



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Evaluación *in vitro* de la proliferación de
queratinocitos humanos (EDAR+) estimulados
con la proteína ectodisplina A1

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

DANIEL SANTILLÁN CORTEZ



DIRECTOR DE TESIS:

M. EN C. MIGUEL ÁNGEL HERRERA
ENRÍQUEZ

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de datos del Jurado

1. Datos del alumno

Apellido paterno
Apellido materno
Nombre(s)
Teléfono
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Carrera
Número de cuenta

2. Datos del tutor

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

3. Datos del sinodal 1

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

4. Datos del sinodal 2

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

5. Datos del sinodal 3

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

6. Datos del sinodal 4

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

7. Datos del trabajo escrito.

Título

Subtítulo
Número de páginas
Año

1. Datos del alumno

Santillán
Cortez
Daniel
58493507
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
305139199

2. Datos del tutor

M en C
Miguel Ángel
Herrera
Enríquez

3. Datos del sinodal 1

Dr
Andrés Eliú
Castell
Rodríguez

4. Datos del sinodal 2

Dra
Martha Luz
Ustaroz
Cano

5. Datos del sinodal 3

M en C
Gabriela
Piñón
Zárate

6. Datos del sinodal 4

Dra
María Isabel
García
Peláez

7. Datos del trabajo escrito

Evaluación *in vitro* de la proliferación de queratinocitos humanos (EDAR+) estimulados con la proteína ectodisplasina A1

75p
2013

Resumen

Evaluación *in vitro* de la proliferación de queratinocitos humanos (EDAR+) estimulados con la proteína ectodisplasina A1.

Algunas lesiones cutáneas de gran extensión que no sanan durante periodos largos de tiempo como quemaduras y úlceras de distinta etiología, son tratadas de manera convencional con trasplantes de piel, sin embargo, no siempre es posible realizar dichos procedimientos. La ingeniería de tejidos ha construido distintos tipos de equivalentes cutáneos para cubrir o promover el cierre de las heridas. Cabe señalar que estos equivalentes no restauran las funciones sensoriales, pigmentarias y secretoras de la piel, por lo que es necesario desarrollar equivalentes cutáneos que contengan melanocitos, células de Merckel, así como los distintos anexos cutáneos. La biología celular a partir de distintos estudios en la embriología cutánea de ratones a proporcionado las bases en el conocimiento proteico para la generación de anexos cutáneos (pelo, glándulas sudoríparas, uñas y dientes). Así se encuentran 6 familias proteicas conservadas filogenéticamente: 1) factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), 2) Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), 3) la proteína hedgehog (HH), 4) la familia de proteínas wingless (WNT) 5) la proteína Notch 6) factor de necrosis tumoral (TNF). Esta última es representada por la proteína ectodisplasina (EDA) involucrada en el desarrollo normal del ectodermo y mesodermo. Si existiera alguna mutación en la proteína ó su vía de señalización en humanos provoca lo que es conocido como displasia ectodérmica hipohidrotica, caracterizada por anomalías en el desarrollo folicular, dental y glandular. a una concentración de 50ng/ml de EDA A1 es reportada para promover el desarrollo folicular. En nuestro grupo de trabajo se ha demostrado que la administración exógena de activina A a una concentración de entre 100 y 250 ng/ml conduce a una proliferación *in vitro* de queratinocitos humanos, sin embargo no se ha evaluado la participación de otros factores como EDA A1 y la proteína Wnt10b (importante para la transcripción de EDA).

OBJETIVO: Evaluar en un equivalente cutáneo la proliferación y expresión de EDAR en queratinocitos basales, estimulados con 3 proteínas: activina A, ectodisplasina A1 (EDA A1) y Wnt10b con la finalidad de verificar su potencial para el desarrollo de los anexos cutáneos.

MATERIAL Y MÉTODO: A partir de la disgregación de una biopsia de piel humana adulta, se obtuvieron cultivos primarios de queratinocitos y fibroblastos de manera independiente. Una vez que las poblaciones celulares fueron expandidas, los fibroblastos fueron sembrados e incluidos en una base dérmica de fibrina, y posteriormente los queratinocitos fueron colocados sobre ella y estimulados con la proteína activina A (recombinante humano) durante 48hrs. Posteriormente, los cultivos fueron suplementados con proteínas de sobrenadante de células MCF7 (donde se detectó la proteína Wnt10b mediante la técnica de ELISA) y EDA-A1 (recombinante humano) (dependiendo el grupo experimental), tras una semana de estimulación los cultivos en los equivalentes cutáneos fueron fijados y procesados para obtener cortes seriados en parafina que fueron procesados con inmunohistoquímica (IHQ) dirigida contra: queratina 5 (K5) y el receptor de EDA (EDAR). Se cuantificó el número de células positivas así como la densidad óptica (DO) de la expresión de K5 y EDAR.

RESULTADOS: El análisis morfométrico de los cortes histológicos realizados en los equivalentes cutáneos mostró que el empleo de activina en los cultivos condujo a regular la expresión de citoqueratina 5. El incremento de células K5 positivas es mayor cuando se adiciona al cultivo el sobrenadante de células MCF7 al 20% y también se ve aumentada la expresión de EDAR. En el empleo de Activina+ Ectodisplasina (50ng/ml) se ve un comportamiento muy similar al anterior mencionado. También se demostró que al utilizar Act/EDA/ sobrenadante MCF7 al 10% en los cultivos se incrementó significativamente ($p < .0001$) el número de células K5+/EDAR+ en relación a los demás tratamientos. El hecho de tener una proliferación de queratinocitos basales EDAR+ sugiere que podrían dar lugar a la formación de folículos pilosos y glándulas sudoríparas en un constructo *in vitro* de piel artificial.

Dedicatoria

Dedico especialmente esta tesis a mis padres:

Rosalva Cortez Suástegui

y

Norberto Santillán Torres.

Quienes me han apoyado en mi formación. Posiblemente esto no sea la mejor paga o lo suficiente para la inversión que desde niño me han tenido, pero por algo se empieza.

Gracias!.

Agradecimientos

Agradezco ese apoyo incondicional familiar que siempre ha estado y espero siga así, también a mis amigos, y profesores que de una u otra manera me han ido influenciando para ser quien soy hoy en día, podrían ser interminables estos agradecimientos si los colocara uno por uno de aquell@s que me han influenciado favorablemente en mi vida por lo que pido una disculpa para aquellos que no lleguen a encontrar su nombre en los siguientes renglones:

Dr. Andrés Castell por ser como ser y no poder decir que no a ninguna persona, lo que me favoreció en el ingreso del laboratorio, su confianza, fortaleza, tranquilidad, así como sus experiencias de vida que llego a compartirme en momentos de flaqueza me motivaron a continuar trabajando y crearme otro panorama humano y científico. Su participación en mis seminarios donde siempre me hizo notar mis puntos débiles de conocimiento y como reto trataba de mejorar en cada momento. A pesar de que Miguel Herrera Enríquez me hizo el feo al principio y aún no lo olvido, terminó siendo mi tutor, algo que al principio no me esperaba y creo que él tampoco, a lo cual agradezco su confianza.

A mis compañeros, colegas y amigos del laboratorio, Rodrigo J.S., Marlene, Paola, Mikal, Rosa, Paulina, Nadia, Norma, Jessica, karlita, Gaby, Bety, Paty y Katy; con quienes compartí ratos de stress, pero mayormente tiempo muy ameno, entre risas, comidas y lo más importante: las criticas profesionales del trabajo algo que Katia sabe decir de la manera más cruda. Pero con las mejores intenciones, creo yo :P, le agradezco la amistad y apoyo integro en mi estancia del laboratorio así como la confianza desde que llegue, que por razones inexplicables nunca tuvo respuesta del ¿Por qué?, a Bety también le extiendo estas líneas ya que la mayor parte de la tesis fue entorno a las inmunohistoquímicas algo que apostaría puede hacer hasta con los ojos cerrados, ¡gracias!

Agradezco al súper equipo de ecología: Alma, Eric, Caro por ser el mejor equipo de trabajo y los mejores amigos encontrados en la facultad, se que serán muy buenos investigadores y tendrán mucho éxito ya que les apasiona lo que hacen. También mis agradecimientos para Aldo Pérez Ramírez, por ser una excelente persona crítica y optimista de la vida, te agradezco por escucharme, aconsejarme y participar en mi crecimiento personal y profesional.

Momentos de horas muertas en la facultad hubieran sido los semestres más feos sin la compañía y amistad de “I@s de las canchas” colegas y amigos de la facultad: Oso, Sonia, Pepe, Chorch, Adrianas, Alejandros, Andrea, Heber, Luis, entre muchos más.

Con mucho respeto, a Jonathan Romero Sandoval Q.E.P.D quien como compañero y amigo admiré y respete mucho por su forma tan alegre y positiva que tenía ente la vida, desafortunadamente también me hizo caer en cuenta que la vida se pude ir de un momento a otro sin aviso alguno, de esta manera agradezco su amistad y sé que en algún futuro nos volveremos a ver. Por último y no menos importantes al pabellón de cirugía plástica del Hospital General, a la Dra. Anabel Villanueva y al Dr. Raymundo Priego, a la donadora Sra. Rocio, Q.E.P.D. y al apoyo económico del proyecto UNAM/DGAPA/PAPIIT: IN213510, IN214109 e IT201313-2.

Agradecimientos Académicos

Para la elaboración de esta Tesis de nivel licenciatura titulada: Evaluación *in vitro* de la proliferación de queratinocitos humanos (EDAR+) estimulados con la proteína ectodisplasina A1, yo, Daniel Santillán Cortez con número de cuenta 305139199.

Agradezco a:

M. en C. Miguel Ángel Herrera Enríquez por la dirección en la elaboración de la tesis, así como al Dr. Andrés Castell Rodríguez por estar al pendiente de la investigación.

Gracias por las asesorías, comentarios y participación activa-positiva, que sin su apoyo esto no hubiese sido posible:

Biól. Beatriz Hernández Tellez.

M.en C. Gabriela Piñon Zárate.

Q. Carlos Castellanos Barba.

M. en C. Jessica Miriam Medrano Hernández.

M. en C. Katya Jarquin Yáñez.

Biól. Rodrigo José Jiménez Sandoval.

Biól. Marlene Zempoaltecatl Jiménez.

Técnica Académica Verónica Rodríguez Mata.

Técnica Académica Raquel Guerrero Alquicira.

Abreviaturas

BMP	Proteína morfogénica osea
DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco.
EDA	Ectodisplasia A.
EDAR	Receptor de la ectodisplasia A.
EDTA	Etilén-diamino-tetra-acetato.
EGF	Factor de crecimiento epidérmico.
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos.
H&E	Hematoxilina/Eosina.
I κ B	inhibidor del factor NF- κ B
IKK	Cinasa del factor I κ B
JNK	cinasa del factor Jun.
NEMO	Modulador esencial de NF- κ B.
NF κ B	Factor nuclear κ B.
PBS	Buffer de fosfatos salino.
PCNA	Antígeno nuclear asociado a células proliferativas.
Rpm	<u>R</u> evoluciones <u>p</u> or <u>m</u> inuto.
SBF	suero bovino Fetal.
Shh	Sonic hedgehog.
TNF	Factor de necrosis tumoral
TROY	Receptor de la superfamilia TNFR expresado en el embrión de ratón.
TRAF	Factor asociado al receptor TNF
TAK1	Factor de crecimiento transformante beta activador cinasa 1
TAB2	Proteína de unión 2 al factor TAK1
XEDAR	Receptor de ectodisplasia A2 ligado al cromosoma X.

Índice General

Hoja de datos del jurado.....I	Fibroblastos.
Resumen.....II	4.3.- Proteína sonic hedgehog.
Dedicatoria.....III	4.4.- Proteína WNT.
Agradecimientos.....IV	4.5.- Proteína Notch.
Agradecimientos académicos.....V	4.6.- Factor de necrosis tumoral (TNF).
Abreviaturas.....VI	4.6.1.- Ectodisplasia.
Introducción	5.- Antecedentes.....21
1.-Generalidades de la Piel.....1	5.1.- Ingeniería de Tejidos.
1.1.- Histología.	5.1.1.- Biomateriales.
1.1.1.- Epidermis.....2	5.1.1.1.- Tipos de biomateriales.
1.1.1.1.- Estrato basal.	5.1.1.1.1.- Fibrina.
1.1.1.2.- Estrato espinoso.	5.2.- Ingeniería de tejidos de piel.
1.1.1.3.- Estrato granular (granuloso).	5.3.- Investigación en las Displasias Ectodérmicas Hipohidróicas.
1.1.1.4.- Estrato Lucido.	6.- Justificación.....30
1.1.1.5.- Estrato corneo.	7.- Hipótesis.....31
1.1.2.- Dermis.....5	8.- Objetivos.....32
1.1.2.2.-Colágena.	8.1.- Objetivo general.
1.1.2.3.- Fibras elásticas.	8.2.- Objetivos particulares.
1.1.2.4.- Glucosaminoglucanos, proteoglucanos y glucoproteínas.	9.- Material y Método.....34
1.1.3.-Hipodermis.....7	9.1.- Colecta de tejido.
2.- Generalidades de la embriología cutánea.....7	9.2.- Aislamiento y cultivo de queratinocitos y fibroblastos.
2.1.- Dermis.	9.3.- Línea celular MCF7.
2.2.- Epidermis.	9.4.- Equivalente cutáneo.
3.- Desarrollo del folículo piloso.....9	9.5.- Estimulación de queratinocitos.
4.- Señales involucradas en la embriología cutánea.....12	9.6.- Evaluación de la expresión de EDA, K5 y pCNA.
4.1.- Familia de crecimiento transformante- β .	10.- Resultados.....38
4.2.- Factor de crecimiento de	10.1.- Construcción del equivalente cutáneo.

Índice General

10.2.- Cultivos MCF7.	12.- Conclusión.....52
10.3.- Estimulación proteica.	13.- Bibliografía.....53
10.4.- Análisis del experimento.	14.- Anexos.....64
11.- Discusión.....49	

Introducción

1.- Generalidades de la Piel:

El órgano más grande del cuerpo humano y la primera barrera de protección es la piel, tiene una superficie aproximada de 2m^2 y su peso representa el 16% del peso total de un adulto (Curtis *et al.* 2006). La piel está constituida por 3 capas (Figura 1): epidermis (epitelio de cobertura), dermis (vascularizada, rica en anexos cutáneos como: pelo, uñas, glándulas sebáceas, glándulas sudoríparas apócrinas y glándulas ecrinas, así como estructuras nerviosas) e hipodermis o tejido subcutáneo (rico en tejido adiposo). El grosor, el color, la textura de la piel no son uniformes y difieren según la edad del individuo, el género así como de la región del cuerpo que se trate.

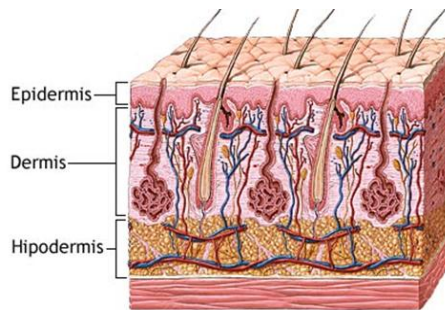


Figura 1.- Esquema que muestra las tres capas histológicas observadas en un corte transversal de piel delgada, tomado de: A.D.A.M. 2013.

Entre las funciones de la piel se destacan las siguientes:

1. Interfase: que delimita el medio interno del externo.
2. Regulación hidroelectrolítica: evita la pérdida de agua e iones, así como de proteínas.
3. Protección: de agresiones físicas, químicas y biológicas, como puede ser rayos UV.
 - Melanocitos son: células que se localizan en la capa basal y son responsables del color de la piel al secretar melanina, que tiene la función de atrapar radicales libres. (Kimber *et al.* 2000).
 - Vigilancia inmunológica: por medio de las células de Langerhans. Son células presentadoras de antígeno que son capaces de fagocitar y presentar antígenos procesados a linfocitos T, que pueden iniciar una respuesta inmune específica.
4. Regulación de la temperatura. Posee un papel importante en el mantenimiento de la temperatura corporal gracias a la acción de las glándulas sudoríparas y de los abundantes lechos capilares.
5. Percepción de la sensibilidad, esta función se desarrolla a través de diferentes terminaciones nerviosas:
 - Las células de Merkel son mecanorreceptores que se localizan en la capa basal y responden a estímulos de tacto fino (Fantini y Johanson, 1995).
 - Corpúsculos de Vater-Pacini. Se localizan en la dermis profunda e hipodermis y detectan presión.

Introducción

- Corpúsculos de Meissner, Estan localizados en la dermis papilar y detectan tacto grueso.
 - Corpúsculos de Krause. Localizados en la dermis superior para detectar frío.
 - Corpúsculos de Ruffini. Situados en la dermis superior con función de detectar calor (Fortoul y Castell, 2010).
6. Metabolismo de moléculas: Síntesis de Vitamina D.
 7. También se le considera como un órgano de expresión de emociones, por su capacidad de revelar los distintos estados de ánimo: vergüenza (rubor), ira (enrojecimiento), temor (palidez), ansiedad (sudor), etc.

1.1 Histología:

1.1.1 Epidermis:

Histológicamente la epidermis está constituida por un epitelio plano estratificado con estrato corneo y corresponde a la capa más superficial de la piel, se le considera como una estructura altamente dinámica que a lo largo de la vida se encuentra en constante renovación celular (Waseem *et al.* 2006). Se encuentra constituida por cuatro tipos celulares (figura 2): Los queratinocitos son las principales células de la epidermis correspondiendo a más del 85% de las células, el resto son células de Langerhans, del 5 al 8%, melanocitos, el 5% y células de Merkel correspondiendo del 3 al 5%(Lloyd, 2008).

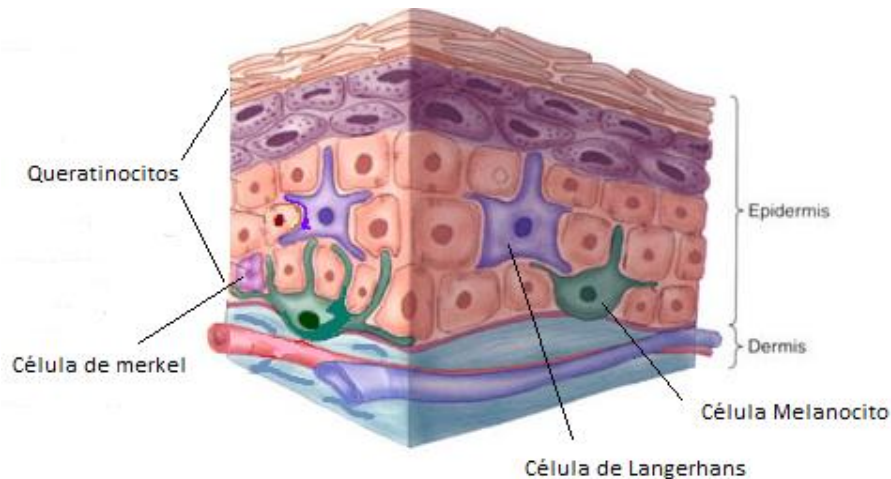


Figura 2.- Esquema que muestra los distintos tipos celulares presentes en la epidermis. Tomado de bestofbothworldsaz.com

Los queratinocitos poseen varias funciones, la más conocida es la de producir queratina, pero además sintetizan otras sustancias químicas, como: interferón alfa (IFN- α), prostaglandinas, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y factor activador de los timocitos derivado de las células epidérmicas (ETA1). Debido al proceso de diferenciación terminal, los queratinocitos adquieren distintas características morfológicas que han permitido clasificarlos en distintos estratos epidérmicos, desde el más basal hacia el más superficial, son los siguientes:

Introducción

- Estrato basal o germinativo
- Estrato espinoso
- Estrato granuloso
- Estrato lúcido* (solo es evidente en piel gruesa, localizada en palmas y plantas de los pies)
- Estrato corneo

Los cambios morfológicos de los queratinocitos se deben a cambios en la actividad sintética de distintas proteínas, tanto estructurales como enzimáticas, siendo estos una característica del estadio de diferenciación en que se encuentran las células fundamentalmente (Eckert y Rorke 1989) y en consecuencia de cada estrato epidérmico. Estos cambios pueden ser observados en los filamentos intermedios y las características de la envoltura celular:

- 1) Los filamentos intermedios, representados por las proteínas de la familia de las queratinas, una gran familia de al menos 39 miembros, que se expresa de forma tejido específico (Moll *et al.*1982). La formación de filamentos de queratina requiere la asociación de una queratina tipo I o ácida y otra de tipo II o básica que se acoplan una alrededor de la otra. El dímero de queratina es el elemento esencial para la formación de un filamento (Martínez y Martínez, 2010). En los queratinocitos se expresan fundamentalmente distintos tipos de queratinas: queratinas 5 y 14 (K5 y K14) localizadas únicamente en queratinocitos del estrato basal, ya que en estratos superiores se inhibe su transcripción, queratinas 1 y 10 (K1 y K10) cuya síntesis comienza en el estrato espinoso y queratinas 2, 9 y 11 (K2, K9 y K11) en los estratos superiores (Busi, 2008).
- 2) La envoltura celular cornificada es un elemento diferencial del queratinocito postmitótico. Durante la diferenciación término-terminal de los queratinocitos del estrato granuloso se le adhiere una enzima llamada transglutaminasa, que permite la adhesión de varias proteínas a la membrana plasmática: la Involucrina, la loricrina y péptidos ricos en prolina (Honeyman, 2013). Esta cubierta proteica estabiliza a la membrana plasmática. Con el objeto de impedir su lisis cuando el núcleo de las células del estrato córneo desaparece. Por otro lado, otras proteínas, como la Filagrina, Elafina, Cistatina A y Cornifelina inducen arreglos de los filamentos de queratina en formación paralela. La unión de estas proteínas con queratinas son dependientes de Calcio⁺⁺.

Histológicamente la piel se puede clasificar en dos variedades: la piel gruesa y la piel delgada. La primera contiene el estrato lúcido, ausencia de folículos pilosos y glándulas sebáceas, con presencia de numerosas glándulas sudoríparas. Se puede encontrar en la palma de las manos así como en la planta de los pies. Mientras que la piel delgada no tiene estrato lúcido, el estrato corneo es delgado y es muy común la presencia de folículos pilosos, músculos erectores del pelo, glándulas sudoríparas y sebáceas.

Introducción

1.1.1.1.- Estrato basal

También llamado estrato germinativo. Está constituida por una sola capa de células de forma cúbica o cilíndrica que descansan sobre la membrana basal. Son células hijas producidas a partir de un pequeño porcentaje de células conocidas como células madre que constituyen aproximadamente del 1-10% de los queratinocitos basales (Staniszewska *et al.* 2011), Estas células sufren un proceso de división celular denominado división asimétrica (figura 3), en donde una célula madre de queratinocitos tiene la capacidad de dividirse como queratinocito transitorio-amplificador y mantenerse de forma quiescente para posteriores renovaciones celulares. Los queratinocitos transitorios-amplificadores son las que tienen mayor división para la autorenovación estable y son las más numerosas en este estrato. Al dividirse gradualmente migran hacia los estratos superiores como células postmitóticas para reemplazar a las células que se desprenden de la superficie cutánea (Goudet *et al.* 2008).

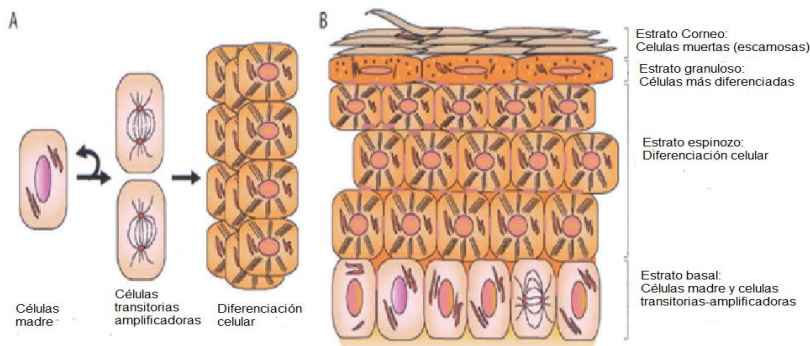


Figura 3.- Proceso de división asimétrica, proliferación y diferenciación de queratinocitos en la epidermis. A) División asimétrica de la célula madre (*stem cell*) dando origen a las células transitorias-amplificadoras y posterior diferenciación epitelial. B) Esquemización de la organización basal de las células madre y las células transitorias-amplificadoras así como su diferenciación hasta llegar al estrato corneo. Tomado de Alonso y Fuch, 2003.

1.1.1.2.- Estrato espinoso

Las células del estrato espinoso tienen forma poliédrica y se hallan dispuestas en varias capas, y se aplanan conforme avanzan hacia la superficie (diferenciación terminal). Son llamadas células espinosas porque en los cortes histológicos convencionales parece que tienen “espinas” al observarlas bajo el microscopio. Las “espinas” contienen desmosomas, que son puentes intercelulares que permiten la adhesión entre células así como la comunicación entre ellas. Las células de este estrato, aunque no han perdido totalmente la capacidad mitótica, normalmente no se dividen (Bailleul *et al.* 1990). La biosíntesis de la involucrina se inicia en este estrato, inmediatamente después de la expresión de las queratinas K1/K10, siendo el principal componente activado, posiblemente con una función de andamiaje (Wolff *et al.* 2009) comenzándose a formar en la última fase de este estrato los cuerpos lamelares (Ross, 2012).

Introducción

1.1.1.3.- Estrato granular (granuloso)

Estas células contienen gran cantidad de estructuras ovoides, delimitadas y de tamaño reducido, denominados cuerpos lamelares, estos contienen enzimas y compuestos lipídicos (Grubauer *et al.* 1989), constituidas por glicosil-ceramidas (en mayor proporción) y acil-ceramidas. Los queratinocitos de este estrato tienen una forma aplanada y se caracterizan por la presencia de gránulos de queratohialina (Resing y Dale, 1991), que contienen un precursor de proteínas, la Profilagrina que al defosforilarse se transforma en Filagrina, que permite la formación de haces paralelos de filamentos de queratina.

1.1.1.4.- Estrato Lúcido

Es un estrato muy delgado, que se observa como una línea homogénea, brillante y transparente, de ahí su nombre, Las células que lo conforman están muertas y sus núcleos en proceso de desaparecer por procesos enzimáticos (Welsch, 2008). Estas células presentan filamentos de queratina que se disponen en forma paralela con la superficie de la piel. Este estrato solo se encuentra en piel gruesa.

1.1.1.5.- Estrato córneo

Es el estrato más superficial y por ende el primero en entrar en contacto con el ambiente externo, está constituido por restos de células sin núcleo (Plewig *et al.* 1997). Como ya se menciono estos componentes son proteínas: involucrina, cistatina A, loricrina, tricohialino, filagrina, entre otros, y se unen por acción de las enzimas transglutaminasas para formar una envoltura insoluble, así estarán cumpliendo la función de permeabilidad. Las células del estrato córneo se liberan continuamente de la superficie de la piel por un proceso llamado descamación.

1.1.2.- Dermis:

La dermis es el componente y estructura más grande de la piel, y como todo tejido conjuntivo está compuesta principalmente por fibras de colágena, fibras elásticas, microfibrillas, hialuronano, dermatán sulfato, fibronectina, nervios y vasos; además de componentes celulares como macrófagos, fibroblastos, linfocitos y mastocitos (Welsch, 2008). La dermis cumple funciones de crecimiento y diferenciación de los queratinocitos, así como protección contra lesiones y almacenamiento de agua. Histológicamente, se distinguen dos capas dérmicas: la capa papilar y la capa reticular.

- Capa papilar: se localiza debajo de la epidermis y forma papilas conjuntivas primarias y secundarias, las cuales ayudan a mantener una unión con la epidermis a través de las crestas epidérmicas, esta capa se caracteriza por poseer colágena tipo III y I, y una abundancia de capilares sanguíneos para la nutrición de la epidermis.
- Capa reticular: Esta capa es la más profunda de la dermis, y se caracteriza por poseer mayoritariamente colágena tipo I, menor cantidad de tipos celulares, así como una orientación paralela a la superficie cutánea entre las fibras de colágeno

Introducción

y las fibras elásticas, formando líneas regulares de tensión de la piel mejor conocidas como: líneas de Langer (Ross, 2005).

1.1.2.2.- Colágena

La colágena es la mayor proteína extracelular de la dermis, y forma alrededor del 80% de la matriz extracelular (Castelo, 2010) Estas fibras proporcionan fuerza y elasticidad, pero también están involucradas en la migración celular, la adhesión y la quimiotaxis. La molécula de colágeno (tropocolagena) es un producto del fibroblasto, tiene tres cadenas polipeptídicas (cadenas α) enrolladas en una hélice triple dextrógira, la disposición de las moléculas de estas fibras tienden a formar una fibrilla de colágena y a su vez la distribución paralela de estas microfibrillas forma la fibra de colágena (Cui, 2011). En la piel se pueden encontrar distintos tipos moleculares de colágeno: tipo: I (dermis), III (dermis), IV (lamina basal) y VII (unión dermis epidermis) (Gartner, 2011).

1.1.2.3.- Fibras elásticas

Las fibras elásticas conforman una red en toda la dermis, típicamente más delgadas que las fibras de colágena, las fibras elásticas son producidas por las mismas células que producen las fibras colágenas y reticulares, en particular, los fibroblastos y las células musculares lisas, estas fibras están conformadas estructuralmente por elastina y microfibrillas de fibrilina (Ross, 2012).

1.1.2.4.- Glucosaminoglucanos, proteoglucanos y glucoproteínas

Los proteoglucanos son complejos de macromoléculas formados por la asociación covalente entre cadenas polipeptídicas y glucosaminoglucanos (Viladot, 2000). Estas últimas se forman de polímeros de unidades de disacáridos repetidas (hexosamina más ácido hexaurónico y en gran parte presentan diferentes niveles de sulfatación, como el condroitin-sulfato, dermatan-sulfato, queratan-sulfato y heparan-sulfato.

La función de los proteoglucanos es contribuir a la adhesividad celular mediante su interacción con la superficie celular y con otros componentes matriciales. El sindecan, por ejemplo, proteoglucano de la membrana celular, transmite señales a proteínas transmembranales, como las integrinas, que a su vez interactúan con el citoesqueleto, el cual facilita la interacción de los filamentos de actina.

Las glucoproteínas principales multifuncionales encontradas en la matriz extracelular son: fibronectina (FN), laminina (LN), tenascina (TN) y trombospondina (TB). Para cumplir con sus funciones estas moléculas necesitan de otras moléculas que sirven de unión entre la matriz extracelular y el citoesqueleto celular, como son: las integrinas, las caderinas, las inmunoglobulinas y las selectinas.

Introducción

1.1.3.- Hipodermis:

La hipodermis ó tejido subcutáneo, sirve como suplemento de reserva energética, acolchado y protección de la piel. Los adipocitos forman la masa principal de células de la hipodermis, están organizados en lóbulos definidos por tabiques de tejido conjuntivo fibroso. Los nervios, vasos sanguíneos y linfáticos están localizados dentro de los tabiques e inervan, nutren y drenan la región. La regulación de la grasa corporal está regulada por diferentes moléculas, mayoritariamente por la hormona leptina que tiene su origen en los adipocitos (Wolff, 2009).

2.- Generalidades de la embriología cutánea:

Durante las etapas tempranas del desarrollo embrionario se originan las tres capas germinativas: endodermo, mesodermo y ectodermo, lo que implica la participación de diferentes vías de señalización por el cual las células de cada una de las capas proliferan, se agrupan, se diferencian y/o migran para formar estructuras con funciones específicas:

- El ectodermo origina: al sistema nervioso central y periférico; al epitelio sensorial del ojo, nariz, oído; la epidermis; las glándulas sudoríparas, ecrinas, mamarias, pituitarias, timo, hipófisis y esmalte dental (García *et al.* 2012)
- El mesodermo origina: el tejido conjuntivo, el cartílago, el hueso, el corazón, la sangre y vasos sanguíneos, los músculos estriados y lisos, los riñones, las gónadas, la corteza de la glándula suprarrenal y el bazo.
- El endodermo origina: el epitelio del tubo digestivo y el árbol respiratorio; el parénquima de amígdalas, glándula tiroidea, las paratiroides, el timo, el hígado y el páncreas; el epitelio de la vejiga urinaria y de parte de la uretra; el epitelio del tímpano y de la trompa de Eustaquio.

En la formación de la piel participa el dermómero¹ y el propio mesodermo lateral (Figura.4). De los componentes mesodérmicos y ectodérmicos se originan, respectivamente, la dermis y epidermis (Palomero *et al.* 2000).

¹ Es la franja de piel constituida por la interacción del mesodermo embrionario y del ectodermo del somita.

Introducción

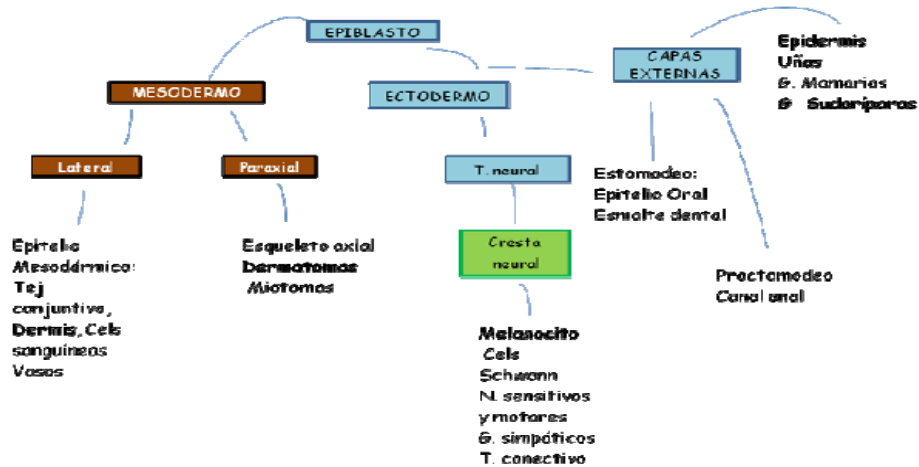


Figura 4.- Orígenes embrionarios del ectodermo y mesodermo. Tomado de Ortiz, 2012.

2.1.- Dermis:

La dermis embrionaria, en contraste con la dermis madura, es celular y amorfa, con pocas fibras organizadas, el mesenquima embrionario contiene una gran cantidad de células pluripotenciales en un gel hidratado rico en ácido hialurónico, se piensa que estas células mesenquimatosas son las progenitoras de las células que producen cartílago, células adiposas, fibroblastos dérmicos y hueso intramembranoso (Zurita, 2008). Las fibras dérmicas existen como filamentos delgados, pero no como fibras gruesas. A las 6 semanas de desarrollo los componentes proteicos de la futura elastina y fibras de colágeno son sintetizados (Lorente, 1998). EL mesenquima superficial se diferencia del tejido subyacente durante la transición embrionaria fetal entre la 12 y 15 semanas, en donde la dermis reticular comienza a tomar su característico aspecto fibrilar y se diferencia de la dermis papilar, que presenta un entretejido más fino. Una continua acumulación de fibras de colágena y elastina perdura hasta el nacimiento, cuando tiene ya una apariencia parecida a la dermis del adulto, aunque todavía es más celular (Wolff, 2009)

2.2.- Epidermis.

Durante el desarrollo embrionario en humanos la epidermis surge como una sola capa de queratinocitos basales en la etapa de blastocisto, cuando el ectodermo y el endodermo se definen morfológicamente. Una segunda capa externa, denominada peridermo, surge al final de 4 semanas de edad gestacional estimada (Ferreti *et al.* 2006). El peridermo y las células basales difieren en su composición de queratinas: ya que el peridermo expresa K8 y K19 (Arredondo y Tamayo, 2007).

El peridermo se convierte en tres capas entre 9-10 semanas de gestación y comienza la estratificación entre la semana 13 y 19, se necesitan 24 semanas para desarrollar todas las capas epidérmicas por actividad de la mitosis que se encuentra activa en todas las

Introducción

capas/estratos, mientras que en la etapa post-natal la proliferación celular de la epidermis se restringe a la capa basal (Ferreti *et al.* 2006).

Los anexos de la epidermis se desarrollan bajo la inducción de la dermis subyacente, este es el caso del pelo, uñas y glándulas sudoríparas y sebáceas. Se puede observar la formación del pelo a partir de la 12ª semana de gestación. Las diferencias entre el distinto tipo de pelo de las diferentes partes del cuerpo se debe a las señales producidas por el mesodermo subyacente de la región corporal de que se trate (Carlson, 2009).

3.- Desarrollo del folículo piloso:

En términos generales el desarrollo de los folículos pilosos se inicia a la semana 12 de vida intrauterina, pero en ocasiones se puede apreciar desde la 9a semana en aquellas zonas donde hay gran densidad folicular como es la cabeza, las cejas y los labios superior e inferior; gradualmente va cubriendo el resto del cuerpo a excepción de la piel de palmas de las manos y plantas de los pies. Durante este período se forman alrededor de 5 millones de folículos pilosos que cubrirán el cuerpo humano (Medwave, 2007) y no se generan nuevos después del nacimiento, sin embargo lo que cambia con el tiempo es el tamaño del folículo piloso, lo cual puede ser influenciado por hormonas, como sucede durante la pubertad.

Para que se lleve al cabo la formación del folículo piloso, se requiere de la acumulación previa de células epidérmicas basales, que formaran la papila dérmica. Esta papila se forma por un cúmulo de fibroblastos dérmicos por debajo de la membrana basal de la epidermis. Posteriormente, se pueden identificar los siguientes estadios de maduración en la formación del folículo piloso (figura.5 y 6):

I.- Inducción: Las células madre epiteliales responden a las primeras señales dérmicas expresando inductores o inhibidores, que son responsables de que la capa del ectodermo se engruese y forme una placoda (pregermen) para cada pelo. Estos inductores involucran a una de las vías moleculares más tempranas que regulan positivamente la inducción; WNT/B-catenina. Las proteínas Wnt se unen a receptores de membrana, lo que resulta en una señal que inhibe la degradación de B-catenina para translocarse al núcleo, así forma un complejo con la familia LEF/TCF, esta activación induce la formación del folículo piloso (Wolff *et al.* 2009). Otros promotores positivos y no menos importantes son el Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), Factor de crecimiento transformante Beta (TGF- β), genes que contienen Homeobox como MSX1 y MSX2, Ectodisplasia A (EDA), así como la integrina- β 1. La expresión de estas moléculas se ve suprimida por la activación de la Proteína morfogénica de hueso 2 y 4 (BMP-2 y BMP4) que actúan como potentes inhibidores de la formación de las placodas (García *et al.* 2011).

II.- Estadio de pregermen o yema: Las células del estrato basal adyacentes a la placoda forman una estructura convexa que envuelve los fibroblastos adyacentes que están en estrecha relación con los queratinocitos basales, formando la papila dérmica, éste proceso está marcado por las vías de señalización sonic hedgehog (SHH) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). La comunicación entre estas células genera

Introducción

proliferación y diferenciación de la epidermis y anexos adyacentes a ella, no sólo por las señales epidérmicas descritas, sino también por señales dérmicas como la activina (Millar, 2002).

III.- Diferenciación: Una vez formado el germen piloso las vías de señalización que promueven la diferenciación celular se activan lo que permite el desarrollo de tres brotes o agrupaciones celulares. Uno de ellos da su lugar a las glándulas sudoríparas que, involucionan cuando el folículo piloso está completamente maduro para volver a ser funcionales en la pubertad, el segundo dará origen a las glándulas sebáceas y el tercero generará una estructura conocida como bulbo del folículo piloso, que tiene un importante papel en el proceso de reparación de heridas y homeostasis en la proliferación celular. (Wolff *et al.* 2009).

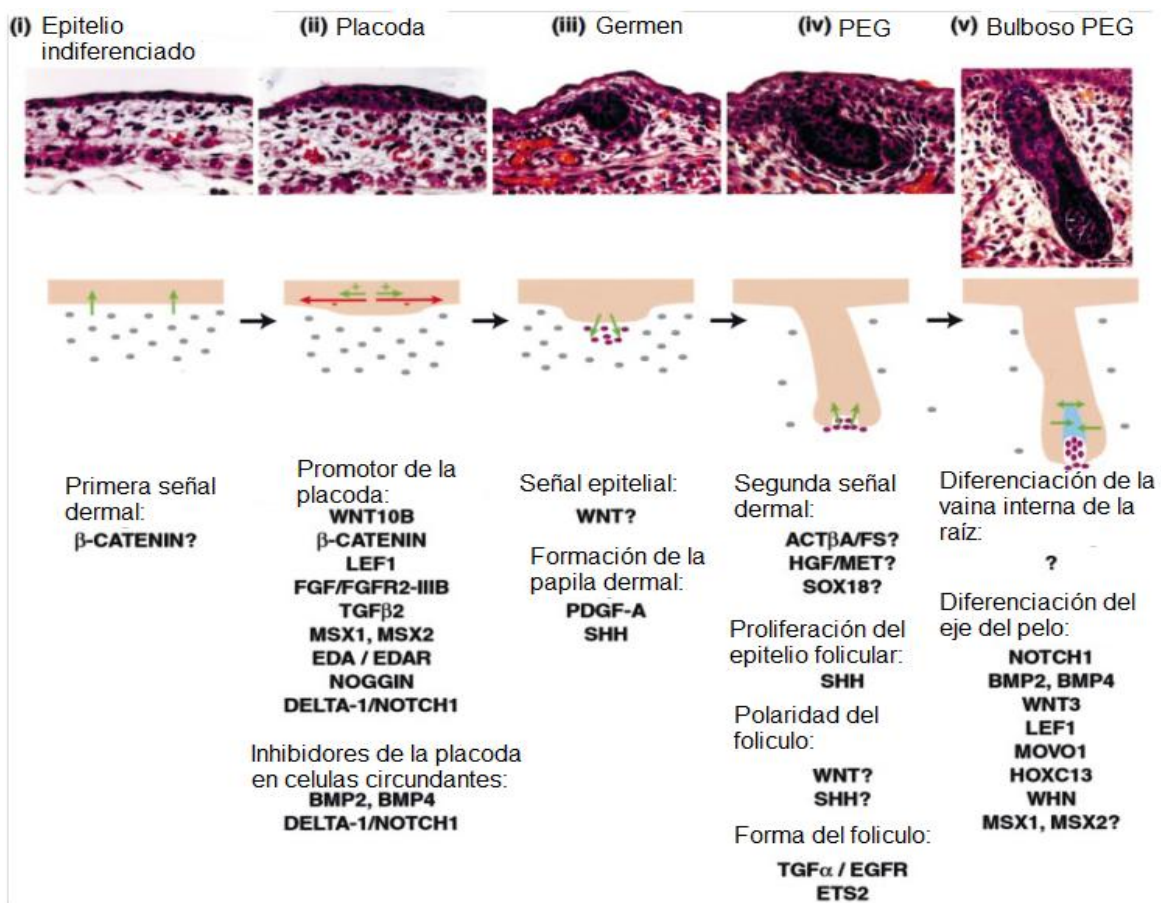


Figura 5.- Eventos de la morfogénesis folicular. Tomado de Millar, 2002.

Alrededor de la 19-21 semanas de edad gestacional (fig.6), el conducto piloso se ha formado completamente, siendo visible el pelo en el cuero cabelludo por encima de la superficie de la epidermis fetal, la que continuará alargándose hasta las semanas 24-28, momento en el que pasa de la fase de crecimiento activa (anageno) a la fase degenerativa (catageno) y finalmente la fase de reposo (telogeno), completándose así el primer ciclo piloso. Con los ciclos subsiguientes los pelos aumentarán su grosor.

Introducción

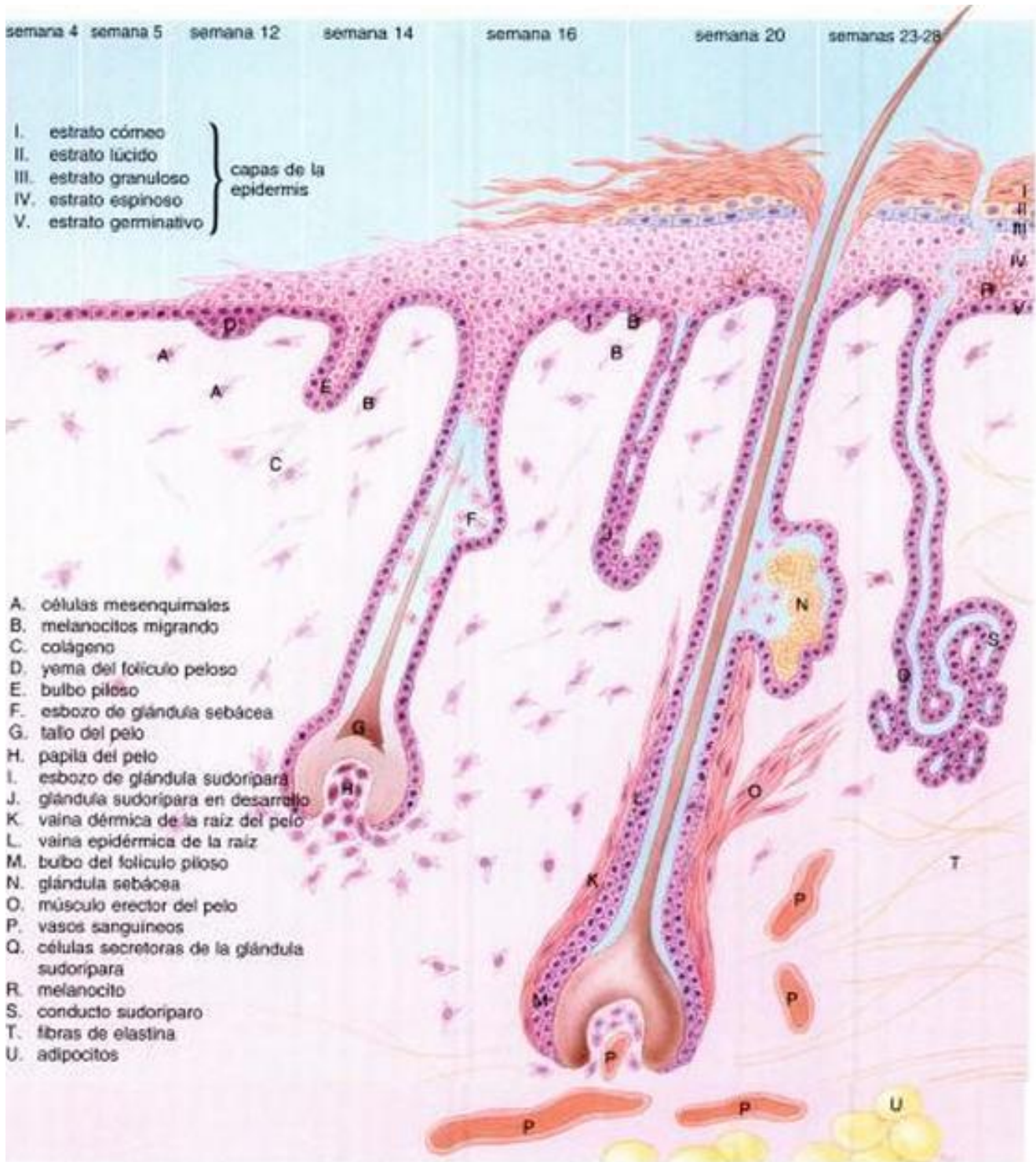


Figura 6.- Esquema que muestra el desarrollo de la piel, pelo, glándulas sebáceas y sudorípara en la edad gestacional estimada para humanos. (Moor, 1996)

4.- Señales involucradas en la embriología cutánea:

“Es importante conocer el proceso embrionario para poder entender el origen y, por ende, la base del tratamiento de algunas enfermedades cutáneas tales como las generadas por alteraciones ectodérmicas y para poder generar hipótesis causales de enfermedades de las cuales aún no conocemos su origen etiológico, pero que podrían tenerlo en alguna alteración embriológica.” (Ortíz, 2012)

Para que el desarrollo normal de la dermis y epidermis se lleve a cabo, se requiere de la expresión adecuada de factores que dirijan el desarrollo embrionario, como lo son: moléculas de activación, receptoras, adaptadoras e involucradas en apoptosis pertenecientes principalmente a 6 familias de proteínas altamente conservadas a través de la filogenia: 1) TGF- β , 2) FGF, 3) Proteína hedgehog (HH), 4) Familia de proteínas Wingless (WNT) (Jernvall y Thesleff, 2000), 5) Proteína Notch (Chen *et al.* 1997) 6) Factor de Necrosis Tumoral (TNF). Cabe mencionar que las señales activadoras de las diferentes proteínas trabajan de manera redundante, no sólo durante la organogénesis sino también durante los ciclos de crecimiento de los anexos ectodérmicos en tejidos adultos (Laurikkala, 2002).

4.1.- familia del Factor de crecimiento transformante β (familia TGF β):

La familia del TGF- β es una super familia de proteínas integrada por más de 35 miembros en las que se incluye a las activinas, inhibinas, proteínas morfogenéticas de hueso (BMP; Davis *et al.* 2000), hormona anti-Mülleriana, al TGF- β propiamente dicho y factores de crecimiento y diferenciación (GDFs), quienes regulan una gran cantidad de actividades biológicas como proliferación, migración y apoptosis en diferentes tipos celulares (Sako *et al.* 2010), tanto en el estado adulto como durante el desarrollo embrionario (Gálvez, 2004).

La activina es una proteína homo- ó heterodimérica, formada por dos péptidos homólogos beta-inhibina de cadenas estructuralmente relacionadas al TGF β . Las forma más comunes son activina A (β -A- β A), activina AB(β A- β B) y activina B (β B- β B). Están involucrados en la secreción de la hormona pituitaria, espermatogenesis, eritropoyesis, desarrollo embrionario y diferenciación neural (Schneider *et al.* 2000). Las activinas median sus efectos biológicos a través de receptores transmembranales de cinasas de serina/treonina que se unen a receptores de activina tipo II (ActRII o ActRIIB) y el receptor ActRIB. Subsecuentemente cuando se activa serina/treonina quinasa los receptores fosforilan proteínas SMAD y sus receptores SMAD modulan la expresión de una gran cantidad de genes involucrados en el desarrollo del mesodermo (Shimizu *et al.* 1998), Se ha identificado en estudios con ratones transgénicos deficientes de activina β A, que la proteína esta implicada en el desarrollo de la diferenciación folicular a través de SMAD 4 y 7 así como promotora del gen de la queratina 14 (K14) (Bamberger *et al.* 2005), lo que lo convierte en un importante regulador no solo de la morfogénesis sino también de la reparación de la piel.

Introducción

Las señalizaciones de BMP (2, 4, 7) participan en el control del desarrollo inicial para la diferenciación de queratinocitos en el folículo piloso y la epidermis (Kobielak *et al.* 2003). Mientras que en piel adulta, estas mismas señales llegan a formar parte importante en el ciclo, talla y color de los folículos pilosos. Por otra parte las BMPs también actúan como supresores tumorales en la piel, inhibiendo la formación tumoral tanto epidérmica como folicular (Ahmed, 2011).

4.2.- Factor de crecimiento de fibroblastos:

La familia del FGF se encuentra constituida por 22 polipeptidos en mamíferos, involucrados en la regulación de la migración, proliferación, diferenciación y supervivencia de distintos tipos celulares (Aman y Piotrowski, 2008; Kottakis *et al.* 2011; Thomas *et al.* 2004), estas proteínas trabajan mediante la participación de 4 receptores transmembranales con actividad tirosin quinasa, conocidos como Receptor de FGF 1 a 4 (FGFR) (Ornitz, 2001). Característicamente los distintos FGFRs tienen algunas variantes, lo que les permite reconocer selectivamente a los distintos miembros de la familia por ejemplo del FGFR2, únicamente la variante IIIb tiene alta afinidad por los FGF7, FGF10 y FGF22 (Zhang *et al.* 2006). quienes son altamente relevantes en la generación epidérmica y los anexos cutáneos como son los folículos pilosos, ya que existe un incremento de FGF7 y FGF10 en la papila dérmica. FGFR3 para el área suprabasal epidérmica (Yang *et al.* 2010)

FGF7, también conocido como factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) es producido por los fibroblastos y exhibe una potente actividad mitogénica para células epiteliales, no así para fibroblastos o células endoteliales (Powers, 2000).

4.3.- Proteína sonic hedgehog:

La familia Hedgehog (HH) está constituida por un pequeño grupo de proteínas implicadas en la morfogénesis de distintos tipos de tejidos y órganos. En mamíferos se han descritos 3 proteínas: (Sonic hedgehog, Desert hedgehog, and Indian hedgehog) (Varjosalo y Taipale, 2008). Cuando estas proteínas se unen al receptor proteico patched (PTCH1/PATCH ó PATCH2) se liberan proteínas *smoothened* (SMO) (Nybakken y Perrimon, 2002) que activan proteínas STK36 cinasas de serina / treonina que modularan a los miembros GLI y SUFU (Laurendeau *et al.* 2010) conduciendo a la activación transcripcional de los genes diana GLI-dependiente, tales como GLI1, PTCH1, CCND2, FOXL1, JAG2 y SFRP1 (Katho y Katho, 2006). Sonic hedgehog (SHH) ha sido reportado como un importante regulador de células madre en tejidos adultos (Ding *et al.* 2012). Por otro lado la expresión de GLI1 a partir de SHH en las células foliculares está implicada en la fase anágeno de crecimiento de pelo (Brownell *et al.* 2011) modulando de esta manera el ciclo folicular.

4.4.- Proteína WNT:

Las proteínas WNT son una familia muy conservada entre diversas especies y desempeñan papeles importantes en el desarrollo normal embrionario. En piel adulta regulan el balance entre proliferación, diferenciación y migración en poblaciones de células (Ouji 1 *et al.* 2006), como pueden ser las localizadas en folículos pilosos y glándulas sebáceas (Slavik *et al.* 2007). Se reportan más de 19 genes WNT para los humanos (Miller, 2001), estas proteínas actúan como ligandos para estimular vías de transducción de señal mediadas por receptores en organismos vertebrados e invertebrados. En la actualidad se conocen cuatro vías de señalización Wnt: 1) vía canónica o Wnt- β -catenina; 2) vía Wnt/Ca²⁺ que involucra a la proteína cinasa A, 3) vía de polaridad celular planar y 4) vía que involucra a la proteína cinasa C e interviene en el proceso de miogénesis. Algunas de las proteínas Wnt activan y modulan la vía canónica, la más importante y mejor estudiada vía de control y regulación citoplasmática relacionada con la proteína β -catenina (Ochoa *et al.* 2012). La activación de esta vía por Wnt10b en la piel es considerada crítica para que los queratinocitos formen folículos pilosos (Ouji 2 *et al.* 2006) ya que cuando se acumula β -catenina en el citoplasma, es translocada al núcleo, interaccionando con factores de transcripción de células T/linfoides y el factor potenciador TCF/LEF para regular la expresión de varios genes (Li *et al.* 2011) incluyendo c-myc, c-jun, fra-1, y ciclin D1 (Kikuchi *et al.* 2006) los cuales regulan la sobrevivencia y muerte celular.

4.5.- Proteína Notch:

La proteína Notch está altamente conservada a través de la evolución y está presente en muchos tipos celulares en varios estados del desarrollo como proliferación, diferenciación y apoptosis. Se han identificado 4 tipos de receptores Notch y 5 ligandos canónicos designados como *Delta-like* (DII-1, DII-3 y DII-4) o *serrate-like* (Jagged-1 y Jagged-2) (Andersson *et al.* 2011). La transcripción de Notch incluyen genes como Hes-1, Factor nuclear Kappa B (NF- κ B), ciclooxigenasa-2 (COX-2), factor de crecimiento endotelial vascular (VEFG) metaloproteinasa de matriz 9 (MMP-9), regulador extracelular quinasa (ERK), AKt, ciclin D1, C-myc, p21 cip1, p27 kip1, P53, entre otros. (Miele, 2006; Miele *et al.* 2006; Wang *et al.* 2008). Las señales de la proteína Notch juegan un importante papel en la regulación de la diferenciación epidérmica, ya sea como promotor de folículos pilosos, glándulas sebáceas, linajes epidérmicos interfoliculares y también se ha demostrado su actividad como un supresor tumoral a partir de los ligandos, receptores y efectores que son expresados en un complejo y dinámico patrón en piel embrionaria y adulta (Watt, 2008).

4.6.- Familia de Factor de Necrosis Tumoral (TNF):

La familia TNF de ligandos (TNFLs) y receptores (TNFRs) consiste en más de 35 pares de ligandos/receptores que influyen una variedad de vías de señalizaciones (Keystone y Ware, 2010), que incluyen: regulación del sistema inmune, apoptosis, permeabilidad endotelial, migración celular, procesos de división asimétrica de las células madre, factores de inflamación (Mathew, 2009), entre otros (Figura.7). A través de vías de

Introducción

señalizaciones TRAFs, las cuales son características de esta familia. Para la generación de apéndices cutáneos se han identificado 2 proteínas (EDA A1 y EDA A2) y 4 receptores: EDAR, XEDAR, TROY y RELT. Las dos últimas, no han sido muy bien caracterizadas, ya que no se sabe realmente cuál o cuáles son los ligandos que interactúan con estos receptores o si posiblemente sean variantes de EDA (Hymowitz,2003).

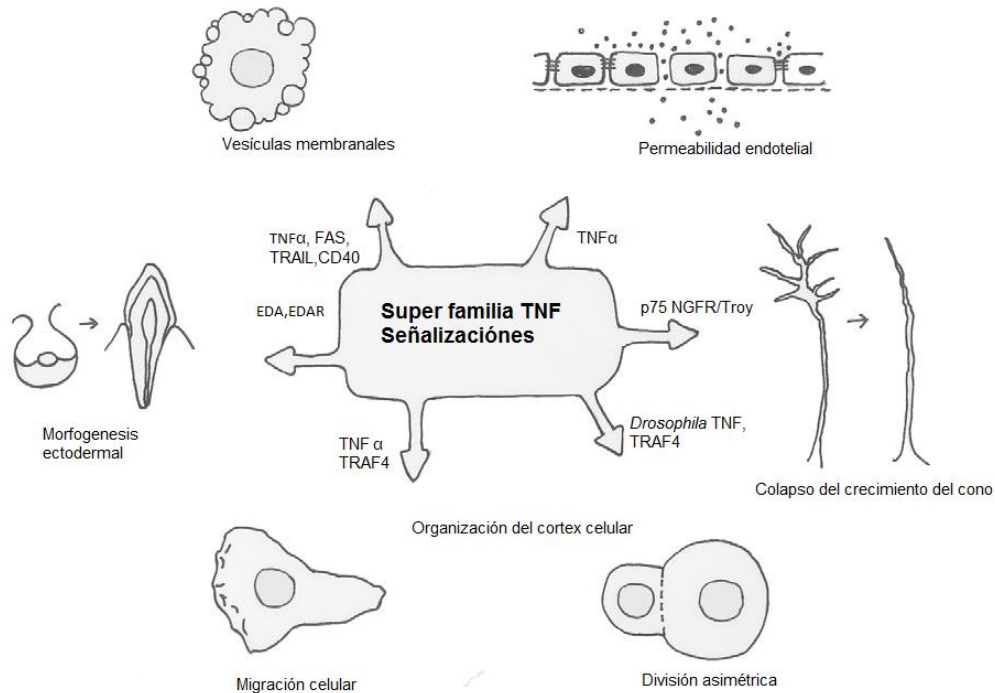
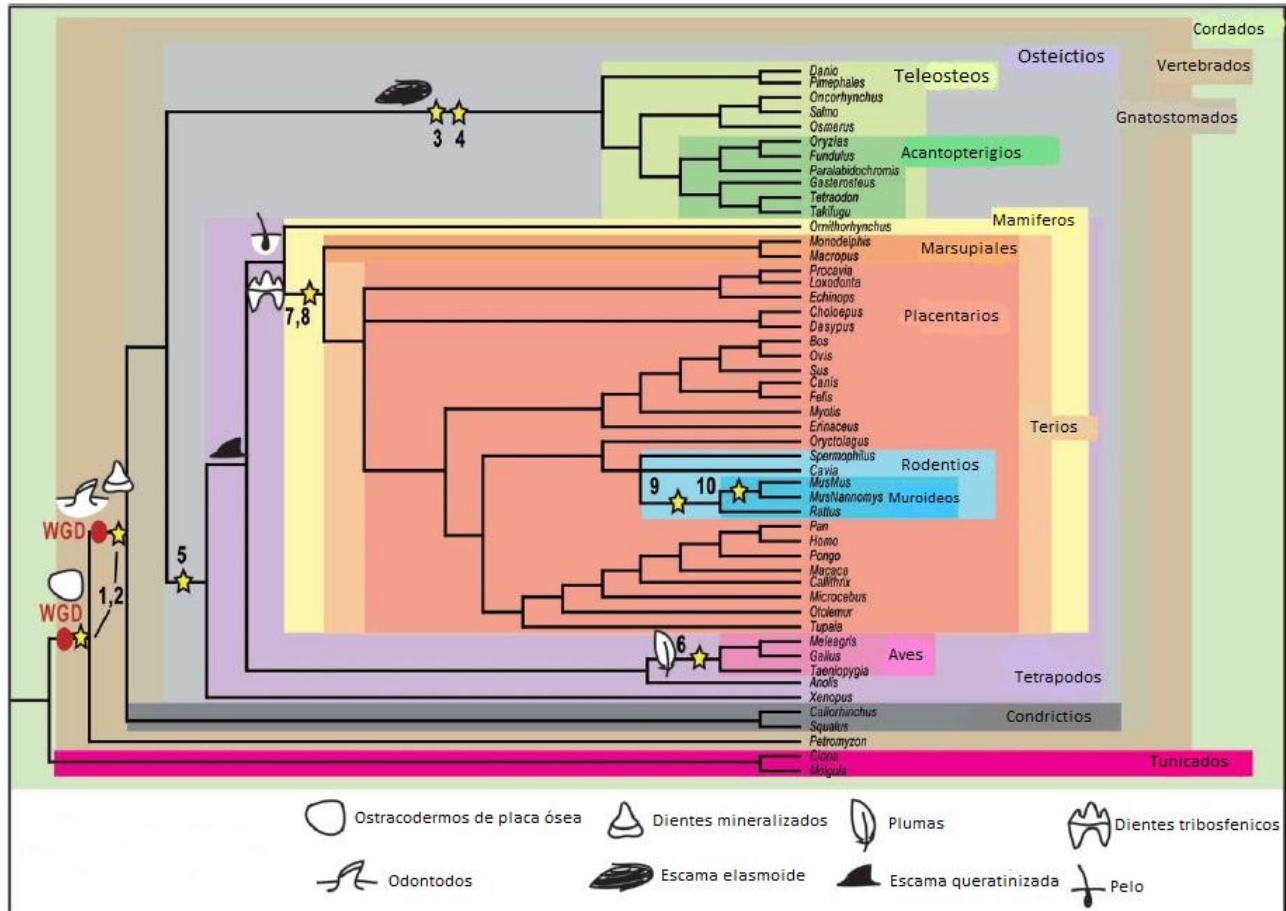


Figura 7.- Papel funcional de señalizaciones de TNF. Tomado de Mathew, 2009.

4.6.1.- Ectodisplasia

Las investigaciones realizadas durante las últimas dos décadas en mutaciones estructurales de los componentes en la vía de señalización ligando, receptor, factor de transcripción han demostrado que a pesar de la amplia diversidad morfológica, los organismos bilaterales utilizan pocas vías de señalizaciones en el desarrollo embrionario (Hedgehog, Wnt, TGFb, Notch, FGF, TNF) (Hoekstra y Coyne, 2007; Pires y Sommer, 2002). No obstante, pequeñas modificaciones en las vías de señalización han permitido el desarrollo de distintas estructuras a lo largo de la evolución (figura.8). Así la vía de señalización de la ectodisplasia está involucrada en el desarrollo temprano de la piel y sus apéndices en todos los vertebrados en la formación de escamas y dientes en los teleósteos, plumas en las aves, y en mamíferos el desarrollo de dientes, cabello así como las distintas glándulas (Pantalacci,2008).

Introducción



Características de vertebrados en común
1- EDA-A1/EDAR/EDARADD Cascada de señalización
2- EDA-A2 variante

Cambios evolutivos y especificidades de las especies
3- Pérdida/divergencia de XEDAR en peces teleosteos
4- Coevolución de EDA/EDAR/TROY en peces teleosteos
5- Otra isomorfa alternativa en tetrapodos
6- Ganancia de un dominio de muerte en XEDAR de aves
7- Cambio en la especificidad del receptor EDA-A2 en terios
8- Dos isomorfos alternativas EDARADD-A y B, conservada en terios
9- EDARADD-A se pierde en muroideos rodentios
10- Selección positiva en EDARADD en el linaje Mus

Figura 8.-Eventos de la evolución del gen EDA en cordados. Tomado de Pantalacci, 2008.

Debido a alteraciones o mutaciones genéticas en las proteínas de las vías de señalización de las proteínas ectodisplasina (EDA) así de la familia TNFR (TROY), existen distrofias ó displasias ectodérmicas, las cuales agrupan una gran variedad de desordenes patológicos y morfogénicos (Cui *et al.* 2006). Actualmente se han descrito más de 200 variedades (López *et al.* 2005) con afectación de dos o más estructuras/apéndices ectodérmicos (Ruggieri y Pascual 2008). Todas ellas comparten anomalías del cabello, dientes, uñas ó glándulas sudoríparas (figura. 9) (Priolo y Laganá 2001). Algunas otras estructuras que también pueden estar afectadas son: la glándula mamaria, la glándula tiroidea, el timo, la hipófisis anterior, la medula suprarrenal, las mucosas oral, nasal, rectal y genital, el sistema nervioso central, el sistema nervioso periférico, el oído externo, los melanocitos, el cristalino, la cornea, la conjuntiva y la glándula y conducto lacrimal (Alarcón *et al.* 2006). En ocasiones, por la compleja interacción que se tiene entre el ectodermo y mesodermo

Introducción

durante su desarrollo se ven afectados algunas estructuras mesodérmicas como los sistemas musculoesquelético y genitourinario (García *et al.* 2012).

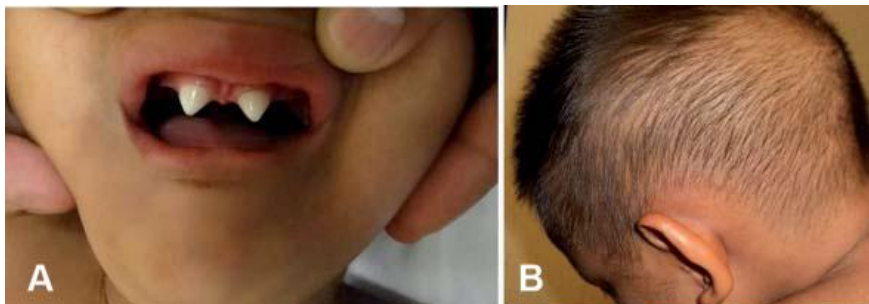


Figura 9.- la displasia ectodérmica hipohidrótica (DEH) como se observa en la figura A, hay anomalía en el desarrollo dental conocido como hipodontia (escaso desarrollo dental) y en ocasiones anodontia (sin desarrollo dental), en la figura B se aprecia un desarrollo “ralo” del cabello conocido como hipotricosis (Figura tomada de Salas *et al.* 2011).

La displasia ectodérmica hipohidrotica fue descrita por Thurnam en 1848 (papa, 2006) quien observó en dos pacientes un desarrollo imperfecto de la piel, folículos pilosos y dientes. Presentando anomalías como piel delicada que se irrita a la temperatura tanto solar como por ejercicio, no presentaban cejas, un desarrollo anormal de las pestañas y la presencia de solo 4 dientes (Thurnam, 1848). En 1913, Christ la catalogó como un defecto congénito del ectodermo, y en 1921 Siemens, vinculó el padecimiento a el cromosoma X a través del estudio de 19 familias, y Touraine, en 1936 describió las manifestaciones clínicas de la enfermedad de manera más amplia (Alarcón *et al.* 2006). Desde entonces se le conoce como síndrome de Christ-Siemens-Touraine o Displasia Ectodérmica Hipohidrótica (DEH) ligada al cromosoma X (DEHLX) correspondiendo al 80% de las displasias ectodérmicas, la mutación ocurre en el gen Xq12-q13.1, pero también se puede encontrar de forma autosómica dominante, o bien como resultado de una mutación en el receptor EDAR en el gen 2q11-q13; de forma autosomal recesiva, así también puede haber mutación en el receptor asociado al dominio de muerte EDARADD en el gen 1q42.42-q43; casos más raros de displasias son provocadas por la mutación en la proteína moduladora esencial de NFK-B (NEMO) en el gen Xq28, incontinencia pigmentaria². (Guillén *et al.* 2010; Mortier *et al.* 2004; Shimomura *et al.* 2004).

² También conocido como síndrome de Bloch-Sulzberger es un trastorno neuroectodérmico sistémico, caracterizado por lesiones cutáneas que evolucionan por etapas. En ocasiones, se asocia a compromiso oftalmológico, neurológico y odontológico. Es una genodermatosis muy rara, con unos 700 casos publicados en todo el mundo. Se presenta casi exclusivamente en mujeres. Casi todos los varones mueren intra-útero. Los casos comunicados en la bibliografía de pacientes masculinos que sobrevivieron presentaban cariotipo 47XXY. (González, 2011)

Introducción

Para el mejor entendimiento biológico de las displasias ectodérmicas y posibles soluciones a ellas, los científicos han generado modelos murinos con las mismas mutaciones presentes en la DEH en humanos (Figura.10).

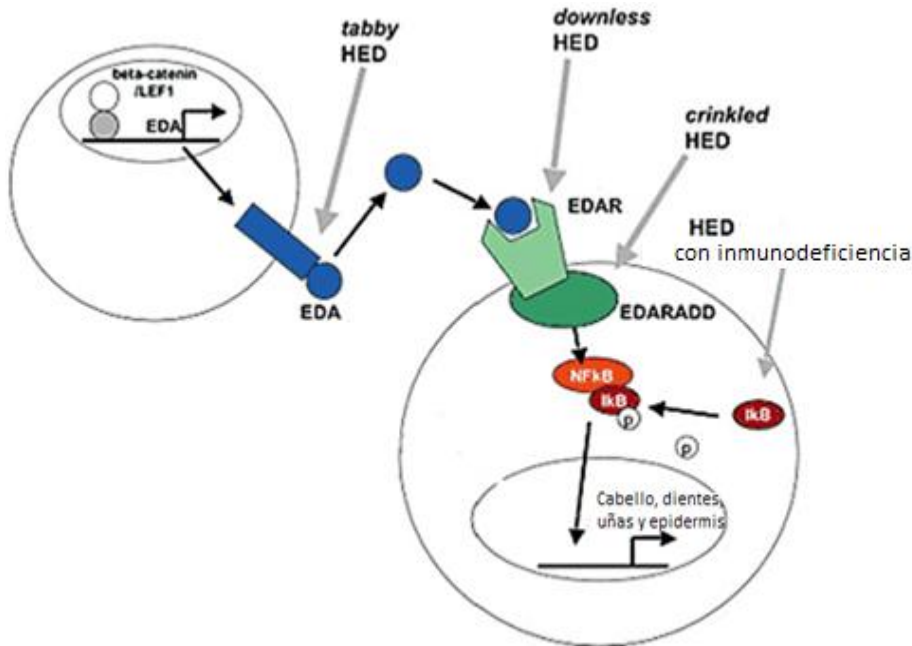


Figura 10.- Variaciones mutacionales en displasias hipohidroticas. El ratón *Tabby* tiene mutación en el gen *EDA*; el ratón *Downless*, tiene una mutación en el receptor *EDAR*; El ratón *Crinkled*, presenta la mutación en el dominio de muerte *EDARADD* y finalmente una mutación en el complejo $\text{I}\kappa\text{B}$. Tomado de O'shaughnessy y Christiano, 2004.

La ectodisplasia es una proteína transmembranal tipo II con un dominio de TNF (dominio de muerte) en el carboxilo terminal, su transcripción y las modificaciones postraduccionales pueden producir diferentes isoformas muy parecidas, para el año 2006 ya se habían reportan 9 isomorfos de EDA en ratón. Sin embargo, EDA-A1 y EDA-A2 comprenden el 80% del total de EDA (Hashimoto *et al.* 2006), considerándose como las isoformas biológicamente más activas. Entre ellas, difieren únicamente por la presencia de Glu308 y Val309 en la región del receptor de unión de EDA-A1 teniendo una mayor sólo por dos aminoácidos, los cuáles cumplen una función de switch controlando la especificidad del receptor (Figura.11). Por lo anterior EDA-A1 se une exclusivamente a su receptor EDAR, mientras que EDA-A2 a su receptor XEDAR. Dicha especificidad se debe a que la presencia de estos aminoácidos modifica la estructura tridimensional y electrostática del dominio de unión al receptor (Hymowitz *et al.* 2003).

Introducción

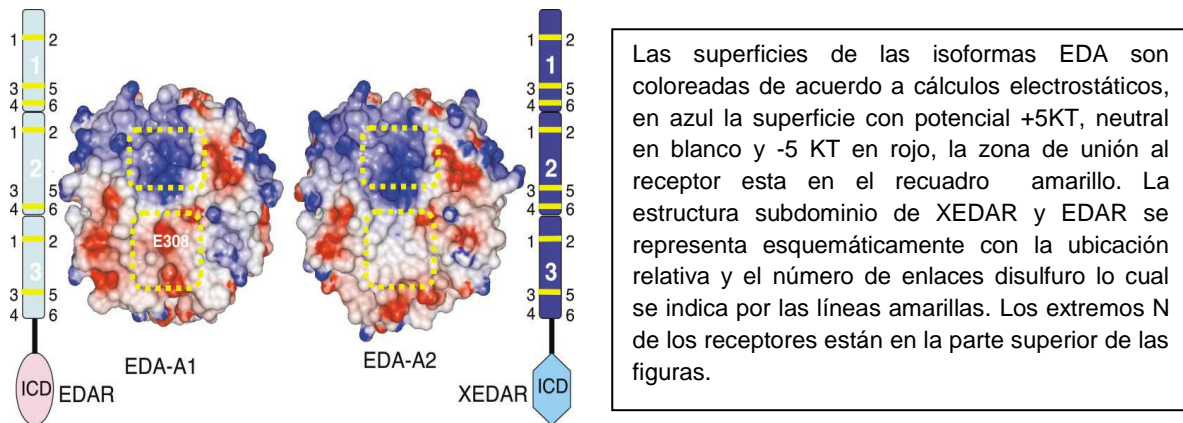


Figura.11.- superficie electrostática de EDA A1 (izquierda) y EDA A2 (derecha). Tomado de Hymowitz, 2003.

La señalización de EDA-A1 comprende el ligando de ectodisplasina, su receptor EDAR así como la participación de una proteína adaptadora del dominio de muerte EDARADD (Houghton *et al.* 2005) la cual le confiere la capacidad de utilizar distintas vías de señalización como TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF5 y TRAF6 mientras que XEDAR al no tener la proteína adaptadora sólo se puede activar por las vías TRAF3 y TRAF6 (figura.12).

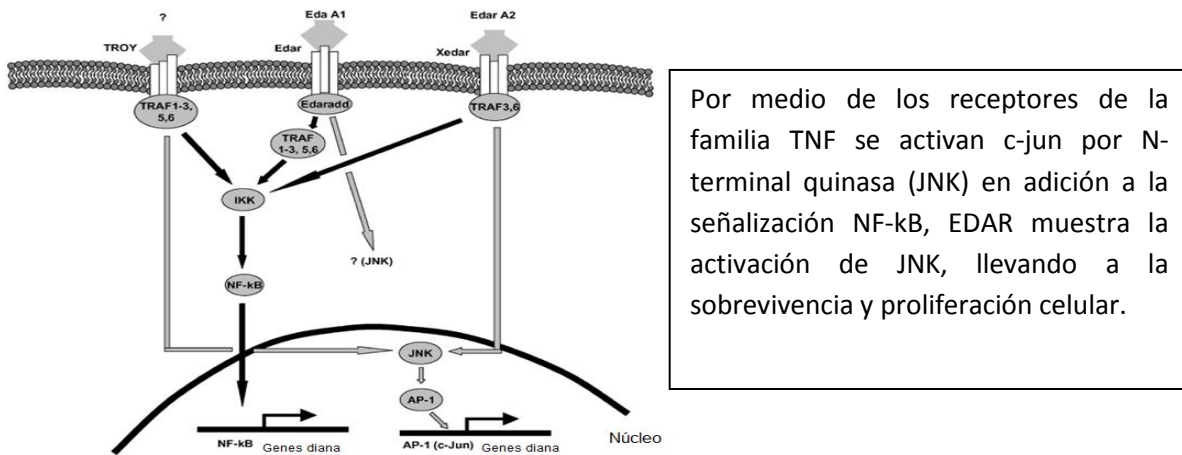


Figura.12.- Componentes moleculares de EDAR, Xedar y Troy, tomado de Botchkarev, 2005.

Cuando se lleva a cabo la interacción del ligando EDA con su receptor EDAR, se ve implicada también la transcripción del gen EDARADD el cual codifica para la proteína citoplasmática con el mismo nombre funcionando así como un adaptador de EDAR para activar el complejo proteínico IKK (constituido ya sea por NEMO e IKK1 ó IKK2) el cual tras la fosforilación del complejo IKB, inhibe la acción del inhibidor del factor nuclear kappa B (NF-KB). Permitiendo así su translocación al núcleo para iniciar la transcripción de numerosos genes implicados en el desarrollo de las estructuras ectodérmicas (Cammarata *et al.* 2007) y que con otras proteínas (figura 13) darán origen a la piel.

Introducción

Proteínas involucradas en la diferenciación y desarrollo de la piel

	EPIDERMIS	DERMIS/SUBCUTIS	UDE	APÉNDICES
Especificación	<ul style="list-style-type: none"> • BMP • Engrailed-1 • Aplasia del cutis 	<ul style="list-style-type: none"> • Lmx-1B (síndrome de uña-rótula) • Engrailed-1 • Wnt7a 	<ul style="list-style-type: none"> • Desconocida 	<ul style="list-style-type: none"> • Lmx-1B • Wnt7a • NGFR
Morfogénesis	<ul style="list-style-type: none"> • p63 • Dix-3 (síndrome trico-dentóseo) 	<ul style="list-style-type: none"> • Lamina A/C, ZMPE STE24 (dermatopatía restrictiva) • PTEN (síndrome de Proteus) • (Hipoplasia dérmica focal/síndrome de Goltz) 	<ul style="list-style-type: none"> • Laminina 1 • Colágeno IV • Sulfato de heparina • Proteoglicanos 	<ul style="list-style-type: none"> • Ectodisplasia A (EDA) (displasia ectodérmica hipohidróica ligada al cromosoma X) • Conexina 30 (displasia ectodérmica hipohidróica autosómica, tipo 2) • Receptor de la EDA (displasia ectodérmica hipohidróica autosómica, tipo 3) • MSX1 (síndrome de Witkop/síndrome de diente-uña) • c-kit (piebaldismo) • PAX-3 (Waardenburg tipo 1,3) • p63 (Hay-Wells/AEC, EEC) • Beta-catenina (pilomatricomas) • Shh • Wnt • BMP • FGF5 • LEF1 • Dix-3
Diferenciación	<ul style="list-style-type: none"> • Proteínas estructurales • K5, K14 (EA simple) • Plectina (EA con DM) • BPAG2 (EABAG) • α6β4 Integrina (EA con AP) • K1, K10 (EICA) • K1, K9 (Vornet, Unna-Thost, Greither) • Loricrina (EICNA, Vohwinkel, eritroqueratodermia simétrica progresiva) • Filagrina (ictiosis vulgar) • Modificadores postraduccionales • LEKT1 (Netherton) • Transglutaminasa 1 (ictiosis laminar, ICNA) • Fitanol CoA hidroxilasa (Refsum) • Aldehído graso deshidrogenasa (Sjögren-Larsson) • Esterol sulfatasa/arilsulfatasa C (ictiosis ligada al cromosoma X) • Proteínas transportadoras/canales • ABCA12 (leto arlequín) • Conexina 26 (síndrome QIS, queratodermia palmoplantar con sordera) • Conexina 30.3 o 31 (eritroqueratodermia variable, eritroqueratodermia simétrica progresiva) • SERCA2 (queratosis folicular) • ATP2C1 (enfermedad de Hailey-Hailey) • Proteínas de transducción de señales • Patched (síndrome del nevo de células basales) 	<ul style="list-style-type: none"> • Proteína de morfogénesis capilar 2 (fibromatosis hialina juvenil, hialinosis sistémica infantil) • Colágeno I, α1 o α2 (osteogénesis imperfecta) • Colágeno V, α1 o α2 (síndrome de Ehlers-Danlos) • Colágeno VII (EA distróica) • Fibrilina (síndrome de Marfan) • Elastina (cutis laxo) • MRP6 (SXE) • Tie-2 (malformaciones venosas hereditarias) • Endoglina, cinasa 1 semejante al receptor de la activina (THH/Osler-Weber-Rendu) • Receptor 3 del VEGF (linfedema hereditario tipo I) • MFH1 (linfedema hereditario tipo II) • Prox-1 • LYVE-1 	<ul style="list-style-type: none"> • BPAG2 • Colágeno VII • α6β4 Integrina • Laminina 5 (EA de la unión dermoepidérmica) 	<ul style="list-style-type: none"> • Pelos • BMP • Hoxc13 • Foxn1 • Placoglobina (enfermedad de Naxos) • Placofilina/banda desmosómica 6 (displasia ectodérmica, síndrome de fragilidad de la piel) • Hairless (atruquia papilar) • Uñas • K6a, K16 (paquioniquia congénita tipo I) • K6b, K17 (paquioniquia congénita tipo II, esteatocistoma múltiple) • Placofilina • Glándulas sebáceas • Bilmp-1 • K6b, K17

AEC = aniquiloblastarón-displasia ectodérmica-paladar y labios hendidos; AP = atresia pilórica; BMP = proteínas morfogenéticas del hueso; BPAG = antígeno del penfigoide ampolloso; DM = distrofia múltiple; EA = epidermólisis ampollar; EABAG = epidermólisis ampollar benigna atróica generalizada; EEC = ectrodactilia-displasia ectodérmica-paladar y labios hendidos; EICA = eritrodermia ictiosiforme congénita ampollar; EICNA = eritrodermia ictiosiforme congénita no ampollar; K = queratina; NGFR = receptor del factor de crecimiento nervioso; QIS = queratosis ictiosis-sordera; SXE = seudoxtantoma elástico; THH = telangiectasia hemorrágica hereditaria. Los nombres de las proteínas se indican en negrita. Las enfermedades asociadas/genodermatosis se enumeran entre paréntesis. Los nombres múltiples de una misma proteína o síndrome se separan mediante /. Los genes y las enfermedades asociadas pueden encontrarse en OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>.

Figura.13.- Señalizaciones proteicas implicadas en el desarrollo de la piel. Tomado de Wolff, 2009.

5.1.- Ingeniería de Tejidos.

El desarrollo de la biología celular y molecular, con sus grandes logros técnicos y científicos, han hecho posible que comience una nueva era de la medicina moderna. La ingeniería de tejidos (IT) está orientada hacia el desarrollo de sustitutos biológicos o equivalentes tisulares que permitan mantener, mejorar o restaurar las funciones normales de tejidos u órganos dañados (Fabres, 2010), afectados por enfermedades degenerativas o infecciosas así como accidentes y quemaduras (Velázquez *et al.* 2008). A partir de un pequeño fragmento de tejido se puede lograr esto, como lo ejemplifican los logros alcanzados con los cultivos de piel, córnea, cartílago, hueso, músculo, tejido nervioso, tejido glandular, entre otros (Arvelo, 2007).

El concepto de ingeniería de tejidos fue acuñado en la primavera de 1987 durante una reunión de la Fundación Nacional de Ciencias de Medicina Humana en Estados Unidos de America, aun cuando sus bases metodológicas como el cultivo celular, habían sido desarrolladas en décadas anteriores (Falke y Atala, 2000). La IT como todas las áreas nuevas del conocimiento, tiene numerosas fuentes de oportunidad y con futuro prometedor en el área de la medicina reconstructiva y la trasplantología, ya que precisamente éstas áreas de la medicina tiene su mayor debilidad en la baja disponibilidad de tejidos obtenidos por donación (Falke, 2001). La IT y la medicina regenerativa involucran la participación de tres actores: 1) las células, ya sea adultas y expandidas o diferenciadas en estirpes celulares *ad hoc*, 2) las sustancias bioactivas que modulen la actividad celular, como lo son los factores de crecimiento, citocinas e iones, y 3) los andamios tridimensionales que permitan una adecuada implantación, activación, proliferación o diferenciación celular, y que ofrezcan las condiciones biofísicas y mecánicas de los tejidos a sustituir, permitiendo su histointegración.

5.1.1.- Biomateriales:

Se denomina biomaterial a aquellos materiales sólidos, líquidos o geles, que por sus características físicas, químicas y mecánicas, pueden entrar en contacto con células y tejidos vivos, y que de manera normal no alteran o modifican negativamente las funciones de las células y tejidos con las que interactúan. Por ello, los biomateriales deben ser inocuos y fisiológicamente aceptables. A través de la historia podemos observar que la utilización de materiales en el campo de la Medicina para restaurar las funciones de tejidos dañados, se remonta en la utilización de productos naturales y ciertos metales en el antiguo Egipto, siendo los primeros en sustituir parcialmente la función del sistema musculoesquelético con prótesis de madera, de igual forma en las civilizaciones clásicas griega y romana (Lizarbe 2007). En la Edad Media, los hermanos Cosme y Damián reimplantaron la pierna de un moro a un cristiano (Caviglia *et al.* 2011). A lo largo del siglo XIX se elaboraron diversas aleaciones resistentes a la corrosión y durante el siglo XX se desarrollaron los polímeros como el hilo de las suturas capaces de ser degradados y absorbidos por el organismo.

Los biomateriales tienen la función de actuar como una matriz de soporte extracelular artificial, que reemplace a la natural ocupando los espacios carentes de tejidos y

Antecedentes

brindando al mismo tiempo un soporte tridimensional que permita no solamente que las células puedan migrar y adherirse, sino que también puedan activarse en términos de proliferación y diferenciación celular (Falke y Atala, 2000), siendo capaces de sintetizar nueva matriz extracelular y promover un proceso de reparación o regeneración. Al mismo tiempo los biomateriales deben permitir el transporte adecuado y entrega de los factores bioactivos necesarios para la activación celular (Fabres, 2010).

5.1.1.1- Tipos de biomateriales

El biomaterial en contacto con tejidos vivos debe ser biocompatible, es decir, no producir en ellos ningún tipo de alteración, no deben inducir toxicidad, ser estables químicamente, así como cumplir requerimientos bio-mecánicos (flexibilidad, resistencia, elasticidad, etc.) así como una facilidad de producción y procesamiento. De manera particular los biomateriales deben ser capaces de permitir el desarrollo, la proliferación y la diferenciación de las células cultivadas. Existe una gran diversidad de biomateriales y polímeros (Figura 14) entre ellos se incluyen: metales, cerámicas, vidrios, polímeros sintéticos de múltiples clases, polímeros naturales, tejidos biológicos modificados, etc. (Serrato, 2010).

Los metales han sido utilizados como biomateriales para reemplazar partes del cuerpo (articulaciones, placas craneales, etc.) o implantes utilizados en la estabilización y ayuda al proceso normal de reparación de un tejido como podrían ser en la unión de huesos rotos. Las cerámicas han tenido una utilización muy variada y principalmente en implantes óseos, proporcionando características positivas, como el ser químicamente inertes, no desencadenan respuestas no deseadas en el tejido implantado y no son susceptibles de ataque microbiano. Los polímeros sintéticos son muy variables, y las propiedades físicas y estabilidad química dependerán demasiado de la composición y del entrecruzamiento del mismo, por lo que se pueden hacer con las características específicas requeridas (Lizarbe 2007), dentro de los biomateriales orgánicos, desarrollados para aplicaciones de ingeniería de tejidos, se han utilizado diversos compuestos de origen tanto bacterial y vegetal como animal. Han sido utilizados polímeros derivados de componentes proteicos, glucoproteicos y de glucosaminoglucanos íntegros o fragmentados con relativo éxito en la construcción de andamios. La colágena es un ejemplo de aplicaciones muy diversas, ya que en forma de membranas o películas se utiliza como sustituto de cornea, en membranas para hemodiálisis, piel artificial y en reparación de hernias. En forma de esponja es utilizado en tratamientos de lesiones de piel, en la sustitución de hueso y cartílago, válvulas cardíacas y como agente hemostático.

Antecedentes

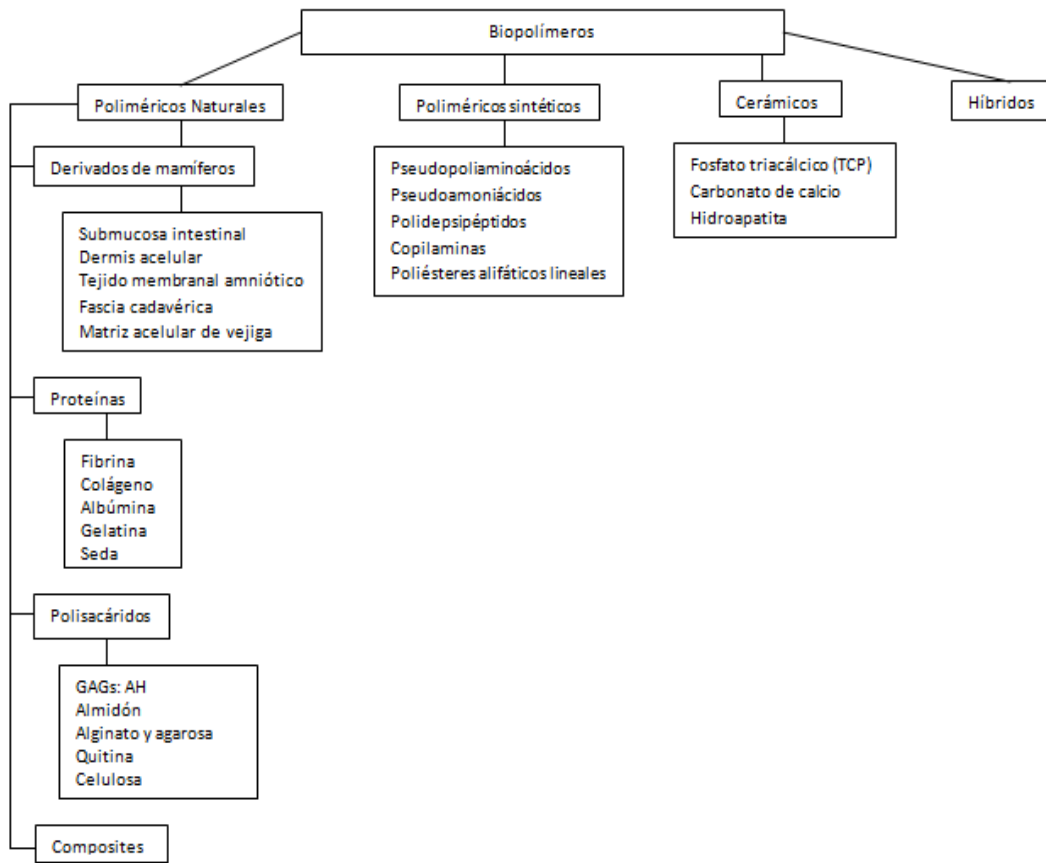


Figura.14.- Clasificación de los biopolímeros y algunos ejemplos.

5.1.1.1.1.- Fibrina como biomaterial:

La fibrina es una red proteica resultante de la polimerización del fibrinógeno presente en el plasma sanguíneo, y aun cuando no es un componente de la dermis, es la base natural necesaria para la reparación de las heridas, ya que además de actuar como hemostático en un primer momento, se convierte en segundo término en una matriz extra celular provisional necesaria para que las células inicien el proceso reparador (Arvelo, 2007). La fibrina puede ser obtenida de manera comercial, también puede ser obtenida mediante el plasma humano autólogo en una concentración de 6-12mg/ml y que a su vez proporciona factores de crecimiento como: factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), FGF, Factor de crecimiento epidérmico (EGF), y el factor de crecimiento transformante α (TNF α) (Currie *et al.* 2001).

5.2.- Ingeniería de tejidos de Piel:

Como ya se ha mencionado, la piel es un órgano de vital importancia, que cumple diferentes funciones biológicas. Sin embargo, existen diversas situaciones que alteran su estructura, integridad y función como por ejemplo, el cáncer, las quemaduras y las úlceras de distinta etiología que no sanan en periodos largos de tiempo (Mackay y Miraliakbari, 2006). Estas situaciones constituyen verdaderos problemas de salud pública a nivel mundial (Franco *et al.* 2006). En el caso de las quemaduras graves de 2o y 3er grado, las implicaciones clínicas y fisiológicas de los pacientes no solo involucran al sistema tegumentario, sino también complicaciones como deshidratación del paciente, en algunos casos hipotermia, hipoalbuminemia y la posibilidad de infección bacteriana (Pérez *et al.* 2006). Aproximadamente, el 1% de la población mundial sufre quemaduras cada año. De ellos, unos 9,000,000 de personas quedan incapacitadas debido a las secuelas (Montes *et al.* 2011). En México la Secretaría de Salud publicó en el año 2007 un registro de 109,479 casos de quemaduras, hasta el 2010 registraban 114 mil accidentes por quemaduras al año de los cuales el 80% corresponde a niños menores de 5 años y adultos mayores de 60 años con alguna discapacidad. La principal problemática que se genera en estas situaciones de quemaduras profundas es el cubrir grandes extensiones de lesión. Una técnica usualmente implementada para ello corresponde a los injertos de piel autóloga o también conocido como autoinjerto, que consiste en trasplantar piel de sitios sanos del mismo paciente hacia la zona dañada, ésta técnica fue introducida originalmente por Jaques-Louis Reverdin en 1871 (Horch *et al.* 2005), otra forma son a partir de aloinjertos que se clasifican en dos formas: 1) homoinjerto o piel homóloga alogénica, corresponde a un distinto genotipo de seres humanos. 2) heteroinjerto o piel heteróloga alogénica (xenogénica), correspondiente a otra especie no humana. En relación a los autoinjertos, la elección de una región donante en el paciente, constituye un riesgo para el mismo, además de ser insuficiente cuando la lesión es extensa (Amortegui y Ramírez, 2008), mientras que para los aloinjertos se encuentran susceptibles a un rechazo inmunológico por parte del paciente así como susceptibilidades a numerosas infecciones como hepatitis B y C o virus de inmunodeficiencia humana (VIH) entre otros. La IT trae ventajas como superar las limitaciones asociadas con el uso de autoinjertos inmediatos gracias a los avances tecnológicos en la fabricación de biomateriales y en el cultivo de células que han permitido la producción de sustitutos cutáneos (Arenas *et al.* 2012).

Dentro de los sustitutos cutáneos más utilizados para cubrir heridas se encuentran el AlloDerm®, que es una matriz proteica formada por dermis de donante desvitalizada mediante criopreservación y liofilización, destruyendo con ello la totalidad de las células del donador. Este sustituto no incluye la capa epidérmica, preservando la estructura tridimensional de la dermis y promoviendo una adecuada invasión de nuevos vasos sanguíneos para una adecuada revascularización; también preserva la estructura de la colágena, elastina y proteoglicanos permitiendo que las integrinas de los fibroblastos del paciente se ligen adecuadamente. Otro equivalente tisular es Apligraf® el cual está constituido por una lámina de colágena bovina tipo I en la que se han sembrado fibroblastos humanos alogénicos, los cuales producen activamente factores de

Antecedentes

crecimiento, la capa epidérmica está formada por queratinocitos humanos alogénicos, los cuales liberan factores de crecimiento epidérmico permitiendo una proliferación de los queratinocitos adyacentes y una posterior reepitelización de la herida.

Biobrane®, es un sustituto cutáneo utilizado para la reepitelización de grandes quemaduras de 2º grado, ésta malla se encuentra compuesta por una película de silicón sobre la que se han anclado una red de nylon embebida con fibrina y colágena tipo I, por lo que se adhiere fácilmente al tejido conjuntivo ofreciendo un soporte proteico para que los fibroblastos del paciente proliferen e induzcan un proceso de reparación y reepitelización. Gracias a la transparencia del silicón y a la presencia de pequeños poros en la membrana ofrece la ventaja de ser una ventana para el monitoreo de la reparación la herida al tiempo que permite vigilar posibles infecciones bacterianas. **Transcyte®**, además de la utilización de una malla de silicón y un soporte mecánico de nylon, incorpora el sembrado de fibroblastos neonatales, los cuáles después de un período de cultivo depositan sobre la malla de nylon numerosas proteínas de matriz extracelular, al igual que factores de crecimiento, posteriormente el equivalente tisular es desvitalizado por congelación, permitiendo de esta manera su aplicación sin riesgos inmunológicos. **Integra®**: está construido por 2 capas, una membrana externa de silicona y una capa profunda de colágena tipo I de origen bovino con glucosaminoglucanos, lo que permite que al ser aplicada sobre lesiones de gran tamaño controle la pérdida de agua por vaporización, al tiempo que permite una reparación del lecho conjuntivo.

Por otra parte, recientemente el cultivo de queratinocitos se ha mejorado notablemente, la técnica mas exitosa del desarrollo in vivo de células epiteliales (queratinocitos) fue elaborada por Rheinwald y colaboradores en 1975, quienes utilizaron queratinocitos humanos sembrados sobre una capa de fibroblastos embrionarios (3T3³), como células alimentadoras, denominada *feeder layer*, con el fin de estimular la proliferación de los queratinocitos. Posteriormente, y con la finalidad de eliminar a los fibroblastos murinos de los cultivos de queratinocitos humanos y poder utilizar las células en implantes se humanos se evaluó la utilización de células alimentadoras irradiadas letalmente o tratadas con mitomincina C. Finalmente en 1980 Banks-Shelegel y colaboradores llevaron al perfeccionamiento las técnicas haciendo posible la utilización de los tejidos obtenidos en el laboratorio a la práctica clínica (Arvelo, 2007).

Utilizando técnicas de cultivo de tejidos, las células epiteliales humanas (queratinocitos) pueden reproducirse *in vitro* en un periodo de 2 a 4 semanas, lo suficiente como para obtener una gran superficie de monocapas de queratinocitos a partir de un pequeño fragmento de piel y su superficie de cobertura puede expandirse 100 veces o más por ejemplo a partir de una biopsia de 1 x 1cm se puede generar 1m² de piel (Ramos *et al.* 2006). El auto injerto de queratinocitos cultivados ha sido utilizado con éxito para lograr cierre permanente de la herida en pacientes con grandes quemaduras, sin embargo, uno de los mayores problemas en la producción de equivalentes cutáneos, está relacionado con la fragilidad de las láminas de queratinocitos en ausencia del componente dérmico, lo

Antecedentes

que ocasiona dificultades para su aplicación e incorporación (Arango *et al.* 2009). Se han realizado esfuerzos para desarrollar equivalentes cutáneos con un componente dérmico, que soporte a las células basales de los queratinocitos, permita su proliferación, expansión, diferenciación y síntesis de la unión dermo-epidérmica tras el implante y funcione como una auténtica piel humana, diversas investigaciones se han enfocado en la utilización de: la fibrina, colágeno, proteoglicanos y glucosaminoglicanos como el condroitin-6-sulfato y el ácido hialurónico, incluso se han evaluado la utilización de matrices acelulares obtenidas de vejiga de cerdo (Butler *et al.* 1998).

En la última década numerosas investigaciones se han enfocado en la construcción de equivalentes dérmicos, que contengan elementos estructurales y celulares como los fibroblastos, que ofrezcan las señales moleculares adecuadas para el rápido crecimiento de los queratinocitos. Se ha demostrado que la utilización de éstos equivalentes producen factores de crecimiento similares a los secretados *in vivo* y que además sirven como reservorio para la infiltración de células inflamatorias y tejido de granulación en el sitio de la lesión, favoreciendo su cicatrización y cierre. (Ghalbzouri *et al.* 2008).

Las regulaciones actuales en buenas prácticas de laboratorio y sanitaria favorecen a los sistemas tisulares libres de células y productos animales, por lo que durante la última década se ha promovido el desarrollo de modelos libres de células alimentadoras murinas al igual que sistemas de cultivo libres de citocinas de origen animal, como el suero fetal bovino. De igual manera el cultivo de queratinocitos y fibroblastos para la generación de equivalentes cutáneos ha demostrado ser además un excelente modelo para el estudio de enfermedades cutáneas inflamatorias, así como para la valoración del efecto de medicamentos, estudio de citocinas (Bowers *et al.* 1999), factores de crecimiento (Noel *et al.* 1995), integrinas, receptores de fibronectina, efectos de la radiación ultravioleta (Brohem *et al.* 2010) y de otro tipo de radiaciones sobre la piel (Calderón *et al.* 2002).

5.3.- Investigación en Displasias Ectodérmicas Hipohidroticas:

Las displasias ectodérmicas hipohidroticas han despertado gran interés a la ciencia debido a las etiologías implicadas, dándose así a la tarea de encontrar soluciones a ellas estudiando las vías de señalización involucradas con la proteína ectodisplasina, la cual al estar implicada en la generación de los distintos anexos cutáneos, adquiere relevancia desde el punto de vista médico, odontológico, antropológico, veterinario y en otras ciencias biológicas.

Tuija Mustonen y cols., en el año 2004, realizaron una investigación en la que demostraron que la proteína ectodisplasina A1 promueve el destino placodal durante la morfogénesis temprana de los apéndices ectodérmicos. Ellos realizaron un modelo de proliferación en el que cruzaron ratones transgénicos que sobre expresan la proteína EDA-A1 acoplada al promotor de la queratina K14, tanto con ratones knock out para EDA-A1 como con ratones *wild type*, y para el día 14 de gestación se evaluó la presencia y tamaño de las placodas ectodérmicas, observando que la sobreexpresión de EDA A1 promueve una fusión de las placodas epidérmicas en algunas secciones debido al incremento en talla y número de las mismas. Por otra parte, al colocar en cultivo explantes

Antecedentes

de piel obtenida de embriones de ratones *Tabby* con una edad de E13, a los cuales se les administró EDA-A1 a diferentes dosis en un rango de 0.05 a 5 $\mu\text{g/ml}$ (figura.15), encontrando que después de 24 horas de cultivo se puede detectar la expresión de los genes *Shh* y β -catenina, en cúmulos celulares formando estructuras placodales, encontrando que bajas concentraciones de EDA-A1 [0.05 $\mu\text{g/ml}$] solamente rescatan de manera parcial el desarrollo de las placodas, mientras que a altas concentraciones [2 $\mu\text{g/ml}$] la magnitud del estímulo indujo un alargamiento y una posterior fusión de las placodas, impidiendo el desarrollo de los primordios, sin embargo a dosis medias entre [0.1 y 0.5 $\mu\text{g/ml}$] se observó un rescate placodal con un patrón morfológico similar al silvestre. Cabe señalar que en dichos embriones sujetos a altas concentraciones de EDA-A1 también se observaron resultados similares en placodas molares y de glándulas mamarias.

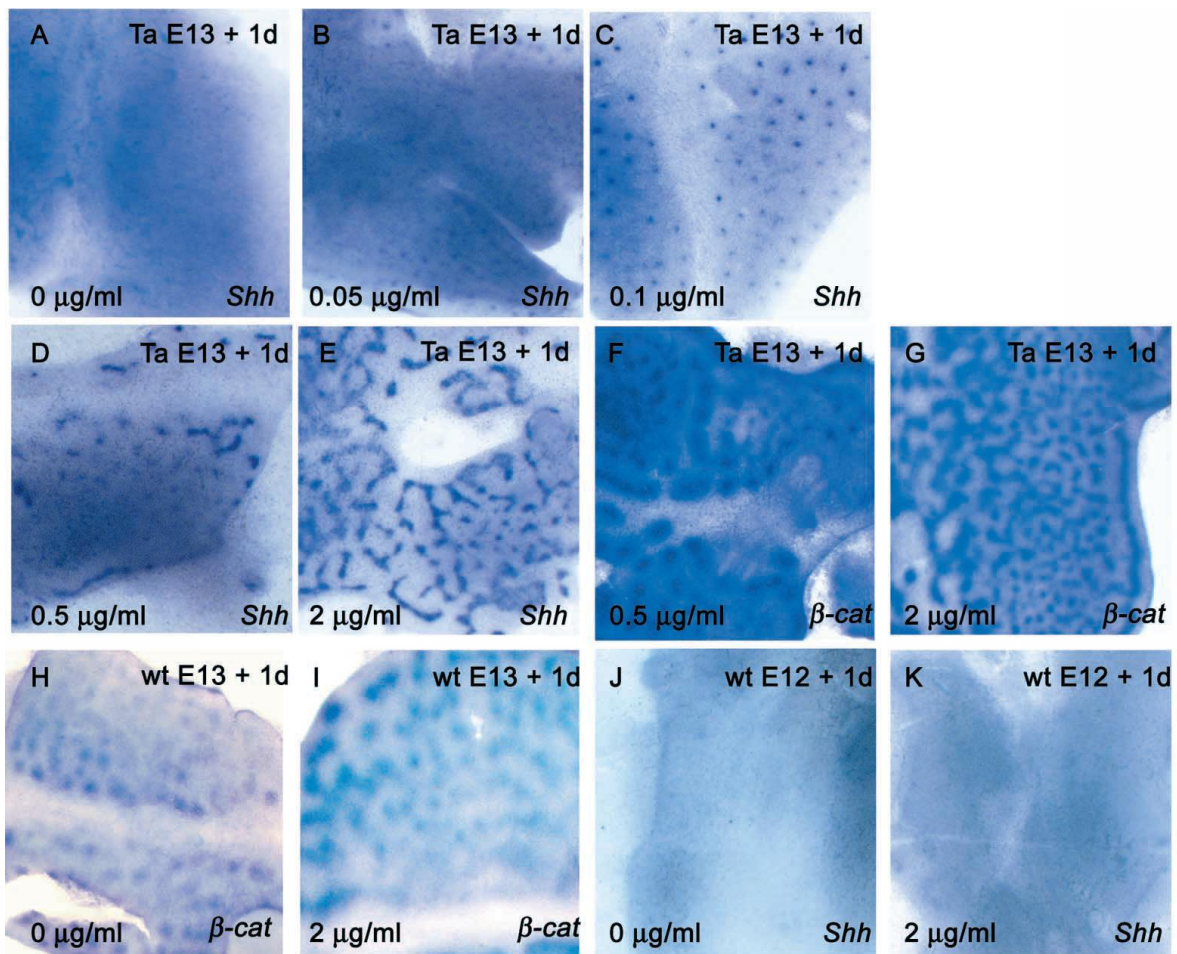


Figura.15.- Evaluación de la ectodisplasia a diferentes concentraciones en explantes de ratones *Tabby*. Tomado de Mustonen *et al.* 2004.

Antecedentes

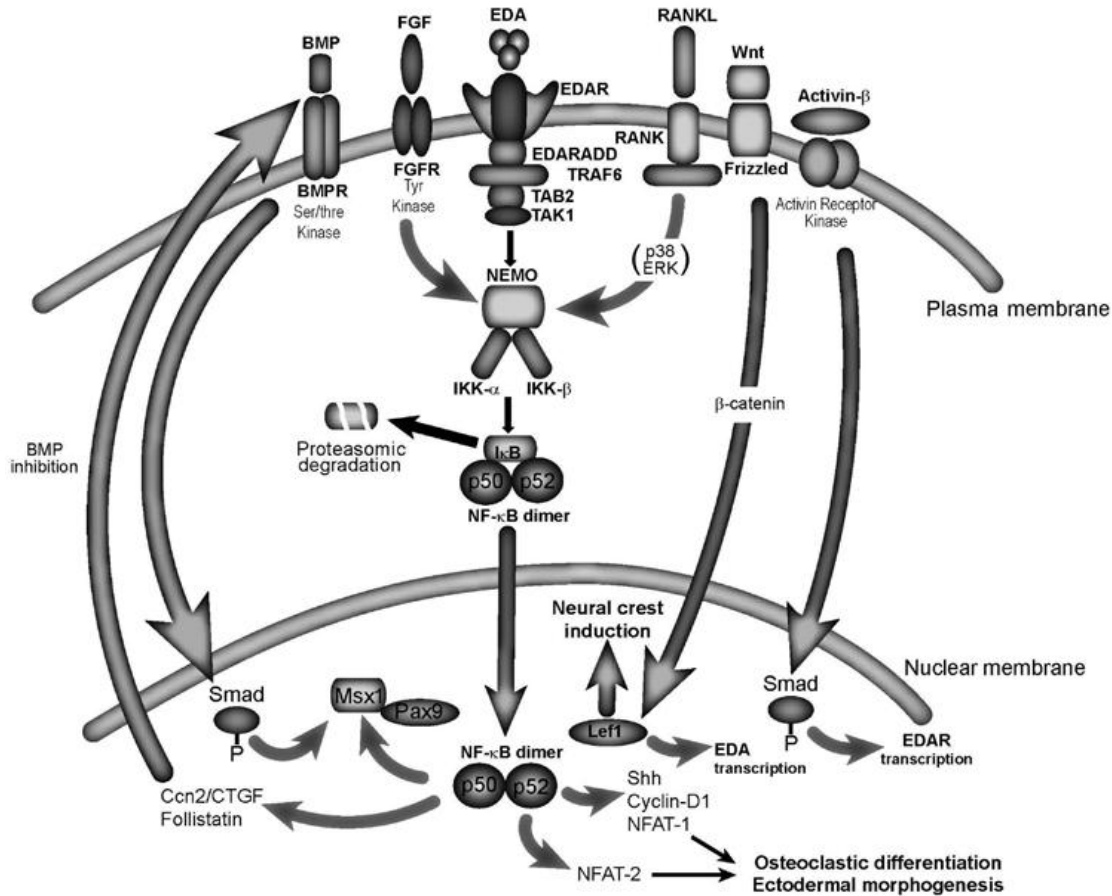


Figura.16 señalizaciones implicadas en la proteína ectodisplina A1. Tomado de Clauss *et al.* 2008.

De manera independiente, Clauss y cols., en el año 2008, propusieron un modelo de señalización para la producción de la proteína EDA-A1 y el receptor EDAR (Figura 16). En donde la proteína activina- β al ligarse a su receptor con actividad cinasa activa al factor de transcripción Smad el cuál induce la transcripción del receptor EDAR esta vía de señalización se ve fortalecida por la propia producción de EDA, la cual esta regulada por la producción de proteínas Wnt por parte de los fibroblastos del tejido mesenquimatoso, donde las proteínas Wnt6, Wnt3a, Wnt7a, Wnt10a y Wnt10b mediante la via de β -catenina estimulan al factor Lef1 para que se transcriba al gen *eda*. En este sentido cabe señalar que la proteína Wnt6 se expresa fuertemente en la piel embrionaria. Por otro lado Wnt6 Wnt3a, Wnt7a y Wnt10b se expresan fuertemente en la dermis embrionaria regulando el desarrollo de la papila folicular (Laurikkala, 2002). Al mismo tiempo la señalización de las proteínas Wnt induce la transcripción de la proteína Shh la cuál inhibe la actividad de las proteínas BMP (Pummila,2007) permitiendo que la proteína EDA al interactuar con su receptor EDAR estimule la activación de P50 y P52, donde la via de señalización de P50 tiene un destino epitelial pues produce el factor de crecimiento de tejido conjuntivo-Ccn2, folistatina que también inhiben a las proteínas BMP estimulando la producción de proteínas Smad para la producción de Msx1 y 2, así como Pax9, los cuáles están implicados en el desarrollo normal meso y ectodérmico, por su parte la vía de P52 conduce a la producción de NFAT2, Shh, Ciclina-D1 y NFAT-1, los cuáles además de

Antecedentes

estar implicados en la diferenciación osteoclastica participan en la morfogénesis ectodérmica.

Producción de la proteína Wnt10B a partir de Células cancerígenas de la línea celular MCF7:

En algunas patologías de estructuras glandulares distintas a las displasias ectodérmicas como el cáncer de mama, se ha observado que las proteínas de señalización involucradas en el desarrollo de los anexos ectodérmicos participan activamente en la progresión tumoral, en la línea celular MCF7 de cáncer de mama humano, se han estudiado de manera extensiva la presencia de diversos receptores y los distintos mecanismos de regulación hormonal. Interesantemente se ha demostrado que las células MCF7 cuentan con numerosos receptores para estradiol, el cuál al ligarse genera una cascada de señalización intracelular que resulta en la producción de la proteína Wnt10b, generando una señal redundante en cuanto a la proliferación celular (Sutherland, 1983, Han, 2003). Recientemente, se ha reportado que la administración exógena de estradiol a una concentración de $[1 \times 10^{-7} \text{M}]$ estimula la producción de la proteína Wnt10b (Kirikoshi, 2002).

Recientemente en nuestro grupo de trabajo demostramos que la administración exógena de la proteína activina A tanto en cultivos de queratinocitos humanos neonatales (SCCE020 Millipore) como en cultivos de queratinocitos humanos adultos obtenidos de biopsias piel normal, modula positivamente el índice de proliferación de queratinocitos que expresan al receptor EDAR en su superficie (Fig.17), de una manera dosis dependiente, la cual se estabiliza en un rango de concentración de $[100 - 200 \text{ ng/ml}]$.

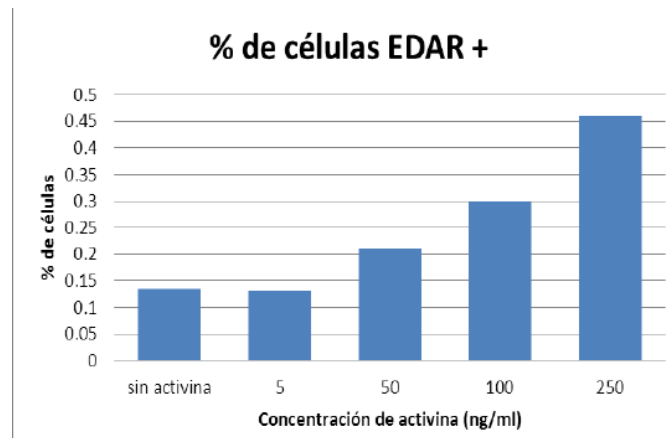


Figura.17.- Gráfica porcentual de la expresión de proliferación de queratinocitos dosis respuesta en relación a la activina A. (Tomado de Vázquez, 2011)

6.- Justificación

La incidencia y prevalencia de casos de pacientes con afecciones que requieran del implante de grandes extensiones de piel, por quemaduras o úlceras ha mantenido durante los últimos años una tendencia a la alza, lo que compromete el tratamiento de dichas personas si se agrega la escasa cultura de la donación así como el bajo desarrollo de bancos de piel y unidades de ingeniería de tejidos.

En este sentido, la ingeniería de tejidos en el área de lesiones cutáneas se ha enfocado al desarrollo de equivalentes tisulares cutáneos, dérmicos, epidérmicos y compuestos, sin embargo la mayoría de los modelos existentes promueven ya sea la reepitelización o bien la integración del implante, sin embargo, al no contar con el componente pigmentario (melanocitos), sensitivo (células de Merkel), así como los anexos dérmicos, folículos pilosos y glándulas sudoríparas y sebáceas, no restituyen las funciones de estos elementos, por lo que el presente estudio constituye parte de un proyecto que tiene como finalidad generar un equivalente cutáneo que cuente con anexos ectodérmicos, por lo que es necesario implementar las condiciones de cultivo que nos permitan evaluar el comportamiento *in vitro* de los mecanismos de señalización intra celular de la proteína Ectodisplasina A1 y las proteína Wnt10b en el desarrollo de los anexos ectodérmicos a partir de queratinocitos sembrados en equivalentes cutáneos.

7.- Hipótesis:

Si se coloca un cultivo de queratinocitos basales humanos, en los que previamente se ha enriquecido la población EDAR+ sobre una base dérmica constituida por fibroblastos inmersos en una red tridimensional de fibrina, entonces al administrarles de manera exógena la proteína ectodisplasina A1, se observará en el equivalente cutáneo un incremento en la proliferación de la población de queratinocitos EDAR+ y la correspondiente formación de cúmulos celulares de queratinocitos EDAR+.

Objetivos

8.- Objetivo General:

Evaluar sí la administración exógena de ectodisplasia A1 induce un incremento en la proliferación de los queratinocitos humanos EDAR+, sembrados sobre un equivalente cutáneo con base dérmica de fibrina.

8.1 Objetivos particulares:

- Evaluar el fenotipo de los queratinocitos humanos cultivados en el equivalente cutáneo, mediante la detección inmunohistoquímica de la expresión del receptor de ectodisplasia (EDAR) y la expresión de la citoqueratina (K5).
- Evaluar la variación en la tasa de proliferación de los queratinocitos humanos cultivados en el equivalente cutáneo después de la administración de EDA.

9.- MATERIAL BIOLÓGICO.

TEJIDOS Y CÉLULAS

9.1 Colecta de Tejidos

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron queratinocitos humanos adultos obtenidos de biopsias de piel normal con tamaño de aproximadamente 1 cm² provenientes de restos quirúrgicos no utilizables de los servicios de cirugía plástica del Hospital General de México, SSA y de la Unidad de Quemados del Hospital Infantil de Tacubaya SSaDF, la toma de las biopsias se realizó mediante el consentimiento informado de los pacientes donadores, de acuerdo al proyecto de investigación PAAPIT IN-213510 y FM-BCyT/005-2013 del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina de la UNAM.

La colecta de los especímenes de piel se realizó bajo condiciones de esterilidad en quirófano y después de un adecuado procedimiento de asepsia y antisepsia, en cada ocasión se disecó el fragmento de piel, el cuál fue colocado en un tubo Falcón de 50 ml con medio de transporte (medio de cultivo suplementado con antibióticos y antimicóticos), el tubo fue inmediatamente sellado y enviado en refrigeración al Laboratorio de Inmunoterapia Experimental e Ingeniería de Tejidos del Departamento de Biología Celular de la Facultad de Medicina de la UNAM para su procesamiento.

9.2.- Aislamiento y Cultivo de Queratinocitos y fibroblastos

En ambiente estéril dentro de una campana de flujo laminar, la muestra fue procesada (figura.18) y con instrumental estéril fue transferida a un tubo nuevo donde se realizó un ciclo de lavados con alcohol al 70% durante 30 segundos y 4 lavados posteriores con solución salina balanceada de Hanks (HBSS) estéril, posteriormente el fragmento de piel fue transferido a una placa de cultivo estéril de 10 cm de diámetro, donde con ayuda de una navaja de bisturí y pinzas finas curvas se retiró el exceso de tejido adiposo subcutáneo procurando evitar que el tejido se seque, finalmente se fragmentó la biopsia de piel en especímenes de aproximadamente 1 mm² los cuales fueron transferidos e incubados durante 18 hrs, a 4 °C, colocados en flotación con la cara dérmica hacia abajo en una nueva placa de cultivo con 10 ml de medio DMEM, suplementado con Dispasa [1mg/ml], y EDTA [0.5mM], posteriormente la placa de cultivo fue transferida a la incubadora donde se mantuvo a una temperatura de 37 °C y atmósfera de CO₂ al 5% durante 1hr, posteriormente y con la ayuda de pinzas curvas finas se separaron las láminas epidérmicas mismas que fueron transferidas a un tubo Falcón con 5 ml de medio DMEM suplementado con tripsina [0.05%] donde fueron incubados en un baño maría con agitación a 37 °C durante 1hr, posteriormente se colectó el sobrenadante y se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se retiró y fue adicionado con enzima fresca y posteriormente se regresó al tubo con las láminas epidérmicas, el botón celular fue transferido a un tubo nuevo y se mantuvo en refrigeración, se repitió el mismo proceso por 3 ciclos de digestión enzimática, acumulando a los queratinocitos obtenidos en cada ronda del ciclo, finalmente los queratinocitos fueron sembrados en botellas de cultivo de 25cm² con medio específico para queratinocitos EPIGRO (Millipore) y mantenidos durante al menos 10 días en expansión hasta obtener una monocapa.

Material y Método

Por otra parte las láminas dérmicas fueron lavadas 3 veces con solución HBSS y posteriormente transferidas a tubos nuevos conteniendo 10ml medio DMEM suplementado con colagenasa-I [2mg/ml] y mantenidas en incubación en baño maría con agitación a 37 °C durante 2 hrs., posteriormente la suspensión celular fue colectada y filtrada con una mala de nylon de 200 micras para retirar detritos tisulares y centrifugada a 1200 rpm durante 10min, finalmente el sobrenadante fue desechado y el botón celular se resuspendió y fue sembrado en botellas de 25cm² y mantenidas en cultivo a 37 °C y atmosfera de CO₂ 5% hasta su expansión.

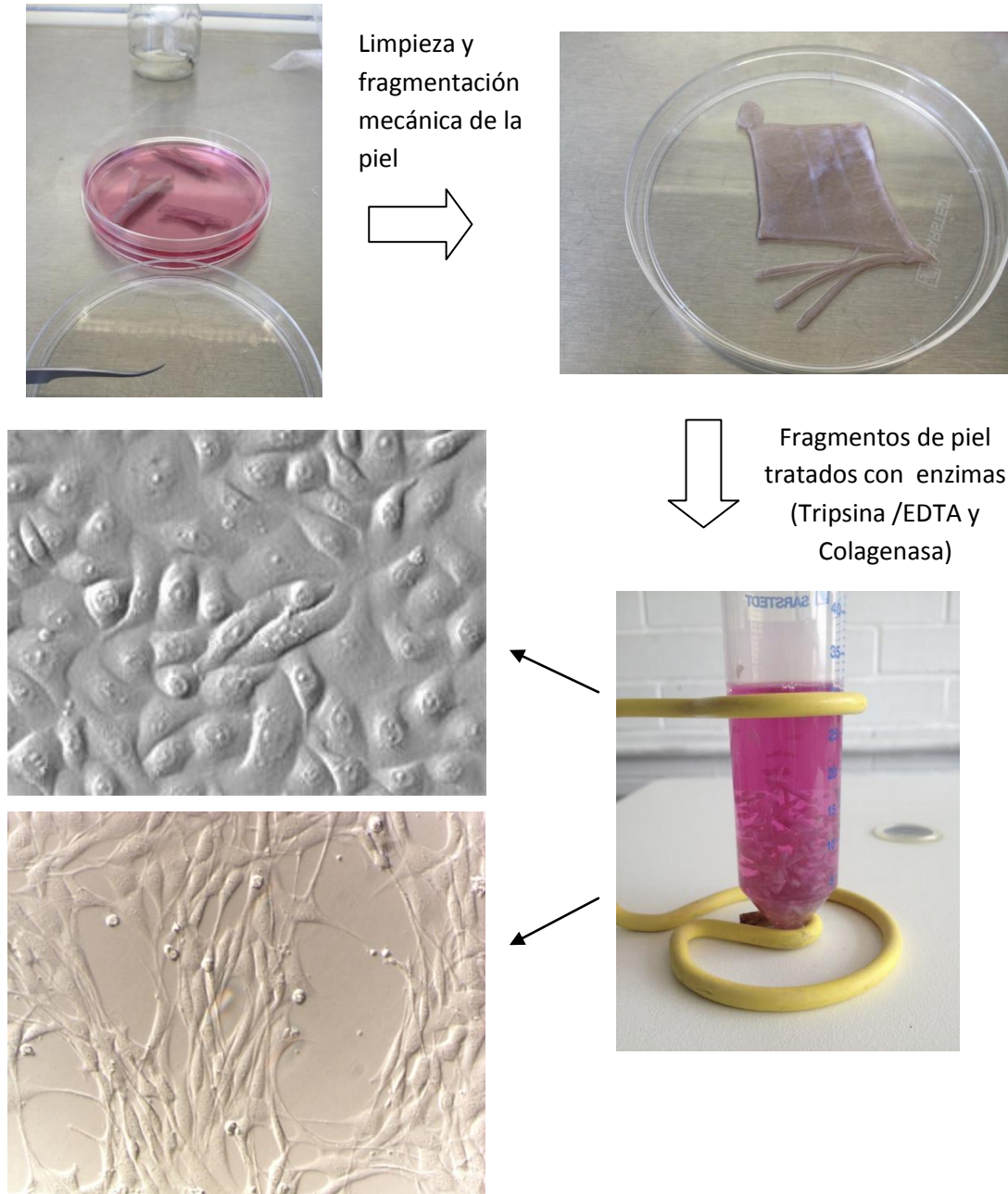


Figura 18.- Ilustraciones en la obtención de las células. A) Piel dispuesta en una caja Petri. B) Fragmentación mecánica de la piel. C) Digestión enzimática para la obtención de las células, imagen superior correspondiente a queratinocitos y la inferior a los fibroblastos.

9.3.- Línea celular MCF7

Una alícuota de la línea celular de cáncer de mama (figura 19), se expandió mediante cultivo en medio DMEM suplementado con aminoácidos no esenciales, SFB al 10% y antibióticos antimicóticos, a 37 °C a CO₂ al 5% una vez que las células alcanzaron una confluencia de aproximadamente el 80% el medio de cultivo fue sustituido por un medio suplementado con 17β-estradiol [1X10⁻⁷ M] libre de SFB, y se dejó incubar durante 72 hrs., al término de este período se colectó el sobrenadante el cuál fue centrifugado a 1200 rpm y filtrado con una malla de PVDF con poro de 0.2µm, finalmente el sobrenadante se alicuoteó y congeló hasta su utilización.

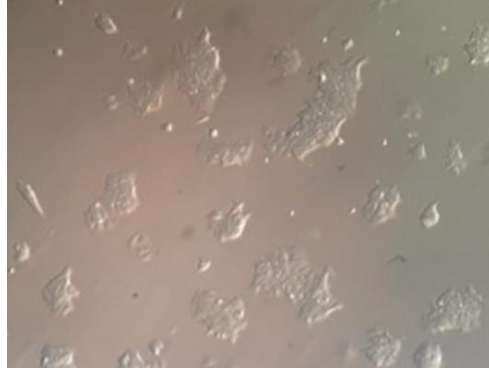


Figura 19.- Cultivo de células de la línea celular MCF7 (cáncer de mama) a 4 días de ser sembradas.

9.4.- Equivalente cutáneo

Se generó un equivalente cutáneo (Fig.20) conformado por una capa epidérmica y una dérmica, los elementos celulares de ambas capas (queratinocitos y fibroblastos) fueron obtenidos mediante la previa expansión celular de las células obtenidas de la biopsia. La base de hidrogel de la dermis se construye con plasma sanguíneo anti coagulado con citrato de sodio, el cual se suplementa con ácido tranexámico y fibroblastos, posteriormente se le adiciona cloruro de calcio para restaurar la cascada de coagulación y se coloca en incubación a 37 °C durante 60 minutos, una vez que gelifica se cubre con suficiente medio de cultivo permitiendo que difunda al interior del andamio, 18 hrs después se sembró la suspensión de queratinocitos y se dejó en medio de crecimiento de queratinocitos permitiendo que proliferaran.

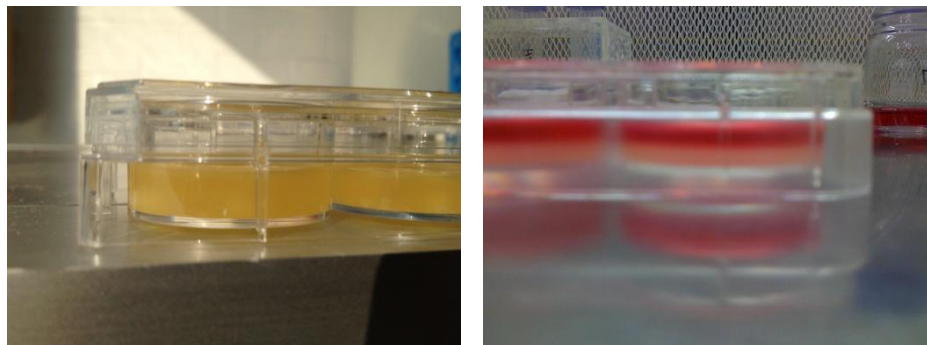


Figura 20.- lado izquierdo se aprecia el andamio de fibrina polimerizado, y en la figura de la derecha cuando se suplementa con DMEM para nutrir a los fibroblastos contenidos en el andamio.

9.5.- Estimulación de queratinocitos

Sobre los equivalentes cutáneos (fibrina+fibroblastos+queratinocitos) se cultivaron con el medio de cultivo basal del experimento (EPIGRO/activina [200µg/ml]) y se dejó en cultivo durante 55 hrs permitiendo que se indujera la expresión de la proteína EDAR, posterior a esta incubación se sustituyó el medio de cultivo, por medio fresco suplementado con el sobrenadante de células MCF7 al 10 y 20 % (suplemento de Wnt10b), finalmente 55 hrs después se les sustituyó el medio por medio de crecimiento (Activina+EDA), cabe señalar que aquellos cultivos que no les correspondía la suplementación proteica se quedaban con el medio basal. Posteriormente los cultivos fueron terminados fijándolos dentro de la placa de cultivo durante 2 semanas en solución fijadora de Zamboni. Los tejidos de cada uno de los bloques fueron retirados de la solución de Zamboni y se procesaron mediante técnica histología convencional de parafina (Figura 21). Conformando los cultivos y tres repeticiones de los siguientes grupos experimentales:

- (1) Medio basal (Epigro + Act A)
- (2) Medio basal + Ectodisplasia
- (3) Medio basal + Wnt10b 20%
- (4) Medio basal + EDA + sobrenadante MCF710%
- (5) Medio basal + EDA + Sobrenadante MCF7 20%



Figura 21.- imágenes que muestran la implementación de esponjas para llevar los sustitutos cutáneos al procesamiento de parafinación, el cual se puede apreciar el resultado en la imagen extrema derecha.

9.6.- Evaluación de la expresión de EDA, K5 y pCNA.

De los especímenes de cada grupo experimental, con la finalidad de evaluar la distribución celular en toda la superficie del cultivo se utilizaron dos estrategias de cuantificación. La primera se obtuvieron 12 cortes seriados de 7 micras cada 200 micras., y el segundo cortes estrictamente seriados de 7 μ m, mismos que fueron colocados por triplicado en portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina, los cuáles fueron almacenados hasta su utilización y procesamiento por inmunohistoquímica dirigida contra las proteínas K5, EDAR y pCNA. Las laminillas procesadas contra K5 y EDAR al ser antígenos citoplásmicos se contratiñeron con hematoxilina, mientras que en el grupo de laminillas procesadas contra pCNA al ser un antígeno nuclear fueron contrateñidas con eosina o verde luz.

De cada laminilla histológica se fotografiaron 10 campos a un aumento de 100X y las imágenes fueron digitalizadas mediante el software NIS-ELEMENTS-F utilizando un microscopio Nikon Eclipse 80i, teniendo un total de 300 imágenes digitales. A cada una de ellas se les analizó la densidad óptica de la marca de inmunohistoquímica mediante el software de análisis Image-Pro Premier (media Cybernetics) y el análisis estadístico de los resultados fue realizado con el software GraphPad Prism 6, cabe señalar que se incluyeron en el estudio como controles positivos a cortes histológicos de piel humana normal para evidenciar la expresión de K5 y EDAR.



Figura.22.- Imagen del microscopio Nikon Eclipse 80i y la computadora donde fueron procesados las imágenes de las inmunohistoquímicas.

10.- Resultados

10.1.- Construcción del equivalente cutáneo

Para el desarrollo del equivalente cutáneo utilizado en el presente estudio, se realizaron cultivos tanto de queratinocitos humanos adultos como de fibroblastos, ambos obtenidos de biopsias de piel sana colectada de restos de procedimientos quirúrgicos, las poblaciones celulares se mantuvieron en cultivo durante al menos 10 días para su establecimiento y otro periodo en cultivo de 10 días más, necesario para su expansión y poder conseguir el número de células necesario para la construcción de los equivalentes. En la figura 23 se observa un cultivo incipiente de queratinocitos y uno ya expandido, donde se observa el cambio en la morfología de las células conforme al paso del tiempo.

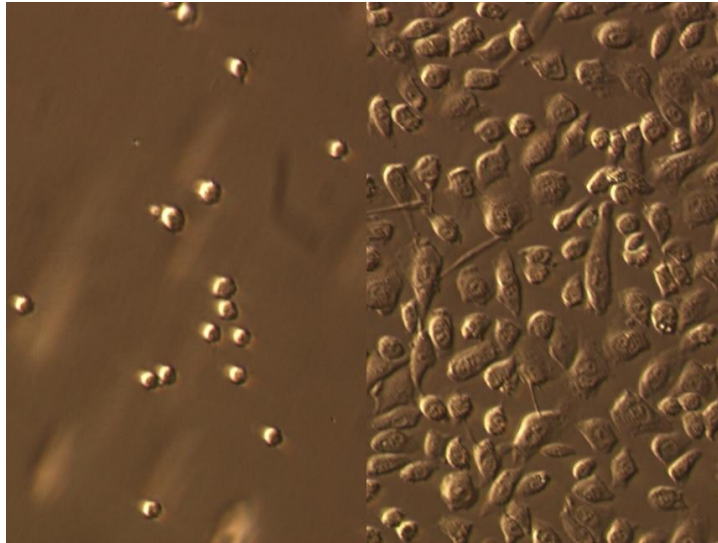


Figura 23.- del lado izquierdo se puede apreciar la morfología redonda como “pelotas” de los queratinocitos al ser obtenidos y puestos en cultivo. Del lado derecho al pasar los días del cultivo se puede apreciar una morfología mas alargada y plana,

En cuanto a la expansión de la población de fibroblastos, estos se cultivaron durante 2 semanas en un medio de cultivo permitiendo que las células alcanzara la formación de monocapas (figura 24).

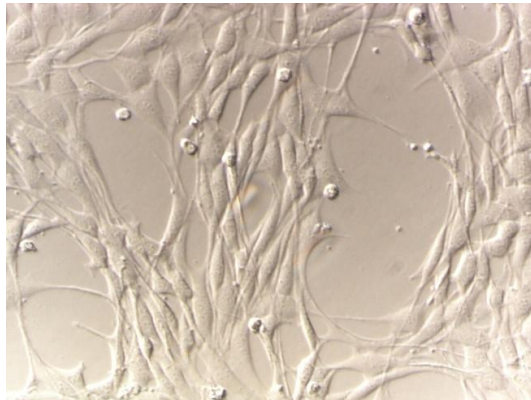


Figura 24.- cultivo de fibroblastos, aproximadamente a una semana y media, en donde la morfología delgada y alargada llega a ser característica de las células.

Resultados

Ambas poblaciones celulares fueron utilizadas para la construcción del equivalente tisular cutáneo, se procuro que la densidad celular empleada fuera la misma que la utilizada en los equivalentes cutáneos creados con fines de trasplante, con la finalidad de mantener las mismas condiciones, ya que en ellos la densidad a la que siembran los queratinocitos por unidad de área permite una fácil y adecuada formación de la lámina epidérmica en el tejido implantado. El número de queratinocitos suplementados con *Epigro* mantiene la densidad celular necesaria para la formación de la lámina epidérmica una vez que se ha implantado, esto con la finalidad de permitir que los queratinocitos con potencial de desarrollo folicular y glandular se distribuyan homogéneamente en el cultivo.

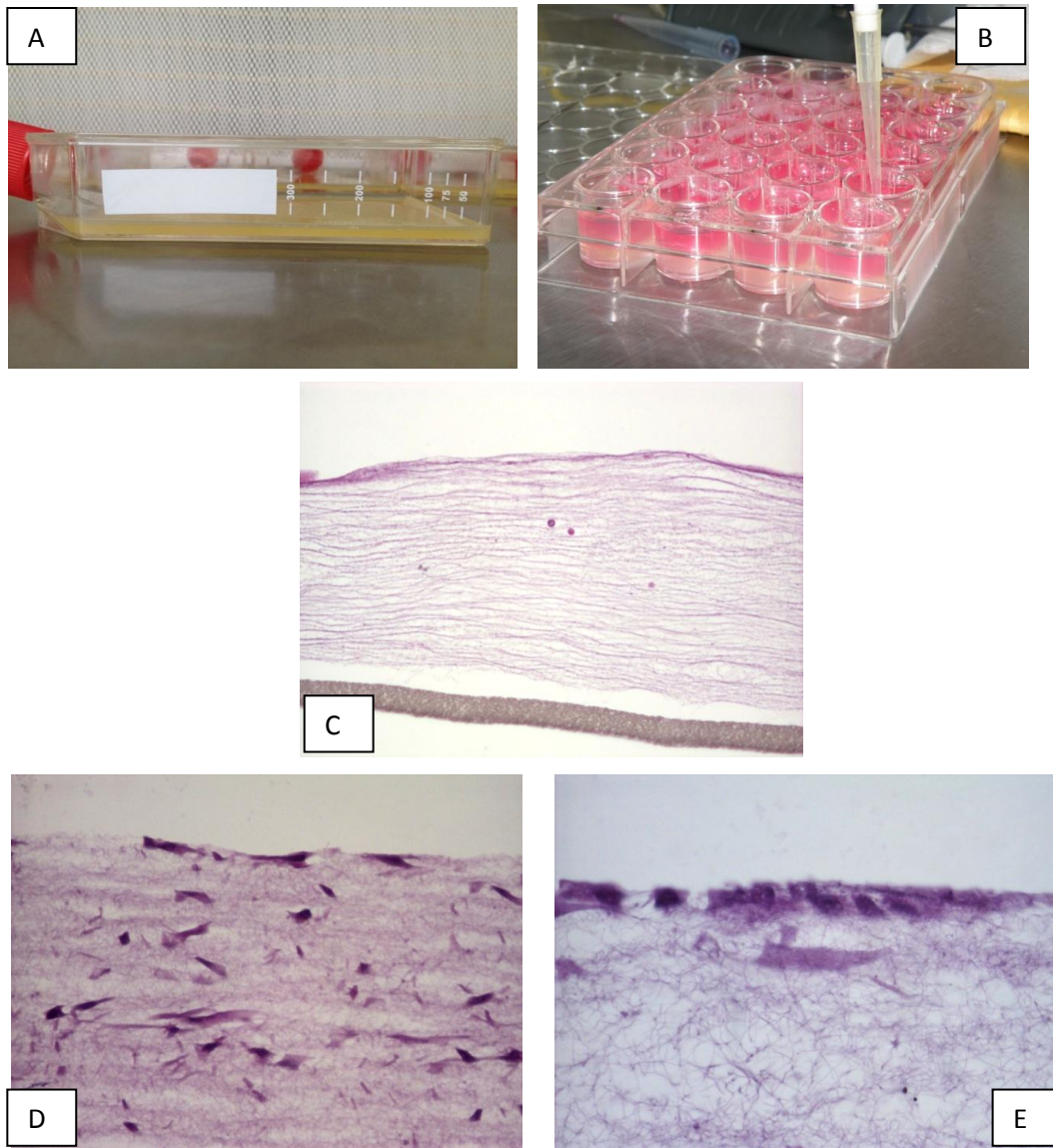
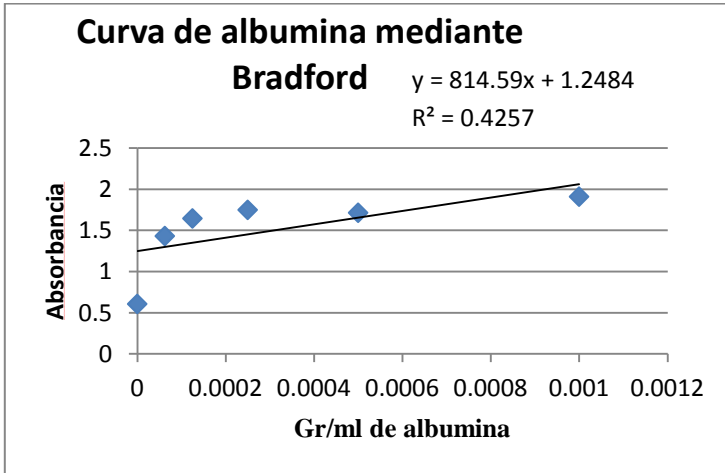


Figura.25.- A y B) modelos de los equivalentes cutáneos, del lado izquierdo, equivalente que se trabaja en el laboratorio para injertos y del lado derecho el modelo trabajado en la placa de 24 pozos. C) equivalente tisular sin células. D) equivalente dérmico con fibroblastos (200x) y E) equivalente epidérmico con queratinocitos a una semana de cultivo.

Resultados

10.2.- Cultivos MCF7:

Los cultivos de la línea celular de cáncer de mama se obtuvieron relativamente rápido a comparación de los queratinocitos y los fibroblastos, cuando llegaron a la confluencia del 80% de la caja estas, fueron estimuladas con estradiol a una concentración de 1×10^{-7} Mol. Para incentivar la producción de la proteína Wnt10b, la cual fue evidenciada mediante una prueba de ELISA. Previo a esto se utilizó la prueba de Bradford con la finalidad de conocer la densidad proteica existente la cual correspondió a .0001234977gramos/ml ($123.4977 \mu\text{g/ml}$) como se puede mostrar en la siguiente gráfica:



Prom.abs: 1.349 Abs
X= $123.4977 \mu\text{g/ml}$

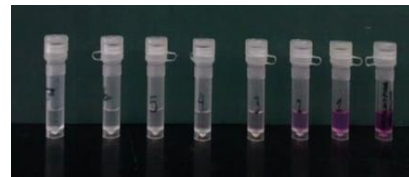
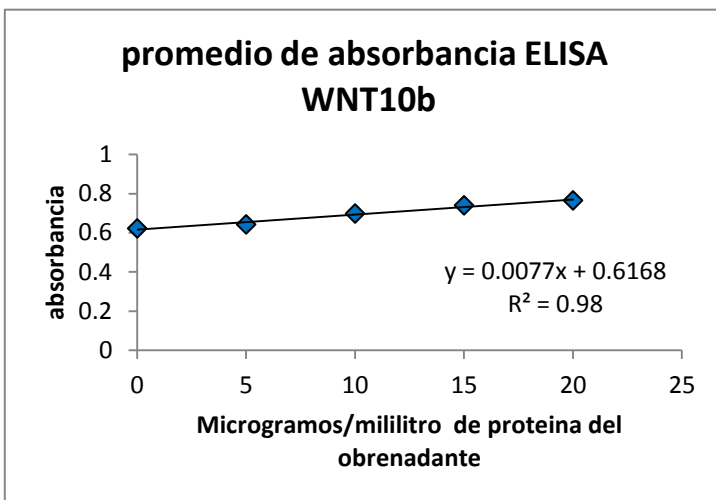
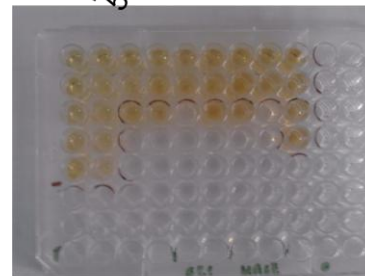


Figura 26.- Grafica en donde se muestra la curva de concentraciones de la albumina utilizada para saber la concentración proteica de los sobrenadantes MCF7.

Debido a que la prueba de ELISA es un método para evidenciar la presencia de antígenos en este caso Wnt10b, apcam recomienda utilizar la cantidad entre $2 \mu\text{g/ml}$ y $20 \mu\text{g/ml}$ de la densidad proteica



PBS
Medio n.
5 $\mu\text{g/ml}$.
10 $\mu\text{g/ml}$.
15 $\mu\text{g/ml}$.
20 $\mu\text{g/ml}$.



$\mu\text{g/ml}$ de proteína	Prom. absorbancia
0	0.622
5	0.6425
10	0.698
15	0.74
20	0.765

Figura.27.- Grafica que muestra la presencia de Wnt10b en los sobrenadantes MCF7.

Resultados

10.3.- Estimulación proteica

Las digitalizaciones (figura.28) proporcionaron un entorno visual a las distintas respuestas de los estímulos proteicos suplementados resaltando el tratamiento experimental que contiene **(4)** Medio basal+Sobrenadante MCF7 10% que propicia un incremento de queratinocitos K5+ (con una marca color café) en relación a los otros tratamientos experimentales y además una diferenciación de ellos tras observar estructuras superiores a la distancia del andamio así como distintos rangos de intensidad de marca. Otro grupo muy semejante a este modelo experimental es **(5)** Medio basal +EDA+Sobrenadante MCF7 20%, pero no muestra la misma densidad celular, el tratamiento control **(1)** presenta queratinocitos k5+ con marca más homogénea, mientras que para Ectodisplina **(2)** se localizó solo una zona en donde se aprecia una aparente fusión de K5+, pero en general no muy diferente a el tratamiento **1** y **3**, el tratamiento con Sobrenadante MCF7 20% **(3)** llega a presentar agrupamientos de k5+ así como queratinocitos distanciados entre ellos, EDAR y PCNA en todos los grupos parecieran tener el mismo comportamiento pero en menor expresión y proporción celular que K5+, sin embargo también llegaron a expresarse en fibroblastos.

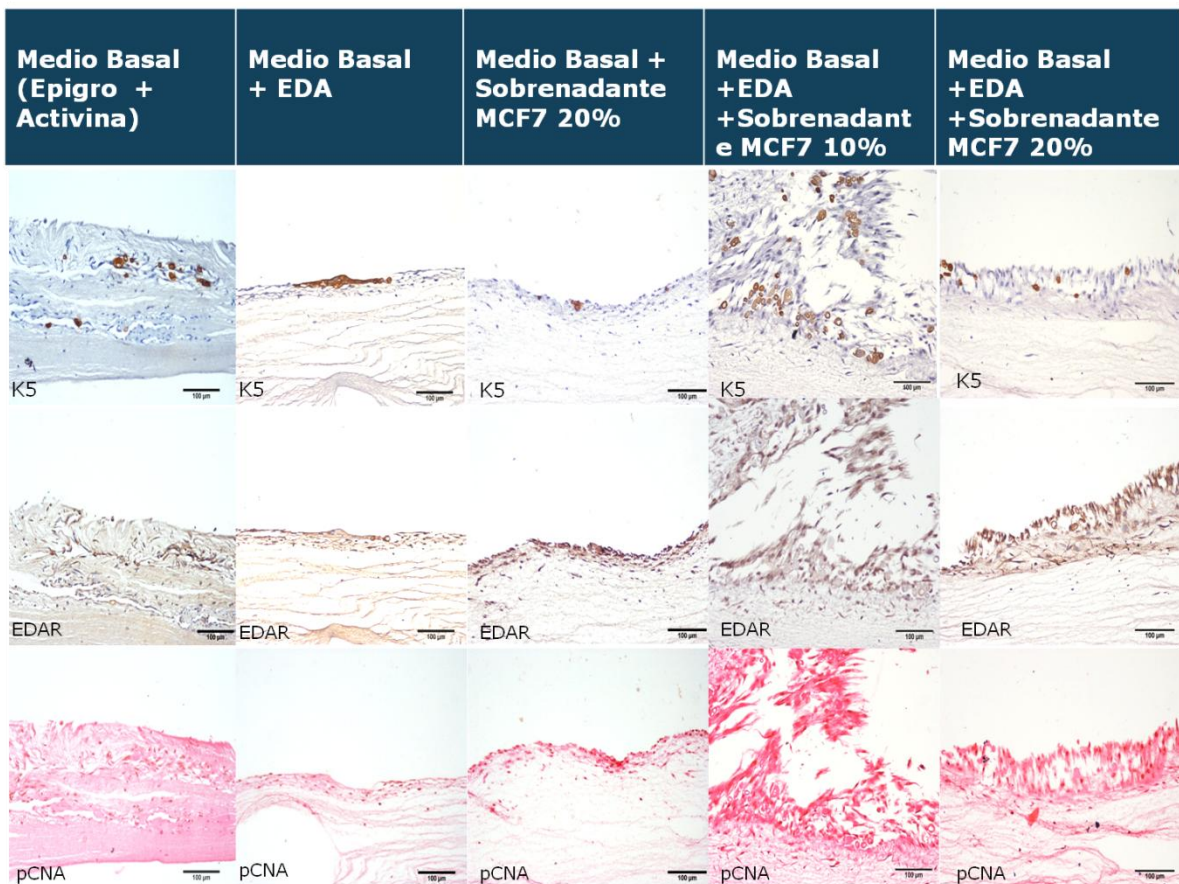


Figura 28.- Esquemas ejemplificativo del comportamiento de los cultivos celulares en el andamio con los diferentes anticuerpos y los diferentes tratamientos proteicos, en la primera fila de manera horizontal se encuentran las inmunohistoquímicas contra queratina 5 , en la segunda fila dispuestos de la misma manera contra el receptor EDA (EDAR) y por último el anticuerpo de pCNA.

Resultados

Con objeto de observar mejor las imágenes, en las siguientes fotografías se muestra la detección de la queratina 5, el receptor de ectodisplina A1 (EDAR) y la actividad mitótica evidenciada por pCNA.

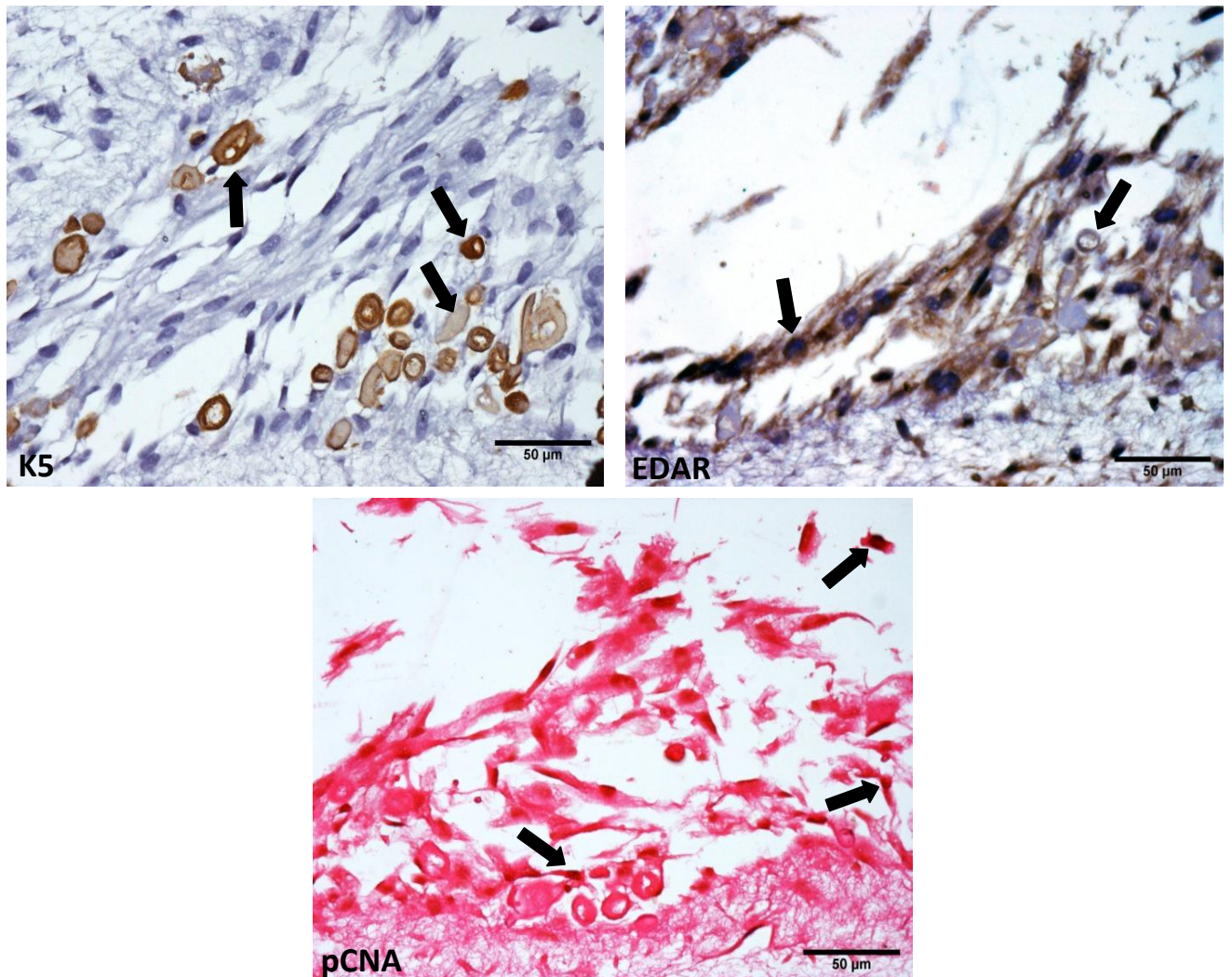


Figura 29.- Imágenes del tratamiento Medio basal+ectodisplina+sobrenadante MCF710%, ejemplificando las células positivas a cada anticuerpo (K5, EDAR y pCNA), el aumento total de 400x.

Resultados

10.4.- Análisis del experimento:

Se juntaron los tratamientos del experimento y su repetición, en donde se puede apreciar el número total de queratinocitos positivos a cada anticuerpo (Figura.30) y sus tendencias experimentales.

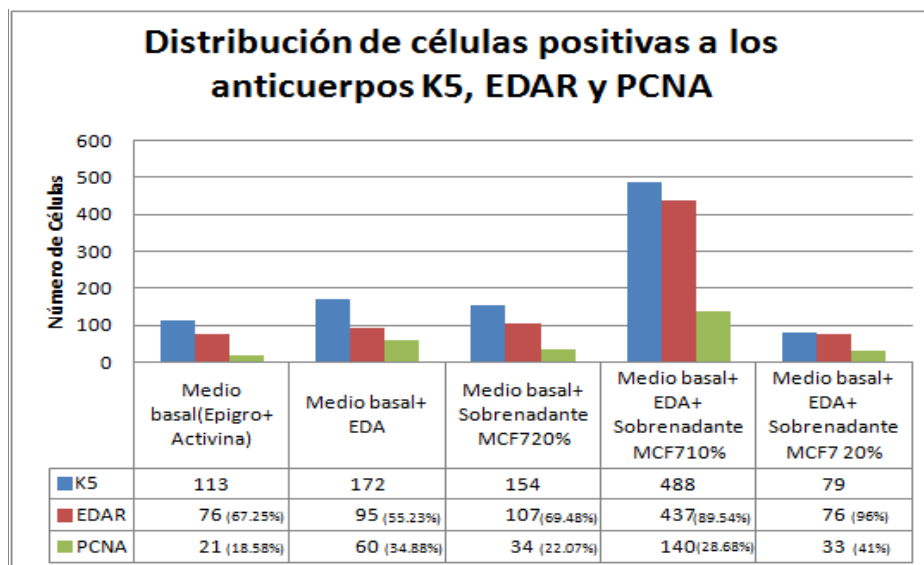
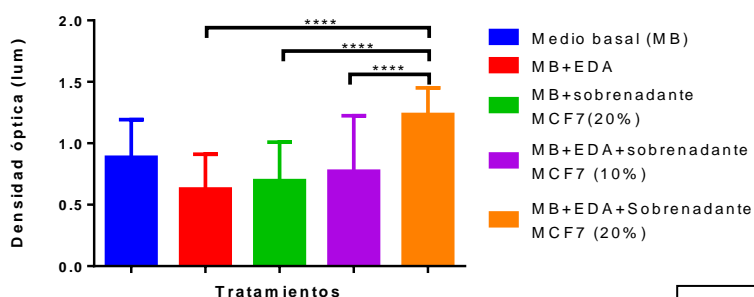


Figura 30.- Distribución proporcional de los anticuerpos en cada uno de los tratamientos y el porcentaje correspondiente en relación a la detección de queratina 5 presente en cada tratamiento.

El anticuerpo de pCNA evidencia que los queratinocitos en los cultivos estaban en actividad mitótica, encontrando una mayor cantidad de células en el cultivo de **Medio basal+ EDA+ Sobrenadante MCF710%**, para saber si existía significancia en la actividad mitótica por el grado de expresión del anticuerpo en cada uno de los otros tratamientos, se hizo un estudio estadístico (Kruskal-Wallis) con el programa Graphpad prism 6, con las Densidades Ópticas (D.O.) de cada célula. Al salir con significancia $P < .0001$ se realizó una comparación múltiple de Dunn evidenciando que el Tratamiento de **Medio basal+ EDA+ Sobrenadante MCF720%** se encontraba con una mayor actividad como se muestra en la siguiente gráfica:

Evaluación de la D.O por la prueba de Kruskal-Wallis para células positivas a pCNA



$P < .0001$

Resultados

Utilizando un corte histológico de piel delgada de humano, logramos obtener las densidades ópticas en las que se expresa la citoqueratina 5 y EDAR (figura 31-32) del estrato basal al granular. Esto con el objetivo de indicarnos que tan basales o suprabasales llegan ser las D.O registradas en los tratamientos proteicos y si estos se salen del rango de la expresión normal.

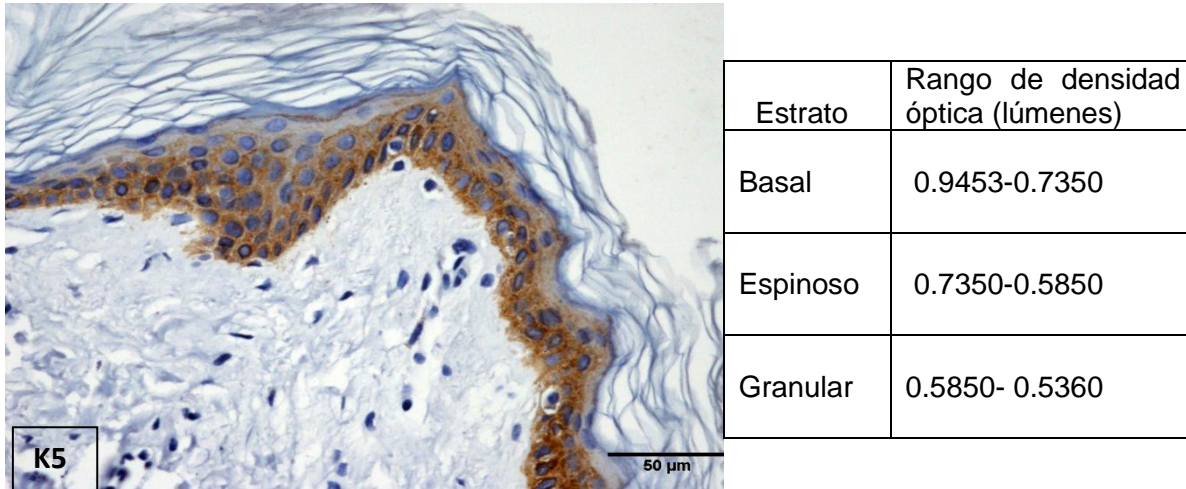


Figura 31.- Fotografía a 400X de una inmunohistoquímica para detectar citoqueratina 5 en el corte de piel delgada de humano normal, con datos de densidades ópticas registradas desde el estrato basal hasta el estrato granular.

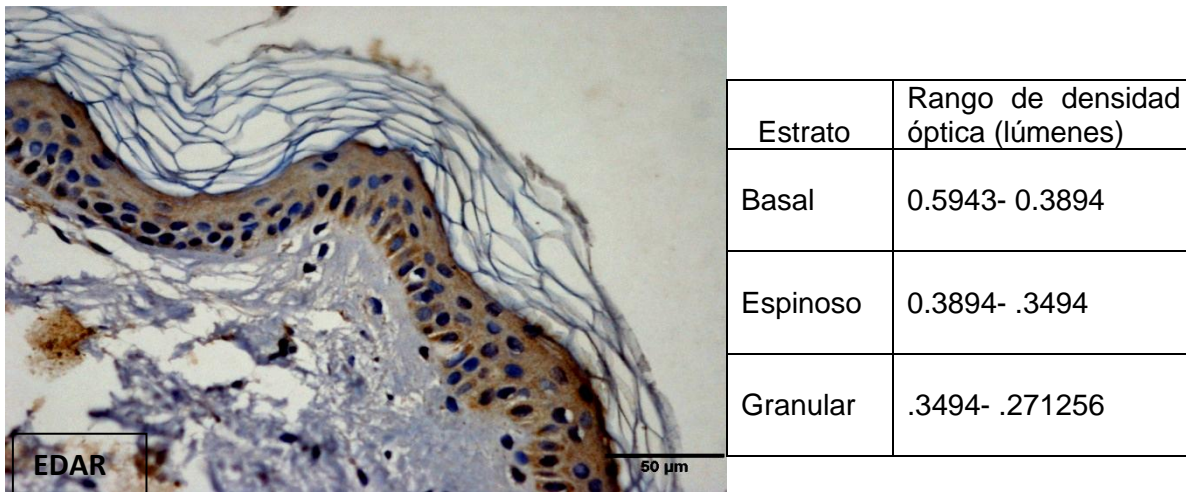
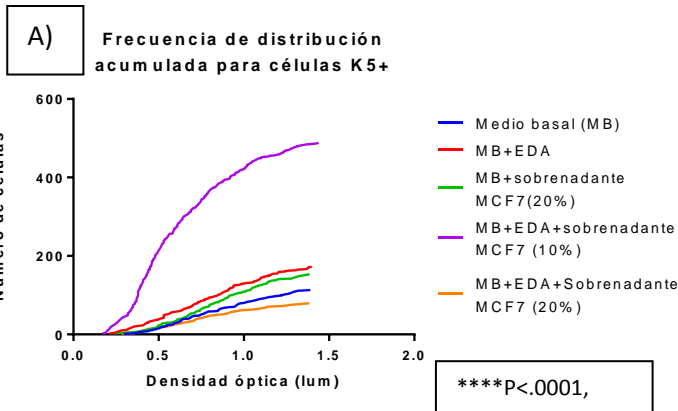


Figura 32.- Fotografía de inmunohistoquímica para detectar células positivas a EDAR en el corte de piel delgada de humano normal, con datos de densidades ópticas registradas desde el estrato basal al estrato granular.

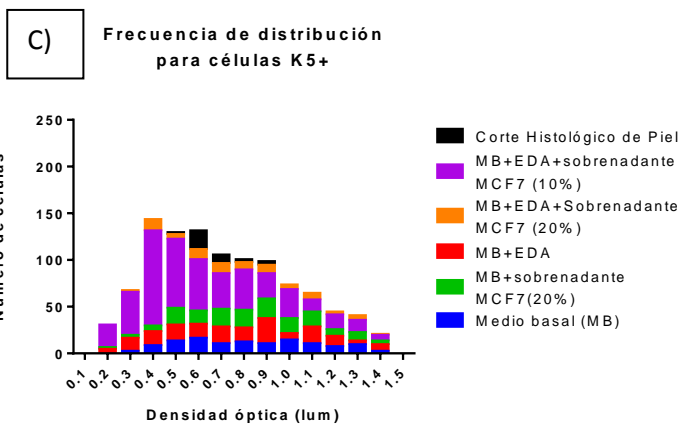
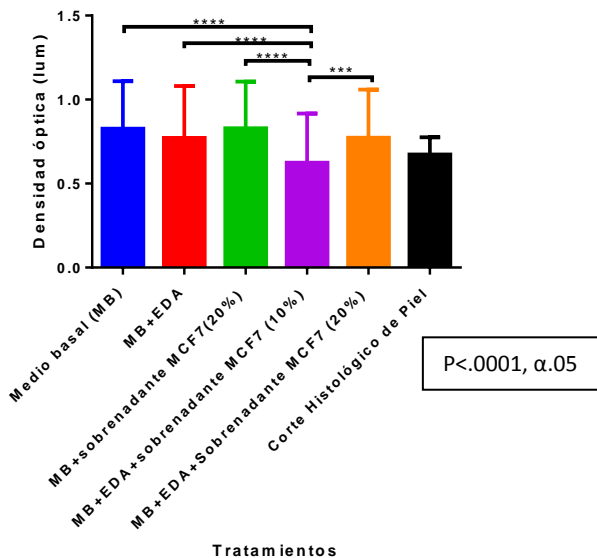
Para los siguientes análisis de densidades ópticas estos datos fueron colocados en el grupo nombrado como: **corte histológico de piel**. Se compararon las densidades ópticas con las de los tratamientos proteicos por medio de la prueba de Kruskal Wallis (análogo a la ANOVA una vía en datos no paramétricos) y si estos salían con una P significativa, consecuentemente se realizaba la prueba de comparación múltiple de Dunn el cuál es un análogo de la prueba de Tukey para datos no paramétricos. Se anexaron gráficas de

Resultados

frecuencias de distribución, las cuales ejemplifican el número de células y sus densidades ópticas, y que a continuación se encuentran.



B) Evaluación de la D.O. por la prueba de Kruskal Wallis- Dunn Para células positivas a K5

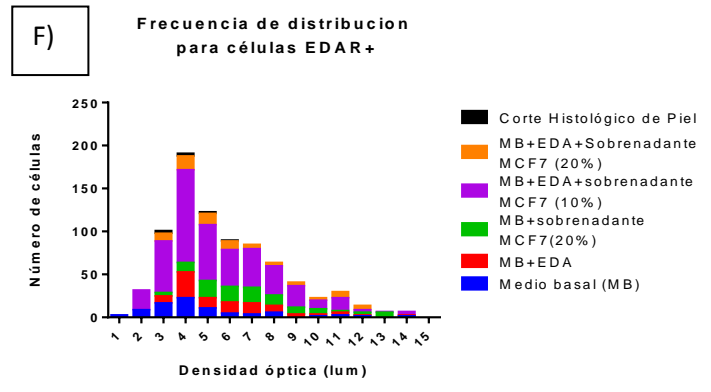
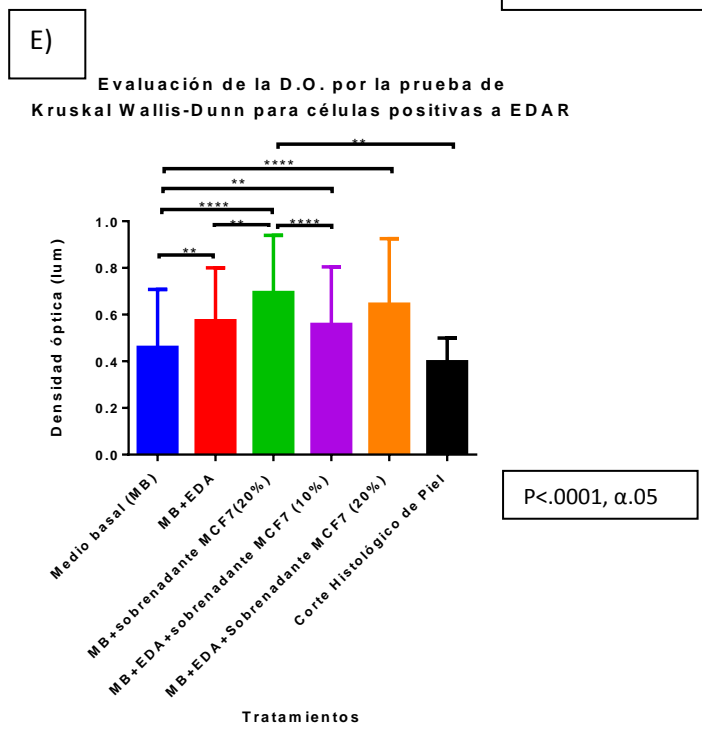
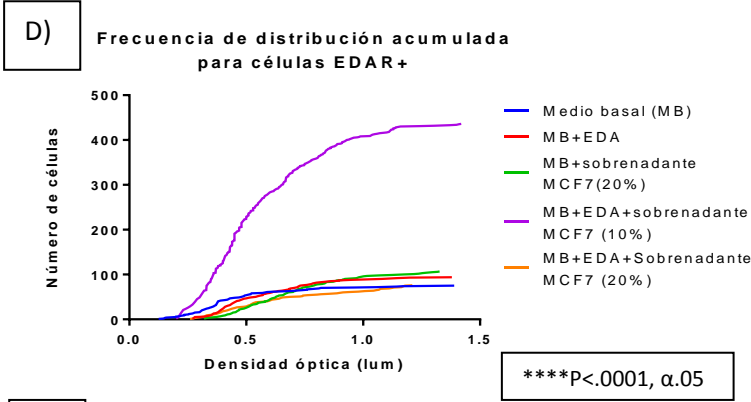


En la gráfica A), se puede apreciar el total de las células positivas a K5 y su densidad óptica máxima en relación a cada uno de los tratamientos proteicos, así el tratamiento que tiene mayor número de células positivas es Medio basal+Eda+ Sobrenadante MCF710%. Seguido del tratamiento de Medio basal+ EDA y después el Medio basal+ sobrenadante MCF7 20%.

En la gráfica B), se realizó la prueba estadística de Kruskal Wallis-Dunn tomando las densidades ópticas del total de las células positivas a K5, y lo que se puede apreciar es que el tratamiento Medio basal+ Eda+ sobrenadante MCF710%, pese a que en la grafica anterior muestra mayor número de células, la densidad óptica resulta ser significativamente negativa en relación a los demás tratamientos, pero muy semejante al corte histológico.

En la gráfica C), se muestra una representación gráfica en relación a la frecuencia de distribución de las células positivas a K5 y sus densidades ópticas de todos los tratamientos, así se puede apreciar que el color morado, correspondiente a el tratamiento Medio basal+ EDA+ Sobrenadante MCF710% que mantuvo el mayor número de células.

Resultados



En la grafica D), se puede apreciar el total de las células positivas al receptor de ectodisplasina (EDAR) y su densidad óptica máxima en relación a cada uno de los tratamientos proteicos, así el tratamiento que tiene mayor número de células positivas es Medio basal+Eda+ Sobrenadante MCF710%. Seguido del tratamiento de Medio basal+sobrenadante MCF720% y después el Medio basal+ EDA.

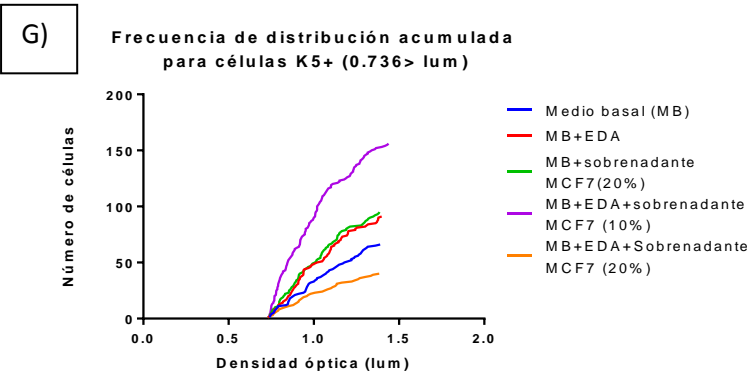
En la Gráfica E), se realizó la prueba estadística de Kruskal Wallis-Dunn tomando las densidades ópticas del total de las células positivas a EDAR, y lo que se puede apreciar es que el tratamiento Medio basal+sobrenadante MCF720%, es estadísticamente más diferente en relación a los demás tratamientos, incluso con el corte histológico.

En la gráfica F), se muestra una representación gráfica en relación a la frecuencia de distribución de las células positivas a EDAR y las densidades ópticas de todos los tratamientos, así se puede apreciar que el color morado, correspondiente a el tratamiento Medio basal+EDA+ Sobrenadante MCF710% es quien mantiene mayor número de células en todas las densidades ópticas registradas.

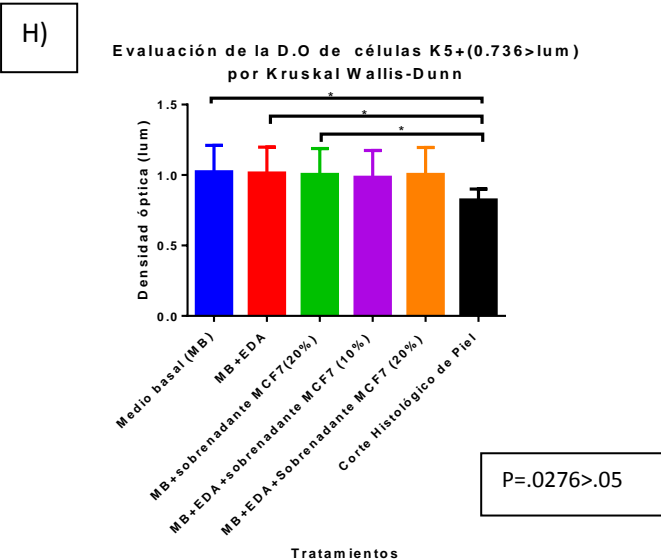
Resultados

Rangos de queratinocitos basales.

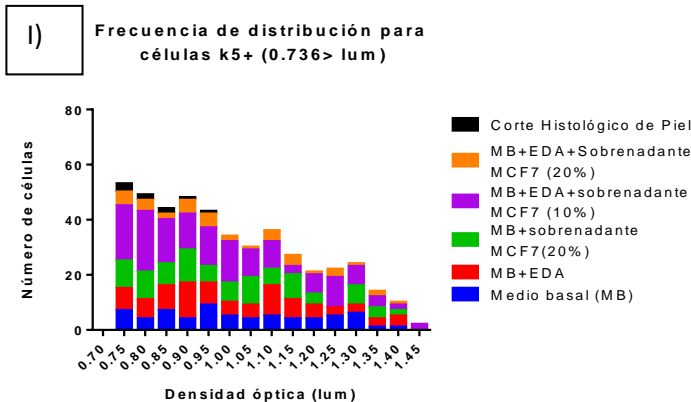
Gracias al corte histológico de humano sabemos que las D.O. de los queratinocitos basales es mayor a 0.736 lúmenes, al retirar las densidades ópticas que no pertenecían a estos rangos se obtuvo lo siguiente:



En la gráfica G, se puede apreciar que graficando la frecuencia de distribución acumulada para células K5 en rangos basales, el tratamiento Medio basal + EDA+ sobrenadante MCF710% sigue siendo el tratamiento que presenta más células positivas, mientras que los tratamientos Medio basal+EDA y Medio basal+sobrenadante MCF7 20% se comportan muy similarmente.



En la gráfica H, se puede apreciar que no existe diferencia significativa entre los grupos experimentales a las células positivas a K5, sin embargo con el corte histológico los primeros tres tratamientos son significativos. Con el valor de P de .0276.

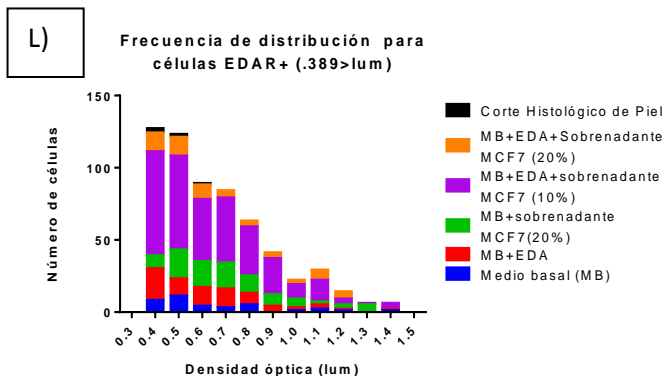
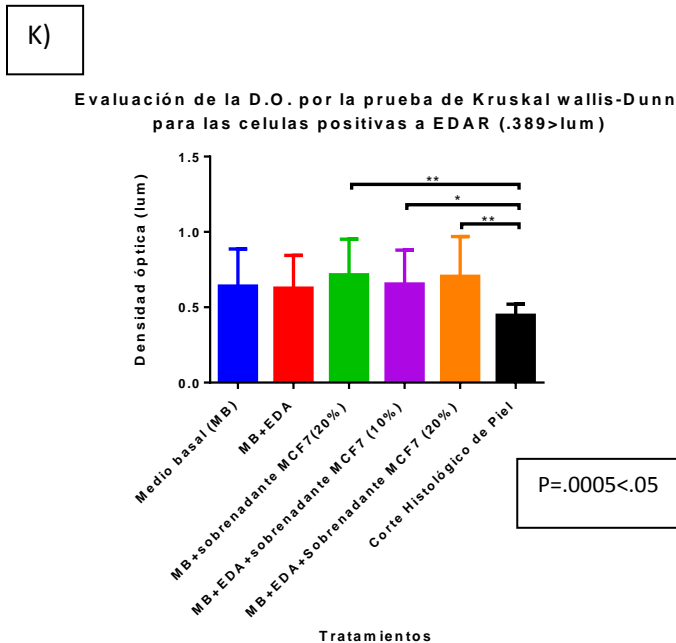
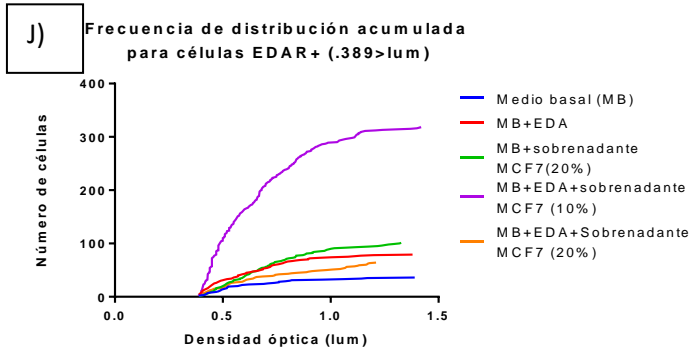


En la gráfica I), se graficó la frecuencia de distribución para células positivas a EDAR, donde puede apreciarse en cada densidad óptica registrada el tratamiento proteico con mayor y menor densidad celular.

Resultados

Rangos de queratinocitos basales.

Las D.O. de los queratinocitos basales para EDAR son mayor a 0.389 lúmenes, de acuerdo al corte histológico. Al retirar las densidades ópticas que no pertenecían a estos rangos se obtuvo lo siguiente:



En la gráfica J), puede apreciarse que aun retirando de los las densidades ópticas más bajas de EDAR, estas tienden a ser muchas células positivas, así se puede apreciar que el tratamiento con mayor porcentaje celular de EDAR es Medio basal+ EDA+ sobrenadante MCF7 10%, también puede apreciarse que el Medio basal + EDA y el Medio basal + sobrenadante MCF720% se comportan muy similarmente entre si.

La gráfica K), muestra el análisis de kruskal wallis-Dunn, donde se tomaron las densidades ópticas de todas las células positivas al anticuerpo, la P tiene un valor de .0005 en relación al corte histológico de piel, mostrando significancias en los grupos donde se contiene el sobrenadante MCF7 al 10 y al 20%.

La frecuencia de distribución para las células EDAR en la grafica L), se aprecia que en cada densidad óptica registrada, el tratamiento Medio basal+ Eda+ sobrenadante MCF7 10% tiene una proporción celular mayor a comparación de los demás tratamientos.

11.- Discusión

Es importante mencionar la relevancia que tiene este tipo de investigaciones para la medicina moderna, la I.T. se ha enriquecido a partir de distintas ciencias: biológicas, físicas y químicas; permitiéndonos hablar hoy en día de la generación y reparación de tejidos y órganos biológicos, como bien lo menciona Falke en el año 2001 *“Hasta hace poco tiempo el trasplante de órganos era un concepto futurista el cual ha ido desarrollándose y ha traído nuevos cambios en el conocimiento de la trasplantología. No obstante, han surgido nuevos problemas que requieren soluciones novedosas”*. En este contexto, la I.T. juega y jugará un papel muy importante en los siguientes años de desarrollo científico para la medicina, y no quedándonos atrás, esta investigación sigue aportando a la ingeniería de tejidos de piel, las bases para la generación de anexos cutáneos en sustitutos artificiales a partir de células adultas.

El andamio de fibrina resultó ser muy eficaz para el mantenimiento de los cultivos celulares, tanto de fibroblastos como de queratinocitos, en condiciones en donde no se les suplementó ningún tratamiento proteico se puede ver un crecimiento adecuado de las dos poblaciones celulares a una semana de mantenerlos. Posiblemente pueda mejorarse la consistencia del andamio modificando las concentraciones de calcio o procurando que los andamios contengan más fibrinógenos para darle una mayor rigidez, y al ser trabajados por la inclusión de parafina, estos no corran el riesgo de modificar su estructura. En el presente trabajo, nosotros empleamos unas esponjas dentro de los casettes antes de enviarlos al procesamiento histológico, y de esta manera disminuimos el riesgo de que se plegara el andamio.

Como mencionamos anteriormente utilizamos dos estrategias para la obtención de los cortes histológicos, 1) seriados a intervalos y 2) seriados estrictos, la primera estrategia, aunque nos permitió tener una visión panorámica de todo el cultivo, tuvo la desventaja de que sólo se contara con el corte antes del intervalo, lo que nos ofreció una visión incompleta ya que entre un intervalo y otro se puede sesgar la cuantificación positiva para las células a todos los marcadores, mientras que la segunda estrategia, aun cuando no tuvimos una visión panorámica, nos permite evaluar mejor, o con mayor fidelidad la presencia de células dobles o triples positivas.

Las células MCF7 con el estímulo de estradiol $1 \times 10^{-7} M$ produjeron la proteína Wnt10b evidenciada por la prueba ELISA cuando la prueba de Bradford indicó que hay una densidad aproximada de 123.4977 μ gramos/ml, sin embargo no puede asegurarse que sea la única proteína secretada por este tipo de células, algunas otras expresiones de genes cercanamente asociadas a la proliferación celular que se reportan al inducir la estimulación de estradiol en el medio de cultivo de las células MCF7 son: factor de crecimiento transformante α , factor de crecimiento similar a la insulina I y II, factor de crecimiento de fibroblastos y factor de crecimiento epidérmico (receptor). (DePasquale *et al.* 1994) situación que se abordara más adelante.

11.- Discusión

La investigación se fundamentó a partir de los diversos estudios que se han realizado sobre la proteína ectodisplasina A1 y las señalizaciones implicadas durante el desarrollo embrionario. Como ya lo hablamos durante la introducción, las señalizaciones de la proteína ectodisplasina A1 juegan un importante papel en el desarrollo embrionario, principalmente en el desarrollo de estructuras ectodérmicas, como los son dientes, glándulas y folículos pilosos, Así, el estudio aborda preferentemente el desarrollo folicular, pero en un futuro este conocimiento se puede aplicar al desarrollo de glándulas sudoríparas para los equivalentes cutáneos. Pese a que no evaluamos ninguna ruta de señalización, se discuten brevemente los siguientes puntos:

- EDA/NF-KB
- WNT10b/ B-catenina
- Activina A

En la presente investigación nuestros resultados indican que la frecuencia y distribución acumulada de células positivas a queratina 5 y EDAR se ve afectada por la presencia de las proteínas Ectodisplasina A1 y el sobrenadante MCF7, ya sea de manera individual o de manera sinérgica, por lo que las proteínas tienen un efecto directamente implicado en la proliferación celular. Así coincidimos con lo observado por Laurikkala y cols., 2002, donde demuestra que las señalizaciones que se dan en la embriogénesis están involucradas también en células adultas, modulando así la regeneración y proliferación.

Por otro lado se sabe que la estimulación de la ectodisplasina A1 es muy específica y que esta proteína se acoplará a su receptor EDAR llevando a la transcripción del factor Nuclear capa K β el cual es estrictamente dependiente de EDA A1 (Pispa *et al.* 2008) así como la expresión de msx1, msx2, SHH, P50, P52, CCn2/CTGF entre muchos más mencionados en la introducción modularan la proliferación y diferenciación de los queratinocitos.

Se sabe que señalizaciones Wnt/ β catenina están implicadas en el desarrollo y generación de glándulas salivales (Hai *et al.* 2010) y que a su vez en ratones con mutación en el gen EDA (*TAbby*) llegan a rescatar placodas primarias de los folículos pilosos (Närhi *et al.* 2008), aunado a esto las señalizaciones Wnt/ β Catenina y EDA parcialmente transcriben los mismos genes (Fliniaux *et al.* 2008; Zhang *et al.* 2009) como es el caso de Sonic Hedgehog (Cui *et al.*, 2006) el cual esta implicado en el rescate del fenotipo glandular y folicular en ratones con mutación en EDAR (*Downless*)(Wells *et al.* 2010); así estas investigaciones coinciden con lo que nosotros logramos visualizar en los tratamientos proteicos. **Medio basal+ Ectodisplasina** y **Medio basal+ sobrenadante MCF720%**, son tratamientos que inducen una mayor frecuencia de distribución de células positivas a los anticuerpos para detectar queratina 5 y al receptor de ectodisplasina (EDAR) en relación al grupo control de medio basal (Epigro+ Activina). Además, las señalizaciones por ligandos WNT y β Catenina han sido catalogadas como altos reguladores de EDAR (Zhang *et al.* 2009), por lo que podría sugerir el aumento en la expresión de EDAR en nuestros resultados (graficas D y E) por **MCF720%** están siendo influenciados por un

11.- Discusión

ligando Wnt, recordando la detección del ligando WNT10b. Así el sobrenadante MCF7 sería el mejor inductor para la transcripción de EDAR. Por otro lado, recordemos que en este experimento la primera señalización que se dio por las proteínas a los cultivos fue la de activina A, 55 horas después se estimulo con el sobrenadante de MCF7 (donde está la proteína Wnt10b) y pasadas otras 55 horas las células fueron estimuladas con la proteína ectodisplasia A1. La investigación realizada por Vázquez Torres, 2011, indicó que la función de la proteína Activina A en queratinocitos está asociada a la proliferación de queratinocitos EDAR positivos y Zhang, 2009, cataloga a la familia Wnt como altos reguladores de EDAR por señalizaciones Wnt/ β catenina y con esto podría inferir que al dar estas señalizaciones primeramente y seguidamente al administrar la proteína EDA de manera exógena se vería maximizado las respuestas celulares de los queratinocitos, en esta investigación encontramos que el mejor tratamiento de células positivas a queratina 5 y EDAR es **Medio basal + Ectodisplasia + sobrenadante MCF710%**, el cual logra ser significativo en relación al control. En relación al tratamiento Medio basal+ Ectodisplasia+ Sobrenadante MCF7 20% al realizar la prueba de kruskal-wallis y seguidamente la prueba de Dunn para el anticuerpo de pCNA sugiere que se encontraba en una mayor actividad mitótica, por lo que creería siendo el tratamiento con mayor suplementación proteica que las células siendo de una naturaleza “normal” posiblemente bajaron su actividad al detectar en el medio concentraciones que posiblemente saturaran sus receptores, y a la vez al paso del tiempo las proteínas se empezaron a degradar y ese fue el momento en donde se restablecieron para continuar su actividad celular incluyendo la mitosis.

Por último, en relación a la proteína Actvina la cual se encuentra en el **medio basal**, Banberger en el año 2005, reportó que esta proteína está implicada en la síntesis de citoqueratina 14, y por lo tanto sabemos que está asociada a la citoqueratina 5, posiblemente al no haber diferencias significativas entre los tratamientos experimentales, podríamos decir que es la única proteína implicada en la transcripción de la K5, por otro lado al encontrar diferencias significativas de los tratamientos Medio Basal+ Activina A, MB+EDA y MB+Sobrenadante MCF7 Vs el corte histológico de humano, indicaría que al estar de manera sinérgica, las señalizaciones se complementan para dar alguna otra señalización que afecta o está implicada en la diferenciación celular ya que los tratamientos MB+EDA+Sobrenadante MCF710% y MB+EDA+Sobrenadante MCF720% bajan su expresión proteica.

Teóricamente, al tener una proliferación de células basales de queratinocitos k5+ y aunado a esto que sean EDAR+ nos daría paso a que en investigaciones futuras, este tipo de células llegasen a congregarse y dar formación a las placodas que darán paso a la formación de folículos pilosos y glándulas sudoríparas de manera *in vitro* dando así una mejor calidad de vida para los pacientes que requieran este tipo de tratamientos.

12.- Conclusión

- Se logró caracterizar adecuadamente el método de obtención de células para los cultivos primarios
- La Activina A es la única proteína, de las evaluadas, que estimula la síntesis de citoqueratina 5.
- El sobrenadante de las células MCF7, donde se expresó la proteína Wnt10b, está asociado a la estimulación de expresión de EDAR.
- La proteína EDA A1 y el sobrenadante de las células MCF7, de manera individual o sinérgicamente están asociadas a la proliferación de queratinocitos K5 y EDAR positivos.
- La conjunción de las tres proteínas en concentraciones de Activina (200ng/ml)+ EDA A1 (50ng/ml) y el sobrenadante MCF7 (10%) logra expresar Densidades ópticas tanto de citoqueratina 5 así como EDAR semejantes a las densidades ópticas registradas en cortes de piel delgada de humano.

13.- Bibliografía

- Ahmed, Mohammed; Mardaryev, Andrei, Lewis, Christopher; Sharov, Andrey y Botchkareva, Natalia. (2011) **MicroRNA-21 is an important downstream component of BMP signaling in epidermal Keratinocytes.** Journal of cell Science 124, 3399-3404.
- Alarcón, Rosario; Ramírez, Pía; Yañez, Tatiana; Alarcón, Francisco; Solís Felipe. (2006) **Displasia ectodérmica hipohidrotica, a propósito de un caso.** Universidad de Concepción. Hospital clínico Guillermo Grant Benavente de Concepción, Chile. Dermatol pediater Lat; 4(3):204-210.
- Alonso, Laura y Fuchs, Elaine. (2003) **Stem cells in the skin: Waste not, Wnt not.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, *Genes Dev* 17:1189-1200.
- Andersson, Emma; Sandberg, Rickard y Lendahl, Urban.(2011) **Notch signaling: simplicity in design, versatility in function.** Development 138, 3593-3612 doi:10.1242/dev.063610.
- Aman, A., y Piotrowski, T. (2008) **Wnt/beta-catenin and Fgf signaling control collective cell migration by restricting chemokine receptor expression.** Dev cell. Nov; 15(5): 749-61.
- Amortegui, Ángela X.; Ramírez, Sandra Rocío. (2008) **Cultivo primario de queratinocitos humanos sembrados en submucosa intestinal porcina.** Rev. Cienc. Salud. Bogotá (Colombia) 6 (3): 8-22, septiembre-diciembre.
- Arango, M.L; Chamorro, C.I; Restrepo, M.L; Correa, L.A; Henao, J. (2009) **Características histológicas de piel cultivada in vitro.** Rev. Argent. Dermatol; 90:190-200.
- Arenas, Gómez Claudia Marcela; Merizalde, Soto Gabriel Jaime; Restrepo Múnera Luz Mariana. (2012) **Sustitutos cutáneos desarrollados por ingeniería de tejidos.** Iatreia vol. 25(1):42-53, enero-marzo.
- Arredondo, María Isabel; Tamayo Liliana. (2007) **Enfoque semiológico de las patologías de la piel del neonato.** Rev. Asoc. Col. Dermatol. Volumen 15, número 4, Diciembre. Pp.261-272.
- Arvelo, Francisco. (2007) **Ingeniería de tejidos y producción de piel humana in vitro.** Investigación clínica 48(3):367-375.
- Bailleul, B; Surani, M.A; White, S; Barton, S.C; Brown, K; Blessing, M; Jorcano, J.L. y Balmain, A. (1990) **Skin hyperkeratosis and papilloma formation in transgenic mice expressing a ras oncogene from a suprabasal keratin promoter.** Cell, 62: 697-708.
- Bamberger, Casimir; Schäfer, Agnes; Antsiferova, María; Tychsen, Birte; Pankow, Sandra; Mischa, Müller; Rülcke, Thomas; Paus, Ralf; Werner, Sabine.(2005) **Activin Controls Skin Morphogenesis and Wound Repair Predominantly via Stromal Cells and in a Concentration-Dependent Manner via Keratinocytes.** American Journal of Pathology, Vol. 167, No. 3.
- Blecher, Stan R. (1986) Anhidrosis and absence of sweat glands in Mice Hemizygous for the Tabby gene: **Supportive Evidence for the Hypothesis of homology Between Tabby and Human Anhidrotic (Hypohidrotic) Ectodermal Dysplasia (Christ-Siemens-Taurine Syndrome).** The society for investigative Dermatology, June 18, 720-722.

13.- Bibliografía

- Botchkarev, Vladimir A. y Fessing Michael Y. (2005) **Edar Signaling in the Control of Hair Follicle Development**. J Investig Dermatol Symp Proc 10:247 – 251.
- Bowers, Wilbert; Blaha, Michael; Alkhyyat, Ahmad; Sankovich, James; Geraldine, Wong; Patterson, Donna. (1999) **Artificial human skin: cytokine, prostaglandin, Hsp70 and histological responses to heat exposure**. Journal of dermatological science. Vol. 20, Issue 3. Pages 172-182.
- Brohem, Carla A., da Silva, Cardeal Laura B., Tiago, Manoela., Soengas, María S., de Moraes, Barros Silvia B., y Engler, Silvy. (2010) **Artificial skin in perspective: concepts and applications**. Pigment Cell Melanoma Res. 24; 35–50.
- Brownell, Isac; Guevara, Elizabeth; Joyner, Alexandra.(2011) **Nerve-derived Sonic hedgehog defines a niche for hair follicle stem cells capable of becoming epidermal stem cells**. Cell Stem Cell. May 6; 8(5): 552–565.
- Busi, Florinda María. (2008) **Barrera epidérmica en dermatitis atópica**. Rev Asoc Col Dermatol. Volumen 16, número 4, diciembre, pág. 293, 301
- Butler CE, Orgill DP, Yannas IV y Compton CC. (1998). **Effect of keratinocyte seeding of collagen-glycosaminoglycan membranes on the regeneration of skin in a porcine model**. Plast Reconstr Surg, 101 (6): 1572-1579.
- Calderón, Valle Willy; Calderón, Valle Rosario. (2002) **Cultivo de queratinocitos humanos en monocapa**. Revista Boliviana de dermatología. N°1. Vol.1 pp.11-22.
- Cammarata-Scalisi, Francisco; da Silva, Gloria; Piquero-Casals, Jaime. (2007) La piel en el contexto de la medicina y sus especialidades, **Displasia ectodérmica hipohidrótica**. Piel. 22(5) 233-7.
- Carlson, Bruce. (2009) **Embriología Humana y Biología del Desarrollo**. 4ª ed., Ed. Elsevier.
- Castelo, Branco Camil; (2010) **Envejecimiento de la piel y las mucosas**. Dermatología. Editorial. Medica panamericana.. Alberto alcocer. Madrid España. pp.136.
- Caviglia, Horacio Alberto; Douglas, Price Ana; Eulalia, Landro María y Romanelli Jorge. (2011) **Ingeniería de tejidos en el aparato musculoesquelético**. ev. Asoc. Argent. Ortop. Traumatol. vol.76 no.1 Ciudad Autónoma de Buenos Aires.
- Chen, H; Thiagalingam, A; Chopra, H; Borges, M. W; Feder, J. N; Nelkin, B. D; Baylin, S. B. and Ball, D. W. (1997). **Conservation of the Drosophila lateral inhibition pathway in human lung cancer: a hairy-related protein (HES-1) directly represses achaete-scute homolog-1 expression**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 5355-5360.
- Clauss, F; Manière, M.C; Obry, F; Waltmann, E; Hadj, Rabia S; Bodemer, C; Alembik, Y; Lesot, H; Schmittbuhl M. (2008) **Dento-Craniofacial Phenotypes and Underlying Molecular Mechanisms in Hypohidrotic Ectodermal Dysplasia (HED): a Review**. Dent Res 87(12):1089-1099.
- Cui, hang-Yi; Hashimoto, Tsuyoshi; Grivennikov, Sergel I; Plao, Yulan; Nedospasov, Sergel A; Sclessinger, David. (2006) **Ectodysplasin regulates the**

13.- Bibliografía

- lymphotoxin-B pathway for hair differentiation.** Edited by Kathryn V. Anderson, Sloan-Kettering Institute, New York, NY, May 2.
- Cui, Dongmei. (2011) **Histología con correlaciones funcionales y clínicas.** Wolters Kluwer Health España, S.A., Lippincott Williams & Wilkins. Pp.439.
 - Curtis, Helena; Barnes, N. Sue; Schnek, Adriana; Graciela, Flores. **Biología General 6ª ed.** En español, capítulo39: Tejidos, órganos y sistemas de los vertebrados. ed. Panamericana 2006, págs. 1043-1064.
 - Currie LA., Sharpe J. y Martin R. 2001. **The use of fibrin glue in skin grafts and tissue-engineered Skin Replacements: A review.** Plastic Recons Surg. 108(6):1713-1726
 - Davis, A.A., Matzuk, M.M. y Reh, T.A. (2000) **Activin A promotes progenitor differentiation into photoreceptors in rodent retina.** Molecular and Cellular Neuroscience.15, 11–2.
 - Ding, Hong; Zhou, Dong; Hao, Sha; Zhou, Lili; He, Weichun; Nie, Jing; Hou, Fan Fan; Liu, Youhua.(2012). **Sonic Hedgehog Signaling Mediates Epithelial–Mesenchymal Communication and Promotes Renal Fibrosis.** J Am Soc Nephrol 23: 801–813, ISSN : 1046-6673/2305-801.
 - Depasquale, Joseph A; Samsonoff, William A; Gierthy John F. (1994) **17- β -estradiol induced alterations of cell-matrix and other cellular adhesions in a human mammary carcinoma cell line.** Journal of cell science 107, 1241-1254, impreso en gran bretaña.
 - Eckert, R.L. y Rorke, E.A. (1989) **Molecular biology of keratinocyte differentiation.** Envir. Health Perspect, 80: 109-116.
 - Fabres V. Cecilia. (2010) **Técnicas del futuro: ingeniería de tejidos y uso de células madre en medicina reproductiva,** Unidad de Medicina Reproductiva. Departamento de Ginecología y Obstetricia. Clínica Las Condes, REV. MED. CLIN. CONDES; 21(3) 488 – 493.
 - Falke, G. (2001) **Introducción a la Ingeniería Tisular, Parte I.** Rev. De Cir infantil 11(2), hospital J.P. Garrahan, Buenos Aires, Argentina. Pp. 69-71.
 - Falke, German F.; Atala, Anthony. (2000) **Reconstrucción de órganos utilizando ingeniería tisular.** Arch.argen.pediatr; 98(2):103.
 - Fantini, F. y Johansson, O. (1995) **Neurochemical markers in human cutaneous Merkel cells. An immunohistochemical investigation.** Exp Dermatol, 4: 365-71.
 - Ferreti, Patrizia; Copp, Andrew; Tickle, Chery Il; Moore Gudrun. (2006) **Embryos, Genes and birth defects, 2nd Edition.** ISBN: 978-0-470-09011-4. John Wiley and sons. The atrium, Southern Gate, Chichester, England.
 - Fliniaux, I., Mikkola, M. L., Lefebvre, S. and Thesleff, I. (2008). Identification of dkk4 as a target of Eda-A1/Edar pathway reveals an unexpected role of ectodysplasin as inhibitor of Wnt signalling in ectodermal placodes. *Dev. Biol.*320, 60-71.
 - Fortoul, Van der Goes Teresa; Castell, Rodríguez Andrés. (2010) **Histología y Biología Celular.** Primera ed. McGraw-Hill Interamericana editores, S.A. de C.V. México, D.F. pp 307.

13.- Bibliografía

- Franco, M; Gonzáles, N; Díaz, M; Pardo, S; Ospina, S. **Epidemiological and clinical profile of burn victims** Hospital Universitario San Vicente de Paúl, Medellín, 1994-2004. Burns, 32, 1044-1051, marzo 2006. En: **Soluciones terapéuticas para la reconstrucción de la dermis y la epidermis.** Oportunidades en el medio antioqueño, Velásquez Puerta Diego A., Pineda Molina Catalina, Cardona Cano María E., Gómez Suarez Nicolás E., Gartz Moises Grete J., Úsuga Gómez Isabel C., Tróchez Wilchez Diana F., Londoño Peláez Carolina, Revista Ingeniería Biomédica, volumen 2, número 3, enero-junio 2008, págs. 77-83.
- Gálvez, Gastélum Francisco Javier; Sandoval, Rodríguez Ana Soledad; Armendáriz, Borunda Juan. (2004) **El factor de crecimiento transformante β como blanco terapéutico.** Salud pública de Mex v.46 n.4 Cuernavaca jul./ago.
- García, Martín P; Hernández, Martín A; Torrelo A. (2012) **Displasias ectodérmicas: revisión clínica y molecular.** Servicio de Dermatología, Hospital Infantil del Niño Jesús, Madrid, España 20 julio.
- García, Alix Alfredo; Quero, José. (2011) **Apéndices cutáneos, pliegues y surcos: Evaluación neurológica del recién nacido.** Vol.1 Madrid, España. Pp 33.
- Gartner, Leslie y Hiatt, James.(2011) **Histología Básica.** Edición en español de la obra original en inglés Concise Histology, Elsevier inc Barcelona, España. Pp342.
- Ghalbzouri A, Commandeur S, Rietveld MH, Mulder AA y Willemze R. **Replacement of animal-derived collagen matrix by human fibroblast-derived dermal matrix for human skin equivalent products.**Biomaterials 2008.
- Goudet, Roover Carmen Elena; Sáenz, Ana María; González, Otero Francisco. (2008) **Células madre en dermatología.** Dermatología Venezolana. Vol 46, No2,pp 5-10.
- González, Burgos Lourdes; Di Martino, Ortiz Beatriz; Rodríguez, Masi Mirtha; Knopfmacher, oilda; Bolla, de Lezcano Lourdes. (2011) **Síndrome de Bloch-Sulzberger (Incontinentia pigmenti). Características y aporte de un caso clínico** Arch. argent. pediatr. vol.109 no.3 Buenos Aires mayo/jun.
- Grubauer, H.G., Feingold, K.R., Harris, R. M. y Elias, P.M. (1989) **Lipid content and lipid type as determinants of the epidermis permeability barrier.** J. Lipid Res, 30: 89-96.
- Guillén Navarro E, Ballesta Martínez MJ, López González V. (2010) **Displasia ectodérmica hipohidrótica.** Protoc diagn ter pediatr; 1:13-7.
- Han, W-D; Mu Y-M., Lu, X-C., Xu, Z-M., Li, X-J., Yu, L., Song, H-J., Li, M., Lu, J-M., Zhao, Y-L y Pan, C-Y.(2003) **Up-regulation of LRP16 mRNA by 17β -estradiol through activation of estrogen receptor α (ER α), but not ER β , and promotion of human breast cancer MCF-7 cell proliferation: a preliminary report.** Endocrine-Related Cancer, 10 217–224.
- Hai, B., Yang, Z., Millar, S. E., Choi, Y. S., Taketo, M. M., Nagy, A. and Liu, F. (2010). **Wnt/b-catenin signaling regulates postnatal development and regeneration of the salivary gland.** *Stem Cells Dev.* 19, 1793-1801.

13.- Bibliografía

- Hashimoto T, Cui CY, Schlessinger D. (2006) **Repertoire of mouse ectodysplasin-A (EDA-A) isoforms.** Gene; 371:42-51.
- Hoekstra HE, Coyne JA. 2007. **The locus of evolution: evo devo and the genetics of adaptation.** Evol Int J Org Evol. 61:995–1016.
- Houghton, Leslle; Lindon, Catherine; Morgan Bruce A. (2005) **The ectodysplasin pathway in feathertract development.** Cutaneous Biology Research Center, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School. Development 132, 863-872.
- Honeyman, Juan. (2013) **Fisiología de la piel.** Pontificia Universidad Católica de Chile dermatologia ibero americana online depósito legal: ppi201002dc3612 en: <http://antoniorondonlugo.com/blog/wp-content/uploads/2010/05/178-FISIOLOGIA-DE-LA-PIEL2.pdf>
- Horch R.E; Kopp J; Kneser U; Beier J; Bach A.D. (2005) **Tissue engineering of cultured skin substitutes.** Journal of Cellular and Molecular Medicine, 9(3), 592-608, Jul-Sep.
- Hymowitz, Sara G; Compaan, Deanne M; Yan, Minhong; Wallweber, Heidi J.A; Dixit, Vishva M; Starovasnik, Melissa A; de Vos, Abraham M.(2003) **The Crystal Structures of EDA-A1 and EDA-A2: Splice Variants with Distinct Receptor Specificity.** Structure, Elsevier Science. Vol. 11, 1513–1520,
- Jernvall, J. and Thesleff, I. (2000). **Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis.** Mech. Dev. 92, 19-29.
- Katoh, Yuriko y Katoh Masaru. (2006) **Hedgehog signaling pathway and gastrointestinal stem cell signaling network (Review).** International journal of molecular medicine 18: 1019-1023.
- Keystone, Edward C. y Ware, Carl F. (2010) **Tumor Necrosis Factor and Anti-Tumor Necrosis Factor Therapies.** The Journal of Rheumatology; 37: Suppl 85; doi:10.3899/jrheum.091463.
- Kikuchi, Akira; Kishida, Shosei y Yamamoto, Hideki. (2006) **Regulation of Wnt signaling by protein-protein interaction and post-translational modifications.** experimental and molecular medicine, Vol. 38, No. 1, 1-10.
- Kimber, I., Cumberbatch, M., Dearman, R.J., Bhushan, M. y Griffiths, C.E. (2000) **Cytokines and chemokines in the initiation and regulation of epidermal Langerhans cell mobilization.** Br J Dermatol, 142: 401-12.
- Kirikoshi, H y Katoh M. (2002) **Expression and regulation of WNT10B in human cancer: up-regulation of WNT10B in MCF-7 cells by beta-estradiol and down-regulation of WNT10B in NT2 cells by retinoic acid.** Int J Mol Med. Genetics and Cell Biology Section, Genetics Division, National Cancer Center Research Institute, Tokyo 104-0045, Japan.
- Kobiela, K; Pasolli, H. A; Alonso, L; Polak, L. and Fuchs, E. (2003). **Defining BMP functions in the hair follicle by conditional ablation of BMP receptor IA.** J. Cell Biol. 163, 609-623
- Kottakis ,F., Polytarchou C., Fotopoulou, P., Sanidas, I.,Kampranis, S.C. y Tsihchis, P.N. (2011) **FGF-2 regulates cell proliferation, migration, and angiogenesis**

13.- Bibliografía

- through an **NDY1/KDM2B-miR-101-EZH2 pathway**. Molecular Oncology Research Institute, Tufts Medical center, Boston, USA. Mol Cell. Jul22; 43(2):285-98.
- Laurendeau, Ingrid; Ferrer, Marcela; Garrido, Delia; D'Haene, Nicky; Ciavarelli, Patricia; Basso, Armando; Vidaud, Michel; Bieche, Ivan; Salmon, Isabelle y Szijan, Irene. (2010) **Gene Expression Profiling of the Hedgehog Signaling Pathway in Human Meningiomas**. LAURENDEAU ET AL. | MOL MED 16(7-8)262-270,
 - Laurikkala, Johanna; Pispá, Johanna; Nieminen, Pekka; Mikkola, Marja; Wang, Xiuping; Saarialho-Kere, Ulpu; Galceran, Juan; Grosschedl, Rudolf; Thesleff, Irma. (2002) **Development and Disease, Regulation of hair follicle development by the TNF signal ectodisplasin and its receptor Edar**. Development 129, 2541-2553.
 - Li, Y., Zhang, K., Ye, J., Lian, X. y Yang, T. (2011) **Wnt 10b promotes growth of hair follicles via a canonical Wnt signaling pathway**. Clinical and Experimental Dermatology. British Association of Dermatologists. 36,534-540.
 - Lizarbe, María Antonia. (2007) **Sustitutos de Tejidos: de los biomateriales a la ingeniería Tisular**. Rev.R:Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat.(Esp) Vol.101. Nº1 pp227-249.
 - Lloyd D. H., Patel A. P. (2008). **Estructura y funciones de la piel. Manual de dermatología en pequeños animales y exóticos**. Capitulo 1.
 - Lomanto, Díaz Leonardo David; Ortiz, Cala Óscar Leonel; Bretón, Pinto César Orlando; Gómez, Lizcano Álvaro Ivan; Mesa, Cornejo Viviana Matilde. (2003) **El ciclo celular** MEDUNAB; 6(16): 21 – 29.
 - López, Cepeda Larissa Dorina; De la Cruz Díaz Cabañas, Alejandro; Ramos, Garibay José Alberto. (2005) **La Piel en el Contexto de la Medicina y sus Especialidades**. Piel: 20(3):129-132.
 - Lorente, J.A; A. Esteban. (1998) **cuidados intensivos del paciente quemado** springer-verlag Iberica, PP.556.
 - Mackay DR. Y Miraliakbari R. (2006) **Skin grafts. Operative Techniques in General Story**. diciembre; 8(4); 197-206.
 - Martínez, Perez J. M. y Martínez, Rodríguez J. M; (2010) **Revisión sobre filamentos intermedios, con especial referencia a las citoqueratinas**. Revista Complutense de Ciencias Veterinarias 4(2): 1-11
 - Mathew, Sam j; Haubert, Dirk; Krönke, Martin y Leptin, María, (2009). **Looking beyond death: a morphogenetic role for the TNF signaling pathway**. Journal of cell science 122, 1939-1946, published by the company of biologists.
 - Medrano, Hernández Jessica Miriam. **Integración de células de Langerhans en un equivalente cutáneo con base dérmica de fibrina**. (Tesis) Universidad Autónoma Metropolitana, división de ciencias biológicas y de la salud, posgrado en biología experimental.
 - Medwave 2007. **Hiperandrogenismo y piel** Jul; 7(6):e1260doi:10.5867/medwave.2007.06.1260 Clínica Alemana, Santiago, Chile.
 - Miele L. (2006) **Notch signaling**. Clin Cancer Res.12:1074–1079.
 - Miele L, Miao H, Nickoloff BJ. (2006) **Notch signaling as a novel cancer therapeutic target**. Curr Cancer. Drug Targets. 6:313–323

13.- Bibliografía

- Millar, Sarah E. (2002) **Molecular Mechanisms regulating hair follicle development.** Departamento de dermatología, células y biología del desarrollo, Universidad de Pensilvania, Filadelfia, Pensilvania, U.S.A. J. Invest. Dermatol 118:216-225.
- Miller, J. R. (2001). **The Wnts.** Genome Biol. 3, reviews3001.1-3001.15.
- Moll, R; Franke, W.W; Schiller, D.L; Geiger, B. y Krepler, R. (1982) **The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells.** Cell, 31: 11-24.
- Montes, Carrasco N; Trancón, Bergas M.J; Oreja Sánchez, C; Vicente Blanco, M.V. (2011) **Efectos de la técnica de Mulligan en un paciente quemado. A propósito de un caso.** Publicado en Rev Iberoam Fisioter Kinesiol.14:90-3. - vol.14 núm 02.
- Moore, Persaud & shiota, (1996) Atlas de embriología clínica. Editorial Medica Panamericana,S.A. Alberto Alcocer,24, Madrid, España.pag.232.
- Mortier, Kathleen; Wackens Georges. (2004). **Ectodermal dysplasia anhidrotic.** Scientific Editor: Professor Antonella Tosti. Orphanet Encyclopedia.
- Mustonen, Tuija; LLmonen, Maritta; Pummila, Marja; Kangas, Aapo T; Laurikkala, Johanna; Jaatinen, Risto; Pispá, Johanna; Gaide, Olivier; Schneider, Pascal; Thesleff, Irma; Mikkola, Marja L. (2004) **Ectodysplasin A1 promotes placodal cell fate during early morphogenesis of ectodermal appendages.** Development 131(20) artículo de investigación.pp 4907-4919.
- Närhi, K., Jārvinen, E., Birchmeier, W., Taketo, M.M., Mikkola, M.L. and Thesleff, I. (2008) **Sustained epithelial Wnt/b-catenin activity induces precocious hair development but disrupts hair follicle down-growth and hair shaft formation.** Development, 135, 1019–1028.
- Noel-Hudson M, Dusse I, Collember M, Muriel M, Bonte F, Font M, Weiperre J. (1995) **Human epidermis reconstructed and synthetic membrane influence of experimental conditions on terminal differentiation.** In Vitro Cell Dev Biol;31:508-515.
- Nybakken, Kent y Perrimon Norbert. (2002) **Hedgehog signal transduction: recent findings.** Elsevier Science Ltd. Current Opinion in Genetics & Development, 12:503–511.
- Ochoa, Hernández Alejandra Berenice; Vásquez, Juárez Clara Ibet; Rosales, Reynoso Monica Alejandra; Barros, Nuñez Patricio. (2012) **La vía de señalización Wnt-β-catenina y su relación con cáncer.** Centro de Investigación Biomédica de Occidente, IMSS. Guadalajara Jalisco. México Volumen 80, No. 4, Julio-Agosto.
- Ornitz, D.M., and N. Itoh. (2001). **Fibroblast growth factors.** Genome Biol. 2:S3005. doi:10.1186/gb-2001-2-3-reviews3005
- Ortíz, Banguera Saira. (2012) **Embriología de la epidermis.** Universidad del valle. Cali-Colombia. pp27.
- 1 O uji, Yukiteru; Yoshikawa, Masahide; Shiroy, Akira y Ishizaka, Shigeaki. (2006) **Wnt-10b secreted from lymphocytes promotes differentiation of skin epithelial cells.** Elsevier. Biochemical and Biophysical research communications 342.

13.- Bibliografía

- 2 Ouji, Yukiteru; Yoshikawa, Masahide; Shiroi, Akira y Ishizaka, Shigeaki. (2006) **Promotion of hair follicle development and trichogenesis by Wnt-10b in cultured embryonic skin and in reconstituted skin.** Biochemical and Biophysical Research Communications 345.
- O'shaughnessy, Ryan F.L. y Christiano, Angela M. (2004). **Inherited disorders of the skin in human and mouse: from development to differentiation.** Departments of Dermatology and Genetics and Development, Columbia University, New York, USA. Int. J. Dev. Biol. 48: 171-179.
- Palomero, Guillermo; Vázquez, T. M; Vega, A. J; Naves, J. F; Rodríguez, C. (2000) **Lecciones de embriología**, Universidad de Oviedo, servicio de publicaciones. Pp 559.
- Pantalacci, Sophie; Chaumot, Arnaud; Benoît, Gérard; Sadier, Alexa; Delsuc, Frédéric; Douzery, Emmanuel J.P; Laudet, Vicent (2008) **Conserved Features and Evolutionary Shifts of the EDA Signaling Pathway Involved in Vertebrate Skin Appendage Development.** Published by Oxford University Press on behalf of the Society for Molecular Biology and Evolution. Mol. Biol. Evol. 25(5):912–928.
- Pérez boluda, Maite; Lara, Montenegro José; Ibañez, Mata Javier; Cagigal, González Leopoldo; León, Llerena Carlos (2006) **Guía de actuación ante el paciente quemado.** Unidad de enfermería de quemados, dirección de enfermería, Hospital R.U. Carlos Haya Málaga.
- Pipa Vallejo, A; López- Arranz Monje E; González García, M. (2006) **Tratamiento odontológico en la displasia ectodérmica.** Actualización. Av. Odontoestomatol, 22 (3): 171-176.
- Pispá, Johanna; Pummila, Marja; Barker, Philip; Thesleff, Irma y Mikkola Marja. (2008) **Edar and troy signalling pathways act redundantly to regulate initiation of hair follicle development.** Human Molecular Genetics, Vol. 17, No. 21.
- Pires-daSilva André y Somer, Ralf.(2002) **The evolution of signalling pathways in animal development.** Nature Reviews, Genetics. Vol. 4. Pp.39-49.
- Plewig, G., Jansen, T. y Schurer, N.Y. (1997) **Stratum corneum.** Hautarzt, 48: 510-20.
- Powers, C.J; McLeskey, S.W; Wellstein, A. (2000) **Fibroblast growth factors, their receptors and signaling.** Endocrine-Related Cancer /. Pp165-197.
- Priolo, Manuela y Laganá, Carmelo. (2001) **Ectodermal displasias: a new clinical-genetic Classification.**
- Pummila, Marja; Fliniaux, Ingrid; Jaatinen, Risto; James, Martyn J; Laurikkala, Johanna; Schneider, Pascal; Thesleff, Irma, Mikkola Marja L. (2007) **Ectodysplasin has a dual role in ectodermal organogenesis: inhibition of Bmp activity and induction of Shh expression.** Development 134, 117-125, doi:10.1242/dev.02708.
- Ramos, López Hans C; Gan, Acosta Antonio; Díaz, R. Jorge L; (2006) **Piel Artificial.** Revista colombiana de tecnologías de avanzada. Universidad de Pamplona, colombia. Vol. 2. Número 8. Pag.41-47

13.- Bibliografía

- Resing, K.A. y Dale, B.A. (1991) **Proteins of keratohyalin. In Physiology, Biochemistry and Molecular Biology of skin.** Ed L. A. Goldsmith, pp. 148-167 N. Y.: Osford University Press.
- Ross, Michael H. 2005. **Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular 4ª edición.** Buenos Aires, Medica Panamericana. Pp 924.
- Ross, Michael H. 2012. **Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular. 6ª Edición.** . Buenos Aires, Medica Panamericana.
- Ruggieri, Martino y Pascual-Castroviejo, Ignacio. (2008) **Hipohidrotic ectodermal displasia (HED). Neurocutaneous Disorders phakomatoses and Hamartoneoplastic Syndromes.** Institute of Neurological Science, national research council, catania, Italy, pp 957-965.
- Sako, Dianne; Grinberg, Asya; Liu, June; Davies, Montique; Castonguay, Roselyne; Maniatis, Silas; Andreucci, Amy; Pobre, Eileen; Tomkinson, Kathleen; Monnell, Travis; Ucran, Jeffrey; Martínez, Erik; Pearsall, Scott; Underwood, Kathryn; Seehra, Jasbir and Kumar Ravindra. (2010) **Characterization of the Ligand Binding Functionality of the Extracellular Domain of Activin Receptor Type IIB.**
- Salas, Alanis Julio C; Cepeda, Valdés Rodrigo; González, Santos Adriana; Amaya, Guerra Mario; Kurban, Mazen; Cristiano, Angela M. (2011) **Mutación en el gen EDA1, Ala349Thr en paciente con displasia ectodérmica hipohidrótica ligada a X.** Rev. méd. Chile vol.139 no.12 Santiago.
- Schneider, Olaf; Nau, Roland y Michel, Uwe.(2000) **Comparative analysis of follistatin-, activin beta A- and activin beta B-mRNA steady-state levels in diverse porcine tissues by multiplex S1 nuclease analysis.** European journal of Endocrinology 142: 537-534.
- Serrato, Ochoa Deyanira (2010). **Evaluación de glucosa, maltosa y trehalosa como agentes criofijadores de tejidos artificiales obtenidos por ingeniería tisular.** Tesis doctoral. Universidad de Granada, España. Facultad de Medicina.
- Shimizu, Akira; Kato Mitsuyasu; Nakao, Atsuhito; Imamura, Takeshi; Ten, Dijke Peter; Heldin, Carl-Henrik; Kawabata, Masahiro; Shimada, Shinji; Miyazono, Kohei. (1998) **Identification of receptors and Smad proteins involved in activin signalling in a human epidermal keratinocyte cell line.** Genes to cells. Vol 3, Tema 2, febrero, pp 125-134.
- Shimomura, Yutaka; Sato, Nobuyuki; Miyashita, Akinori; Hashimoto, Tsuyoshi; Ito, Masaaki. (2004) **A Rare Case of Hypohidrotic Ectodermal Dysplasia Caused by Compound Heterozygous Mutations in the EDAR Gene and Ryozo Kuwano.** the journal of investigative dermatology. 123:649 –655.
- Slavik, Marni A; Allen, Hoffmann B. Lynn; Liu, Bob Y; Alexander, Caroline M. (2007) **Wnt signaling induces differentiation of progenitor cells in organotypic keratinocyte cultures.** BMC Dev Biol; 7: 9. Published online 2007 February 17. doi: 10.1186/1471-213X-7-9

13.- Bibliografía

- Staniszewska, Marzena; Sluczanska-Glabowska, Sylwia, Drukała justyna. (2011) **Stem cells and skin regeneration**. Folia histochemica et cytobiologica. Vol.49, No 3, pp 375-380.
- Sutherland, Robert L; Hall, Rosemary E; Taylor, Lan W. (1983) **Cell Proliferation Kinetics of MCF-7 Human Mammary Carcinoma Cells in Culture and Effects of Tamoxifen on Exponentially Growing and Plateau-Phase Cells**. CANCER RESEARCH 43,3998-4006, September.
- Thurnam; John.(1848) **Two cases in which the skin, hair and teeth were very imperfectly developed**. Medical superintendent of retreat, Near York. Pp. 72-82.
- Thomas-Mudge, Rachel; Okada-Ban, Maï; Vandenbroucke, Franck; Vincent-Salomon, Anne; Girault, Jeanne; Thiery, Jean-Paul y Jouanneau, Jacqueline. (2004) **Nuclear FGF-2 facilitates cell survival *in vitro* and during establishment of metastases**. Oncogen. 23,4771-4779. Nature publishing.
- Varjosalo, Markku y Taipale, Jussi. (2008) **Hedgehog: Functions and mechanisms**. Genes. Review. Dev. 2008 22: 2454-2472
- Vázquez, Torres Nadia Adriana (2011) Expresión *in vitro* del receptor de Ectodisplasia A1 (EDAR) en queratinocitos humanos estimulados con activina A. Tesis para obtener el título de bióloga, UNAM. Facultad de Ciencias.
- Velázquez, Puerta Diego A; Pineida, Molina Catalina; Cardona, Cano María; Gómez, Suarez Nicolás; Garts, Moises Grete; Úsuga Gómez Isabel; Tróchez, Wilchez Diana; Londoño, Peláez Carolina. (2008) **Soluciones terapéuticas para la reconstrucción de la dermis y la epidermis**. Oportunidades en el medio antioqueño. Rev. Ingeniería biomédica, vol. 2, número 3, Medellín colombia. pp.77-83.
- Viladot, Voegeli A. (2000) **Lecciones básicas de biomecánica del aparato locomotor**. Editorial Springer-verlag ibérica. Pp. 342.
- Wang Z, Li Y, Banerjee S, Sarkar FH. (2008) **Exploitation of the Notch signaling pathway as a novel target for cancer therapy**. Anti-Cancer Res. 28:3621–3630
- Waseem, Ahmad; Leigh, Irene M. The skin. (2006) **Embryos, Genes and Birth Defects**, Second Edition Edited by Patrizia Ferretti, Andrew Copp, Cheryll Tickle and Gudrun Moore, John Wiley & Sons, Ltd. ISBN: 978-0-470-09010-7
- Watt, Fiona M; Estrach, Soline; Ambler, Carrie A. (2008). **Epidermal Notch signalling: differentiation, cancer and adhesion**. Current Opinion in Cell Biology. 20:171–179.
- Welsch, Ulrich. 2008 Welsch sobotta: **histologia (2ª ed.)** panamericana, pp. 699 isbn 9788498351781.
- Wolff, Klaus; Goldsmith, Lowell A; Kats, Stephen I; Gilchrest Barbara A; Paller, Amy S; Leffell, David J.(2009) **FITZPATRICK. DERMATOLOGÍA EN MEDICINA GENERAL**. Tomo 2, 7ª edición. Editorial medica panamericana, Buenos Aires Argentina.
- Yang, Jingxuan; Meyer, Michael; Müller, Anna-Katharina; Böhm, Friederike; Grose, Richard; Dauwalder, Tina; Verrey, Francois; Kopf, Manfred; Partanen, Juha; Bloch, Wilhelm; Ornitz, David M; Werner, Sabine. (2010) **Fibroblast growth factor**

13.- Bibliografía

receptors 1 and 2 in keratinocytes control the epidermal barrier and cutaneous homeostasis. J. Cell Biol. Vol. 188 No. 6 935–952.

- Zhang, X., O.A. Ibrahimi, S.K. Olsen, H. Umemori, M. Mohammadi, and D.M. Ornitz. (2006) **Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family.** J. Biol. Chem. 281:15694–15700. doi:10.1074/jbc.M601252200.
- **Zhang, Y., Tomann, P., Andl, T., Gallant, N. M., Huelsken, J., Jerchow, B., Birchmeier, W., Paus, R., Piccolo, S., Mikkola, M. L. et al.** (2009). Reciprocal requirements for EDA/EDAR/NF- κ B and Wnt/b-catenin signaling pathways in hair follicle induction. *Dev. Cell* **17**, 49-61.
- Zurita, Malavé Elba Rahil; Gallardo, Lucia Aracelys; Cohen, Raquel Carolina; Ferreira, Marycarmen. (2008) **Embriología cutánea.** Dermatología Venezolana. Vol.46, N°4. Pp5-11.

Otras:

- Imagen de las capas de la piel A.D.A.M: <http://www.clinicadam.com/imagenes-de-salud/8912.html>
- Imagen del desarrollo embrionario del folículo piloso: Keith L Moore; T V N Persaud; Kohei Shiota; Pérez de Miguelanz. Editorial:Madrid : Médica Panamericana, ©1996. En: <http://books.google.com.mx/books?id=9IM29zR7kaAC&pg=PA231&lpg=PA231&dq=embriolog%C3%ADa+de+la+piel&source=bl&ots=RRgcBDannN&sig=fH6VD6213InC-QQuKNc0VNCEe9E&hl=es-419&sa=X&ei=R4NKUdzoEuiE2QWZvIDoBA&ved=0CFUQ6AEwBw#v=onepage&q&f=false>
- Secretaria de Salud pública de México, comunicado de prensa número 131. http://www.salud.gob.mx/ssa_app/noticias/datos/2012-04-11_5690.html. 12/07/12 2:00pm
- Rev Chil Pediatr 76 (2); 166-172, 2005 en http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0370-41062005000200007&script=sci_arttext
- <http://www.qiagen.com/Products/Genes%20and%20Pathways/Complete%20Biology%20List/Hedgehog%20Signaling/>; 14/04/2013. 8:19 pm
- (ficha técnica TGR BioSciences <http://www.tgrbio.com/home.html>. 11:32am)
- <http://www.lifescienceslab.com/es/noticias/novedades-de-productos/millipore-introduce-nuevas-herramientas-para-estudios-con-celulas-epiteliales/> 3:21 21/04/2013
- <http://www.biohorizons.com/documents/MLD102.pdf>
- http://www.apligraf.com/professional/what_is_apligraf/index.html
- <http://heridas.smith-nephew.es/pro-biobrane.html>
- http://www.medscape.com/viewarticle/583984_3
- http://www.ilstraining.com/bmwd/bmwd/bmwd_it_01.html

14.- Anexos

Medio de fibroblastos: 89% DMEM, 10% Suero bovino Fetal, 1% antibiótico-antimicótico

Medio de cultivo queratinocitos:

EpiGRO™ Human Epidermal Keratinocyte Complete Media Kit, Millipore

Medio MCF7: 88% DMEM, 10% suero bovino Fetal, 1% antibiótico-antimicótico, 1% AA no esenciales

- Adicionar 1×10^{-7} de estradiol por cada 100 ml para estimular los receptores de estrógeno de las células y así una producción de WNT10B.

Hanks 1litro: KCl .04gramos, KH₂PO₄ 0.06 gramos, NaCl 8 gramos, NaHCO₃ 0.35, gramos, Na₂HPO₄ 0.048 gramos * .7H₂O .9gramos, H₂O 10000 ml, Glucosa 1 gramo,

Tripsina /EDTA 100ml : Tomar 10 mililitros de Hanks, colocar 90 mililitros de agua destilada y agregar Tripsina 0.05gramos, EDTA 0.02 gramos.

Andamios base dérmica de fibrina (formula original): Plasma sanguíneo 10 ml, Cloruro de sodio 12 ml, Suspensión celular 1 ml , Acido tranexámico 200 microlitros, Cloruro de calcio 2 ml.

Formula modificada: Plasma sanguíneo 17 ml, Cloruro de sodio 3.5 ml, Suspensión celular 1 ml, Acido tranexámico 450 microlitro, Cloruro de calcio 5 ml

Medio de congelación celular: DMEM 80% + SFB10%+ DMSO 10%.

Elaboración de dispasa 10x 5 ml: 500 microlitros de SBF, 500 microlitro de antibiótico, .05gramos de dispasa.

Anticuerpos:

Cada uno de los anticuerpos se utilice en concentración 1:100.

Anti Queratina 5.- Thermo Scientific, Prod#MAI-39412, Pierce Anti-keratin 5, rabbit monoclonal Antibody.

Anti EDAR.- Gene Tex. EDAR antibody, GTX109388

pCNA (c-20) SC-9857, lot#DO12 Santa Cruz Biotechnology.