Primero se construye el nuevo tejido ó un individuo completo a partir de los tejidos remanentes, como lo describió Morgan en 1898, y posteriormente se inicia la proliferación celular que contribuye a alcanzar el tamaño original<sup>7,9</sup>.

El modelo que más se utiliza para describir la morfolaxis es la hidra. A partir de segmentos obtenidos del corte del cuerpo de la hidra, surgen nuevos organismos del tamaño del trozo seccionado en los que se desarrollará la cabeza y el pie a partir de la región anterior y posterior del tejido seccionado respectivamente. La polaridad anteroposterior de la hidra es establecida por una serie de gradientes morfogenéticos conformados por la alta concentración de WNT de Hidra y de Goosecoid en la región anterior, donde se formará la cabeza, que irá decreciendo en la región posterior para formar el disco basal<sup>4,7,9,10</sup> (**Imagen. 2**).

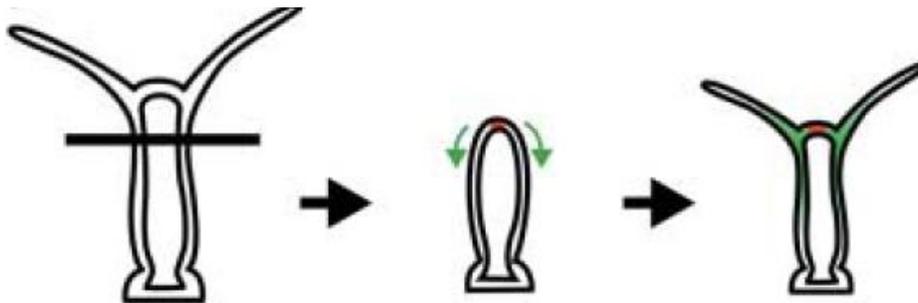


Imagen. 2. Regeneración de una Morfolaxica de la hidra, después de la amputación (en rojo) se inicia la interacción anteroposterior para que de lugar a la regeneración (flechas en verde). Kiyokazu Agata, et al.2007

**Regeneración Compensatoria.** La Regeneración Compensatoria es el esfuerzo de un órgano para superar el efecto de algunas insuficiencias funcionales sobre el organismo, se refleja como el incremento y el despliegue de las células existentes que generan el crecimiento rápido de alguna otra región del órgano que ayuda a compensar la pérdida del tejido dañado. Este tipo de regeneración se puede ver claramente en el hígado. Cuando se extirpa una porción de uno de sus lóbulos dejando a los otros intactos, el lóbulo extirpado no vuelve a crecer pero los lóbulos restantes aumentan de tamaño para compensar esta pérdida del tejido hepático. Este crecimiento regenerativo está bajo control de un mecanismo regulador del crecimiento, ya que este se detiene cuando el tejido perdido ha alcanzado su tamaño normal<sup>11,12</sup>.

En este tipo de regeneración se basa principalmente en la proliferación celular de las células diferenciadas, así, en el hígado, las células hepáticas, (los hepatocitos), las células del conducto, las células almacenadoras de grasa, las células endoteliales y los macrófagos de Kupffer, empiezan a dividirse para generar el mismo linaje celular<sup>4,11,12</sup>.

**Regeneración fisiológica.** La regeneración fisiológica se refiere a la sustitución y renovación natural de un tejido. Hay ejemplos muy claros de este tipo de regeneración como es la reposición las células epiteliales del intestino, la renovación del endometrio después de cada ciclo menstrual y el reemplazo de las células sanguíneas. La regeneración fisiológica es considerado como un término de conveniencia que incorpora una variedad de procesos destinados a mantener el equilibrio normal de los tejidos del cuerpo.<sup>6</sup>

### **Regeneración en Invertebrados.**

Los invertebrados poseen una gran capacidad regenerativa<sup>5</sup>, ya que en muchas de las especies de invertebrados la regeneración es también una forma de reproducción asexual. Las esponjas, son los invertebrados más primitivos que presentan regeneración. Las células responsables de este proceso son los arqueocitos, considerados las células madre capaces de generar el resto de los tipos celulares presentes en estas especies. Cuando se presenta algún daño, los arqueocitos se acumulan en el sitio de la herida y forman un blastema del que se generan otros tipos celulares. Hay algunas especies de esponjas en donde los pinacocitos, las células que recubren a los organismos, cubren en su totalidad la superficie de la herida, delimitando el espacio mesénquimal que contiene fibroblastos y arqueocitos<sup>13</sup>.

La regeneración de las planarias implica dos procesos diferentes: la regeneración epimorfica y la morfolaxis, en donde hay una reorganización del tejido en el muñón. La regeneración epimorfica en estas especies se observa cuando se regenera el tronco y la cabeza y la regeneración Morfolaxica sólo se encuentra presente en la regeneración de la cola. La Formación del Blastema ha sido atribuida a la existencia de células especializadas totipotentes en el parénquima, cuyo origen en el papel de la regeneración ha sido objeto de debate durante muchos años<sup>4,9,13</sup>.

La regeneración también es consistente en los anélidos. Los Anélidos son los metazoos triploblásticos que comparten la característica de metamerización. El tronco del cuerpo consiste en una sucesión longitudinal de unidades llamadas metámeros o segmentos. La regeneración y la reproducción asexual por fragmentación se da cuando un organismo puede romperse en dos o más fragmentos y cada uno de estos fragmentos es capaz de convertirse en un individuo a través de la regeneración, proceso que también es compartido de manera muy similar con las anémonas y muchos hidrozooos. La regeneración es evidente principalmente en los Poliquetos y Oligoquetos, y el tipo de regeneración que este grupo de anélidos presenta es de tipo epimorfica. Los poliquetos pueden reemplazar las regiones perdidas anteriores más exitosamente que los oligoquetos, pero este potencial regenerativo es más evidente en los individuos que habitan en tubos (gusanos tubícolas)<sup>13</sup>.

La regeneración de los moluscos se observó por primera vez en 1768 por Spallanzani, muchos órganos pueden ser reemplazados después de la amputación o autotomía (escisión de una parte del cuerpo provocada por el propio organismo), incluyendo el pie y la cabeza con los órganos cefálicos (ojos, tentáculos, rádula) en gasterópodos, y los brazos y partes del manto, incluyendo a los órganos derivados, de los cefalópodos. Casi todas las especies de moluscos son capaces de regenerar estas estructuras<sup>13</sup>.

Los Artrópodos incluyen principalmente crustáceos e insectos. Los artrópodos, como los moluscos, no pueden regenerar un animal completo a partir de un fragmento aislado del cuerpo y están totalmente desprovistos de la reproducción asexual. En cambio, los mecanismos de autotomía se encuentran en los miembros de todas las clases, incluso en ausencia de regeneración. Siempre que un artrópodo sigue su muda puede regenerar prácticamente cualquier accesorio, por lo que la dependencia del ciclo de muda y de las hormonas es una característica de la regeneración de los artrópodos. Durante la muda, los artrópodos desprenden su exoesqueleto

para aumentar de tamaño y, en caso de tener una extremidad pérdida, la remplazan. Esto es controlado por dos hormonas reguladoras, la 20-hidroxiecdisona y la hormona juvenil (JH)<sup>13,14</sup>.

Los equinodermos son deuterostomados (aquellos animales en los que el blastoporo no origina la boca) y pentarradiales con una dermis calcárea rígida. A excepción de los erizos de mar, la mayoría de los equinodermos (estrellas de mar, ophiurs, holoturias) son capaces de regenerar un animal entero a partir de un fragmento del cuerpo. Por ejemplo, las estrellas de mar pueden originar un animal completo a partir de un brazo amputado. Varias especies de holoturias son capaces de regenerarse, formando un animal completo, a partir de la sección de su cuerpo en varios fragmentos. Muchos representantes de esta clase, cuando se toman fuera del agua ó son sometidos a lesiones, desechan una gran parte de sus órganos internos (tracto gastrointestinal, sistema ambulacral y gónadas) por un proceso denominado evisceración, estos órganos son entonces restaurados por completo<sup>13,15</sup>.

### **Regeneración en Vertebrados.**

A diferencia de los invertebrados, la capacidad regenerativa de los vertebrados es más restringida y sólo pocas especies de los diferentes Phyla presentan dicho rasgo.<sup>5</sup>

Los peces primitivos pulmonados africanos (subclase Dipnoi) pueden regenerar su aleta pectoral; un delgado apéndice cónico compuesto por cadenas de cartílagos. Los teleósteos son bien conocidos por su capacidad para regenerar aletas caudales, pectorales y pélvicas. El pez cebra puede regenerar aletas y el tallo neural y probablemente todos los axones de la medula espinal<sup>13,16,17</sup>.

Los anfibios urodelos (tritones y salamandras) poseen una amplia gama de capacidad regenerativa. Varias especies pueden regenerar sus extremidades, la cola (incluyendo la médula espinal), las mandíbulas y los tejidos oculares; como la córnea, el cristalino y la retina. Una cuestión clave en la regeneración de estos vertebrados con respecto a las extremidades, es la regeneración epimorfica por la formación de un blastema de regeneración<sup>8,13</sup>. En anfibios anuros, la amputación de las extremidades anteriores presenta algunos rasgos regenerativos limitados, ya que se forma un miembro rudimentario en el lugar de la amputación<sup>18</sup>.

La regeneración está severamente restringida en aves, reptiles y mamíferos y no queda claro que factores celulares y bioquímicos son los limitantes en sus tejidos. En aves, el cristalino y la retina se pueden regenerar en embriones de pollo y las células ciliadas del oído interno pueden ser reemplazadas en aves adultas, además recientemente se ha demostrado que la regeneración de las extremidades puede ser inducida durante el desarrollo del pollo<sup>13</sup>. En los reptiles, la regeneración no es muy común, en los lagartos la regeneración se limita a la cola pero esta es diferente a la original, por ejemplo, las escamas que recubren a la cola difieren de las originales y la columna vertebral tiene una estructura simplificada<sup>13,19</sup>. En los mamíferos, los primordios de las extremidades embrionarias muestran una respuesta regenerativa en los dedos 1 y 5 parcialmente desarrollados a los 13.5 dpc (días post coito)<sup>20</sup>. Al respecto, se sabe que incluso los dígitos de los humanos en etapa infantil y adulta, así como los de los ratones y monos se regenerará pero sólo cuando la amputación es a través del lecho de la uña de la falange distal, que es muy importante para generar una respuesta regenerativa, ya que cuando esta estructura se retira, la regeneración no se produce<sup>21</sup>. La regeneración de la punta del dígito en ratones fetales y neonatales se correlaciona con la expresión de *Msx-1* en la región distal amputada. El *Msx-1* es un factor de transcripción que también es expresado en las regiones proliferativas no diferenciadas durante la regeneración de la extremidad del tritón<sup>22</sup>. Se ha propuesto que la expresión de *Msx-1* puede ser esencial para la regeneración al mantener el estado de dediferenciación y mantenimiento del blastema ya que *Msx-1* induce la dediferenciación en cultivos de miotubos. Durante la regeneración de la punta del dedo la expresión de *Msx-1* se observa en el mesénquima del lecho de la uña, lo que se ha sugerido estar representando una población de células madre pluripotentes y como un centro de señalización de producción de factores necesarios para la regeneración<sup>23</sup>.

## Cicatrización.

La cicatrización resulta en la formación de una cicatriz que es generada por el abundante depósito de proteínas de matriz extracelular (MEC), principalmente por colágena I y colágena III. Se considera como un proceso dinámico interactivo, donde participan mediadores solubles extracelulares, células sanguíneas y células del tejido dañado<sup>24</sup>. La cicatrización en mamíferos se divide en diferentes fases o etapas que se superponen en el tiempo. Estas son la fase inflamatoria, la proliferativa y la de remodelación, cuyos rasgos y estudios han sido establecidos principalmente por heridas producidas en la piel debido a su sencilla disposición y manipulación<sup>25</sup> (**Imagen. 3**).

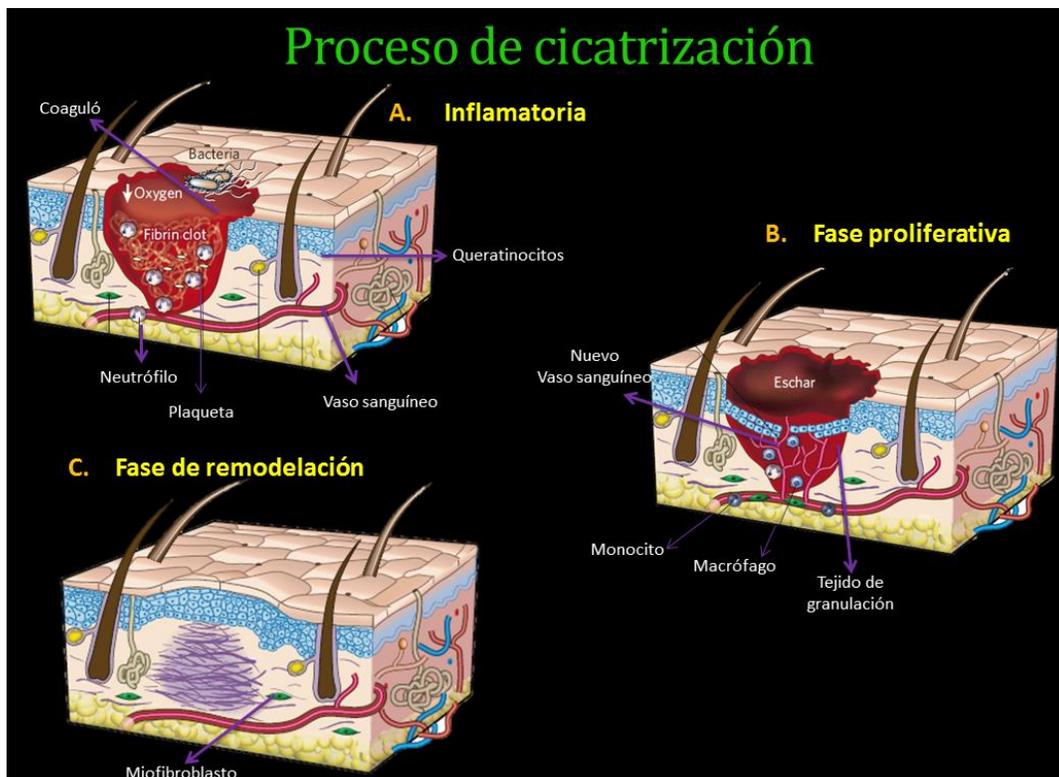


Imagen.3. Fases de la Cicatrización. Inflamatoria. A;Proliferativa. B; Remodelación. C. *Geoffrey C. et al. 2008*

**Inflamación.** Generalmente, después de que se genera una lesión, se produce el rompimiento de vasos sanguíneos, la extravasación sanguínea y la cascada de coagulación que resulta en un tapón que cubrirá a la herida, este tapón o coágulo se compone de fibrina y de plaquetas. Es considerado como un tejido transitorio que será reemplazado por el tejido de cicatrización conforme avanza el proceso de reparación<sup>26,27</sup>. Se considera esencial en la respuesta inflamatoria por la liberación de factores de crecimiento y de citocinas que organizan a las células e inducen los mecanismos necesarios para la reparación de la herida<sup>18</sup>.

Las plaquetas que se encuentran en el lecho de la herida, liberan una serie de factores de crecimiento como el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF), el Factor de Crecimiento Transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), el Factor de Crecimiento Transformante- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) y el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) que funcionan como agentes que estimulan ó regulan la migración epidérmal, la angiogénesis, la activación de los fibroblastos y como quimiotacticos para el reclutamiento de las células inflamatorias<sup>25,27</sup>.

Las primeras células inflamatorias en ser reclutadas son los neutrófilos, que son células polimorfonucleares (PMN), que son atraídos por el complemento C5a, PDGF y la quimiocina CXCL8. Estos se agregan a los pocos minutos en el sitio de la herida y tiene la función de eliminar a las bacterias o agentes infecciosos por la liberación de una gran variedad de sustancias antimicrobianas y por fagocitosis. Además, los neutrófilos producen citocinas proinflamatorias tales como IL-1 $\alpha$  y el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), que promueven la expresión de moléculas de adhesión como la Selectina P y la Selectina E, así como de ICAM-1 e ICAM-2, involucrados en la adhesión de leucocitos y la diapédesis, que es el paso de los leucocitos a través de las células del endotelio y de la membrana basal. Los neutrófilos llegan al sitio dañado por la acción de IL-8, LTB4 y C5a. Una vez realizada su función los neutrófilos mueren por apoptosis promoviendo la activación de los macrófagos y monocitos<sup>24,27,28</sup>.

En la piel hay monocitos residentes que son activados al producirse la herida y que promueven, junto con el epitelio de la herida, el reclutamiento por diapédesis de los monocitos en circulación por la secreción de varias quimiocinas, tal como la Proteína Quimioatrayente de Monocitos-1 (MCP-1)<sup>24,29</sup>. Esta diferenciación implica una activación de los macrófagos que resultará en la fagocitosis de los neutrófilos, de restos de agentes patógenos y de células necróticas del tejido, así como la síntesis de numerosos factores de crecimiento como TGF- $\beta$ , TGF- $\alpha$ , EGF y PDGF que estimulan la proliferación de los queratinocitos y los fibroblastos, además de

promover la síntesis de moléculas de la MEC. Los macrófagos se consideran las células claves en la transición entre la fase inflamatoria y la de proliferación<sup>25, 27, 28, 29</sup>.

**Proliferación.** La fase de proliferación se caracteriza por la estimulación de varios procesos importantes: la angiogénesis, la epitelización y la contracción. La angiogénesis se caracteriza por la formación de nuevos capilares y vasos sanguíneos. Las células endoteliales participan en la formación de las nuevas estructuras vasculares que son estimuladas por VEGF y FGF-2 induciendo su proliferación en la matriz provisional de fibrina y formando nuevos capilares. Además las células endoteliales empiezan a producir metaloproteinasas (MMPs) que contribuirán en el establecimiento de los vasos sanguíneos en la región de la herida por la degradación de la matriz provisional. La angiogénesis se puede favorecer por tres mecanismos diferentes: formación de una red de novo, anastomosis de vasos preexistentes y acoplamiento en los vasos de la herida y se inicia simultáneamente con la proliferación de los fibroblastos o fibroplasia<sup>30</sup>.

La reepitelización requiere de la migración, proliferación y diferenciación de los queratinocitos adyacentes. Esta migración se da a través de la matriz provisional de fibrina<sup>29</sup>. Existen dos posibles sitios de migración de los queratinocitos: los bordes libres de la herida y los remanentes de las células madre del folículo piloso en el área afectada<sup>31</sup>. La proliferación de los queratinocitos es favorecida por EGF, TGF- $\beta$ 1, FGF-2, -7 y -10<sup>24</sup>.

Los queratinocitos pueden regular su propia actividad a través de la liberación de IL-1 $\alpha$ , ya que esta interleucina promueve la inducción de FGF-7 y del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) por parte de los fibroblastos que resulta en la activación de los queratinocitos adyacentes a la herida y acelerar el cierre de esta<sup>24, 27</sup>. Los fibroblastos constituyen las células más importantes en la producción de la matriz dérmica que migran a la región de la herida auxiliándose del receptor de matriz, la integrina  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 que interactúa con la fibronectina de la matriz provisional de la herida. PDGF estimula, además de la expresión de las subunidades  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 5 de las integrinas, la proliferación de los fibroblastos junto con TGF- $\beta$ 1 y FGF<sup>24</sup>.

Los fibroblastos son las principales células responsables del recambio de la matriz celular produciendo inicialmente colágena III y elastina lo que incrementa la fuerza de la matriz provisional que se forma. Adicionalmente, también producen fibronectina, laminina y tenascina que median la adhesión de los diferentes tipos de celulares en la MEC. Los fibroblastos adyacentes al sitio de la herida se diferencian a miofibroblastos que expresan  $\alpha$ -actina de músculo liso y

vimentina. Estas células tienen características ultra estructurales de musculo liso que contraen el tejido de la herida y producen grandes cantidades de componentes de la MEC como colágena I, tenascina C y fibronectina<sup>24,29</sup>. La contracción de la herida ayuda a disminuir el espacio entre los extremos dérmicos y la superficie de la lesión, que, para heridas de espesor total, contribuye hasta un 40% en la disminución de esta<sup>29,32</sup>.

**Remodelación.** La remodelación consiste en el depósito de matriz extracelular permanente. El coágulo de fibrina formado se reemplaza por tejido de granulación rico en colágena tipo III y subsecuentemente por colágena tipo I. La principal característica de la fase de remodelación es el cambio de la composición de la MEC. La colágena tipo III se secreta en estadios tempranos de la reparación, aparece entre las 48 o 72 hrs, y gradualmente es reemplazada por colágena tipo I, siendo esta más estable y similar a la original<sup>25, 29</sup>. El recambio de la colágena tipo III por la colágena tipo I es controlada por las metaloproteasas de Matriz (MMPs).<sup>24</sup>

Las MMPs son una familia de proteasas dependientes de Zinc de 180 residuos de aminoácidos secretadas generalmente, al medio extracelular. Los miembros de la familia de MMPs se clasifican en 6 familias e incluyen más de 24 miembros: colágenasas, estromelisin, matrilisin, metaloproteinasas unidas a la membrana (MT-MMPs), gelatinasas y otros tipos<sup>33</sup>. Las colágenasas corresponden a MMP-1, -8 y 13 y rompen la colágena fibrilar tipo I, II y III; Las estromelisin, MMP- 3, -10 y -11, actúan sobre los proteoglicanos, laminina, fibronectina y colágena desnaturalizada. La MMP-7, perteneciente a las matrilisin, es sintetizada por células las epiteliales y secretada apicalmente, incide en moléculas de superficie celular como el ligando Fas. Las metaloproteinasas unidas a la membrana cuenta con las proteínas transmembranales de tipo 1 (MT-MMP-14, -15, -16 y -24) y dos proteínas ancladas al glicosifosfatidilinositol (MMP- 17, 25) con actividad colagenolítica. Las gelatinasas (MMP-2 y 9) degradan la colágena desnaturalizada, las gelatinas, la laminina, la fibronectina y un número de moléculas de la MEC incluyendo a la colágena IV, V y XI. Finalmente hay 7 MMPs que no están clasificadas en las categorías anteriores, un ejemplo es la MMP-12 que fue descubierta en macrófagos, pero que también se expresa en los condrocitos hipertróficos. Esta MMP degrada la elastina y es esencial en la migración de macrófagos<sup>34,35</sup>.

Terminadas las diferentes fases de la cicatrización, el tejido cicatrizante resultante, compuesto principalmente de matriz extracelular, carece de anexos cutáneos (folículos pilosos, glándulas sebáceas y sudoríparas) y alcanza una resistencia máxima del 70%<sup>29,32</sup>.

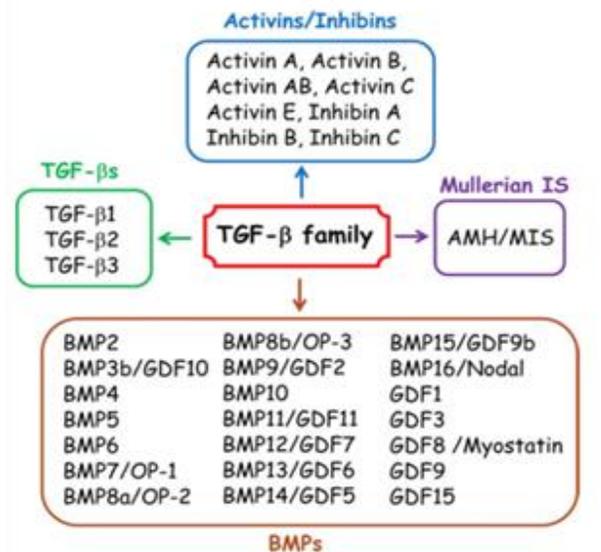
## La Súperfamilia del Factor de Crecimiento Transformante-Beta (TGF-β).

Desde el descubrimiento del primer miembro de la súper familia del TGF-β en los años 80, se han identificado y caracterizado numerosas proteínas relacionadas funcionalmente en vertebrados e invertebrados. En los mamíferos, los miembros de la súperfamilia del TGF-β regulan una amplia variedad de procesos biológicos como la morfogénesis, la diferenciación celular, la apoptosis, la síntesis de la matriz extracelular (MEC) y la migración de diversas estirpes celulares<sup>36, 37,38</sup>.

Los miembros de la superfamilia del TGF-β están conformados por un grupo de polipeptidos dimericos que difunden hacia el medio extracelular y que interactúan con receptores transmembranales en las células blanco<sup>39</sup>.

La súperfamilia del TGF-β incluye a más de 40 miembros agrupados en varias familias. La familia del TGF-β comprende de tres isoformas en mamíferos; el TGFβ1, el TGFβ2 y el TGFβ3, la familia de las Proteínas Morfogenéticas del Hueso (BMPs) se conforma por más de 20 miembros, la familia de las Activinas incluye diversas isoformas de las Activinas y las Inhibinas y finalmente la agrupación de otros péptidos relacionados tal como el Factor Inhibitorio Mulleriano (MIS) y el Factor Neurotrófico Derivado Glial (GDNF)<sup>36,38</sup> (Imgen.4).

Las tres isoformas del TGF-β, presentes en los humanos son codificados por tres genes distintos; 19q13, 1q41 y 14q24 para TGFβ1, TGFβ2 y TGFβ3, respectivamente<sup>36</sup>. El TGF-β1, es la isoforma predominante en mamíferos adultos, mientras que las tres isoformas del TGFβ son expresadas durante el desarrollo embrionario, desde la etapa de cuatro células, pasando por la etapa del blastocito y continuando presente durante la morfogénesis de la gran mayoría de los tejidos<sup>40</sup>.



Imgen.4. La súperfamilia de los TGF-β, se divide en cuatro grandes grupos. Los TGF-βs, BMP, Activinas/Inhibinas, MIS y GDNF. Juan F. Santibáñez, et al. 2011.

## Vía de la Señalización del TGF- $\beta$ medida por las SMADs.

Los miembros de la familia del TGF- $\beta$  actúan interaccionando con sus receptores que se encuentran en la membrana de las células sensibles a esta señalización. Hay dos tipos de receptores que son cinasas de serina treonina necesarios para trasducir la señal del TGF- $\beta$ . El TGF $\beta$  interacciona primeramente con el receptor tipo II (T $\beta$ RII) que promueve el reclutamiento y la activación del dominio cinasa del receptor tipo I (T $\beta$ RI/ALK5). La activación de T $\beta$ RI/ALK5 induce la transducción de la señal del TGF $\beta$  mediada de manera canónica por las proteínas SMAD. Las SMADs activadas por el receptor (R-SMADs) que son Smad2 y Smad3, son fosforiladas por el receptor tipo I lo que promueve la formación de un complejo con una SMAD acompañante ó Co-SMAD que es la Smad4. Este complejo se transloca del citoplasma hacia el núcleo, donde interactúan de una manera específica con otros factores de transcripción como AP-1, y regulan la transcripción de genes blanco de respuesta al TGF- $\beta$ . Se han reconocido dos R-SMADs que transducen la señal de la familia del TGF $\beta$ ; la SMAD2 y la SMAD3 que forman el complejo citoplasmático con la SMAD4, la única Co-SMAD reconocida en mamíferos. Existen otros tipos de SMADs que regulan negativamente la señalización del TGF $\beta$ . Estas son las SMADs Inhibidoras, SMAD6 y SMAD7, que carecen de la región que es fosforilada por el T $\beta$ RI pero que presentan los dominios de interacción con el receptor y con la SMAD4, confiriéndoles su característica inhibitoria por la competencia existente entre la SMAD2 y la SMAD3 <sup>37, 39, 40, 41, 42</sup> (Imagen.5).

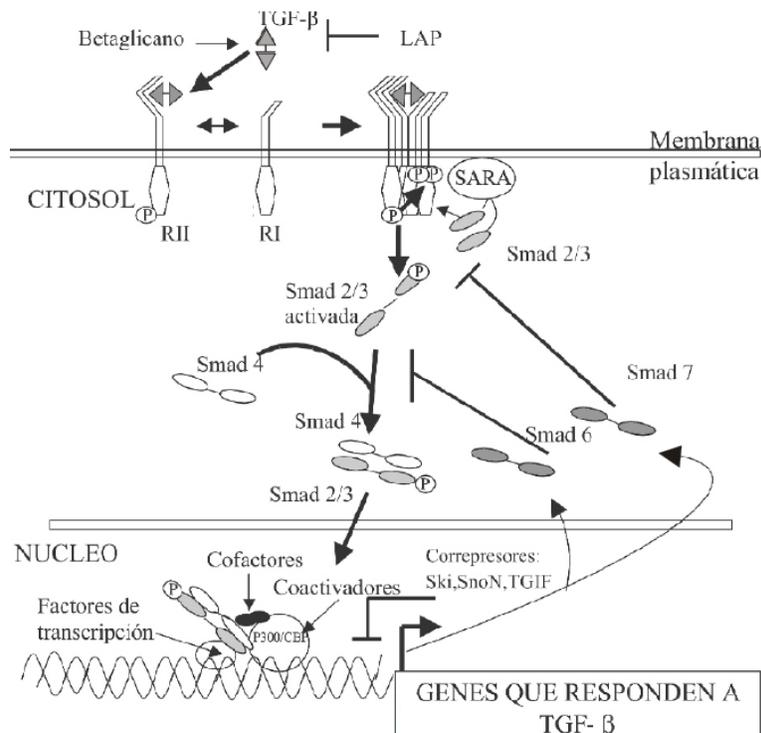


Imagen.5. Vía de señalización del TGF- $\beta$ . Se observan los complejos formados por las Smad para llevar la señal del TGF- $\beta$  a sus genes blanco. *Marcela Sosa-G. et al. 2004*

## Receptores del TGF- $\beta$ .

Los miembros de la súperfamilia del TGF- $\beta$  median su señal a través de un complejo receptor compuesto de receptores cinasas de serina-treonina. Todos los receptores son transmembranales y presentan su dominio cinasa en la parte intracelular, un dominio transmembranal y un dominio extracelular más corto y rico en cisteínas y N-glicósidos<sup>43</sup>.

Este complejo receptor de serina-treonina cinasa consta de dos proteínas transmembranales distintas, conocidas como los receptores tipo I (T $\beta$ RI) y los receptores tipo II (T $\beta$ RII). Para el caso de los miembros de la familia del TGF $\beta$ , hay una alta afinidad del ligando con un par de receptores tipo I, cuando se alcanza esta interacción es reclutado un par del receptor tipo II que resulta en la formación del complejo receptor formado por el ligando, un par de receptores tipo I y un par de receptores tipo II. Estas interacciones conducen a un evento de fosforilación unidireccional en el que el receptor de tipo II fosforila al receptor de tipo I, activando de este modo su dominio cinasa<sup>41</sup>. Hay siete receptores tipo I (ALK 1-7) y cinco receptores de tipo II (TGF $\beta$ RII/ BMPRII/ ACVRII/ ACVRIIB/ AMHR2), que median la señal de los miembros de la superfamilia del TGF $\beta$ <sup>44</sup>. Se ha observado que los receptores tipo II son cinasas constitutivas, mientras que la actividad cinasa de los receptores tipo I depende de su fosforilación por el receptor II.

Las tres isoformas del TGF- $\beta$  para la activación de su señal son mediadas por un solo receptor tipo II, el TGF $\beta$ RII, y un receptor tipo I denominado TGF $\beta$ RI ó ALK-5. Además, las tres isoformas del TGF- $\beta$  pueden interactuar, con moléculas de superficie celular que funcionan como presentadores de los ligandos a los receptores del TGF $\beta$ , estas son el betaglicano y la endoglina.<sup>28,30</sup> El betaglicano, conocidos también como co-receptor tipo III (T $\beta$ RIII), es un proteoglicano que tiene la capacidad de unir con gran atracción al TGF $\beta$ 2, compensando así su baja afinidad por los receptores tipo I y II. Mientras que la endoglina es una glicoproteína, presente en las células endoteliales; comparte características con el betaglicano, sin embargo une al TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 3 selectivamente pero al TGF- $\beta$ 2<sup>37,40</sup>.

### **Proteínas Traductoras de Señal: Las SMAD.**

Las proteínas Smad han sido identificadas como las principales proteínas mediadoras de la señalización intracelular de los miembros del TGF- $\beta$  que actúan también como factores de transcripción. Hay tres diferentes tipos de proteínas Smad que son identificadas por su estructura y funcionalidad.<sup>26</sup> Las R-Smads son las Smads activadas por fosforilación en su motivo SXSS localizado en la región carboxilo terminal, por el receptor T $\beta$ RI. Estas proteínas blanco del receptor tipo I participan en la especificidad de la respuesta biológica. Este grupo cuenta con cinco miembros la Smad-2 y la Smad-3 que son reconocidos por receptores de TGF- $\beta$  y Activinas y las Smad-1, Smad-5 y Smad-8, reconocidos por los receptores de BMP<sup>39</sup> **(Imagen.6)**.

En el segundo grupo encontramos a las Co-Smad. Esta Smad forma complejos heterotrimericos con las R-Smad activadas. La formación de este complejo se transloca al núcleo y es fundamental para la regulación de genes blanco de la señal del TGF $\beta$ . Esta subfamilia o sub grupo cuenta con un solo miembro en mamíferos que es la Smad-4y se ha identificado en *Xenopus* a Smad-4 $\beta$  ó Smad-10. La principal función de las co-Smads es la de regular la transcripción ya que puede reforzar la interacción de las R-Smads con el DNA y recluta a varios co-activadores ó co-represores transcripcionales, con los que regula positiva o negativamente la expresión génica<sup>41</sup> **(Imagen.6)**.

Las Smad inhibitoras (I-Smad), están formadas por la Smad-6y la Smad-7. La Smad-6inhibe preferencialmente la señalización de las BMPs, mientras que las Smad-7 antagoniza la señal del TGF- $\beta$ /Activinas y la de las BMPs<sup>44</sup>.

Las R-Smads y la Co-Smad poseen dos dominios, el MH1 (N-terminal) y el MH2 (C-terminal), conectadas por una región de enlace denominada región Linker. El dominio MH1 posee una señal de localización nuclear (NLS), interacciona directamente con el DNA y con otros factores reguladores de la transcripción tal como ATF2 y TFE<sup>40</sup>. Smad-2 es la única R-Smad que carece del motivo de unión al DNA, por lo que requiere de la interacción con Smad-4 para controlar la transcripción. El dominio MH-1 puede interaccionar con el dominio MH-2 en las R-Smads que se encuentran en estado basal (no fosforiladas) resultando en la inhibición de la transcripción y la actividad biológica mediada por las Smads **(Imagen.6)**.

El dominio MH2 permite la oligomerización de las R-Smads con la Co-Smad, permite la unión específica con el receptor tipo I y con diferentes proteínas nucleares reguladoras de la transcripción tal como FAST, CBP, TGIF y Ski. En este dominio se realiza la fosforilación en el motivo SSXS por el receptor tipo I que permite la activación de las R-Smads<sup>37</sup>.

La región “linker”, es la menos conservada entre las diferentes Smads, ya que es muy variable en las secuencias como en el tamaño, es rico en serina y prolina y contiene múltiples sitios de fosforilación que son reconocidos por las cinasas activadas por mitógenos (MAPK) que una vez fosforiladas se mantienen en el citoplasma impidiendo su translocación nuclear.

Es notable que la activación de la vía del TGF- $\beta$  por activación de las Smads es auto-regulable ya que se ha identificado un Elemento de Unión a las Smads (SBE) en el promotor de *Smad7*<sup>40,45</sup>.

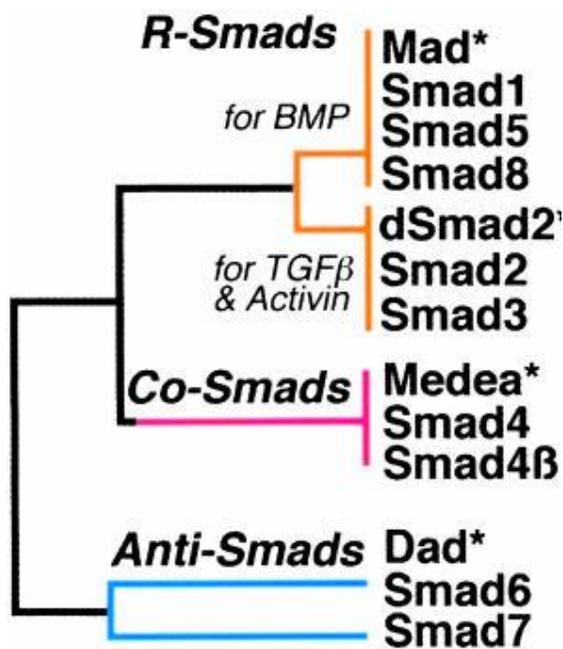


Imagen.6. Representación de la interacción de las diferentes Smad con la familia de TGF- $\beta$ s. Joan Massague. 2000

## Control de la Activación de la Vía de la Señalización de TGF- $\beta$ /SMAD.

Se han reportado numerosas proteínas que interactúan con los receptores y con las proteínas Smads que regulan la señal por diferentes mecanismos. Existen dos diferentes tipos de proteínas reguladoras; las positivas, que promueven la señal y las negativas que la antagonizan ó inhiben. Dentro de los reguladores positivos se encuentran al receptor tipo III, que son proteoglicanos anclados a la membrana y que unen al TGF- $\beta$  con gran afinidad para posteriormente presentarlo a los receptores tipo II. La interacción de las proteínas R-Smad con el complejo receptor esta mediada por la proteína asociada a la membrana SARA. Esta proteína se asocia a la membrana celular a través del dominio FYVE por la interacción directa de sus lípidos. SARA une a Smad2 y a Smad 3 encontrados en el citoplasma y facilita la interacción de estas Smads con el complejo receptor del TGF- $\beta$ <sup>38,46</sup>.

De las proteínas más conocidas que ejercen un control negativo son las Smads inhibitoras. Las Smad-7 puede unirse al receptor tipo I e interferir con su fosforilación y activación ya que carecen del motivo SSXS lo que resulta también en una competencia con las R-Smads su asociación con el receptor o con la Smad-4. Smad-7 además es capaz de reclutar a Smurf-1 que media la degradación proteosomal de los receptores tipo I por ubiquitinación.<sup>37,40</sup>

A pesar de ser, conceptualmente, una señalización simple y lineal, la señalización TGF $\beta$ /Smad produce varias respuestas celulares muy complejas. Esto se debe, en parte, a que el complejo R-Smad/Smad4 nuclear puede unirse a diversos factores que promueven la transcripción específica de ciertos genes blancos. FAST, OAZ, TEE3, AP-1 y AML son algunos de estos factores de transcripción que interactúan con las Smads y que producen ciertas respuestas específicas en las células<sup>46</sup>.

FAST, en un miembro de la familia de proteínas de unión al ADN con motivo de "hélice en forma de ala" (Winged-helix) identificado por unirse al elemento de respuesta a Activina (ARE), una región del DNA que pertenece al Potenciador (Enhancer) del gen *Mix.2*, que codifica para el factor con caja homeótica (Homeobox) *Mix.2* en *Xenopus*. Se conoce que FAST-1 media la activación de un complejo de genes relacionados con la especificación del mesodermo. Fast-1 interactúa con los complejos Smad2/Smad4 o Smad3/Smad4, pero no con complejos activados de Smads que median la señal de las BMPs. La interacción de FAST-1 con el complejo de las Smads permite la activación eficiente de la transcripción de *Mix.2*, *gooseoid*, *nodal* y *Lefty2*, genes que

especifican el mesodermo. A diferencia del dominio MH1 de smad4 que no es requerido para la unión al DNA del complejo de Smad3/Smad4/FAST-1, este es necesario cuando el complejo induce a Smad2, cuyo dominio MH-1 carece de las secuencias de unión al DNA<sup>46,47</sup>.

OAZ se identificó como un cofactor de unión al DNA que se asocia con la Smad1, una Smad activada por la señal de las BMPs, para promover la transcripción del gen que codifica para el factor de transcripción con caja homeótica, *Xvent-2*, que controla la ventralización del mesodermo y suprime la neurulación en *Xenopus*. La región promotora de *Xvent-2* contiene un elemento de respuesta a BMP (BRE) que permite la unión de Smad1/Smad4 y el reclutamiento de OAZ, que carece de una actividad intrínseca de tras-activación, y que es auxiliada por el complejo de las Smads a través del dominio MH-2<sup>38,46,48</sup>.

TFE3 se identificó como un factor de transcripción que regula la expresión de la cadena pesada de la inmunoglobulina  $\mu$  uniéndose su Potenciador. TFE3 interacciona, en forma de homodímero, con el coactivador p300/CBP y con la secuencia de ADN, CACGTG que se conoce como la caja E. TFE3 se une a la caja E en uno de los elementos de respuesta a TGF- $\beta$  del promotor del *inhibidor del activador del plasminogeno (PAI-1)*. La unión de TFE a esta región permite el reclutamiento del complejo de Smad3/Smad4 a dos elementos de respuesta a las Smads (SBE) que están adyacentes. En respuesta al TGF- $\beta$ , las Smad incrementan la actividad basal de TFE3 al compararse con su actividad individual<sup>46,50</sup>.

El complejo AP-1 se constituye de la interacción entre Fos y Jun y participa en la regulación transcripcional de varios genes de respuesta a la señalización del TGF- $\beta$ . Se ha observado *in vitro* que las R-Smads de TGF- $\beta$ s y Activinas interactúan con AP-1 para promover la actividad transcripcional de promotores artificiales. También se ha demostrado que el complejo Smad3/Smad4/AP-1 sinergizan en la activación transcripcional del promotor de *c-Jun*, *c-fos* y *jun B* en diversos tipos celulares<sup>51,38</sup>.

Las proteínas de la familia de la leucemia mieloide aguda (AML) existen como tres formas heterodiméricas, cada una compuesta de una subunidad  $\alpha$  diferente ( $\alpha A$ ,  $\alpha B$  y  $\alpha C$ ) y una subunidad  $\beta$  común. Las subunidades  $\alpha$ -contienen un dominio Runt de unión al DNA y un dominio de trans-activación. La subunidad  $\beta$  mejora la actividad de unión al DNA de las subunidades  $\alpha$ . Se ha demostrado que AML1 ( $\alpha B$ ) se requiere para la hematopoyesis, mientras que AML3 ( $\alpha A$ ) es esencial para la diferenciación de los osteoblastos y la formación del hueso. AML2 ( $\alpha C$ ), junto con AML1, controlan la transcripción del gen de la *inmunoglobulina A (IgA)* a través de la interacción del elemento potenciador  $I\alpha$ . La señalización del TGF- $\beta$  activa este potenciador e induce la transcripción de IgA en las células B del bazo. El elemento promotor de  $I\alpha$  contiene el elemento de unión a las Smads (SBE) y sitios de reconocimiento a AML que son contactados por el complejo Smad3/Smad4/AML1 ó AML2 en respuesta al TGF- $\beta$ . En condiciones de sobreexpresión proteica, así como *in vitro*, las tres subunidades- $\alpha$  pueden formar complejos con las Smads activadas por el TGF- $\beta$  así como con las Smads activadas por BMPs. Estas interacciones involucran al dominio MH2 de las Smads con varias regiones en AML. Se ha descrito que el complejo AML1/Smad parece estar formado constitutivamente en el citoplasma, siendo activado por la asociación con factores adicionales presentes en el núcleo en respuesta a la señal del TGF- $\beta$  <sup>46,52,53</sup>.

## La Señalización de TGF- $\beta$ en la Cicatrización y en la Regeneración.

Cuando se produce una lesión en un tejido u órgano se desencadena el proceso de reparación. Dependiendo de la especie, del tejido dañado, del mecanismo de lesión y de la profundidad de la herida, la reparación se induce por dos mecanismos principales: la cicatrización y la regeneración. La cicatrización resulta en la formación de una cicatriz que es generada por el abundante depósito de proteínas de la matriz extracelular (MEC), principalmente por colágena I y colágena III<sup>29</sup>, mientras que la regeneración es el restablecimiento de la arquitectura original del tejido perdido. La vía de señalización del TGF- $\beta$  está involucrada en la regulación de ambos procesos. Las diferentes isoformas del TGF- $\beta$ s se expresan en las heridas adultas y embrionarias de los mamíferos. En las heridas de un adulto esencialmente están presentes las isoformas TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2 pero en mayor cantidad el TGF- $\beta$ 1 que se encuentra presente en todas las fases de la cicatrización. Estas dos isoformas son liberadas inicialmente por las plaquetas, los granulocitos y posteriormente por las células inflamatorias como los neutrófilos y los macrófagos; esto da como resultado la formación de una cicatriz. El TGF- $\beta$ 2 se encuentra en todo el proceso de cicatrización en adultos pero con niveles muy bajos. Las heridas embrionarias expresan niveles altos de TGF- $\beta$ 3, y presenta muy bajos niveles de las isoformas TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 2, que da a una herida sin cicatriz<sup>54</sup>. Durante la cicatrización de las heridas en el adulto, el TGF- $\beta$ 1 regula la migración, la quimiotaxis y la proliferación de diferentes tipos celulares, así como la producción de la MEC y la expresión de inhibidores de proteasas. Una vez que se produce una lesión, las plaquetas que arriban al lecho de la herida liberan TGF- $\beta$ 1 que retroalimenta su propia expresión mediada por neutrófilos, macrófagos y fibroblastos<sup>55</sup>. Un rasgo característico de los macrófagos es la secreción del TGF- $\beta$ 1 que actúa como un quimiotáctico de estas células resultando en un incremento en el reclutamiento de este tipo celular. Esto puede ser determinante en la calidad de la herida ya que los macrófagos persisten hasta a la fase de remodelación<sup>56</sup>. El papel del TGF- $\beta$ 1 en la reepitelización de la herida es controversial. Algunos trabajos muestran que la aplicación exógena del TGF- $\beta$ 1 promueve la formación de nuevo tejido de granulación y la re-epitelización<sup>55</sup>. Sin embargo, como se señala a continuación, se ha reportado que los queratinocitos inhiben la proliferación in vitro e in vivo por la señalización del TGF- $\beta$  a través de la señalización de las Smad 2/3<sup>33,42</sup>.

Durante la remodelación de la herida, el TGF- $\beta$ 1 estimula la síntesis de los múltiples componentes de la MEC que incluye a la colágena, la fibronectina, la vitronectina y los proteoglicanos<sup>57</sup>. Además está involucrado en la modulación del recambio de la matriz por la supresión de la expresión de las MMPs y la inducción de los inhibidores de las metaloproteinasas (TIMP)<sup>40,58</sup>. Por otra parte, el TGF- $\beta$ 1 también induce la diferenciación de los fibroblastos en miofibroblastos, esenciales en la contracción de la herida y en la síntesis activa de los componentes del tejido de granulación, (colágena y fibronectina). La sobreexpresión del TGF- $\beta$ 1 puede promover la fibrosis en la herida que puede generar una cicatriz hipertrófica<sup>27,58</sup>.

Estudios realizados con ratones knockout han demostrado la participación de la señalización del TGF- $\beta$ 1 en la cicatrización en los mamíferos. Heridas de espesor total realizadas en ratones knockout condicionales del receptor tipo II del TGF- $\beta$  bajo el promotor de COL1A2 que se expresa en fibroblastos (Tgfbr2-dermalKO), mostraron una rápida re-epitelización así como un incremento en la proliferación y la migración de los queratinocitos adyacentes. Adicionalmente, el infiltrado celular de macrófagos es casi ausente. Estas observaciones indican que la señalización del TGF $\beta$  proveniente de los fibroblastos reduce la re-epitelización y la proliferación de los fibroblastos mientras que promueve el infiltrado de los macrófagos. Este ratón también muestra que, aunque el TGF- $\beta$  no altera la diferenciación de los fibroblastos a miofibroblastos, sí regula la organización de la MEC<sup>59</sup>.

Heridas incisionales de espesor total realizadas en ratones knockout de Smad-3, presentaron una aceleración de la re-epitelización que ocurrió al segundo día en comparación de los ratones silvestres que se presentó hasta los 5 días. Esta rápida re-epitelización se genera por la alta capacidad proliferativa que se generó en los queratinocitos. Además, se observó una reducción notable en el número de células inflamatorias como los neutrófilos y los monocitos y un aumento en la contractilidad de la herida<sup>60</sup>. Todos estos datos muestran que la señal del TGF- $\beta$ , mediada por Smad3, promueve la cicatrización incrementando la inflamación, la síntesis de la Matriz Extracelular y reprimiendo la re-epitelización.

Contrariamente a las heridas en mamíferos adultos, la señal del TGF- $\beta$  juega un papel importante en la regeneración de las extremidades de los anfibios; ya que, en lugar de promover la cicatrización como ocurre en los mamíferos, ayuda promover una respuesta regenerativa durante la regeneración de las extremidades de los ajolotes. Un modelo claro es el del ajolote mexicano, *Ambystoma mexicanum*. Este anfibio urodelo tiene la capacidad de regenerar las

extremidades al ser amputadas y nunca forma tejido cicatrizante. El ajolote presenta dos fases regenerativas; la primera es conocida como fase de preparación y la segunda de reconstrucción. Se ha observado que el TGF- $\beta$ 1 presenta niveles altos durante la fase de preparación, caracterizada por la formación de un blastema de regeneración. En la fase de reconstrucción la expresión del TGF- $\beta$ 1 es disminuida. La señal del TGF- $\beta$ 1 es interrumpida por el inhibidor farmacológico SB-431542 en la extremidad amputada del ajolote, se inhibe la migración celular de las células que establecen al blastema de regeneración y por lo consiguiente hay ausencia del blastema e interrupción del proceso regenerativo<sup>61</sup>.

### **TGF- $\beta$ 3 en la Reparación de una Herida.**

Las heridas embrionarias poseen características distintas a las de los adultos, tal como una respuesta inflamatoria disminuida. Debido posiblemente a un sistema inmune inmaduro presente en los embriones<sup>54, 57</sup>. Además, en el embrión se presenta una restauración completa de la estructura de la piel, con un depósito de colágena idéntico al perdido y una distribución normal de los folículos pilosos, los vasos capilares y las glándulas sebáceas<sup>58</sup>. Se ha propuesto que una de las moléculas responsables inductoras de esta respuesta regenerativa es el TGF- $\beta$ 3, secretado principalmente por los queratinocitos y los fibroblastos<sup>54</sup>.

Durante la reparación de las heridas embrionarias, el TGF- $\beta$ 3 es expresado fuertemente en el epitelio que rodea a la herida. Este epitelio es estimulado por el TGF $\beta$ 3, resultando en la rápida re-epitelización por la inducción de la migración de los queratinocitos, lo que contribuye a un rápido cierre de la herida. Se ha propuesto que durante la reparación embrionaria la poca formación de coágulos de fibrina y de desgranulación plaquetaria contribuye a que los niveles de TGF- $\beta$ 1 sean bajos, lo que generaría una disminución en el depósito de moléculas de matriz y la falta de una cicatriz<sup>37</sup>.

El grupo de Mark W. J. Ferguson probó la eficiencia del TGF- $\beta$ 3 en la reparación al adicionar de manera exógena el factor a heridas en ratas. En una rata adulta se le realizaron heridas incisionales de 1cm de longitud en las que se les administraron anticuerpos neutralizantes de TGF- $\beta$ 1 y de TGF- $\beta$ 2 además de la proteína TGF- $\beta$ 3 en cada herida. Al neutralizar las dos isoformas endógenas del TGF- $\beta$ , el TGF- $\beta$ 1 y el TGF- $\beta$ 2, hubo una reducción en las células proinflamatorias (monocitos y macrófagos), una mejoría en la arquitectura de la piel, una reducción en el depósito

de proteínas de la MEC como la fibrina, la colágena I y la colágena III. Estas respuestas resultaron en una cicatriz muy reducida en comparación con las heridas controles. Contrariamente, cuando se adiciona de manera exógena TGF- $\beta$ 1 o TGF- $\beta$ 2, el depósito de la MEC aumenta en las primeras etapas de la cicatrización lo que genera una cicatriz. Al inverso, cuando se adiciona TGF- $\beta$ 3 a la herida se reducen notablemente los monocitos y los macrófagos, disminuye la síntesis de la fibronectina, la colágena I y la colágena III que resulta en una notable mejora en la arquitectura de la piel que se asemeja a la normal <sup>62</sup>.

Heridas incisionales realizadas en humanos con diferentes grados de profundidad, han demostrado un perfil de expresión diferente con respecto a los factores fibrogénicos. Cuando se realizaron heridas profundas, se presentaron síntomas de una cicatrización hipertrófica; el epitelio engrosado, fibras de colágena muy gruesas, hiper celularidad y un aumento en los vasos sanguíneos. También se encontró una disminución en la concentración de decorina y fibromodulina en los fibroblastos de la capa profunda y un aumento en la expresión del TGF- $\beta$ 1 mientras que los niveles del TGF- $\beta$ 3 se ven abatidos. Contrariamente, en las heridas superficiales, se encontró una reparación con una mínima cicatriz, los fibroblastos expresaron mayores niveles de decorina y el TGF- $\beta$ 3 se expresó en los fibroblastos subyacentes a la membrana basal y en los queratinocitos basales del epitelio. Similarmente a las heridas fetales que sanan sin cicatriz, también se mostró un incremento en los niveles de expresión del TGF- $\beta$ 3 <sup>63</sup>.

### Modelo de Regeneración en la Oreja de Ratón.

En 1998 se reportó por primera vez un modelo de regeneración en la oreja de ratón en la cepa Murphy Roths Large (MRL). Cuando se realizaron perforaciones de dos milímetros (2mm) de diámetro en las orejas de los ratones MRL se observó que después de 30 días pos-perforación, las orejas de la cepa MRL cierran por completo la herida a comparación de los ratones de la cepa B6<sup>64</sup>. Estudios posteriores sobre la regeneración de la oreja de ratón revelaron que algunas cepas comunes tienen capacidad regenerativa en la oreja, pero esta se observa solo a una edad avanzada; por ejemplo las cepas B6 y BALB/c a los 9 y 7 meses de edad, respectivamente, cierran sus heridas por un proceso regenerativo, principalmente en las hembras. Al hacer un comparativo histológico de las orejas de los individuos adultos de la cepa B6 y de individuos jóvenes de la cepa MRL, se observa la presencia de un blastema de regeneración similar al que presenta los anfibios al regenerar sus extremidades. Estas cepas regeneran todos los tejidos de la oreja: el cartílago, las glándulas sebáceas, la dermis, los vasos sanguíneos y los folículos pilosos. Inclusive en los ratones de la cepa B6 que presentan pelaje negro se observó la generación de melanocitos<sup>65</sup> (**Imagen.7**).

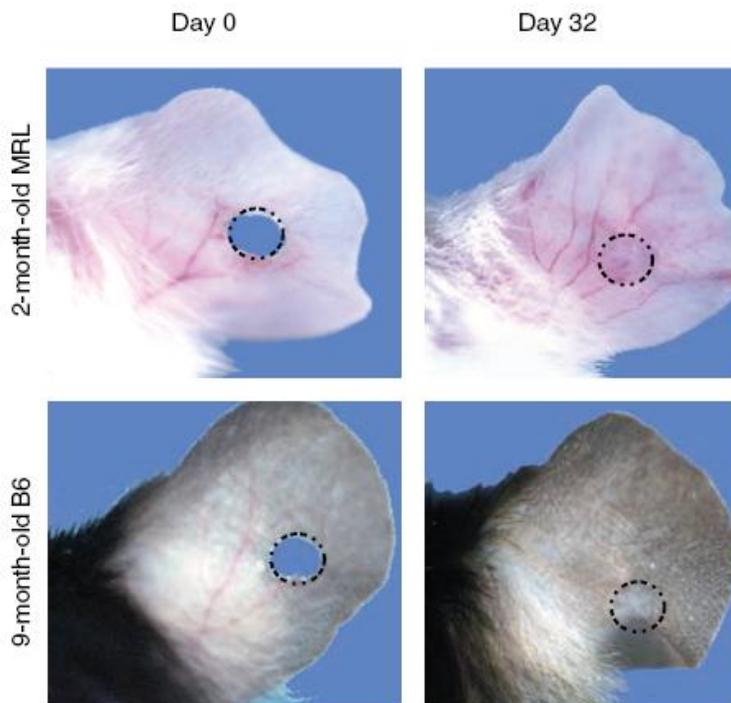


Imagen.7. La oreja de ratón de la cepa MRL de 2 meses de edad a los 32 dpp cierra en su totalidad la herida. La oreja del ratón B6 de 9 meses de edad, logra cerrar la herida a los 32 dpp. *Ellen Heber-Katz. 1999*

### **Planteamiento del problema.**

En el laboratorio se ha observado que la cepa de ratones no consanguínea, CD1, presentan respuestas regenerativas limitadas que dependen de la edad cuando se realiza una herida excisional en las orejas. Cuando la perforación es realizada en individuos jóvenes de 2 meses de edad no se muestra un cierre de la herida, sino una cicatrización en los bordes de esta, cuando se realizan estas perforaciones en individuos de 9 meses de edad, el cierre de la herida es mayor y se observan respuestas regenerativas limitadas, tal como la formación de nuevo cartílago y anexos cutáneos. Por otra parte, se conoce que al adicionar de manera exógena TGF- $\beta$ 3 en heridas incisionales en el dorso del ratón, se acelera la reparación y hay una disminución en la formación de la cicatriz. Además, en embriones, la expresión del TGF- $\beta$ 3 es mayor y no se forma tejido cicatrizante. Sin embargo, no se conoce que procesos regenerativos son regulados directamente por el TGF- $\beta$ 3 y si la expresión del TGF- $\beta$ 3 puede estar presente en un tejido con capacidad regenerativa limitada. En este trabajo se evaluará la Inmunolocalización del TGF- $\beta$ 3 durante la regeneración limitada de la oreja del ratón y se determinará el papel de este factor durante la reparación de heridas de espesor total realizadas en las orejas de individuos de 2 meses de edad de la cepa CD-1 que no regeneran.

**Hipótesis.**

- Las orejas regenerantes (CD-1) expresan TGF- $\beta$ 3 durante todo el proceso de reparación promoviendo una respuesta regenerativa que resultará en la inducción de un blastema de regeneración, una re-epitelización más rápida, un depósito más laxo de proteínas de la MEC y una disminución en el infiltrado inflamatorio.

**Objetivo.**

Evaluar la respuesta regenerativa promovida por el TGF- $\beta$ 3 durante la reparación de una herida excisional realizada en la oreja del ratón y evaluar su expresión durante la cicatrización y regeneración de la oreja.

- Determinar la localización del TGF- $\beta$ 3 durante la reparación de la oreja de ratones macho de 2 meses de edad de la cepa CD-1 (no regenerante).
- Evaluar si el factor de crecimiento transformante-beta 3 (TGF- $\beta$ 3) promueve la regeneración de heridas de espesor total en la oreja del ratón no regenerante (ratones macho de la cepa CD-1 de 2 meses de edad).

## **Material y Método.**

### ***Aplicación del TGF $\beta$ 3 en la oreja del ratón.***

Se montó un modelo *in vivo* en donde se utilizaron machos de la cepa de ratón CD-1 con una edad de 2 meses debido a que no presentan capacidad regenerativa. Los animales se obtuvieron del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de Rehabilitación. A los ratones se les realizó una perforación de 2mm de diámetro. Se establecieron tres grupos de ratones; un grupo experimental donde se les implanto, en el borde superior de la herida, perlas de heparina embebidas en TGF- $\beta$ 3, que funcionan como acarreadores y liberadores del factor, un grupo control donde se les implanto perlas de heparina embebidas en PBS y un grupo con sólo la perforación.

La perforación en la oreja se realizaron mediante un muesquidor de 2mm de diámetro, la perforación se realizó en la oreja izquierda. La colocación del TGF- $\beta$ 3 se hizo por medio de la colocación de perlas de heparina con un diámetro de 100 a 150  $\mu$ m, estas se incubaron en promedio una hora con el TGF- $\beta$ 3. En los ratones donde se les colocó la perla de heparina, se les realizó una microcirugía en donde se separó el cartílago de la piel y se implanto la perla en la cavidad generada (**Imagen.8**).

Para el aislamiento de la oreja, los animales se sacrificaron por dislocación cervical. Estas muestras se obtuvieron en diferentes días pos-perforación (dpp); día 1,3, 5, 7, 14, 21, 28 y 35 por cuadruplicado para los tres grupos. El manejo de los animales se realizó de acuerdo a la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-062-ZOO-1999, ESPECIFICACIONES TÉCNICAS PARA LA PRODUCCION, CUIDADO Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO.

Las muestras obtenidas se fijarán en "Safefix" (Protocol; USA) que es una solución fijadora amortiguadora.

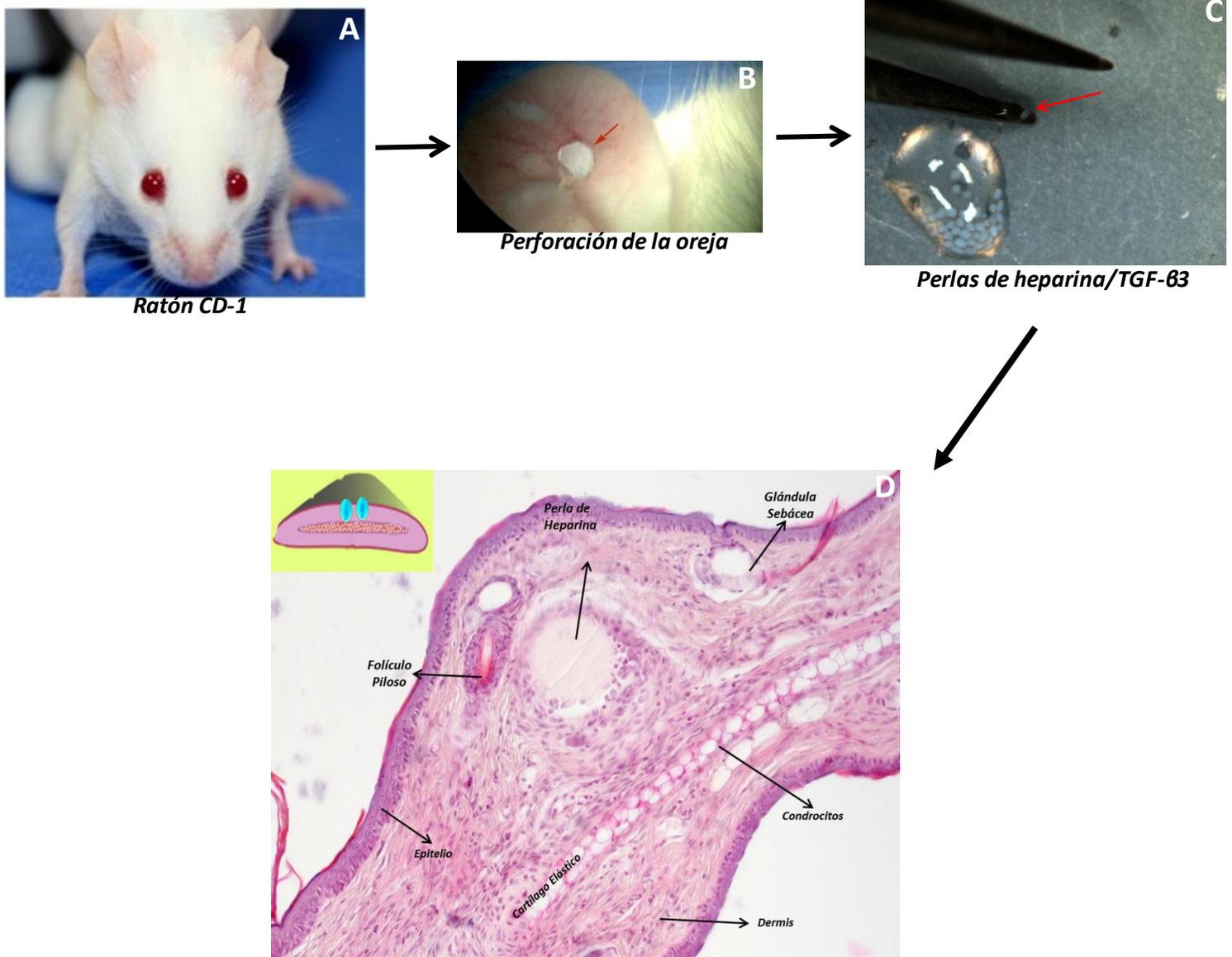


Imagen.8. Esquema de la perforación de la oreja del ratón. Cepa CD-1, A. Perforación de 2mm de diámetro en la oreja del ratón, se muestra con una flecha roja el sitio donde se colocara la perla de heparina con rhTGF-β3, B. Perlas de heparina embebidas con rhTGF-β3, C. Corte histológico donde se muestra como queda la perla de heparina en el interior de la oreja y las diferentes estructuras que compone a la oreja del ratón, D.

### Registro fotográfico de las orejas.

Para llevar el registro fotográfico de las muestras, las orejas aisladas durante los diferentes dpp, previamente fijadas en "Safefix" (Protocol; USA), se colocaron en una caja Petri de 15 cm de diámetro, se fijaron a ella con un adhesivo hypafix y se recubrieron con el fijador. Se prosiguió a tomarle foto con un Microscopio Estereoscópico (ZEISS. Discovery. V20; GER).

### Análisis Histológico.

Las orejas se deshidrataron en alcoholes graduales (etanol-50%, 80%, 90%, 100%) y se almacenaron a una temperatura de -20°C para su posterior tratamiento, o bien se prosiguió con la inclusión de las muestras en medio de inclusión "Paraplast" (Sigma; USA) y se realizaron cortes trasversales de 5 µm en un micrótomos (Leica; USA). Las muestras se desparafinaron y se les realizaron diferentes tinciones: Hetaxolina & Eosina, Tricrómica de Masson y Tinción de Herovici<sup>66</sup>. Las muestras se analizaron y documentaron en un Microscopio óptico vertical (ZEISS. imager.Z1; GER). (Imagen.9).

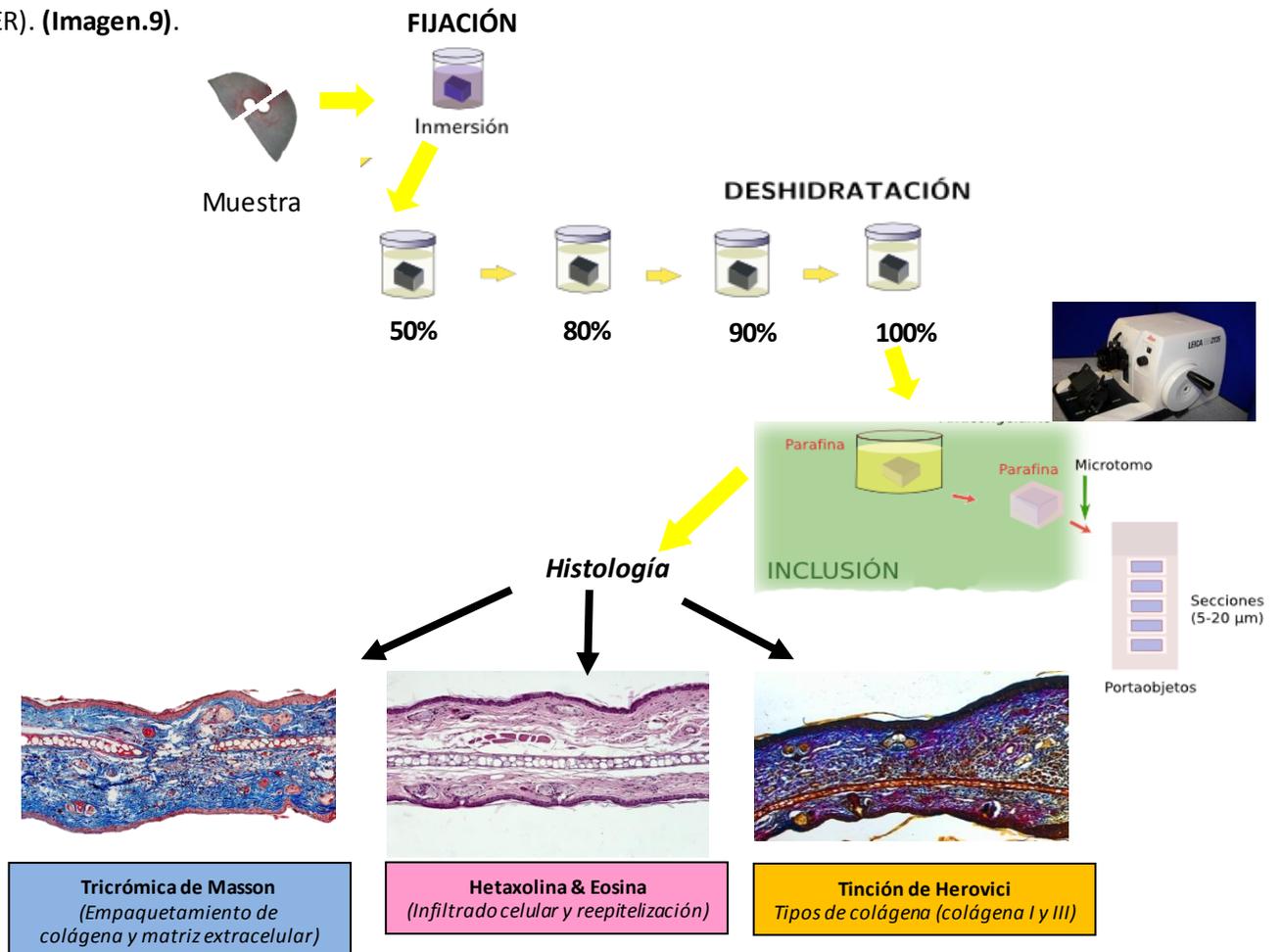


Imagen.9. Representación del procedimiento de histología.

### ***Inmunolocalización del TGF-β3 y de la SMAD 2-3 durante la regeneración y reparación de la oreja del ratón.***

Los anticuerpos primarios que se emplearon fueron, un anticuerpo policlonal de conejo contra TGF-β3 (Novus Biological; USA) y un anticuerpo policlonal de conejo contra Smad 2/3 (Biosensis; AUS). Los cortes histológicos de las orejas se desparafinaron y rehidrataron con alcoholes graduales (etanol-100%, 90%, 80%, 70%, 50%, 25%). Se bloquearon con albumina de suero bovino al 1% en PBS/Tritón 0.3% durante 2hrs. a temperatura ambiente. Después de este tiempo, se incubaron con el anticuerpo primario 1:100 durante 12 a 24 hrs. a temperatura ambiente. Después se realizaron lavados con PBS/tritón 0.3% seguido de la incubación con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado con el fluorocromo Rojo Texas 1:1000 durante 2 hrs. Posteriormente se realizarán lavados con PBS/Tritón 0.3% y se montarán en Vectashield con DAPI 1μg/ml (Vector; USA). Las muestras se analizarán en un Microscopio Vertical con fluorescencia (ZEISS. imager.Z1; GER).

### ***Evaluación del TGF-β3***

Para evaluar el posible papel del TGF-β3 en la regeneración de la oreja del ratón, se analizó la velocidad de reepitelización, la formación de nuevos anexos cutáneos, la formación de un blastema de regeneración y el tipo de empaquetamiento de la colágena, en la oreja de los ratones tratados con TGF-β3, que son rasgos característicos reportados del proceso regenerativo.

### ***Análisis Estadístico***

Se realizó una prueba de ANOVA unidireccional para la comparación entre grupos, la  $P < 0.05$  fue considerada estadísticamente significativa, los datos se presentan como las medias con barras de error que indican el error estándar de la media.

## Resultados.

Para ver el efecto del TGF- $\beta$ 3 aplicado de manera exógena en una herida de espesor total en la oreja de ratón, se utilizaron 96 animales en total, se dividieron en tres grupos y las observaciones y análisis fueron por cuadruplicado para los días 1, 3, 5, 7, 14, 21, 28 y 35 post perforación. El grupo 1 fue el control negativo y consistió de ratones a los que se les perforó solamente las orejas, el grupo 2 o control positivo fue conformado por ratones con orejas perforadas y perlas de heparina implantadas y el grupo tres o experimental, estribó en ratones con orejas perforadas y tratadas con perlas de heparina embebidas con TGF- $\beta$ 3.

Se llevo un registro fotográfico de las orejas a los diferentes dpp de los tres grupos. En el aspecto macroscópico de las heridas se puede notar que las perforaciones del grupo experimental mostró un cierre a partir de los 14dpp y 21dpp, que se evidenció notablemente a los 35dpp a comparación de los dos controles (Fig.1).

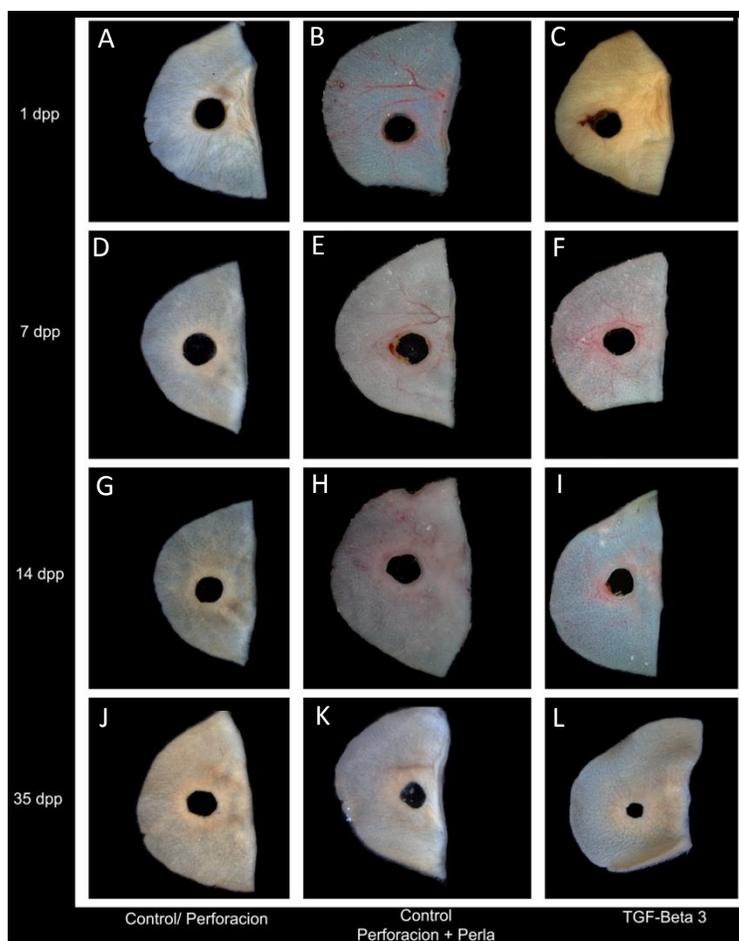
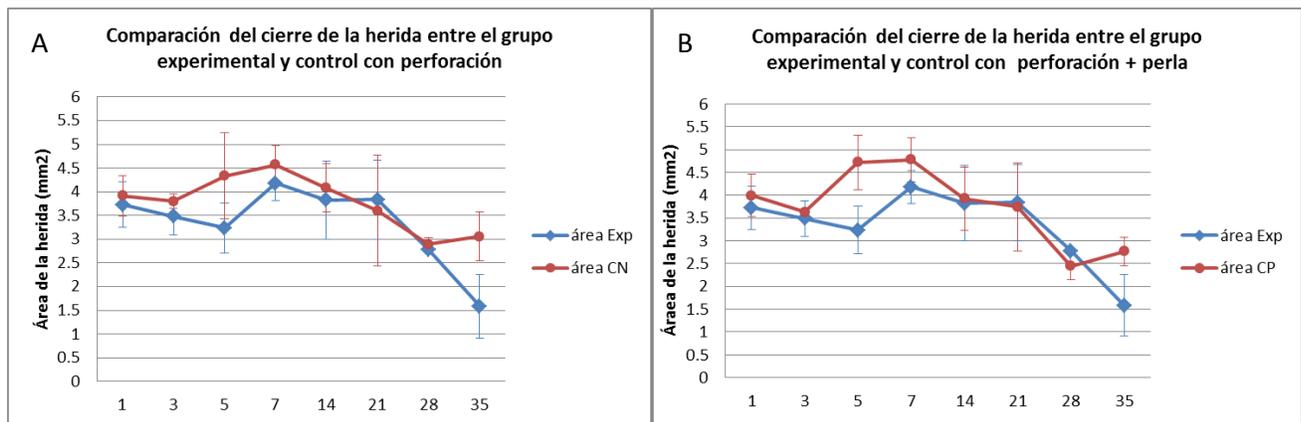


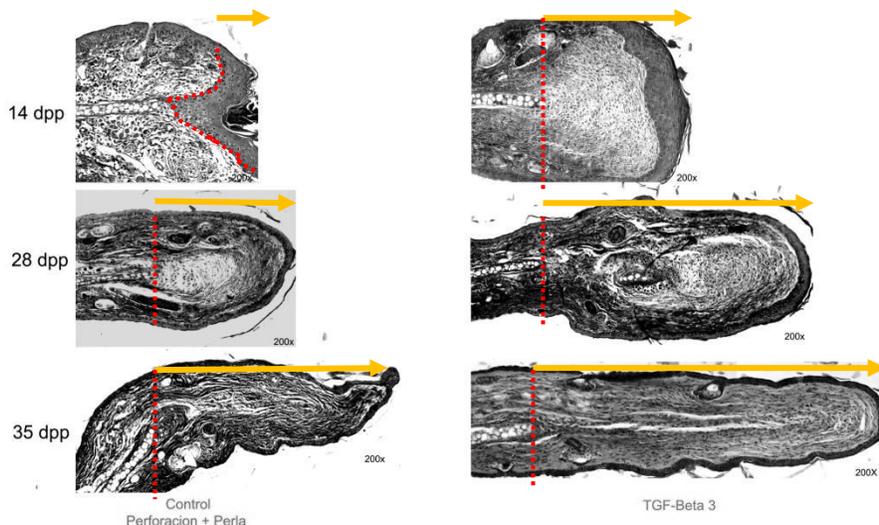
Fig.1. Orejas de ratones perforados con implantes de perlas de Heparina y tratados con rhTGF- $\beta$ 3 durante los diferentes días postperforación. El grupo control con únicamente la perforación corresponde a A, D, G y J. El grupo control con perforación y perla de Heparina corresponde a B, E, H y K. Las orejas tratadas con rhTGF- $\beta$ 3 corresponden a C, F, I y L. A-C corresponden al día 1, D-F al día 7, G-I al día 14 y J-L al día 35.

Se midió el área de la herida en los tres grupos durante los diferentes días pos-perforación (dpp). El grupo control con perforación mostró un ligero aumento en el área de la herida evidenciada a los 7 dpp. De los 14 dpp, hasta los 35 dpp, el área de la herida disminuyó aproximadamente  $1 \text{ mm}^2$  (25%) (Fig.2A). Los animales control con perforación + perla mostraron un comportamiento similar en el cierre de la herida a los controles con perforación, su incremento máximo en el área de la herida fue de  $4.7 \text{ mm}^2$  a los 7dpp y a partir de ese tiempo el área de la herida disminuyó (Fig. 2B).

El grupo experimental mostró un aumento en el área de la herida similar a los grupos controles a los 7 dpp, sin embargo, esta área fue menor con respecto a los controles en  $0.5 \text{ mm}^2$ . A partir de los 21 dpp se mostró un cierre significativo en el área de la herida hasta los 35dpp en más del 50%(Fig.2B).



**Fig.2.** Graficas que compara el área del cierre de la herida en ratones controles con perforación (CN) y el grupo experimental (Exp). Se muestra que hubo una disminución reducida en el área de la herida en el grupo tratado con TGF- $\beta$ 3, A. Grafica en el que se compara el área del cierre de la herida en ratones controles con perforación+perlas de heparina implantadas (CP) y el grupo experimental (Exp). Se muestra que hubo una disminución reducida en el área de la herida en grupo tratado con TGF- $\beta$ 3, B. con una  $P < 0.05$



**Fig.3.** Cortes transversales de la región de la herida de las orejas de ratones perforados, perforados con implantes de perlas de Heparina y tratados con rhTGF- $\beta$ 3 durante los días 14, 28, 35 posperforación, donde se muestra el crecimiento apical del nuevo tejido. Amplificación de todas las fotografías a 200x.

### **Análisis histológico.**

Los cortes histológicos de las orejas de los tres grupos se tiñeron con Hematoxilina & Eosina para evaluar el infiltrado celular y la reepitelización, con Tricrómica Masson para evaluar el empaquetamiento de la colágena y de la matriz extracelular y con Tinción de Herovici para determinar el tipo de colágena sintetizada (colágena I y III). En el día 1 pos-perforación se observó que en todos los grupos, tanto controles como en el experimental se presentó un evidente infiltrado celular en el borde de la herida (Fig.4 A-C. Fig. 5 A-C).

Al tercer día, el grupo experimental presentó una reepitelización completa ya que cubrió en su totalidad a la herida y un infiltrado celular casi ausente (4/4). El grupo control con orejas perforadas + perla de heparina presentó una reepitelización completa en 2 de 4 animales, mientras que el infiltrado celular, aun que disminuyó, aún se hizo presente (4/4) (Fig.4E-F). En el grupo con sólo la perforación, la epitelización no se completó observándose un engrosamiento en los bordes de la herida. El infiltrado celular aún se presentó abundante en 4 de 4 casos. (Fig.4D, 5D).

A los 5dpp, el grupo de animales con perforación + perla presentó engrosamiento del epitelio sólo en 1 de 4 casos, mientras que en el experimental se observó un engrosamiento del epitelio en 3 de 4 casos (Fig. 4H, I). En el grupo control con sólo perforación se observó una reepitelización completa (3/4) (Fig. 4G). El empaquetamiento de las fibras de colágena y de la matriz extracelular fue laxo en la punta de la herida de los tres grupos analizados, mientras que la matriz se presentó empaquetada en las regiones laterales de la dermis (Fig. 5 G-I, 6 G-I).

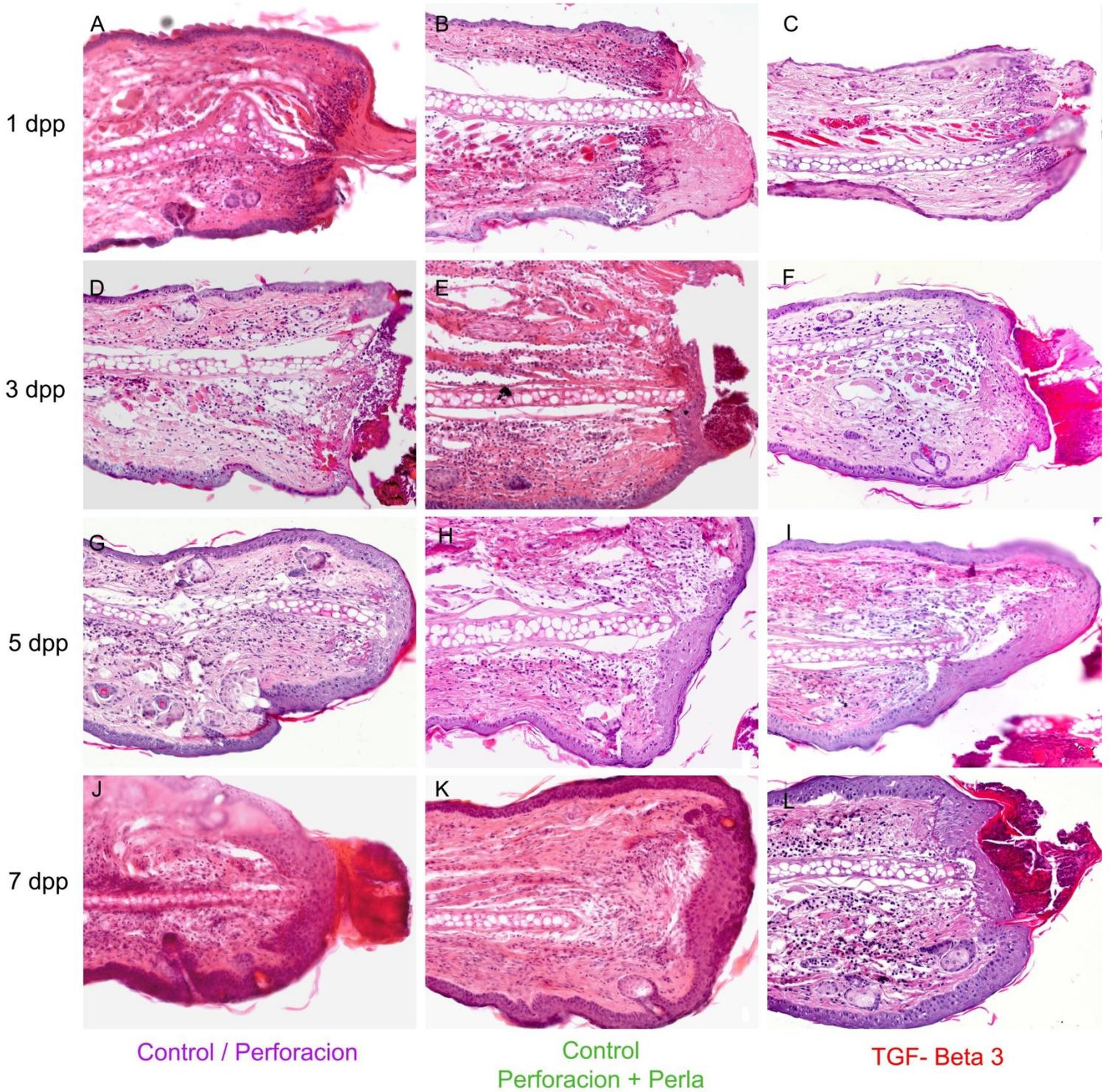


Fig.4. Tinciones Histológicas con Hematoxilina & Eosina de cortes transversales de la región de la herida de las orejas de ratones perforados, perforados con implantes de perlas de Heparina y tratados con rhTGF- $\beta$ 3 durante los primeros siete días pos-perforación. El grupo control con únicamente la perforación corresponde a A, D, G y J. El grupo control con perforación y perla de Heparina corresponde a B, E, H y K. Las orejas tratadas con TGF- $\beta$ 3 corresponden a C, F, I y L. A-C corresponden al día 1, D-E al día 3, F-H al día 5 e I-K al día 7. Amplificación de todas las fotografías a 200x.

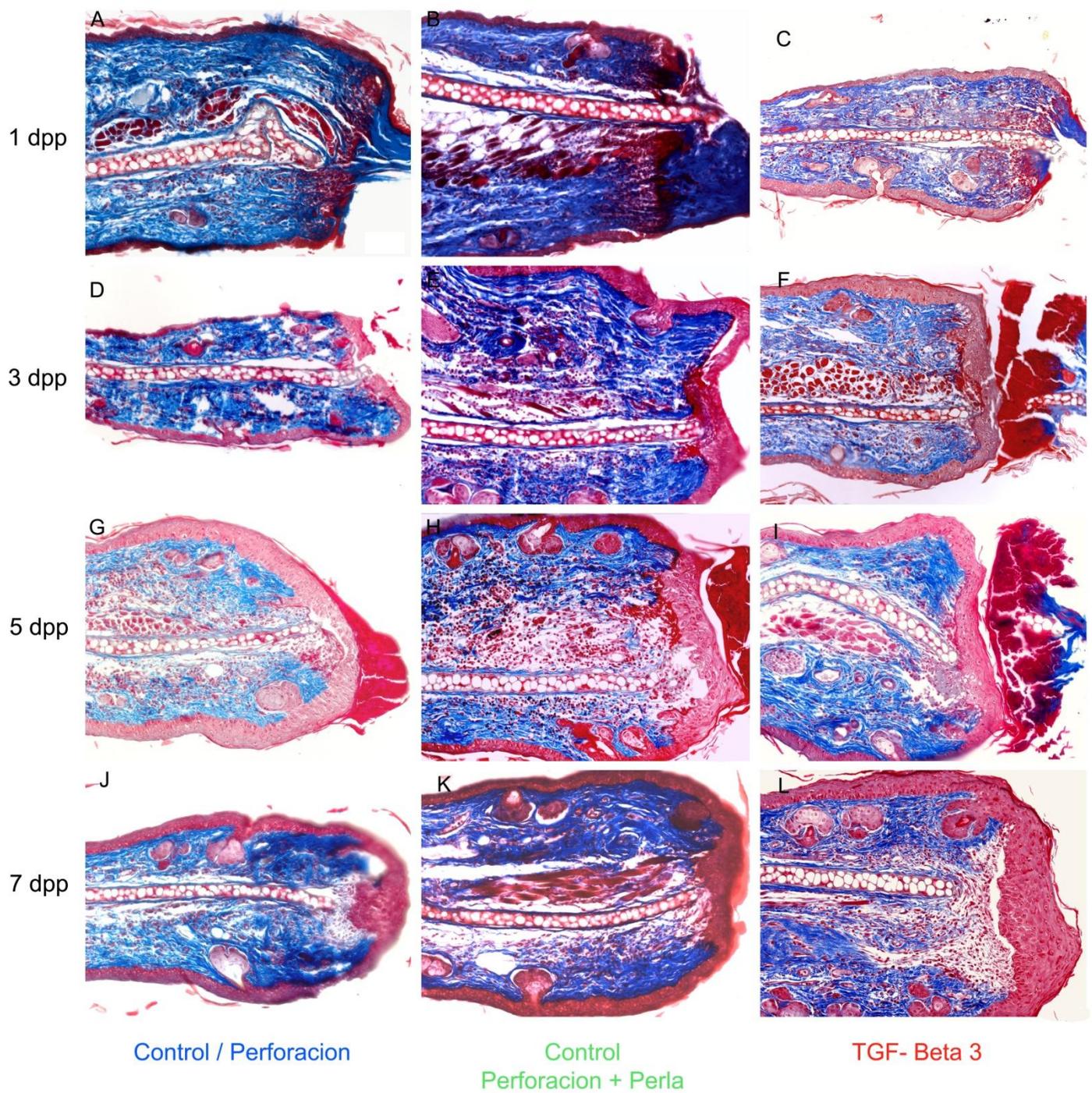


Fig.5. Tinciones Histológicas con Tricrómica de Masson de cortes transversales de la región de la herida de las orejas de ratones perforados, perforados con implantes de perlas de Heparina y tratados con rhTGF- $\beta$ 3 durante los primeros siete días pos-perforación. El grupo control con únicamente la perforación corresponde a A, D, G y J. El grupo control con perforación y perla de Heparina corresponde a B, E, H y K. Las orejas tratadas con TGF- $\beta$ 3 corresponden a C, F, I y L. A-C corresponden al día 1, D-E al día 3, F-H al día 5 e I-K al día 7. Amplificación de todas las fotografías a 200x.

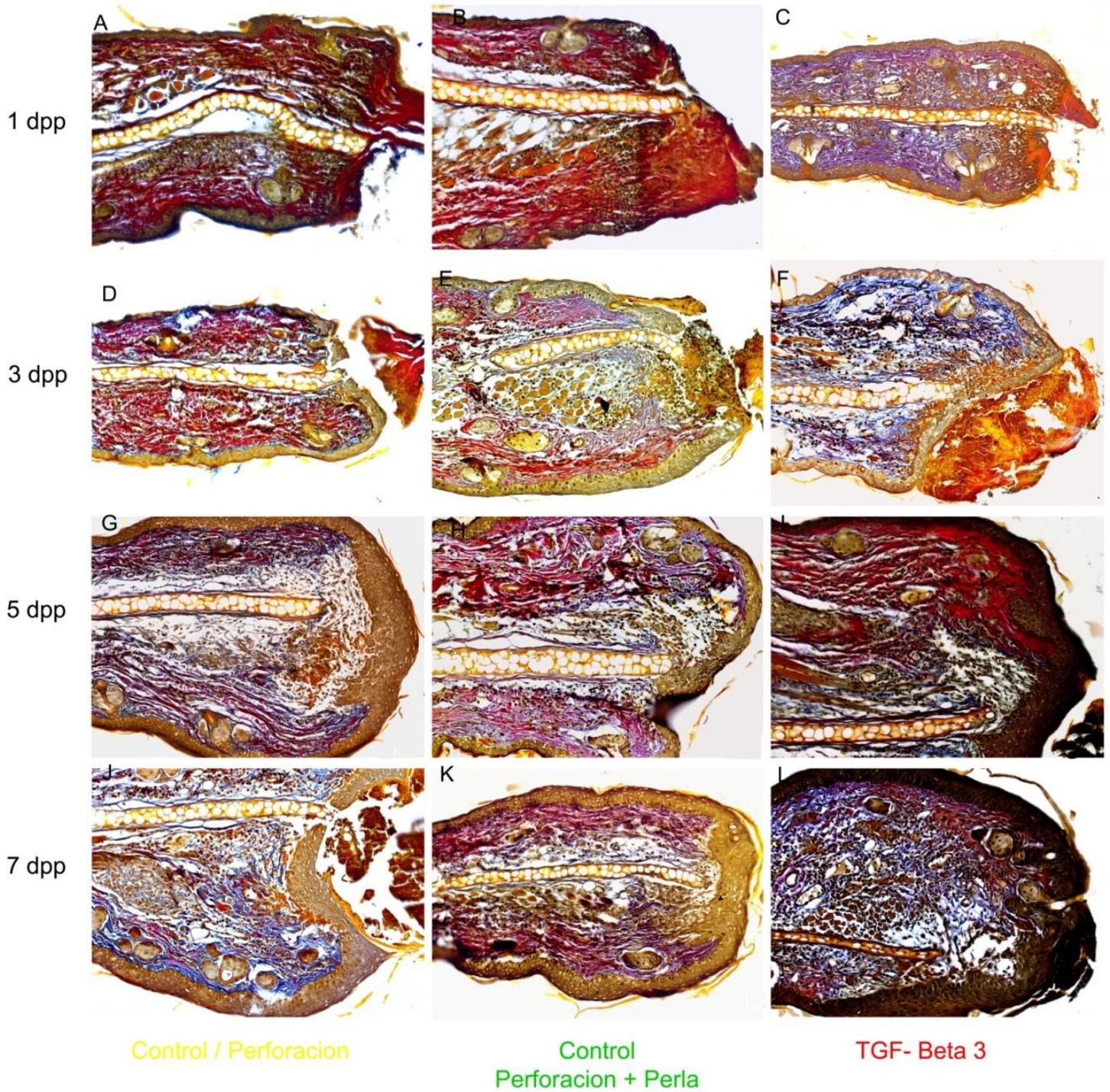
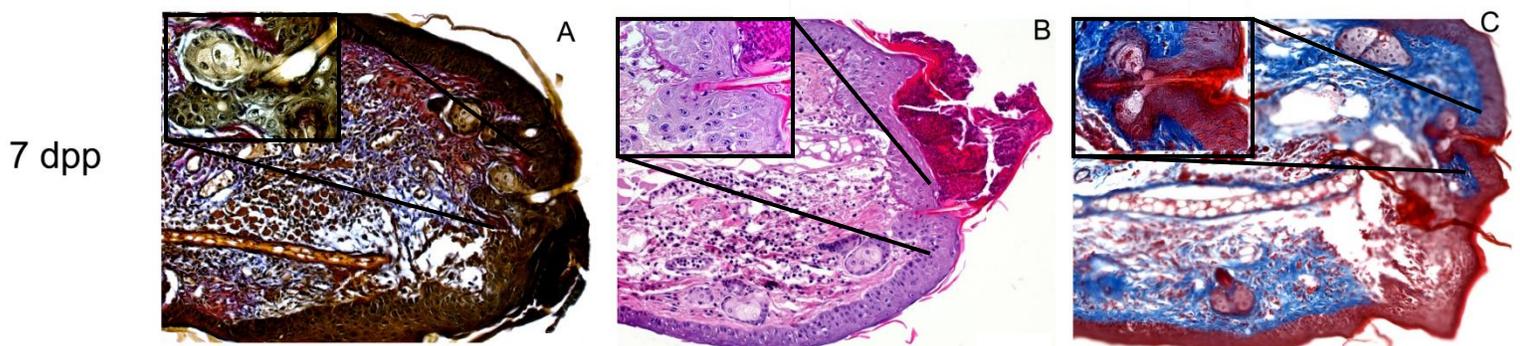


Fig.6. Tinciones Histológicas con Herovici de cortes transversales de la región de la herida de las orejas de ratones perforados, perforados con implantes de perlas de Heparina y tratados con rhTGF- $\beta$ 3 durante los primeros siete días pos-perforación. El grupo control con únicamente la perforación corresponde a A, D, G y J. El grupo control con perforación y perla de Heparina corresponde a B, E, H y K. Las orejas tratadas con TGF- $\beta$ 3 corresponden a C, F, I y L. A-C corresponden al día 1, D-E al día 3, F-H al día 5 e I-K al día 7. Amplificación de todas las fotografías a 200x.

A los 7dpp, se observó, interesantemente, en el grupo experimental, la presencia de anexos cutáneos en los bordes de la herida (2/4) ó en el área de la herida (2/4)(Fig. 7A-B). El epitelio se mostró engrosado(3/4) (Fig.4L) y la matriz extracelular subyacente a la herida presentó una matriz extracelular muy laxa, sin presencia de colágena madura evidenciada por la falta de tinción evaluada por Tricrómica de Masson y Herovici (2/4) (Fig. 5L y 6L). En un solo caso de control con perforación +perla se mostró indicios de la formación de un folículo piloso (Fig.4k) y similarmente al grupo experimental, pero en menor grado, se observó el establecimiento de una matriz extracelular laxa (Fig.6K). El control con perforación no presentó anexos cutáneos en la región de la herida y, similarmente al grupo experimental y control positivo, el epitelio se evidenció engrosado con una matriz laxa subyacente (Fig. 4J y 6J).



**Fig.7.** Tinciones Histológicas con Herovici, Hematoxilina & Eosina y Tricrómica de Masson de cortes transversales de la región de la herida de las orejas de ratones perforados, tratados con rhTGF- $\beta$ 3 durante el día siete pos-perforación. A, B y C corresponde a las orejas tratadas con TGF- $\beta$ 3 que muestran formación de nuevos anexos cutáneos en la área la herida .Amplificación de todas las fotografías a 200x y 1000x.

A los 14dpp, el grupo control con orejas únicamente perforadas reveló un epitelio engrosado (3/4), con una matriz extracelular aún laxa sin un evidente empaquetamiento de las fibras de colágena (Fig. 8A, 9A y 10A). En el grupo control con perforación + perla, se encontró un engrosamiento del epitelio en 2 de 4 animales y similarmente al control negativo, la matriz extracelular se evidenció laxo (Fig. 8B, 9B y 10B). Tomando como referencia al cartílago amputado como el punto de inicio de elongación, en el grupo experimental se observó un mayor crecimiento de tejido nuevo ó crecimiento dermal (4/4), (Fig. 8C, 9C y 10C). Notablemente, se evidenció el establecimiento de un blastema de regeneración en el tejido nuevo, con gran cantidad de células embebidas en una matriz extracelular laxa con la incipiente presencia de colágena tipo III como puede evidenciarse por la tinción de Herovici. El blastema se localizó subyacente a un epitelio todavía muy engrosado (4/4) (Fig. 9C y 10C).

A los 21 dpp, el grupo experimental presentó un blastema de regeneración con una matriz extracelular más densa con abundantes fibras de colágena tipo III (Fig. 10F). Se evidenció en la punta del cartílago seccionado agregaciones al parecer pre-cartilaginosas y también la presencia de anexos cutáneos bien desarrollados (Fig. 9F). El epitelio de la herida se observó adelgazado, aunque sin llegar a un grosor normal (3/4) (Fig. 8F). Los dos grupos control presentaron un epitelio ligeramente engrosado, con una extensión dermal con una matriz en general empaquetada, en algunos casos con presencia de colágena III (Fig. 10D y E)., no se observó la presencia de anexos cutáneos en la región de la herida ni tampoco agregados pre-condrogénicos (Fig.9 D y E).

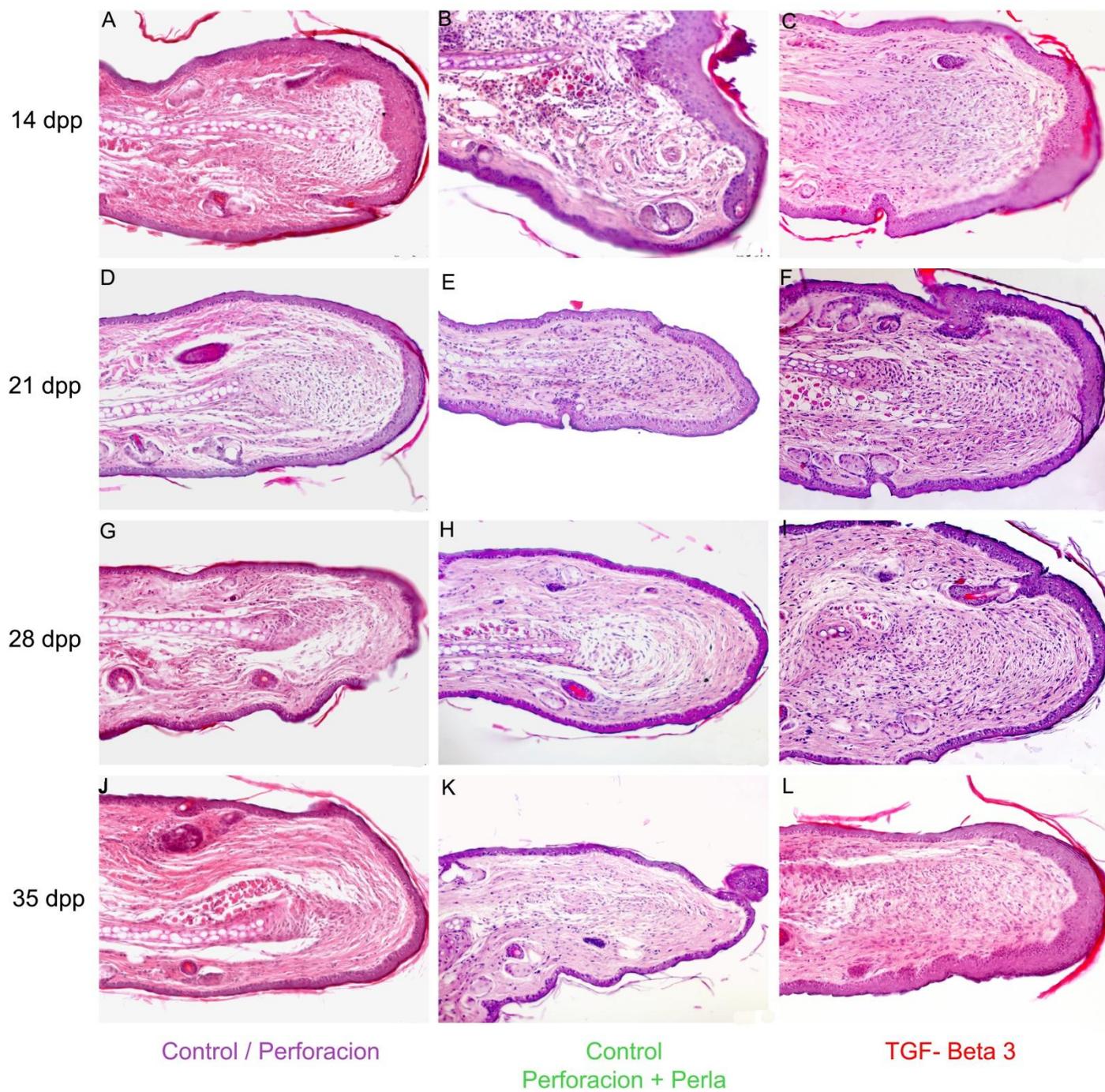


Fig.8. Tinciones Histológicas con Hematoxilina & Eosina de cortes transversales de la región de la herida de las orejas de ratones perforados, perforados con implantes de perlas de Heparina y tratados con rhTGF- $\beta$ 3 durante los días 14, 21, 28 y 35 pos-perforación. El grupo control con únicamente la perforación corresponde a A, D, G y J. El grupo control con perforación y perla de Heparina corresponde a B, E, H y K. Las orejas tratadas con TGF- $\beta$ 3 corresponden a C, F, I y L. A-C corresponden al día 1, D-E al día 3, F-H al día 5 e I-K al día 7. Amplificación de todas las fotografías a 200x.

A los 28dpp el grupo experimental presentó una elongación dermal más extensa caracterizada por presentar un área central cercana al cartílago con una matriz laxa rodeada por una matriz más densa de colágena tipo III y colágena tipo I en la periferia observada por la tinción de Herovici (4/4). En un caso se presentó la formación de un islote de cartílago rodeado de agregaciones celulares (Fig. 9I). Anexos cutáneos claramente desarrollados se localizaron en el nuevo tejido dermal 3/4 (Fig. 8I). El grupo control con perforación + perla presentó un epitelio de la herida adelgazado, igual al epitelio estratificado que rodea a toda la oreja, cubriendo la elongación del nuevo tejido dermal, menor al del grupo experimental (4/4) (Fig. 8H). Se observó la presencia de anexos cutáneos poco desarrollados (2/4) y en un caso se evidenció una agregación celular poco densa alrededor del cartílago amputado (Fig. 9H). Una abundante matriz extracelular se hizo presente con fibras de colágena tipo I densamente empaquetadas rodeando a una matriz reticular compuesta de colágena tipo III (Fig. 10H). En el grupo control con perforación, hay apenas un crecimiento de tejido nuevo (Fig. 8G), sin presentar anexos cutáneos y con una matriz altamente empaquetada con presencia de colágena tipo I, similar a una cicatriz (Fig. 10G).

A los 35dpp, el grupo control con sólo la perforación no presentó crecimiento de tejido nuevo ni presencia de anexos cutáneos (Fig. 8J), las fibras de colágena se encontraron densamente empaquetadas, compuestas principalmente de colágena tipo I aunque con presencia de colágena tipo III en los bordes de la herida (Fig. 9J, 10J). En general se observó una agregación celular reducida alrededor del cartílago dañado (Fig. 10J). En el grupo control con perforación + perla se observó un ligero crecimiento de tejido nuevo así como la presencia de anexos cutáneos aislados (Fig. 9K). Agregaciones celulares reducidas se hicieron presentes junto al cartílago amputado (Fig. 8K). El epitelio se encontró muy adelgazado, con un grosor igual al resto del epitelio que rodea al resto de la oreja (Fig. 8K). En general, la matriz extracelular densamente empaquetada presentó fibras de colágena tipo I correspondientes a las de una cicatriz (Fig. 9K y 10K). El grupo experimental presentó un considerable crecimiento del tejido nuevo (3/4) (Fig. 8L). Debido al incremento en el empaquetamiento de la matriz extracelular, se puede considerar una ausencia del blastema de regeneración, aunque la matriz mostró una mayor cantidad de fibras coloreadas de color azul con la técnica de Herovici, indicando mayor presencia de colágena III (3/4) (Fig. 9L y 10L). En un sólo caso se presentó un epitelio aún engrosado en el borde de la herida (Fig. 8L) y, en general, proximalmente al epitelio reparado se observó la presencia de anexos cutáneos (Fig. 9L y 10 L).

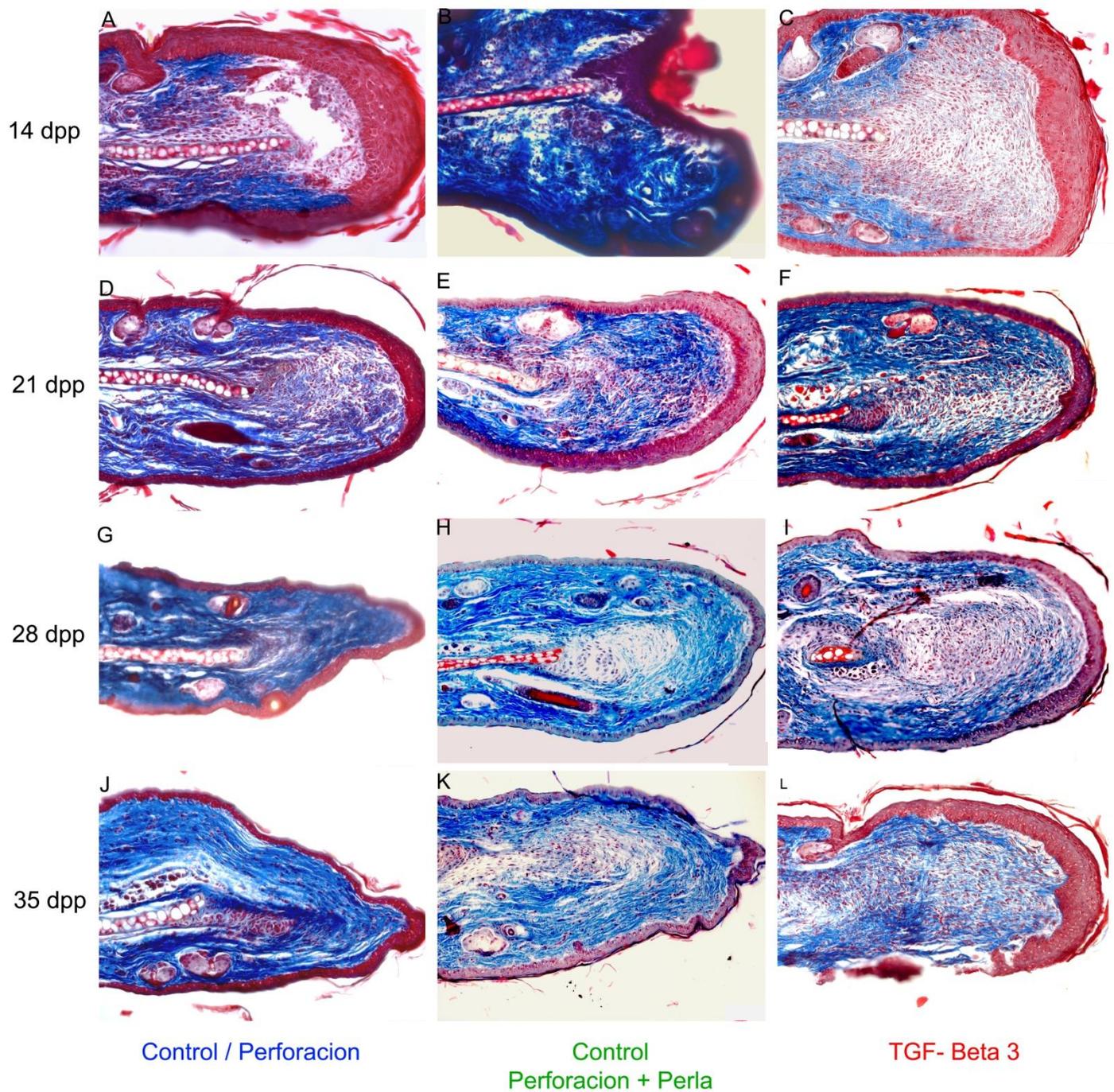


Fig.9. Tinciones Histológicas con Tricrómica de Masson de cortes transversales de la región de la herida de las orejas de ratones perforados (control) (A, D, G, J), perforados con implantes de perlas de Heparina y tratados con rhTGF- $\beta$ 3 durante los días 14, 21, 28 y 35 pos-perforación. El grupo control con únicamente la perforación corresponde a A, D, G y J. El grupo control con perforación y perla de Heparina corresponde a B, E, H y K. Las orejas tratadas con TGF- $\beta$ 3 corresponden a C, F, I y L. A-C corresponden al día 1, D-E al día 3, F-H al día 5 e I-K al día 7. Amplificación de todas las fotografías a 200x.

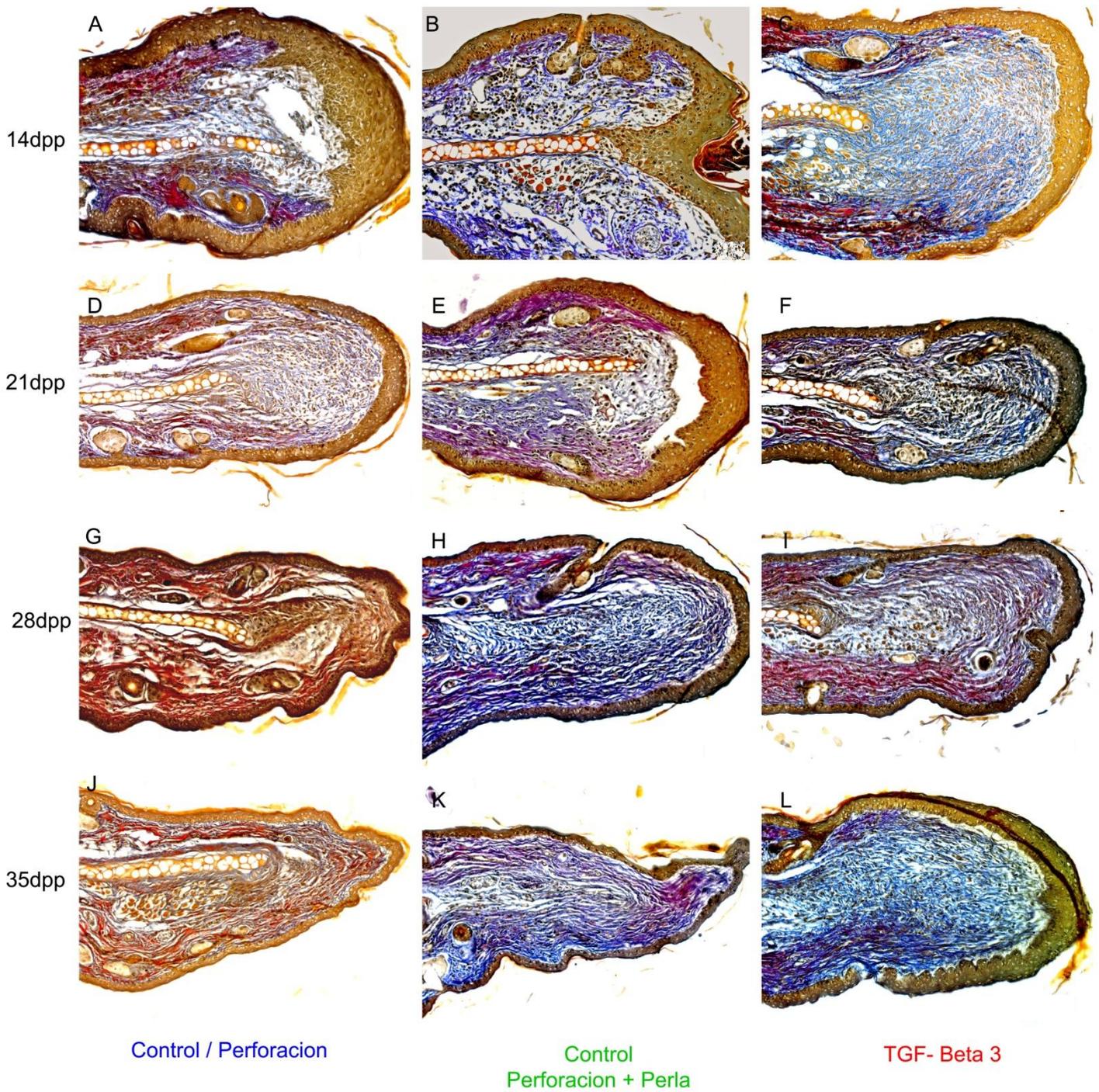


Fig.10. Tinciones Histológicas con Herovici de cortes transversales de la región de la herida de las orejas de ratones perforados, perforados con implantes de perlas de Heparina y tratados con rhTGF- $\beta$ 3 durante los días 14, 21, 28 y 35 posperforación. El grupo control con únicamente la perforación corresponde a A, D, G y J. El grupo control con perforación y perla de Heparina corresponde a B, E, H y K. Las orejas tratadas con TGF- $\beta$ 3 corresponden a C, F, I y L. A-C corresponden al día 1, D-E al día 3, F-H al día 5 e I-K al día 7. Amplificación de todas las fotografías a 200x.

### **Localización y Distribución del TGF- $\beta$ 3**

Para detectar la localización y distribución del TGF- $\beta$ 3, se realizaron inmunofluorescencias en los tres grupos.

La localización del TGF- $\beta$ 3 se reconoce en color rojo y los núcleos celulares de color azul. La presencia del TGF- $\beta$ 3, fue principalmente celular. En el día uno pos-perforación, en el grupo experimental se observa claramente la presencia del TGF- $\beta$ 3 a diferencia de los grupos control. El TGF- $\beta$ 3 se localizó evidentemente en el epitelio adyacente a la herida y en las células estromales cerca de la herida (2/2) (Fig. 11C). En los dos grupos controles no se observó la expresión del TGF- $\beta$ 3 en todos los casos. Esta ausencia del TGF- $\beta$ 3 persistió durante los primeros siete días evaluados (Fig. 11).

En el grupo experimental, al día 3 pos-perforación, se puede evidenciar la localización del TGF- $\beta$ 3 no solo en el borde de la herida sino también más alejada a esta en la región de la dermis. La presencia del TGF- $\beta$ 3 se mantuvo en las capas externas del epitelio y en un caso de dos, se observó en varias células cercanas al cartílago (Fig. 11F).

En el día 7 pos-perforación, se observó una alta presencia de células positivas a TGF- $\beta$ 3 en la dermis subyacente a la herida, que disminuyeron a los 14 y 21 dpp (Fig. 11I, 12 C y 13 B).

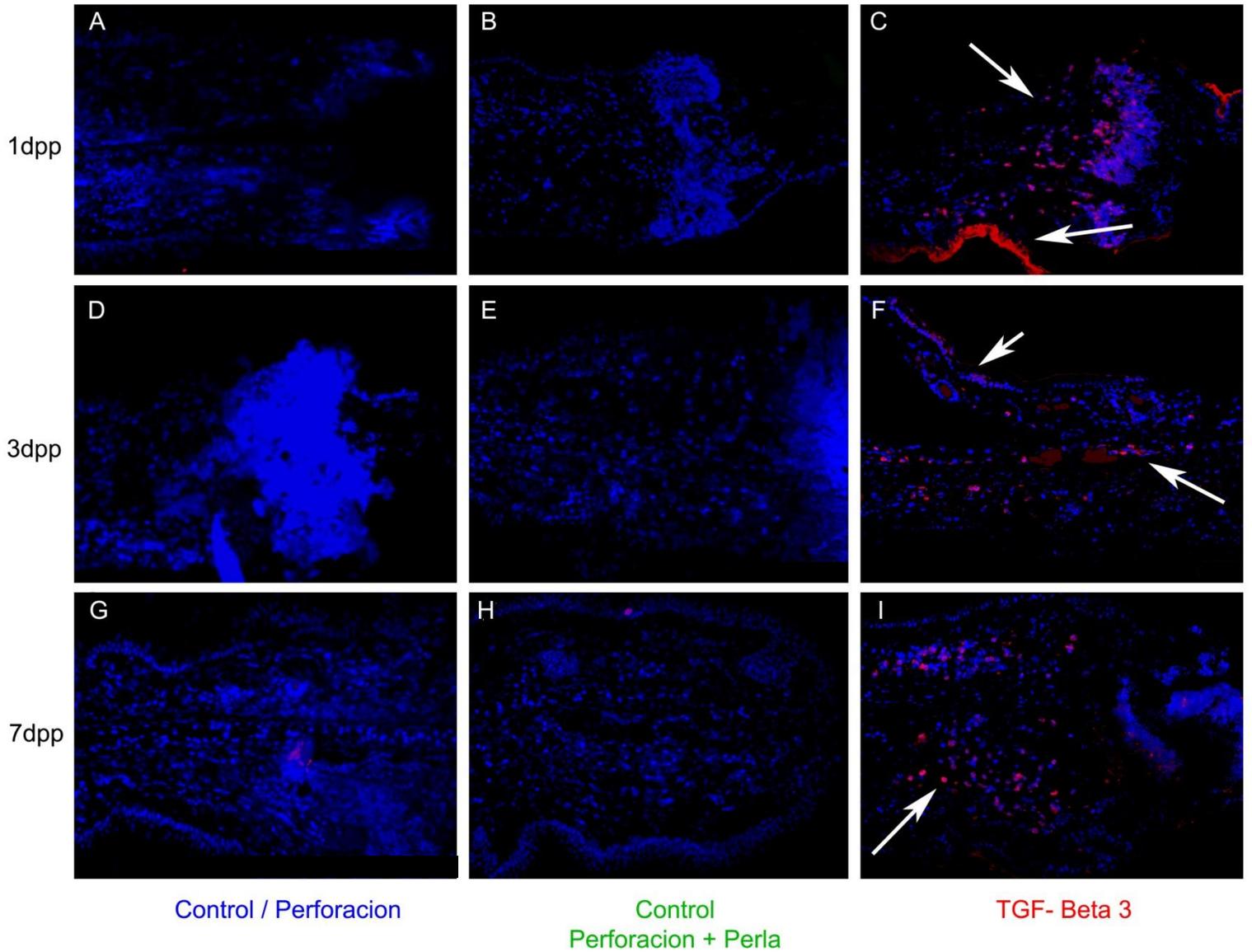
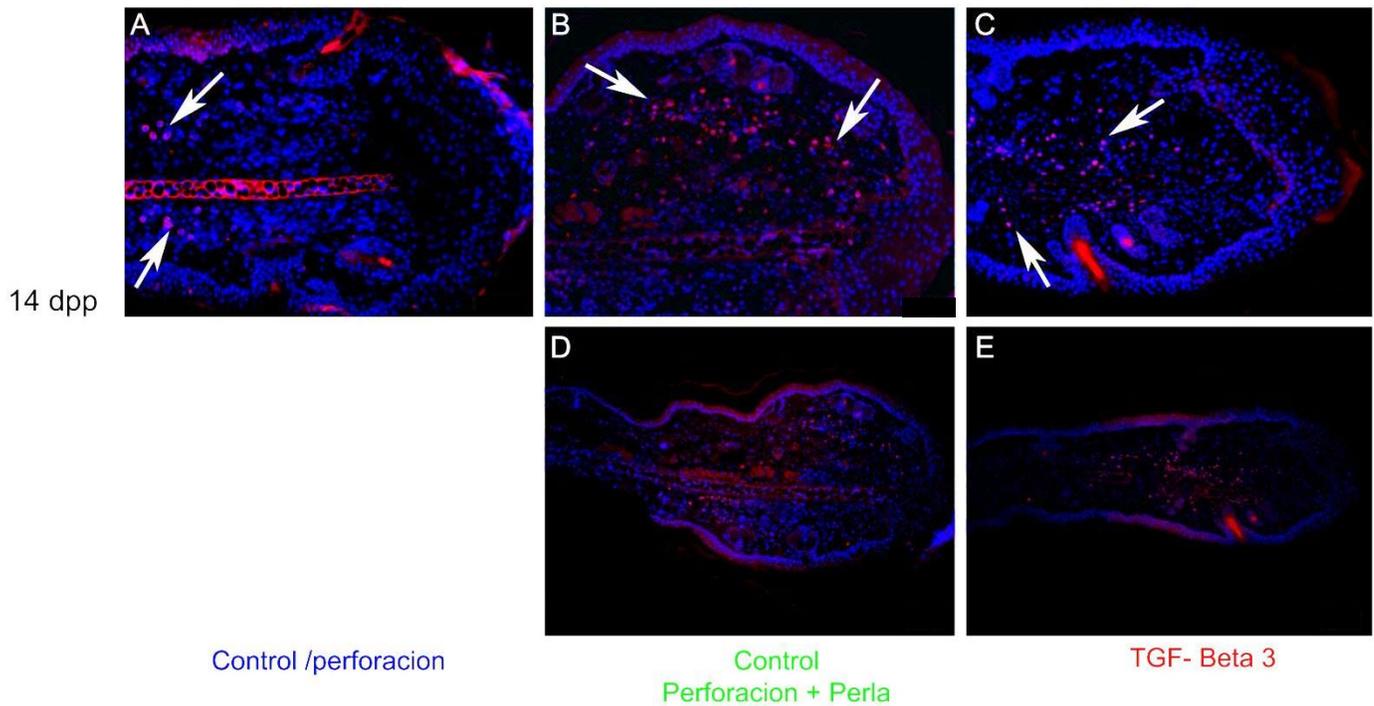


Fig.11. Inmunofluorescencia de cortes transversales de la región de la herida de las orejas de ratones perforados, perforados con implantes de perlas de Heparina y tratados con rhTGF- $\beta$ 3 durante los primeros siete días post-perforación. El grupo control con únicamente la perforación corresponde a A, D y G. El grupo control con perforación y perla de Heparina corresponde a B, E y H. Las orejas tratadas con TGF- $\beta$ 3 corresponden a C, F y I. A-C corresponde al día 1, D-F al día 3, G-I al día 7. Amplificación de todas las fotografías a 200x. Núcleos de células color azul, localización del TGF- $\beta$ 3 rojo.

A los 14dpp, en los tres grupos analizados se observó la expresión del TGF- $\beta$ 3, aunque en menor grado en el grupo control con sólo la perforación, en varias células cercanas al borde de la herida (Fig. 12A-C). Esta expresión celular disminuyó en todos los grupos a los 21 dpp y subsecuentemente (Fig. 13A y B). Estos datos indican que el TGF- $\beta$ 3 aplicado exógenamente indujo la expresión de esta misma proteína, por lo que se regula positivamente.



**Fig.12.** Inmunofluorescencia de cortes transversales de la región de la herida de las orejas de ratones perforados, perforados con implantes de perlas de Heparina y tratados con rhTGF- $\beta$ 3 durante el día 14 días posperforación. El grupo control con únicamente la perforación corresponde a A. El grupo control con perforación y perla de Heparina corresponde a B y D. Las orejas tratadas con TGF- $\beta$ 3 corresponden a C y E. Amplificación de las fotografías A, B y C a 200x, D y E 100x. Núcleos de células color azul, localización del TGF- $\beta$ 3 rojo.

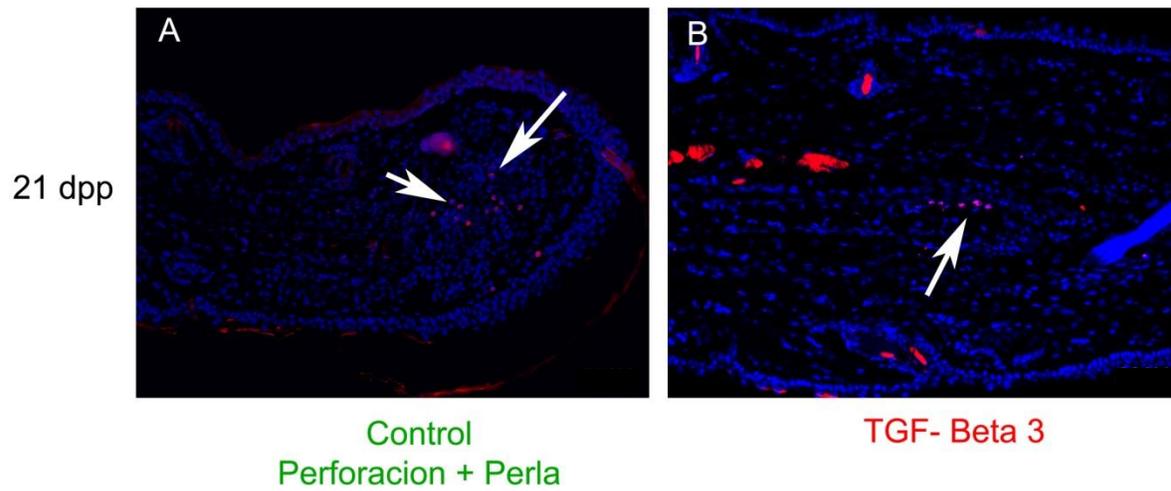


Fig.13. Inmunofluorescencia de cortes transversales de la región de la herida de las orejas de ratones perforados, perforados con implantes de perlas de Heparina y tratados con rhTGF- $\beta$ 3 durante el día 21 días posperforación. El grupo control con perforación y perla de Heparina corresponde a A. Las orejas tratadas con TGF- $\beta$ 3 corresponden a B. Amplificación de todas las fotografías a 200x. Núcleos de células color azul, localización del TGF- $\beta$ 3 rojo.



## Discusión.

Los resultados obtenidos de la aplicación exógena del TGF- $\beta$ 3 en una perforación de 2mm de diámetro en la oreja de ratón en una cepa que no regenera, demostró que reduce la cicatrización y que promueve una respuesta regenerativa. La aplicación exógena del TGF- $\beta$ 3 aumentó el depósito de colágena III y la disminución de colágena I y promovió una rápida re-epitelización en las primeras etapas de la cicatrización. Los efectos observados en el trabajo son similares cuando se aplica TGF- $\beta$ 3 en heridas incisionales en rata con respecto al depósito, mejor organizado, de la matriz extracelular así como la disminución del infiltrado celular inflamatorio correspondiente a los monocitos y macrófagos<sup>62</sup>. La disminución del depósito de colágena I en las heridas tratadas con TGF- $\beta$ 3 en las orejas de ratón, es parecido a lo que ocurre en las heridas embrionarias, que se correlaciona además con una disminución en la respuesta inflamatoria<sup>55,57</sup>. En los grupos controles se observó una re-epitelización completa a los 5dpp, dos días después que en el grupo experimental. Esto sugiere que el TGF- $\beta$ 3 está involucrado en la rápida re-epitelización de la herida. Sin embargo, estudios realizados con ratones knockout del receptor II para TGF- $\beta$  (Tgfbr2dermalKO) mostraron una rápida re-epitelización así como un incremento en la proliferación y la migración de los queratinocitos adyacentes a la herida<sup>59</sup>. Estos resultados también se asemejaron a realizar heridas excisionales en el dorso del ratón Knockout para *Smad-3*<sup>69</sup>. Debido a que estos resultados coinciden con experimentos *in vitro* en los que el TGF- $\beta$ 1 inhibe la proliferación de los queratinocitos y, a que se han evaluado en heridas realizadas en organismos adultos donde los niveles de TGF- $\beta$ 1 son altos, se ha señalado al TGF- $\beta$ 1 como responsable de inhibir la reepitelización<sup>59</sup>. Además, a pesar de compartir los mismos tipos de receptores y la misma cascada de señalización intracelular, ha sido claramente demostrado el efecto diferencial que en la respuesta de reparación tiene el TGF- $\beta$ 1 y el TGF- $\beta$ 3. Se ha reportado en heridas embrionarias que el TGF- $\beta$ 3 promueve la proliferación de los queratinocitos y una rápida re-epitelización, además de promover la síntesis de colágena III. El TGF- $\beta$ 3 en heridas embrionarias se encuentra elevado y en heridas en adultos se encuentra a niveles bajos<sup>62</sup>. Contrariamente, el TGF- $\beta$ 1 inhibe la proliferación de los queratinocitos y la re-epitelización, promueve la síntesis de múltiples componentes de la matriz extracelular, principalmente colágena I, que son necesarios para la cicatrización, además de estimular la proliferación de fibroblastos y en heridas embrionarias, el TGF- $\beta$ 1 está muy reducido a diferencia de las heridas en adultos que se encuentra a niveles altos<sup>57</sup>.

Al día 7dpp el grupo experimental a diferencia de los grupos controles mostraron la presencia de anexos cutáneos en la región de la herida. La formación de anexos cutáneos es considerada una característica regenerativa, ya que las heridas que resultan en una cicatriz carecen de estos. Estos resultados sugieren que el TGF- $\beta$ 3 promueve la formación de nuevos anexos cutáneos de manera similar a lo que ocurre con los embriones que pueden tener una restauración completa de la estructura de la piel dañada y una distribución normal de folículos pilosos y glándulas sebáceas al ser tratada con TGF- $\beta$ 3<sup>58</sup>. Al parecer el TGF- $\beta$ 3 solo promovió la formación de folículos pilosos, ya que fueron incapaces de mantenerse en los días subsecuentes después de la formación de la herida, debido a que no se observó la presencia de estos en etapas posteriores después del daño. El ciclo del pelo se divide en tres fases, la fase anágena, cuando se forma el folículo piloso y el pelo, la fase catágena que se refiere al mantenimiento del folículo piloso y el pelo y la fase telógena que es cuando el pelo es liberado e indica el inicio de un nuevo ciclo<sup>67</sup>. Probablemente el TGF- $\beta$ 3 puede estar contribuyendo solo en la primera fase ya que después de los 7dpp el folículo piloso que se forma no se mantiene y no se vuelve a observar en el sitio de aparición, esto nos indica que se requieren otros factores de crecimiento o moléculas que sean capaces de mantener a los nuevos anexos cutáneos como el IGF es un factor de crecimiento que promueve la formación y el mantenimiento de los anexos cutáneos. Se ha observado que ratones transgénicos adultos que sobreexpresan IGF específicamente en los queratinocitos, promueven la formación y morfogénesis de folículos pilosos y los mantienen durante las tres etapas del ciclo, principalmente en la fase anágena y catágena<sup>68</sup>.

El inicio de un blastema de regeneración se presenta en el día 7dpp en el grupo donde se colocó de manera exógena el TGF- $\beta$ 3. En este tiempo se presentó un epitelio engrosado, similar a la capa ectodérmica apical que en anfibios se requiere para la formación de un blastema de regeneración<sup>4</sup>. En ratones B6 de seis meses de edad y ratones MRL de dos meses de edad que regeneran la oreja presentan evidencia de un blastema de regeneración a los 6 días pos perforación<sup>65</sup>. Esto indica que el TGF- $\beta$ 3 ayuda a promover un blastema de regeneración similar a las cepas de ratón que regeneran. A los 14 dpp el blastema de regeneración se ve claramente desarrollado en toda la parte del nuevo tejido formado. Esto se pudo distinguir por la poca tinción de la elongación epidérmica, subyacente a un epitelio bastante engrosado. La región del blastema se caracterizó además de un depósito de colágeno totalmente laxo. Similar para el caso específico del anfibio *triturus cristatus*, donde el blastema de regeneración que se forma después de una amputación a los días 10 y 14 alcanza un tamaño distinguible<sup>69</sup>, el blastema formado en las orejas

tratadas con TGF $\beta$ -3 fue también muy evidente en este tiempo, es decir a los 14 días pos-perforación. A los 35 dpp, la elongación epidérmal presentó una matriz extracelular aún laxa al compararse con los controles, indicando que esta región aún presentó un rasgo característico del blastema de regeneración en las orejas tratadas. Estos resultados sugieren que el TGF- $\beta$ 3 mantiene el blastema, pero no fue capaz, en estos experimentos, de promover su crecimiento para inducir el cierre de la perforación, posiblemente a la falta de otras señales que pudieran contribuir a este fenómeno. Se ha reportado que la señalización mediada por TGF- $\beta$  promueve la formación y mantenimiento del blastema de regeneración de la extremidad del ajolote, ya que al ser inhibida esta señal por un fármaco específico la regeneración de la extremidad se ve interrumpida<sup>61</sup>. Estos resultados y los presentados en este trabajo indican que la señalización del TGF- $\beta$ s está involucrada estrechamente en la inducción y la formación del blastema de regeneración en mamíferos.

En los tres grupos de estudio se presentaron agregaciones celulares alrededor del borde del cartílago donde se realizó la herida inicialmente, estas agregaciones celulares al parecer corresponden a condrocitos que se empiezan a juntarse para formar nuevo cartílago, sin embargo, la respuesta condrogénica varió entre los grupos, siendo el grupo tratado con TGF- $\beta$ 3 el que presentó estas agregaciones celulares de manera más rápida y desarrollada, ya que desde el día 21 pos-perforación estas agregaciones fueron evidentes, manteniéndose y desarrollando nuevo cartílago hasta los 35 días. En los dos controles, aunque estas agregaciones celulares pueden observarse desde el día 28 pos-perforación, no fueron prominentes ni se desarrollaron a condrocitos. Para corroborar si estas agregaciones celulares corresponden a células pre-condrogénicas se podría evaluar la expresión de *col2* ó *sox9* que son marcadores de este tipo celular<sup>43</sup>. Hay evidencia clara de que la vía del TGF- $\beta$  induce la condrogénesis. Estudios experimentales en los que se implantaron perlas embebidas con TGF- $\beta$ 1 en el espacio interdigital en la extremidad del embrión de pollo, mostraron que el TGF- $\beta$ 1 indujo la formación de un nuevo dígito, promoviendo la formación de nuevo cartílago a las 20h. Estos experimentos mostraron que el TGF- $\beta$  es capaz de disparar una cascada molecular que resulta en la formación del dedo ectópico induciendo la expresión de *sox9*, *sox8*, *bmpr1b*, *agrecano* y *colágena II*<sup>72</sup>. Además, Células madre mesenquimales (MSC) derivadas de médula ósea tratadas con TGF- $\beta$ 3 fomentaron su diferenciación hacia el linaje condrogénico a través de ERK1/2 activando la expresión de *agrecano*, *Sox9* y *colágena II*<sup>73</sup>.

A diferencia del grupo experimental los grupos controles tendieron a sintetizar y depositar colágena empaquetada que resultó en una cicatriz. Aunque inicialmente la síntesis de colágena presentó un patrón reticular y laxo, a los 28 dpp su depósito fue más denso, finalizando en una matriz densamente empaquetada rica en colágena tipo I, observada a los 35 dpp. Contrariamente, el grupo experimental mantuvo el depósito de una matriz extracelular más laxa con un patrón reticular fino correspondiente a colágena tipo III. Este comportamiento fue muy similar a la reparación de las heridas fetales que no generan cicatrices, en donde la colágena se deposita rápidamente en un patrón reticular fino indistinguible de la piel sana<sup>70</sup>. En contraste, las heridas de los adultos muestran un entrecruzamiento desorganizado de las fibras y un mayor depósito de colágena tipo I, lo que indica que forma un tejido cicatrizante<sup>62</sup>.

A diferencia del grupo que se trató con TGF- $\beta$ 3, que mostró expresión de este factor desde el día 1 pos-perforación en la dermis adyacente a la herida y principalmente en toda la zona del epitelio, los grupos control no mostraron localización de este factor durante los primeros siete días evaluados. La presencia del TGF- $\beta$ 3 en la zona de la dermis y, principalmente en la superficie del epitelio, durante los subsiguientes días pos-perforación (3 y 7 dpp) en las orejas tratadas fue similar a la distribución del TGF- $\beta$ 3 cuando se realizan heridas incisionales superficiales en adultos humanos<sup>63</sup> y cuando se reparan heridas embrionarias por regeneración en donde el TGF- $\beta$ 3 expresado intensamente en el epitelio que rodea a la herida, estimula la rápida re-epitelización<sup>57</sup>. A los 14dpp se observó normalizada la expresión del TGF- $\beta$ 3 ya que los dos grupos controles mostraron localización del factor en las células estromales de la oreja del ratón. Estos resultados nos indican que de forma endógena, el TGF- $\beta$ 3 se expresa normalmente a los 14 dpp durante la reparación de la oreja de ratón y que además algunas células son sensibles a la señal del TGF- $\beta$ 3 promoviendo la autorregulación positiva ó incrementando la expresión de este factor al ser aplicado exógenamente. La estimulación temprana de la expresión del TGF- $\beta$ 3 contribuyó a la formación de folículos pilosos tempranos como se ha mencionado anteriormente, este fenómeno posiblemente también actúe a los 14 dpp ya que la observación ocasional de folículos pilosos después de este tiempo fue detectada en las orejas de los grupos controles, principalmente en las orejas control con perlas de heparina implantadas. Debido a que existe una correlación entre la expresión del TGF- $\beta$ 3 y la formación de anexos cutáneos, además de los experimentos de ganancia de función, se propone que el TGF- $\beta$ 3 contribuye en la formación de anexos cutáneos en la zona de reparación.

Debido a que las R-Smads de TGF- $\beta$  se expresaron en el epitelio durante la aplicación del TGF- $\beta$ 3 es sugerente pensar que la formación de los folículos pilosos y la reepitelización acelerada pueda estar mediada por la vía de las Smads. La expresión de las Smads promovida por la aplicación del TGF- $\beta$ 3 correlacionó con los días donde se pueden ver algunas características de una respuesta regenerativa como la rápida re-epitelización, la formación de nuevos anexos cutáneos y la formación de un blastema de regeneración. El mantenimiento de este blastema podría ser regulado indirectamente por la señalización TGF- $\beta$ /Smads a través de la interacción epitelio mesénquima. Las interacciones epitelio-mesénquima en la embriogénesis son consideradas importantes ya que promueven la formación de nuevas estructuras y la diferenciación celular por medio de la comunicación célula-célula entre estos tejidos. Por ejemplo, durante la regeneración de la extremidad del ajolote es necesaria la interacción de la AEC con el mesénquima subyacente para inducir la formación del blastema<sup>4,6</sup>.

Aunque la herida no cerró completamente, el mayor crecimiento de la extensión dérmica en las orejas tratadas con TGF- $\beta$ 3 reflejó una disminución significativa en el cierre de la herida con respecto a los grupos controles. La señalización del TGF- $\beta$ 3 a través de las Smads podría contribuir a este mejor cierre. Heridas excisionales realizadas en las orejas de ratones knockout de *Smad3* incrementaron dramáticamente el área de la herida debido a un incremento en la síntesis de elastina, inhibición de la contracción e incremento en la actividad de las metaloproteinasas<sup>71</sup>. De tal manera se puede suponer que la aplicación exógena TGF- $\beta$ 3 estaría activando la vía de las Smads, aumentando las fuerzas de tensión al controlar la síntesis de las fibras de elastina y promoviendo la contracción de la herida mediada por los miofibroblastos. Estos resultados indican que la señalización TGF- $\beta$ 3/Smad3 contribuye al cierre de la herida en la oreja del ratón.

Por otra parte la aplicación exógena del TGF- $\beta$ 3 en la respuesta que hay sobre la reparación en la oreja del ratón puede estar mediada no solo por la vía de las Smad si no también vías independientes de las Smads puede intervenir la vía de señalización de las MAPK cinasas, activada por ERK 1-2 y p38. Se ha reportado que el TGF- $\beta$  y las MAPK activadas pueden converger junto con las Smad en un efecto directo de los receptores del TGF- $\beta$ . Las vías más destacadas de las MAPK pueden ser por medio de MKK4, JNK y p38. In vitro, las Smad activadas pueden asociarse con c-Jun o complejos de ATF2 por medio de la activación de JNK o p38 que median la respuesta transcripcional. Los sitios de fosforilación de las Smad por medio de JNK no sean identificado aún.

La aplicación del TGF- $\beta$ 3 por medio de perlas de heparina como acarreadores, es un modelo que proporciona ventajas debido a que no se requiere de una gran cantidad del factor para su aplicación y se puede ver sus efectos específicamente de manera local. La aplicación de las perlas de heparina embebidas en factores de crecimiento es muy empleada en estudios del desarrollo, por ejemplo para estudiar los mecanismos moleculares del desarrollo de las extremidades en vertebrados. Además, estudios en los que se implantaron perlas embebidas en FGF-2 se ha demostrado la formación del blastema en extremidades desnervadas en la salamandra y para inducir la regeneración de las extremidades en *Xenopus*<sup>4</sup>. Estos datos validan el uso de este método para el estudio de la participación de varios factores de Crecimiento en la regeneración en mamíferos. El estudio de la regeneración en el modelo de la oreja del ratón en cepas que no regeneran en una edad joven en base a la caracterización de cepas que si regeneran como la MRL y la C57BL/B6<sup>64, 65</sup>, puede permitir aclarar de manera funcional las señales involucradas en la regeneración y la identificación de los mecanismos regenerativos que se han perdido durante la evolución de los mamíferos.

**Conclusión.**

La adición exógena del TGF- $\beta$ 3 en heridas de espesor total en la oreja de ratón, induce una respuesta regenerativa aumentando la velocidad de epitelización, promoviendo la formación de un blastema de regeneración, cartílago, y folículos pilosos, además de regular el depósito de la matriz extracelular.

La localización de las proteínas Smads de TGF- $\beta$  en el epitelio sugiere una participación directa en la reepitelización y en la foliculogénesis e indirecta en el mantenimiento del blastema de regeneración en la dermis.

El TGF- $\beta$ 3 genera su propia autoinducción para promover una respuesta regenerativa.

El TGF- $\beta$ 3 promueve y contribuye a la disminución del cierre de la herida.

## **Perspectivas.**

Para confirmar que el TGF- $\beta$ 3 induce la formación de nuevos anexos se deben analizar los diferentes marcadores moleculares de la morfogénesis de estos tal como: Lhx2, Sox9, Tcf4, Lgr5 que se expresan ó durante la formación del nuevo bulbo folicular.

Para determinar si el TGF- $\beta$ 3 promueve la contracción de una herida, se deberá realizar una evaluación de la contracción por medio de geles de colágena con fibroblastos, agregándoles diferentes concentraciones de TGF- $\beta$ 3 y expresión de  $\alpha$ -actina de musculo liso.

Evaluar la condrogenesis por medio de Sox9 y colágena II y si depende de las Smads ó de vías independientes de las Smads.

Determinar que si la adicción exógena del TGF- $\beta$ 3 inhibe la expresión de citocinas como IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , debido a que la inflamación exacerbada genera una calidad deficiente en la cicatriz y altera la regeneración.

Analizar la expresión de diferentes genes troncales como, Oct 3, Oct4, Sox2, NANOG, Msx1, en el blastema que intervengan en la regeneración, si se están apagando o prendiendo, para que se pueda dar este proceso, comparando la cepa CD-1 que no regenera y cepa MRL que regenera.

## Bibliografía

1. Christian Salem Z, Juan Antonio Pérez P, Enrique Henning L, Fernando Uherek P, Carlos Schultz O, Internos Jean Michel Butte B y Patricio González F. 2000. *Heridas. Conceptos Generales*. Cuad. Cir. 14: 90-99
2. Estilita Esteva-Farmacéutica. 2006. *El Tratamiento de las Heridas*. O F F A R M. 25: 54-60
3. I. García-Alonso. 1998. Heridas. *Traumatismos Mecánicos Abiertos: Las Heridas*. 1-7
4. Scott F. Gilbert. 2003. *Metamorphosis, regeneration and aging*. Developmental Biology. Ed. Sinauer Associates Inc. USA. Seventh Edition. 575-603
5. Porfirio Hernández Ramírez. 2006. *Regeneración Biológica. Secretos de la naturaleza*. Hematología, Inmunología y Hemoterapia. 22: 3
6. Bruce M. Carlson. 2007. *An Introduction to Regeneration*. Principles of Regenerative Biology. Ed. Academic Press is an imprint of Elsevier. San Diego California, USA. 1-28
7. Iván duran. 2009. *Modelos de Regeneración*. Encuentros en la biología. 2: 22
8. Holly L.D. Nye, Jo Ann Cameron, Ellen A.G. Chernoffand David L. Stocum. 2002. *Regeneration of the Urodele Limb*. Develop. Dynamics. 226:280-294
9. Kiyokazu Agata, Yumi Saito and Elizabeth Nakajima. 2007. *Unifying principles of regeneration I: Epimorphosis versus Morphallaxis*. Develop. Growth Differ. 49: 73-78
10. By M. Maden. 1981. *Morphallaxis in an Epimorphicsystem: size, growth control and pattern formation during amphibian limb regeneration*. J. Embryol exp. Morph.65: 151-167

11. Giovanna MariaLedda-Columbano, PierpaoloConi,GabriellaSimbula, IgnazioZedda and AmedeoColumbano. 1993. *Compensatory Regeneration, Mitogen- Induced Liver Growth, and Multistage Chemical Carcinogenesis*. Health Perspectives 101: 163-168
12. Bart Boersma and Jan Maarten Wit. 1997. *Catch-up Growth*.Endocrine 18: 646–661
13. PatrizaFerretti, Jacqueline Geraudie. 1998. *Invertebrates- vertebrates. Cellular and Molecular Basic of Regeneration: From Invertebrates to Humans*. Ed. John Wiley & Sons. Toronto. 9-30
14. Curtis Helena, Sue Barnes N, Schnek Adriana, Flores Graciela. 2000. *El reino animal III: los artropodos*. Biología. Ed. Panamericana. Sexta Edición. 899-907
15. Dolmatov, I.Y. 1992. *Regeneration of the aquapharyngeal complex in the holothurian Eupentecta fraudatrix (Holothuroidea, Dendrochirota)*. In *Key for Regeneration*. Toban, C.H. and Boilly, B. (eds). Karger, Basle. 40-50
16. Goss, R.J. 1969. *Principles of Regeneration*. Academic Press, New York.
17. Viravuth, P. Yin and Kenneth, D. Poss. 2008. *New regulators of vertebrate appendage regeneration*. NIH Pubic Access. 18/4: 381-386
18. Mohanty-Hejmadi, P. Dutta, S.K. and Mahapatra, P. 1992. *Limbs regenerated at site of tail amputation in marbled balloon frog after vitamin A treatment*. Nature. 355: 352-353
19. Anoop Kumar. B. and Pilo. P. 1994. *Influence of catecholamine and acetylcholine neurotransmitters on tail regeneration in the gekkonid lizard Hemidactylus flaviridis*. Indian J. Exp. Biol. 32: 767-771
20. Wanek. N., Muneoka. K. and Bryant. S.V. 1989. *Evidence for regulation following amputation and tissue grafting in the developing mouse limb*. J. Exp. Zool. 249: 55-61

21. Muneoka. K. and Sassoon. D. 1992. *Molecular aspects of regeneration in developing vertebrate limbs*. Development. Biol. 152: 37-49
22. Jessica A. Lehoczky, Benoit Robert, and Clifford J. Tabin. 2011. *Mouse digit tip regeneration is mediated by fate-restricted progenitor cells*. PNAS. 108/51: 20609-20614
23. Han M, Yang X, Farrington JE, Muneoka K. 2003. *Digit regeneration is regulated by Msx1 and BMP4 in fetal mice*. Development. 130: 5123–5132
24. German Alfredo Ramírez Hernández. 2010. *Fisiología de la Cicatrización Cutánea*. Revista Facultad de Salud-RES. 2 (2): 69-78
25. Geoffrey C. Gurtner, Sabine Werner et al. 2008. *Wound repair and regeneration*. Nature. 453: 314-321
26. J.A. Páramo, E. Panizo, C. Pegenaute, R. Lecumberri. 2009. *Coagulación 2009: Una visión moderna de la hemostasia*. Rev Med Univ Navarra. 53(1): 19-23
27. Van der Veer WM, Bloemen MC, Ulrich MM, Molema G, van Zuijlen PP, Middelkoop E, Niessen FB. 2009. *Potential cellular and molecular causes of hypertrophic scar formation*. Burns. 35: 15-29
28. Sabine A. Eming, Thomas Krieg and Jeffrey y M. Davidson. 2007. *Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms*. J Invest Dermatol. 127: 514-25
29. Joaquin Benavides. 2008. *Reparación de heridas cutánea*. Rev Asoc Col. Dermatol. 16/1
30. By William W. Li, MD. 2003. *Angiogenesis in Wound Healing*. Con Temporary surgery

31. Oscar Peralta-Z., Lagunas-Martínez A, Madrid-Marina V. 2001. *Factor de crecimiento transformante beta-1: estructura, función y mecanismos de regulación en cáncer*. SaludPública México. 43: 340-351
32. Robbins y Cotran. 2010. *Patología estructural y funcional*. Octava Edición. Elsevier. España. S.L. 99-108
33. Choun-Ki Joo and Young Seomun. 2008. *Matrix metalloproteinase (MMP) and TGF $\beta$ 1-stimulated cell migration in skin and cornea wound healing*. Commentary & View. Cell. Adhesion & Migration. 2:252-253
34. Robert Visse and Hideaki Nagase. 2003. *Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry*. Circulation Research is published by the American Heart Association. 92:827-839
35. Gillian Murphy and Hideaki Nagase. 2008. *Progress in matrix metalloproteinase research*. NIH Public Access. 29/5: 290-308
36. Juan F. Santibáñez, Miguel Quintanilla and Carmelo Bernabeu. 2011. *TGF- $\beta$ 1/TGF- $\beta$ receptor system and its role in physiological and pathological conditions*. ClinicalScience121: 233-251
37. M. Prieto, J. V. Rivas, J. M. López Novo and F. Pérez-Barriocanal. 2002. *El TGF- $\beta$ : síntesis y mecanismo de acción*. Nefrología. 22: 135-143
38. Joan Massagué and Ye-Guang Chen. 200. *Controlling TGF- $\beta$  signaling*. Genes & Development. 14: 627-644
39. Francisco Javier Gálvez G., Ana Soledad R., Juan Armendáriz B. 2004. *El Factor de Crecimiento Transformante  $\beta$  como blanco terapéutico*. Salud Pública México. 4/64: 341-350

40. Marcela Sosa-Garrocho y Marina Macías-Silva. 2004. *El Factor Crecimiento Transformante Beta (TGF- $\beta$ ) y Funciones y Vías de Transducción*. Departamento de Biología Celular. Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. 23: 3-11
41. Liliana Attisano and Jeffrey L. Wrana. 2002. *Signal Transduction by the TGF- $\beta$  Superfamily*. View point. Science. 296: 1646
42. Werner, S. and Grose, R. 2003. *Regulation of wound healing by growth factors and cytokines*. Physiol. Rev. 83: 835-870
43. Franck Verrecchia and Alain Mauviel. 2002. *Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling Through the Smad Pathway: Role in Extracellular Matrix Gene Expression and Regulation*. The Journal of Investigative Dermatology. 22: 211-215
44. Mary Y. Wu<sup>1</sup> and Caroline S. Hill<sup>1</sup>. *TGF- $\beta$  Superfamily Signaling in Embryonic Development and Homeostasis*. Developmental Cell. .2009.02.012
45. Yan Xioahua and Ye-Guang Chen. 2011. *Smad7. Not only a regulator, but also a cross-talk mediator of TGF- $\beta$  signaling*. Biochem. J. 434: 1-10
46. Joan Massague and David Wotton. 200. *Transcriptional control by the TGF- $\beta$ /Smad signaling system*. The EMBO Journal. 8: 1745-1754
47. Saijon, Y. et al. 2000. *Left-right asymmetric expression of lefty2 and nodal is induced by a signaling pathway that includes the transcription factor FAST2*. Mol. Cell. 5: 35-47
48. Labbe, E., Silvestri, C., Hoodless, P.A., Wrana, J.L. and Attisano, I. 1998. *Smad2 and smad3 positively and negatively regulate TGF- $\beta$ - dependent transcription through the forkhead DNA-binding protein FAST2*. Mol. Cell. 2: 109-120

49. Beckmann, H., Su, L.K. and Kadesch, T. 1990. *TFE3: a helix-loop-helix protein that activates transcription through the immunoglobulin enhancer muE3 motif*. *Genes dev.* 4: 167-179
50. Hua, X., Miller, Z.A., Wu, G., Shi, Y. and Lodish, H.F. 1999. *Specificity in transforming growth factor  $\beta$ -induced transcription of the plasminogen activator inhibitor-1 gene: interaction of promoter DNA, transcription factor E3 and smad proteins*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 96: 13130-13135
51. Zhang, Y., Feng, X.H. and Derynck, R. 1998. *Smad3 and smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGF- $\beta$ -induced transcription*. *Nature.* 394: 909-913
52. Lin, Y.C. and Stavnezer, J. 1992. *Regulation of transcription of the germ-line Ig  $\alpha$  constant region gene by an ATF element and by novel transforming growth factor- $\beta$ 1-responsive elements*. *J. Immunol.* 149: 2914-2925
53. Pardali, E., Xie, X.Q., Tsapogas, P., Itoh, S., Arvanitidis, K., Heldin, C.H., ten dijk, P., Grudstrom, T. and Sideras, P. 2000. *Smad and AML proteins synergistically confer transforming growth factor  $\beta$ 1 responsiveness to human germ-line IgA genes*. *J. Biol. Chem.* 275: 3552-35660
54. Mark W. J. Ferguson and Sharon O. Kane. 2004. *Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention*. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 839-850
55. Valluru M, Staton CA, Reed MW, Brown NJ. 2011. *Transforming growth factor and endoglin signaling orchestrate wound healing*. *Front Physiol.* 2: 89
56. A.J. Cowin, M.P. Brosnan, T.M. Holmes, and M.W.J. Ferguson. 1998. *Endogenous Inflammatory Response to Dermal Wound-Healing in the Fetal and Adult Mouse*. *Developmental Dynamics.* 212: 385-393

57. Allison J. Cowin, Toby M. Holmes, Patricia Brosnan, Mark W.J. Ferguson. 2001. *Expression of TGF-beta and its receptors in murine fetal and adult dermal wounds*. European Journal of Dermatology. 11(5): 424-31
58. J. Matthew Rhett, Gautam S. Ghathekar, Joseph A. Platinus, Michael O Quinn, Michael J. Yost and Robert G. Gourdie. *Novel therapies for scar reduction and regenerative healing skin wounds*. Trends in Biotechnology. 26(4): 173-180
59. Magaly Martinez-Ferrer, Ali-Reza Afshar-Sherif, Consolate Uwamariya, Benoit de Crombrughe Jeffrey M. Davidson and Neil A. Bhowmick. 2010. *Dermal Transforming Growth Factor- $\beta$ . Responsiveness Mediates Wound Contraction and Epithelial Closure*. The American Journal of Pathology. 176: 98-107
60. Gillian S. Ashcroft, Xiao Yang, Adam B. Glick§, Michael Weinstein, John J. Letterio, Diane E. Mizel, Mario Anzano, Teresa Greenwell-Wild, Sharon M. Wahl, Chuxia Deng and Anita B. Roberts. 1999. *Mice lacking Smad3 show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response*. NATURE CELL BIOLOGY. 1: 260-266
61. Mathieu Le'vesque, Samuel Gatien, Kenneth Finnson, Sophie Desmeules, E' ricVilliard, MireillePilote, Anie Philip and Ste'phane Roy.2007. *Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling Is Essential for Limb Regeneration in Axolotls*. PLoS ONE. 2(11): e1227
62. Mamta Shah, David M. Foreman and Mark W. J. Ferguson. 1995. *Neutralisation of TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 2 or exogenous addition of TGF- $\beta$ 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring*. Journal of Cell Science. 108: 985-1002
63. DariushHonardoust, PhD, Mathew Varkey, MSc, Yvonne Marcoux, BSc, Heather A. Shankowsky, RN, Edward E. Tredget, MD, MSc, FRCSC. 2012. *Reduced Decorin, Fibromodulin, and Transforming Growth Factor- $\beta$ 3 in Deep Dermis Leads to Hypertrophic Scarring*. J Burn Care Res. 33:218-227
64. Ellen Heber-Katz. 1999. *The Regenerating Mouse Ear*. Cell &Develomental. 10: 415-419

65. Brandon Reines, Lily I. Cheng, and Polly Matzinger. 2009. *Unexpected Regeneration in Middle-Aged Mice*. REJUVENATION RESEARCH. 12: 1
66. Prophet E.B., Mills B. A. JB. And Sabon L.H. *Procesamiento de muestras. En Métodos Histotecnológicos*. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas, Washington D.C. Registro de Patología de los estados unidos; 1992
67. Luis ramón Nolasco espinosa. 2003. *Modulo 4 Dermatología*. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina veterinaria y Zootecnia. 228: 9-25
68. Ekaterina Semenova, Heidi Koegel, Sybille Hasse, Jennifer E. Klatte, EsfirSlonimsky, Daniel Bilbao, Ralf Paus, Sabine Werner and Nadia Rosenthal. 2008. *Overexpression of mIGF-1 in Keratinocytes Improves Wound Healing and Accelerates Hair Follicle Formation and Cycling in Mice*. The American Journal of Pathology. 173: 1295-1310
69. By A. R. Smith and A. M. CRawley. 1977. *The pattern of cell division during growth of the blastema of regenerating newt forelimbs*. J. Embryol, exp. Morph. 37: 33-48
70. Amy S. Colwell, Michael T. Longaker and H. Peter Lorenz. 2003. *Fetal Wound Healing*. *Frontiers in Bioscience* 8: 1240-1248
71. Praveen R. Arany , Kathleen C. Flanders, Tetsu Kobayashi, Catherine K. Kuo, Christina Stuelten, Kartiki V. Desai, Rocky Tuan, Stephen I. Rennard and Anita B. Roberts. 2006. *Smad3 deficiency alters key structural elements of the extracellular matrix and mechanotransduction of wound closure*. PNAS. 103: 9250-9255
72. J Chimal-Monroy, J Rodríguez y León, JA Montero, Y Gañan, D Macias, R Merino and JM Hurle. 2003. *Analysis of the molecular cascade responsible for mesodermal limb chondrogenesis: sox genes and BMP signaling*. *Developmental Biology*. 257: 292-301
73. Nestor A. Arita, Daniel Pelaez and Herman S. Cheung. 2011. *Activation of the extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2) is needed for the TGFb-induced*

*chondrogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells*. BBRC. 405: 564-569

74. Makoto Suzuki, Nayuta Yakushiji, Yasuaki Nakada, Akira Satoh, Hiroyuki Ide, and Koji Tamura. 2006. *Limb Regeneration in Xenopus laevis Froglet*. *The Scientific World JOURNAL*. 6: 26-37