

DOCTORADO en CIENCIAS BIOMÉDICAS



Papel eferente de las neuronas del ganglio de la raíz dorsal en el recambio y la reparación epitelial en la piel de la rata

Tesis de Doctorado
Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas
Universidad Nacional Autónoma de México

Alumno

EDUARDO MARTÍNEZ MARTÍNEZ

Tutor principal

DR. GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Para la Choma

SINODALES

Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles

Dr. Rudolf Marinus Buijs

Dr. Patricio Gariglio Vidal

Dr. Armando Pérez Torres

Dr. José Juan Antonio Ibarra Arias

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina por todos estos años en los que me ha brindado su apoyo incondicional y me ha dado la libertad para emprender algunas aventuras experimentales. Mi más sincero agradecimiento.

Al Dr. Ricardo Tapia y al Dr. Froylán Gómez Lagunas por sus críticas y supervisión durante los tutorales.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de mis estudios doctorales (número de becario 186324). Así como, a la DGEP-UNAM por la beca complementaria para estudiantes de doctorado.

Este trabajo no habría sido posible sin el financiamiento otorgado al laboratorio del Dr. Gabriel Gutiérrez por la DGAPA-PAPIIT al proyecto IN210105 y por el CONACyT a los proyectos 38615N, 45872M y 53194 (Fomento a la formación de doctores). Además el trabajo contó con el apoyo del proyecto IMPULSA-02 de la Coordinación de la Investigación Científica de la UNAM.

Quiero agradecer a Brenda Toscano y a Claudio Galván por su valiosa ayuda durante las distintas etapas en las que se incorporaron al proyecto. Quedaré siempre en deuda por la paciencia que me tuvieron, ya que yo tuve que aprender a idear una forma de cómo hacerme entender y que pudiéramos trabajar coordinados.

Mi trabajo tampoco habría sido posible sin la ayuda de muchos de los laboratorios del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Gracias por los reactivos, equipo y ayuda que encontré en el momento justo.

En especial quiero agradecer al Dr. Alfonso González Noriega, a la Dra. Clórida Arias, al Dr. Jesús Chimal, a la Dra Ivett Caldelas y al Dr. Horacio Merchant.

A todos los miembros del laboratorio con los que conviví en sus distintas etapas: Julieta, Miguel, Horacio, Leonora, Raquel, Ingrid, Marce, Itzel, Belén, Paulina, Dannia, Lillian, Jimena....interminable la lista, así como los recuerdos que me llevo.

A Eileen siempre pendiente y dispuesta a ayudarme. Gracias por todos los textos leídos, incluida esta tesis, a la cual le corregiste muchos de los errores que ya no veía.

A Patricia Padilla que durante sus años de labor en el laboratorio siempre estuvo al pendiente de que reactivos, equipo e instalaciones estuvieran siempre listos para el trabajo. Pero mucho más agradezco tu amistad y pláticas a lo largo de estos años. Gracias Paty.

No puedo dejar de mencionar al dúo Paty y Mary Carmen que hicieron muy llevaderas las interminables horas frente al microscopio DSU. Habría sido un infierno sin sus atenciones.

Al Master de Master Don Marco que ya no me van a alcanzar los dedos para contar las veces que me has salvado. Sin tu ayuda esta tesis no tendría el formato editorial que le diste. Muchas Gracias.

A Lucy Brito, Martha Cariño, Erasto Brito y Mary por estar siempre dispuestos a brindar apoyo para conseguir material bibliográfico a toda costa.

A la Vecina que con todo y sus amarguras me daba ánimos y me presionaba cuando era necesario para no perder tiempo.

Gracias a la Choma y al Modosán. Ni diciendo mil veces gracias podría expresar lo mucho que significó su apoyo durante estos años de educación. Por ustedes llegué aquí, ya que por consentirme tanto pude dedicarme de tiempo completo a mis locuras. Espero recompensarlos algún día.

ÍNDICE

ABSTRACT	5
RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
1.1 Las neuronas del ganglio de la raíz dorsal: citología, fisiología y neuroquímica	9
1.2 Neuropéptidos: CGRP y Sustancia P	11
1.2.1 CGRP	11
1.2.2 Sustancia P	12
1.2.3 Síntesis y liberación de neuropéptidos	13
1.3 Anatomía de la piel	14
1.3.1 Folículo piloso y el nicho de células troncales de la protuberancia	16
1.3.2 Inervación en la piel de los mamíferos	20
1.4 Funciones eferentes de las neuronas del ganglio de la raíz dorsal en la piel de los mamíferos	23
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVO	28
2.1 Objetivos específicos.....	29

RESULTADOS	31
3.1 Fibras intraepidérmicas PGP ⁺ en ratas control y tratadas con capsaicina	31
3.2 Fibras intraepidérmicas CGRP ⁺ en ratas control y tratadas con capsaicina	34
3.3 Doble marcaje de las fibras intraepidérmicas con tubulina β III y CGRP	36
3.4 Evaluación de la proliferación de los queratinocitos en la piel glabra	39
3.5 Tiempo de cerrado de las heridas en la piel del lomo	41
3.6 Evaluación de la proliferación epitelial en la piel herida del lomo	42
3.7 Evaluación de la migración celular del folículo a la epidermis	45
3.8 Activación epitelial alrededor de la herida	49
3.9 Inervación sensorial alrededor de la herida	52
3.10 Receptores de neuropéptidos en el nicho de la protuberancia	56
DISCUSIÓN	59
CONCLUSIONES	79
MATERIALES Y MÉTODOS	71
BIBLIOGRAFÍA	83
ANEXOS	93

ABSTRACT

Neurons at sensory ganglia are widely known for their ability to transmit external or internal information toward the central nervous system. However, it has been proposed that the main function of sensory neurons expressing neuropeptides such as substance P (SP) and calcitonin gene-related peptide (CGRP) is to promote tissue renewal and maintenance. Recently, it was found that the axons of the peptidergic neurons are strongly related with epithelial structures. Remarkably, there are synaptic-like specializations in the membranes of both keratinocytes and nerves. However, little is known about the relevance of the peptidergic terminals on keratinocyte physiology. Moreover, it is not known whether peptidergic innervation can influence skin stem cells on which relies the homeostasis of the epithelia. In this study, we decided to explore how the renewal and repair of the rat epidermis was altered after chemical denervation induced by capsaicin. We used different labeling experiments with thymidine analogs to follow keratinocytes and used different neuronal markers to analyze the sensory innervation. Quantitative analysis of both parameters was performed using design-based stereological methods. We found that capsaicin greatly reduces intraepidermal nerve fibers, but mainly peptidergic fibers remain after treatment. In normal conditions, there were no differences on keratinocyte proliferation in glabrous skin between control and treated rats. After wounding the back skin, the epidermis of treated rats showed less proliferation. Moreover, follicle stem cells mobilization toward the epidermis was impaired in treated rats. Notably, stem cells in the hair bulge express neuropeptide receptors for SP and CGRP. Overall, we propose that peptidergic neurons of dorsal root ganglion interact with stem cells and its progeny to modulate epithelial renewal and repair.

RESUMEN

La función clásicamente atribuida a las neuronas del ganglio de la raíz dorsal o neuronas sensoriales es la de transmitir información hacia el sistema nervioso central. Sin embargo, se ha propuesto que las neuronas sensoriales, que sintetizan péptidos como la sustancia P (SP) y el péptido relacionado al gen de la calcitonina (CGRP), también participan en el mantenimiento estructural y funcional de los tejidos. Aunque se ha descrito que las terminales peptidérgicas se relacionan anatómicamente con el epitelio de la piel, se conoce muy poco acerca de cómo la inervación peptidérgica influye sobre la fisiología de los epitelios. Mucho menos se sabe si la inervación peptidérgica puede interactuar con las células troncales de la piel, las cuales son indispensables para el recambio de los queratinocitos. Por eso, exploramos cómo se alteraba el recambio y la reparación de la epidermis de la rata después de la denervación química por capsaicina. Para ello, se realizaron diversos protocolos de marcaje con análogos de timidina e inmunotinciones de nervios sensoriales que fueron cuantificados por métodos estereológicos. En este trabajo encontramos que si bien la denervación química por capsaicina elimina gran parte de las fibras intraepidérmicas de la piel glabra, las que prevalecen después del tratamiento son de tipo peptidérgico. En estas condiciones, la proliferación de la epidermis fue semejante entre ratas control y tratadas. Sin embargo, la activación de proliferación en la epidermis de las ratas tratadas fue menor tras hacer una herida en el lomo. Además, en las ratas tratadas se observó una menor movilización de las células troncales del folículo hacia la epidermis. Notablemente, el nicho de células troncales del folículo presentó los receptores de los neuropéptidos SP y CGRP. Con base en estos resultados, proponemos que las neuronas peptidérgicas del ganglio de la raíz dorsal modulan el recambio y la reparación epitelial al interactuar con las células troncales del epitelio.

INTRODUCCIÓN

En el ganglio de la raíz dorsal (DRG, por sus siglas en inglés) existe una población neuronal encargada de detectar estímulos mecánicos y otra de detectar estímulos dolorosos y térmicos. Tradicionalmente se considera que la función exclusiva de estas dos subpoblaciones es la de transmitir información sensorial desde receptores especializados en la periferia hacia el cerebro, a través de una serie de relevos neuronales (función aferente). Sin embargo, un grupo de neuronas en el DRG, asociadas con el procesamiento de información nociceptiva, también presenta la capacidad de liberar algunos neuropéptidos y regular, así, diversos procesos en el blanco inervado (función eferente)¹⁻³.

De hecho una de las características más sobresalientes de la inervación sensorial es su presencia en prácticamente todas las regiones del cuerpo del mamífero incluyendo piel, músculo liso, epitelios, vísceras, órganos linfoides, dientes y hueso. En algunos de estos sitios las terminales sensoriales que contienen neuropéptidos establecen contactos parecidos a una sinapsis con diversos tipos celulares como las células de Langerhans, melanocitos, células cebadas y células óseas⁴⁻⁷. En los sitios donde no hay un blanco definido como en las glándulas, músculo liso y tejido linfoide, se postula que las terminales peptidérgicas inducen sus efectos mediante liberación paracrina¹. Un aspecto a resaltar

de los estudios anatómicos es que las terminales peptidérgicas han sido descritas en sitios que difícilmente serían activados por estímulos nociceptivos durante la vida de un organismo. Además, cabe resaltar que aproximadamente el 50% de las neuronas consideradas como nociceptores expresan al menos un tipo de neuropéptido. Al respecto, se ha propuesto el término *nociefector* para referirse a aquellas neuronas peptidérgicas cuya principal acción biológica es la de modular diversas funciones en los tejidos que expresan los receptores para los neuropéptidos¹.

A lo largo de varias décadas se ha documentado que la inervación sensorial está ligada al mantenimiento y renovación tisular. A principios del siglo XX, se describió por primera vez que además de su función sensorial las neuronas del DRG tienen también la capacidad de modular el flujo sanguíneo en la piel^{8,9}. Asimismo, se ha observado que los denominados cambios tróficos de la piel, que incluyen alteraciones estructurales y funcionales en la epidermis, uñas y tejidos subcutáneos, están relacionados con una pérdida de la inervación sensorial causada por algún daño mecánico o una neuropatía periférica. Además, la falta de inervación sensorial podría ser uno de los elementos que dificultan la reparación de úlceras cutáneas en pacientes con hemiplejias y diabetes. Esto ha llevado a postular que una de las funciones de los nervios sensoriales en la piel es promover el recambio epitelial. Sin embargo, poco se sabe acerca de las funciones específicas que los nervios sensoriales inducen sobre los queratinocitos y de los mensajeros neuronales que pudieran inducir estos efectos. Mucho menos se conoce si los nervios sensoriales influyen sobre los nichos de células troncales, los cuáles son proveedores de precursores epiteliales para cambiar a las células viejas y dañadas de la epidermis. El presente trabajo estuvo enfocado a estudiar la función eferente de los nervios sensoriales sobre los queratinocitos de la piel de la rata en condiciones normales y de lesión.

Las neuronas del ganglio de la raíz dorsal: citología, fisiología y neuroquímica

En general se han descrito dos grandes clases de neuronas en los ganglios sensoriales con base en el tamaño del cuerpo celular, apariencia del citoplasma, diámetro axonal y contenido de mielina en el axón. Por su apariencia en el microscopio, las neuronas del DRG se subdividen en células grandes y claras (también denominadas células A) y células pequeñas y oscuras (o células B)^{10,11}. Por estudios inmunohistoquímicos ha sido establecido que la apariencia clara es dada por un contenido alto de las subunidades de neurofilamentos de 150 y 200 kDa¹². De igual manera, las neuronas oscuras tienen un citoesqueleto principalmente compuesto por la proteína de filamentos intermedios denominada periferina^{13,14}. Además de estas características citológicas, es sabido que las propiedades eléctricas como la velocidad de conducción axonal correlaciona con el tamaño del soma y el diámetro de la fibra¹⁵. Así, las neuronas grandes y claras (diámetro >35 μm) corresponden a las neuronas con axón mielinizado^{12,16,17}. Estos axones de gran calibre y mielinizados son conocidas como fibras A y son divididas en tres subgrupos: α , β y δ , de la más rápida a la más lenta. Por su parte, las neuronas pequeñas y oscuras (<20 μm) dan lugar a las fibras C las cuales son fibras amielínicas y, consecuentemente, las fibras más delgadas y lentas entre los nervios sensoriales^{15,18}. Sin embargo, la relación entre los parámetros anatómicos y propiedades funcionales no aplica de manera estricta a las neuronas de tamaño medio (20-35 μm). Por ejemplo, algunas células A δ que tienden a la población grande son negativas para neurofilamentos y otras neuronas A δ que tienden hacia la población pequeña son positivas para neurofilamentos^{16,19}.

Por otro lado, comúnmente se considera que las neuronas grandes están dedicadas exclusivamente a detectar estímulos mecánicos y las neuronas pequeñas a detectar

estímulos dolorosos y térmicos. Sin embargo, esta clasificación es una simplificación de la heterogeneidad de las neuronas del DRG. Tanto en la población grande, media y pequeña existen neuronas que responden a estímulos nociceptivos e inocuos²⁰⁻²².

En varios vertebrados como roedores, primates, felinos, aves y reptiles se ha descrito la presencia de neuronas peptidérgicas en los ganglios sensoriales^{21,23-25}. La proporción de estas neuronas varía dependiendo de la especie y dentro de una especie varía según el nivel de la médula espinal (i.e. cervical, torácico, lumbar o sacro). Sin embargo, en las diferentes especies se ha observado que la población peptidérgica se compone mayoritariamente de una subpoblación de neuronas con fibras C y en menor medida de una subpoblación con fibras A^{21,24,26,27}. Aunque el contenido de neuropéptidos está asociado con la modulación del dolor, recientemente se ha documentado que una fracción de neuronas peptidérgicas no procesa exclusivamente estímulos dolorosos^{20-22,27,28}. Los esfuerzos para relacionar un fenotipo neuroquímico que prediga una modalidad sensorial no han sido exitosos. Algunas neuronas del DRG tienen un programa genético para expresar neuropéptidos, otras adquieren el fenotipo sólo cuando entran en contacto con el blanco en fases tardías del desarrollo embrionario²⁹⁻³¹. Aparentemente, el fenotipo peptidérgico está relacionado con la ubicación de las terminales periféricas en el blanco, más que a una modalidad sensorial en particular^{21,27,28}. De hecho, se ha postulado que las neuronas peptidérgicas constituyen un sistema que probablemente carece de una función sensorial². No obstante, existe la controversia de si la misma población es capaz de realizar tanto la función aferente como la eferente, o si son dos poblaciones independientes. Por razones de conveniencia nos referiremos a aquellas neuronas sensoriales con capacidad eferente como neuronas peptidérgicas o nociefectores, asumiendo que si una neurona presenta vesículas con péptidos en la terminal periférica es para llevar un mensaje específico que ayude a mantener la homeostasis del tejido, independientemente de si la neurona transmite un estímulo sensorial y si este es o no un estímulo nocivo¹.

Los principales péptidos sintetizados por las neuronas del DRG son la sustancia P y el péptido relacionado al gen de la calcitonina (CGRP). Además, las neuronas del DRG también sintetizan otros péptidos como la somatostatina, el neuropéptido Y, la galanina, el polipéptido intestinal vasoactivo, el péptido activador de la adenilato ciclasa y algunos opioides.

1.2.

Neuropéptidos: CGRP y sustancia P

1.2.1

CGRP

El CGRP pertenece a una familia de péptidos con propiedades vasoactivas que incluyen a la calcitonina, la adrenomedulina y la amilina³². Existen dos isoformas: α -CGRP y β -CGRP. Dichas isoformas son diferentes por un aminoácido en la rata y por tres en el humano^{33,34}. El sitio principal de síntesis de α -CGRP en el sistema nervioso periférico es el DRG; mientras que β -CGRP se expresa preferentemente en neuronas entéricas. En el DRG de roedores, la concentración de α -CGRP es de tres a seis veces más alta que la de β -CGRP³⁵⁻³⁷. CGRP recibe este nombre porque se deriva del procesamiento alternativo del transcrito del gen *Calca* que también codifica para la hormona calcitonina^{38,39}. La traducción del transcrito para CGRP codifica un péptido de 121 y 128 aminoácidos en la rata y en el humano, respectivamente. Los primeros 25 residuos son la señal para dirigir al péptido al retículo endoplásmico, los siguientes 103 residuos constituyen lo que se denomina proCGRP. El péptido final de 37 aminoácidos se obtiene al eliminar por corte proteolítico dos péptidos que flanquean al proCGRP⁴⁰.

Por medio de estudios funcionales se han identificados dos tipos de receptores: CGRPR1 y CGRPR2⁴¹⁻⁴³. Ambos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores

acoplados a proteínas G, pero sólo de CGRPR1 se ha identificado el gen y la proteína correspondiente. A través de técnicas de biología molecular se determinó que el CGRPR1 es un heterodímero compuesto por la proteína receptora parecida al receptor de calcitonina (CRLR o CLR) y la proteína modificadora de la actividad del receptor 1 (RAMP1). Esta última proteína es requerida para transportar al CLR a la membrana plasmática y controlar el patrón específico de glicosilación que determina la afinidad por el CGRP⁴⁴. Los efectos biológicos en los que está involucrado CGRP como la activación de células del sistema inmunológico y la vasodilatación son terminados por la acción de una serie de proteasas entre las que se incluyen la endopeptidasa neutra, la triptasa y la quimiotripsina.

1.2.2 Sustancia P

La sustancia P (SP) pertenece a la familia de las taquiquininas que son péptidos que conservan la secuencia FXGLM-NH₂ en el carboxilo terminal. El gen preprotaquiquinina A codifica para el mensajero TAC1 que requiere de procesamiento alternativo para dar lugar a la SP, a la neuroquinina A, al neuropéptido K y al neuropéptido γ ^{45,46}. Después de este procesamiento y traducción se obtiene la forma activa de la SP que es un péptido de 11 aminoácidos^{47,48}.

Los efectos de las taquiquininas son mediados por una familia de tres receptores acoplados a proteínas G de tipo metabotrópico: receptor de neuroquinina 1 (NK-1), receptor de neuroquinina 2 (NK-2) y receptor de neuroquinina 3 (NK-3). De estos receptores, NK-1 es el que presenta mayor afinidad por la SP. La endopeptidasa neutra y la enzima convertidora de angiotensina son enzimas claves para la inactivación de la SP⁴⁹.

1.2.3

Síntesis y liberación de neuropéptidos

El CGRP y la SP son expresados en grandes cantidades de manera normal en las neuronas del DRG lo cual sugiere que están listos para usarse en el momento que sean requeridos. Una gran proporción de las neuronas con capacidad para liberar neuropéptidos son distinguidas por su susceptibilidad a la capsaicina. La capsaicina es el ingrediente picante en los chiles del género *Capsicum* y ha sido una herramienta farmacológica y clínica muy valiosa ya que ha permitido el estudio de la función aferente y eferente de las neuronas del DRG⁵⁰⁻⁵². Varios estudios han mostrado que la capsaicina es capaz de inducir inflamación neurogénica mediante la liberación de SP y CGRP de las terminales periféricas. La capsaicina induce la liberación peptidérgica a través de la activación del receptor de potencial transitorio a vaniloide 1 (TRPV1), aunque otros miembros de la familia de los TRP pudieran estar involucrados⁵³. El TRPV1 es un canal no selectivo de cationes que también puede ser abierto por estímulos nociceptivos^{54,55}. En diferentes preparaciones se ha observado que tanto temperaturas altas (40-50 °C) como la estimulación ácida promueven la liberación de CGRP a través de un mecanismo que depende de TRPV1 y de la presencia de calcio⁵⁵⁻⁵⁸. A la fecha, se han descubierto sólo unos cuantos ligandos endógenos que produzcan efectos similares a la capsaicina como son la anandamida, arquidonato y el diacilglicerol^{59,60}. Otras moléculas que promueven la liberación de péptidos son los mediadores inflamatorios como la histamina, la bradiquinina y las citocinas como IL-1 β y TNF- α ^{57,61,62}. Entre los péptidos que inhiben la liberación de neuropéptidos se encuentran la nociceptina y algunos opioides⁶³⁻⁶⁸.

La síntesis de CGRP y SP no sólo está condicionada por su propia liberación, sino que es influenciada por diversos factores. De manera normal, los factores de crecimiento como las neurotrofinas y algunas hormonas regulan la síntesis de estos neuropéptidos. En condiciones inflamatorias la IL-1 β aumenta la cantidad del mRNA de preprotaiquinina

y el contenido de SP⁶⁹. Ciertas condiciones como la hipertensión, el género, el embarazo, las lesiones a los nervios y la edad afectan la expresión genética y la cantidad de neuropéptidos^{35,70-72}. En ratas el mensajero de CGRP y el CGRP pueden disminuir o aumentar dependiendo de la causa que provoque la hipertensión^{71,73}. En cuanto a las diferencias por dimorfismo sexual, los machos presentan una mayor proporción de células inmunorreactivas a CGRP en los DRG del nivel lumbar y sacro, a diferencia de las hembras en las cuales el 17 β -estradiol pudiera inhibir la expresión de este péptido⁷². En las ratas y los humanos la concentración del CGRP en plasma aumenta durante el embarazo y disminuye en el periodo posparto^{74,75}. La lesión mecánica a los nervios sensoriales, y en menor grado el envejecimiento, reduce el contenido de CGRP, SP y somatostatina; pero aumenta el contenido del péptido intestinal vasoactivo, la galanina y el neuropéptido γ ^{76,77}.

1.3.

Anatomía de la piel

Todos los organismos se caracterizan por tener una barrera que los separa del medio exterior. La piel de los mamíferos es la cubierta que previene la deshidratación, impide la entrada de microorganismos y protege contra la radiación⁷⁸. Sin embargo, la piel no es sólo una barrera física, es un órgano muy sofisticado en donde converge el sistema inmunológico, vascular, endocrino y nervioso. Su conexión con el sistema nervioso le permite, entre otras cosas, el reconocimiento y la evaluación del ambiente para evitar estímulos nocivos. Por su parte, las células inmunes presentes en la piel son la primera línea de defensa, para el reconocimiento de elementos extraños al cuerpo.

De manera general, la piel de los mamíferos se compone de tres capas: la epidermis, que es un epitelio plano estratificado con estrato córneo y avascular; la dermis, que se compone principalmente de fibroblastos y tejido conjuntivo laxo y

denso^{79,80}. La impermeabilidad y parte de la resistencia de la piel están determinadas en gran medida por la integridad de la epidermis. Estas propiedades son el resultado de la composición estructural de los queratinocitos y de su organización dentro de la epidermis. Los queratinocitos representan aproximadamente el 90-95% de las células presentes en la epidermis y reciben este nombre porque el principal componente de su citoesqueleto son los filamentos intermedios de queratina. La expresión de queratinas varía dependiendo de la localización de los queratinocitos en la epidermis y de su estado de diferenciación. La epidermis, además, contiene otros tres tipos celulares: los melanocitos, las células de Langerhans y las células de Merkel. Los melanocitos producen el principal pigmento cutáneo, la melanina. Las células de Langerhans son células especializadas del sistema inmune cuya función es la presentación de antígenos. Las células de Merkel están asociadas a terminales nerviosas y en conjunto funcionan como receptores táctiles (mecanorreceptores) de adaptación lenta. La epidermis se subdivide en cuatro capas de la más profunda a la más superficial: el estrato basal (o germinativo), el estrato espinoso, el estrato granuloso y el estrato córneo. Las células del estrato basal se encuentran unidas a la membrana basal que separa a la dermis de la epidermis. Además de contener queratinocitos diferenciados, el estrato basal contiene células troncales y una población de células amplificadoras. Las principales queratinas expresadas en este estrato son la citoqueratina 14 (CK14) y la CK5. En el estrato espinoso se localizan queratinocitos con una capacidad de división limitada y que expresan principalmente las queratinas CK1 y CK10. El estrato granuloso está formado por queratinocitos que han perdido su capacidad proliferativa y presentan las queratinas CK2 y CK11. Además, estos queratinocitos se caracterizan por contener gránulos de queratohialina y cuerpos lamelares que contienen glicoproteínas, glicolípidos, fosfolípidos, lipasas, proteasas, fosfatasas y glicosidasas. Finalmente, el estrato córneo está compuesto de varias capas superpuestas de células aplanadas, queratinizadas y anucleadas (corneocitos).

La dermis es una capa fibroelástica formada por tejido conjuntivo rico en fibras de colágena. El principal tipo celular que se encuentra inmerso en este compartimento son las células productoras de tejido conjuntivo denominadas fibroblastos. La colágena es el componente más abundante de la dermis, representa el 75% del peso seco de la piel y es el responsable de dar a la piel su especial firmeza y elasticidad. En la dermis se encuentra el sistema vascular y el resto de las células del sistema inmune como son los macrófagos, células cebadas o mastocitos y linfocitos.

Además, en la dermis se encuentran los denominados apéndices cutáneos como las glándulas sudoríparas, glándulas sebáceas, glándulas mamarias y folículos pilosos.

1.3.1

Folículo piloso y el nicho de células troncales de la protuberancia

El pelo es uno de los rasgos distintivos de los mamíferos y está involucrado en una variedad de funciones entre las cuales se puede mencionar la termorregulación, la protección física, el camuflaje, las funciones táctiles y la dispersión del sudor y el sebo. El pelo o unidad pilosebácea está constituido por el tallo del pelo, un folículo piloso, una glándula sebácea y el músculo piloerector (Fig. 1). La formación del pelo ocurre básicamente durante la etapa fetal y el desarrollo perinatal de la piel. Sin embargo, también pueden generarse nuevos folículos pilosos después de una lesión cutánea en mamíferos adultos^{81,82}.

El folículo piloso es uno de los pocos órganos del cuerpo que atraviesa por ciclos continuos de degeneración y regeneración. El ciclo tiene una fase de crecimiento (anágeno), una de retracción mediada por apoptosis (catágeno) y otra de reposo (telógeno)⁸³. En cada ciclo se forma un nuevo tallo del pelo y el tallo viejo eventualmente es desplazado en un proceso denominado exógeno. La generación del nuevo tallo

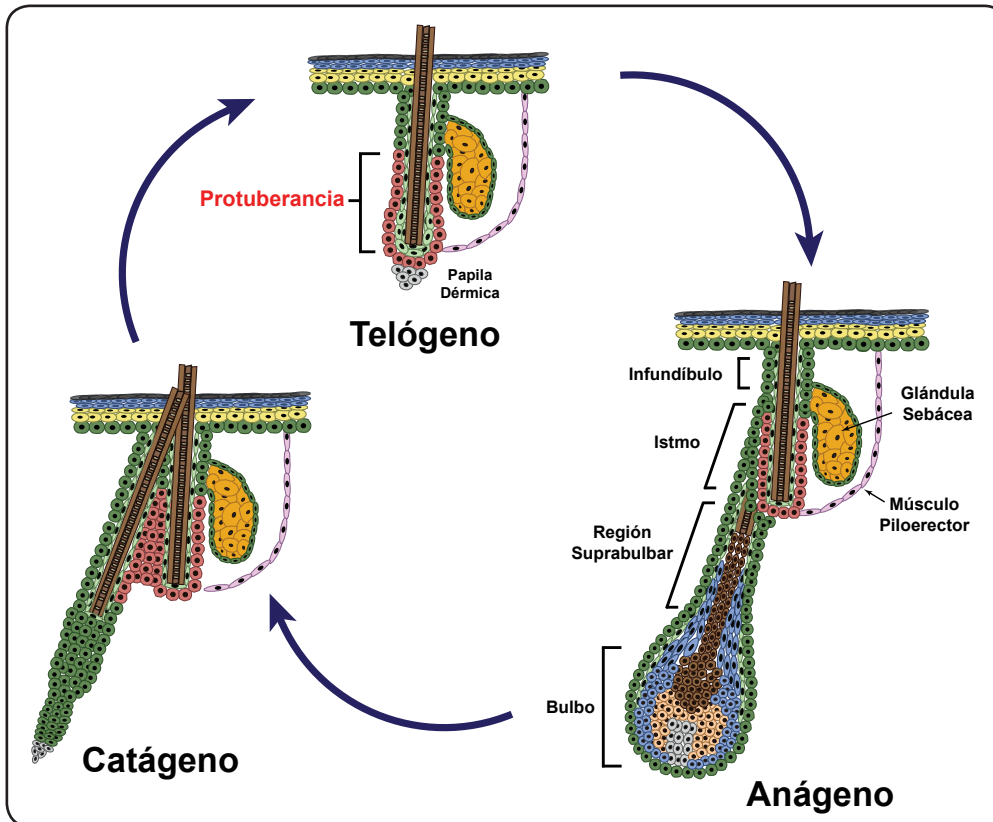


Fig 1. Estructura de la unidad pilosebácea y ciclo de crecimiento del pelo. El pelo o unidad pilosebácea atraviesa por remodelaciones estructurales durante el crecimiento del pelo. En la fase de reposo o telógeno el folículo tiene su menor extensión. Al activarse el crecimiento (fase de anágeno) se genera la región suprabulbar. Durante la fase de regresión o catágeno la parte inferior a la protuberancia se degenera.

depende de la activación de un grupo de células troncales que residen en la zona de la protuberancia (esta zona es conocida en inglés como *bulge*) del folículo. En roedores, el ciclo de crecimiento de los folículos dura alrededor de 4 semanas^{84,85}. El crecimiento del pelo responde a varios factores de crecimiento, citocinas, neuropéptidos y hormonas⁸⁶. El folículo piloso maduro (anágeno) puede ser dividido en la parte superior que es permanente y la parte inferior que se remodela en cada ciclo (Fig. 1). La parte superior incluye al infundíbulo que es el canal de apertura a la superficie de la piel y el istmo que abarca del sitio de inserción del canal de la glándula sebácea hasta el sitio de inserción del músculo piloerector. La parte inferior está conformada por el bulbo del pelo que es donde se diferencian las células que dan lugar al tallo. Cabe mencionar que en la parte inferior del istmo es donde reside un grupo de células troncales. En esta región generalmente se observa un ensanchamiento del epitelio desde el primer ciclo de crecimiento y que se hace más evidente a partir del segundo ciclo porque ahí se localiza el resto del tallo del ciclo anterior. Por este motivo, esta región es denominada como

la zona de la protuberancia⁸⁷. Esta zona está separada del bulbo del pelo por epitelio suprabulbar.

En el folículo maduro se pueden distinguir ocho capas concéntricas de células que se caracterizan por la expresión diferencial de queratinas^{88,89}. De afuera hacia adentro, la primer capa es la vaina radicular externa seguida de la capa adyacente, de la vaina radicular interna y del tallo del pelo. La vaina radicular interna se compone de tres capas: la capa de Henle, la capa de Huxley y la cutícula de la vaina interna. El tallo del pelo se compone de la cutícula, la corteza y la médula. La generación y renovación de todas las capas del folículo piloso se da mediante la proliferación de precursores epiteliales derivados de los nichos de células troncales localizados en la vaina radicular externa.

Todos los epitelios se caracterizan por su continuo recambio de células viejas o dañadas. El proceso por el cual se lleva acabo este reemplazo celular se denomina homeostasis tisular y depende de la presencia de células troncales⁹⁰. Las células troncales son funcionalmente definidas por su capacidad de autorrenovarse y de diferenciarse en distintos linajes celulares para realizar alguna función especializada. La capacidad regenerativa del folículo piloso en cada ciclo de crecimiento recae en un grupo de células troncales localizadas en la zona de la protuberancia. Estas células fueron identificadas por su baja tasa de división. Para marcarlas se inyectó timidina tritiada durante la primera semana de vida y las células que retuvieron la marca en los folículos pilosos se localizaron en el istmo del folículo. Las células retenedoras de marca se encontraron en la parte del folículo que está entre la glándula sebácea y el sitio de inserción del músculo piloerector⁹¹. A través de experimentos de doble marcaje con análogos de timidina y de trasplantes de la zona de la protuberancia se ha determinado que esta zona aporta precursores con capacidad de generar todos los linajes presentes en el folículo piloso maduro^{92,93}. En el inicio del anágeno, un grupo de células troncales de la protuberancia activa su proliferación. Las células hijas migran hacia la base del folículo formando el bulbo del pelo donde continúan dividiéndose y empiezan a diferenciarse.

La identificación de marcadores moleculares como la CK15 y la proteína membranal CD34 ha permitido el avance de la caracterización de las células troncales de la protuberancia^{94,95}. Además, se han desarrollado elegantes estrategias genéticas para marcar a las células de la protuberancia que ha permitido su aislamiento por medio de técnicas de citometría de flujo. Esta purificación ha permitido analizar el perfil genético de las células troncales. Aproximadamente 150 genes son preferentemente expresados en la protuberancia en comparación con las células basales de la epidermis⁹⁶⁻⁹⁸. Entre los genes sobreexpresados en las células troncales de folículos en fase de telógeno se encuentra el ligando c-kit, receptores de efrina con actividad de cinasa de tirosina, CD34 y factores de transcripción como Barx2, Sox9, Lhx2 y TCF3. Como es de suponerse la expresión de genes relacionados con proteínas de proliferación celular como Ki67 y Cdc25C se encuentra disminuida.

De manera normal las células troncales de la protuberancia no aportan precursores a la epidermis. Las células del folículo sólo emigran en condiciones de alta demanda celular como en el crecimiento del organismo y la reparación de una herida^{92,99}. A través del análisis de la dinámica de la proliferación celular y del marcaje con genes reporteros de poblaciones celulares del folículo se ha podido determinar que tras una herida las células de la protuberancia se activan y se inicia la migración de su progenie a la epidermis^{92,100,101}. La permanencia de las células del folículo en la epidermis regenerada es transitoria. En caso de provenir de la zona de la protuberancia se ha observado que su presencia en la epidermis no sobrepasa más de un mes, pero si provienen del infundíbulo se ha documentado la presencia de algunas células marcadas en la epidermis hasta por cuatro meses^{100,101}. Recientemente, se ha postulado que la función de las células del folículo es la de acelerar la reformación del epitelio. En ratones que presentan una mutación que previene el desarrollo de los folículos pilosos en la cola se observó que la reparación de una herida presenta un retraso en la reformación del epitelio. Este retraso se compensa con una mayor activación de los precursores en la epidermis, ya que se

observó que el área de expresión de citoqueratina 6 (CK6), un marcador de queratinocitos proliferantes, se incrementa en los ratones sin folículos¹⁰². La contribución de las células del folículo es importante para iniciar rápidamente la reformación del epitelio, pero no para asegurar el cerrado de la herida. De igual manera durante el desarrollo neonatal las células del folículo son requeridas para asegurar una rápida expansión del epitelio. La cola del ratón sin folículos pilosos es más corta y presenta varios pliegues. Este fenotipo se aminora si se promueve la proliferación de la epidermis con ácido retinoico¹⁰³. Si bien es clara la participación de las células de la protuberancia en condiciones de expansión de la epidermis, poco se conoce acerca de los mecanismos que activan a las células troncales quiescentes. Mucho menos se conocen las señales necesarias para movilizar a las células troncales de la protuberancia durante la reformación epitelial. Estas señales pueden provenir de elementos celulares como los vasos sanguíneos, fibroblastos y las terminales nerviosas que en su conjunto conforman el nicho de la protuberancia.

1.3.2

Inervación en la piel de los mamíferos

Los órganos periféricos que están en contacto con el exterior como los intestinos, los pulmones y la piel se caracterizan por presentar una compleja red de inervación que permite una comunicación bidireccional entre el cerebro y estos órganos. La piel de los roedores ha sido uno de los principales modelos donde se han caracterizado los diferentes tipos de terminales periféricas así como los patrones de inervación autónoma y sensorial¹⁰⁴⁻¹¹¹. Independientemente de que se trate de piel con pelo o piel glabra (piel sin pelo), la inervación sensorial tiene el siguiente patrón general de distribución (Fig. 2). Los axones mielinizados y amielínicos de las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal y del ganglio del trigémino llegan a la piel como nervios de gran calibre a la parte más profunda de la dermis. Los nervios se van ramificando en plexos de menor calibre hacia

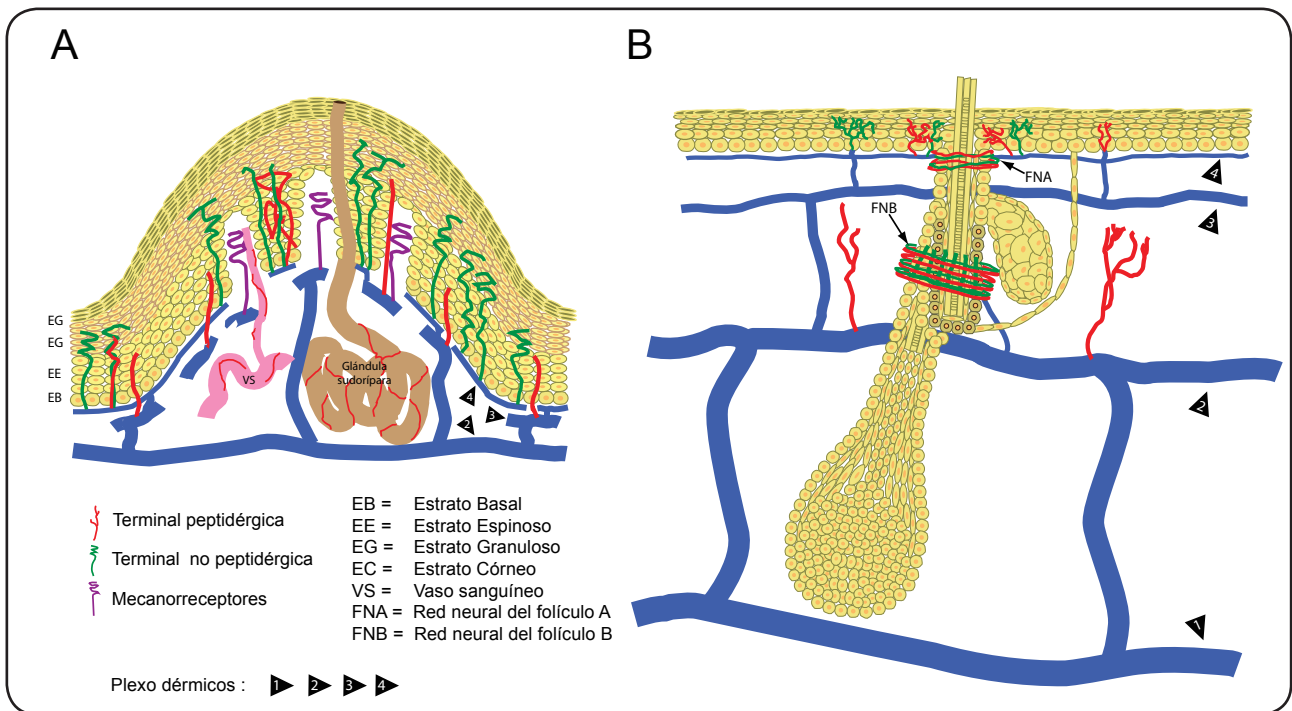


Fig. 2 Inervación sensorial en la piel de los mamíferos. Tanto en la piel glabra (A) como en la piel con pelo (B) los axones de las neuronas del ganglio de la raíz dorsal llegan agrupados en forma de plexos a la dermis profunda. Estos plexos disminuyen su calibre hacia la superficie de la piel. En términos generales las neuronas amielínicas y poco mielinizadas se dividen en peptidérgicas y no peptidérgicas. Las terminales de estas neuronas se localizan cerca de las células del sistema inmunológico y de los folículos pilosos. Nótese además la presencia de terminales dentro de la epidermis.

la superficie de la piel. En general se observan cuatro grandes plexos en la dermis: 1) el plexo profundo, 2) el plexo intermedio, 3) el plexo superficial y 4) el plexo subepidérmico. El plexo intermedio es la fuente principal de los axones mielinizados de calibre medio que dan lugar a las terminales de Merkel y a las terminales lanceoladas. El plexo superficial es la fuente de la mayoría de los axones peptidérgicos y no peptidérgicos que están asociados a la vasculatura superficial, a las glándulas sudoríparas y al infundíbulo de los folículos. El plexo subepidérmico es la fuente de las terminales amielínicas de tipo no peptidérgico y peptidérgico que cruzan la membrana basal para introducirse a la epidermis en forma de terminales nerviosas libres. Algunas de estas terminales establecen contactos parecidos a las sinapsis con células de Langerhans⁵. Esta interacción con células residentes en la piel no se restringe a la epidermis. En la dermis, las terminales nerviosas libres se localizan muy cerca de algunas células del sistema inmune y de algunos fibroblastos⁷. Las terminales nerviosas que establecen este tipo de interacciones se caracterizan por contener péptidos

como SP y CGRP. A lo largo de su trayectoria, el axón muestra varicosidades que son sitios potenciales de liberación de neuropéptidos, ya que estos sitios no están cubiertos de células de Schwann^{112,113}. Esta distribución casi ubicua en la piel sólo fue evidente hasta la generación de anticuerpos contra marcadores presentes en las neuronas sensoriales. En pocos años ha sido posible identificar arreglos de inervación que están conservados en varias especies de mamíferos. Entre los marcadores globales que se utilizan para detectar a la inervación sensorial y evaluar sus alteraciones se encuentran la proteína del producto génico 9.5 (PGP) y la tubulina β III. Otro tipo de marcadores sólo se localizan en algunos subtipos de axones e incluyen a los neurofilamentos de 200 kDa, la proteína básica de mielina, la sinaptofisina, la proteína asociada al crecimiento de 43 kDa (GAP-43), el neuropéptido Y, la galanina, la somatostatina, diversos canales TRP, receptores purinérgicos (P2X₃), sustancia P y CGRP.

La morfogénesis del folículo piloso está íntimamente ligada al desarrollo de la inervación¹⁰⁷. Desde etapas embrionarias las terminales nerviosas llegan a los sitios donde madurarán, durante el desarrollo posnatal, las dos redes de inervación presentes en los folículos de mamíferos adultos (Fig.2B). Estas redes de inervación están localizadas en la parte constante del folículo piloso y se han denominado red neural del folículo A y B¹⁴. La red neural del folículo A (FNA) abarca la epidermis perifolicular y la parte superior del infundíbulo. Esta red consiste de numerosas fibras amielínicas de tipo C de las cuales unas inervan a la epidermis perifolicular y otras rodean la desembocadura del folículo a la epidermis. Estas fibras presentan inmunoreactividad para PGP, CGRP, SP, acetilcolinesterasa (ChAT) y el péptido histidin metionina (PHM, marcador colinérgico)^{107,115}.

La red neural del folículo B (FNB) está localizada entre el ducto de la glándula sebácea que se conecta al canal del pelo y el sitio de inserción del músculo piloerector. Esta red consiste de una fila de terminales longitudinales que están acomodados en forma de empalizada alrededor de la vaina radicular externa del folículo. Estos nervios corren por fuera de la membrana basal que separa el epitelio del folículo del mesénquima de la dermis. Estas terminaciones nerviosas son las denominadas terminales lanceoladas y están

rodeadas por varios anillos de fibras compuestas tanto de fibras poco mielinizadas como de fibras amielínicas. Las fibras del FNB muestran exclusivamente inmunoreactividad para PGP, CGRP y ChAT^{107,114,116}.

De igual manera los cambios tisulares que ocurren durante el ciclo de crecimiento del pelo están acompañados de rebrotes y regresiones de la inervación cutánea¹¹⁵. Durante el anágeno temprano el número de fibras inmunorreactivas a PGP en la FNA y las fibras circulares en la FNB aumenta respecto de las observadas en el telógeno; asimismo, en la dermis y en el subcutis¹¹⁴. Las fibras inmunorreactivas a CGRP (CGRP+) aumentan durante el anágeno temprano en la dermis, subcutis y en las fibras circulares de la FNB. Las fibras SP⁺ y PHM⁺, primordialmente localizadas en la dermis y en el subcutis también aumentan durante esta etapa. Durante etapas tardías del anágeno y el catágeno el número de las terminales peptidérgicas tiende a disminuir progresivamente. Como se describirá a continuación estos cambios en la distribución de las terminales nerviosas no parecen ser azarosos sino que están asociados a procesos fisiológicos para el mantenimiento de la homeostasis cutánea.

1.4.

Funciones eferentes de las neuronas del ganglio de la raíz dorsal en la piel de los mamíferos

La noción de que las neuronas del DRG regulan funciones en su blanco por medio de la liberación de neurotransmisores no es nueva. Sin embargo, la función eferente de los nervios sensoriales tiende a asociarse solamente a condiciones agudas que involucran daño al tejido. Esta actividad se descubrió hace ya más de cien años al encontrar que la estimulación antidrómica de los nervios sensoriales provoca vasodilatación y otros signos de inflamación en la piel^{8,9}. En la actualidad se denomina inflamación neurogénica a las

reacciones vasculares e inmunes inducidas por la liberación de péptidos como SP y CGRP provenientes de terminales periféricas de neuronas del DRG². La liberación peptidérgica en estas condiciones extremas ha sido explicada con base en el modelo de "reflejo axonal"². De acuerdo con este modelo, un estímulo nocivo activa a una rama axonal ubicada en la piel, lo cual promueve la liberación de neuropéptidos en otra rama axonal de la misma neurona que inerva a los vasos sanguíneos. No obstante, hasta el momento no existe una confirmación morfológica de que el arreglo anatómico en el que se basa este modelo realmente exista¹¹⁷. Si bien se sabe que factores locales como el factor de crecimiento neural, las prostaglandinas y la bradiquinina inducen la síntesis y liberación de SP y CGRP en condiciones de lesión a la piel¹¹⁸, se desconoce si estos mismos factores actúan en circunstancias normales. Por otra parte, la denervación sensorial de la piel altera la expresión genética de componentes de citoesqueleto, matriz extracelular, señalización intracelular y de factores de transcripción¹¹⁹. Esta evidencia reafirma que las terminales sensoriales liberan péptidos independientemente de una herida en el órgano blanco. Al respecto, resaltan los datos clínicos y experimentales que asocian lesiones del sistema nervioso central y/o estados de estrés con la etiología de enfermedades dermatológicas, óseas, inmunes y cardiovasculares¹²⁰⁻¹²². Así, se ha propuesto que los "reflejos de la raíz dorsal" pudieran ser otro mecanismo para explicar la liberación periférica en condiciones normales o de lesión. En este modelo un estímulo en la piel activa a una aferente primaria que a su vez activa a una interneurona en la médula espinal. Esta interneurona facilita la despolarización de una segunda neurona del DRG y como consecuencia se promueve la liberación periférica de neuropéptidos¹¹⁷. En condiciones fisiológicas algunos núcleos en el tallo cerebral podrían modular la liberación de neuropéptidos ya que la estimulación de la sustancia gris del periacueducto induce reflejos de la raíz dorsal¹²³. En el futuro será importante conocer que mecanismos subyacen a la modulación de la liberación periférica en condiciones normales y patológicas, ya que los neuropéptidos han sido involucrados en diversos padecimientos dermatológicos (ej., dermatitis atópica, vitíligo, psoriasis y alopecia) y en la reparación de heridas¹²⁴⁻¹²⁶.

Como ya se mencionó, uno de los aspectos mejor estudiados de la función eferente de los nervios sensoriales es su relación con el sistema inmunológico¹²⁷. La inflamación neurogénica es considerada como un proceso clave para la defensa del organismo tanto en condiciones de lesión como de invasión de patógenos¹²⁸. En la inflamación neurogénica, el enrojecimiento característico de la piel está dado por la vasodilatación causada por CGRP y la hinchazón por el aumento en la permeabilidad vascular originado por la SP. Los experimentos de denervación sensorial y la utilización de agonistas y antagonistas de la comunicación peptidérgica han ayudado a descifrar en qué eventos participan las neuronas del ganglio de la raíz dorsal. En resumen, las terminales sensoriales y sus neuropéptidos están involucrados en: 1) inducir la síntesis de citocinas y quimiocinas proinflamatorias, 2) aumentar la liberación de mediadores inflamatorios, 3) aumentar la expresión de moléculas de adhesión para la infiltración leucocitaria y 4) promover la proliferación de linfocitos^{122,129-135}. Tanto CGRP como SP suelen tener actividades proinflamatorias mientras que la somatostatina tiene un papel antiinflamatorio. Además de acciones inflamatorias, la inervación sensorial está involucrada en la generación de inmunidad celular. Para iniciar la respuesta inmune cutánea (sensibilidad por contacto), las células de Langerhans que residen en la epidermis son las encargadas de la presentación de antígenos en los ganglios linfáticos. Muchas de estas células son contactadas por terminales intraepidérmicas que contienen CGRP. Este neuropéptido inhibe en cultivo celular la presentación de antígenos a clonas de tipo TH1, pero favorece la presentación a clonas tipo TH2^{5,136}. La denervación de la piel promueve un aumento del número de células de Langerhans que son inmunorreactivas a PGP, aunque su significado funcional sigue sin ser entendido¹³⁷.

Un proceso crítico para mantener la homeostasis epitelial es el continuo recambio de los queratinocitos. Además de los factores locales de crecimiento, se ha propuesto que algunos factores derivados de los nervios sensoriales pueden regular la proliferación de los queratinocitos. En la psoriasis, por ejemplo, la hiperproliferación de los queratinocitos correlaciona con un incremento en la densidad de las terminales peptidérgicas en la

piel¹³⁸. Además, los neuropéptidos sensoriales promueven la proliferación en cultivo de líneas celulares de queratinocitos y melanocitos^{6,139,140}. En roedores, la lesión del nervio ciático induce un adelgazamiento de la epidermis de la planta de la pata. Al respecto, se ha sugerido que la eliminación de las fibras intraepidérmicas reduce la proliferación de los queratinocitos^{141,142}. Sin embargo, la lesión del nervio ciático también daña a la inervación motora y autónoma. Por eso, cabe la posibilidad de que el adelgazamiento de la epidermis sea causado por una anomalía de la postura o por una deficiencia del aporte sanguíneo, más que por la eliminación del efecto promotor de la proliferación de la epidermis por parte de las terminales sensoriales^{143,144}. Con base en estos escenarios, es necesario el diseño de experimentos donde se modifique selectivamente a las terminales intraepidérmicas para tener un mejor entendimiento del papel de estas terminales en la regulación de la proliferación de los queratinocitos.

El tratamiento neonatal con capsaicina disminuye considerablemente el número de neuronas pequeñas que tienen axones tipo C y A δ ^{145,146}. Estos axones, en especial las fibras C, son los que inervan de manera abundante a diferentes tipos de epitelios. Cabe resaltar el hecho de que los animales tratados neonatalmente con capsaicina muestran mayor susceptibilidad a desarrollar úlceras gástricas, a presentar lesiones oculares en forma de opacidades corneales y a desarrollar lesiones espontáneas en la piel¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. Es por esto que se ha propuesto que el recambio de los epitelios está alterado por la disminución de las terminales peptidérgicas que provoca la capsaicina. Sin embargo, no se ha determinado si la denervación química por capsaicina afecta la proliferación de los queratinocitos en condiciones normales.

Observaciones tanto clínicas como experimentales indican que las neuronas del DRG están involucradas en los procesos de reparación de heridas¹²⁶. En general, una reducción de la inervación del DRG se asocia con una mayor superficie de la herida y retrasos en su reparación^{148,150-152}. Al igual que en el caso anterior, se postula que las neuronas peptidérgicas del DRG tienen un efecto benéfico en la reparación. Sin embargo, el papel específico de estas neuronas ha sido poco estudiado. Al parecer la

inervación peptidérgica influye en varias fases de la reparación de heridas. La dinámica de proliferación y apoptosis del tejido de granulación están alteradas en ratas tratadas con capsaicina¹⁵¹. También se ha observado que la formación de vasos sanguíneos que son necesarios para la reparación se reduce en ratones noqueados para CGRP¹⁵². Por otro lado, tanto la administración de SP como de CGRP aceleran el cerrado de las heridas; mientras que, un antagonista de CGRP lo retrasa¹⁵³⁻¹⁵⁵. Una posibilidad para explicar lo anterior es que los neuropéptidos también influyan en la reformación del epitelio. Como ya se mencionó la reformación del epitelio en una herida cutánea se acelera por la migración de queratinocitos provenientes del nicho de células troncales de la protuberancia del folículo piloso. De manera interesante, la SP adelanta la fase de crecimiento (anágeno) del pelo si se administra durante su fase de reposo (telógeno), pero si se administra durante el anágeno induce un paro prematuro de la proliferación (catágeno)¹⁵⁶. Hay que recordar que la inervación sensorial forma parte del nicho de células madre^{107,157}. Esta relación anatómica abre la posibilidad de que las terminales peptidérgicas del DRG pudieran modular la actividad del nicho de células madre. Por eso uno de los objetivos del presente trabajo es explorar si la inervación peptidérgica está involucrada en la modulación de la proliferación y migración hacia la epidermis de poblaciones amplificadoras provenientes de las células troncales del folículo.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVO

Si bien se conoce desde hace ya más de un siglo por los trabajos sobre vasodilatación de Bayliss y Lewis que las neuronas del DRG tienen una capacidad eferente, no fue sino hasta hace tres décadas que se comenzaron a identificar los neuromensajeros y la presencia de sus receptores en diversos tejidos. Cada vez se hace más evidente que la inervación tiene un papel crítico en la diferenciación tisular y en el subsiguiente mantenimiento estructural y funcional del blanco. En enfermedades dermatológicas como la dermatitis atópica, la psoriasis y la alopecia se reconoce que existe un desajuste de la comunicación entre la piel y el sistema nervioso. Aunque en los últimos años se ha revelado que las terminales nerviosas, que contienen neuropéptidos como la SP y el CGRP, están vinculadas anatómicamente con la epidermis y los folículos pilosos, no se ha logrado desentrañar por completo el significado funcional de esta relación. Hay evidencia que sugiere que la inervación peptidérgica estaría involucrada en promover el recambio epitelial. Sin embargo, hasta el momento se desconoce si la inervación pudiera modular a los precursores epiteliales que son responsables de este recambio en condiciones normales y de lesión. Lo anterior cobra importancia en el contexto de que las heridas crónicas en pacientes con hemiplejia y diabetes presentan baja capacidad de reformación epitelial. Notablemente, las heridas

se presentan en zonas de la piel que carecen o tienen poca inervación sensorial. Por lo tanto, el propósito de este trabajo es averiguar si la inervación peptidérgica está involucrada en el recambio y reparación epitelial, así como su posible interacción con nichos de células troncales en el epitelio.

2.1

Objetivos específicos

- a) Estimar al mes, a los tres y a los seis meses de edad, la longitud total de las terminales intraepidérmicas inmunorreactivas a PGP (PGP⁺) y a CGRP (CGRP⁺) en la epidermis de la piel glabra de la planta de la pata trasera de ratas control y ratas tratadas neonatalmente con capsaicina. Aunque se sabe que la capsaicina disminuye el número de neuronas con axón amielínico, no se conoce la magnitud de la eliminación de terminales lograda en la epidermis.
- b) Determinar si las fibras presentes en la epidermis tras el tratamiento con capsaicina son de tipo peptidérgico al mes, a los tres y a los seis meses de edad, por medio de inmunofluorescencia del doble marcaje con tubulina β III y CGRP.
- c) Estimar el número de células marcadas con BrdU en la epidermis de la piel de la planta de la pata trasera de ratas control y tratadas con capsaicina al mes, a los tres y a los seis meses de edad.
- d) Estimar a las 31 h, 47 h y 61 h posherida el número de células BrdU⁺ en la epidermis y en los folículos que están alrededor de una herida escisional en la piel del lomo de ratas control y de las ratas tratadas con capsaicina. El propósito fue determinar si la denervación química altera la dinámica de proliferación del epitelio de la piel.

- e) Cuantificar la migración de células epiteliales del folículo hacia la epidermis lesionada. Esto se determinó por medio de un doble marcaje con análogos de timidina (yododesoxiuridina, IdU; clorodesoxiuridina, CldU) que permitió seguir el destino de las células foliculares y permitió inferir si el flujo de células se modifica en las ratas tratadas con capsaicina.
- f) Determinar el área de activación de la proliferación en la epidermis en ratas control y tratadas. Para esto se determinó el volumen de la epidermis con inmunoreactividad para CK6.
- g) Evaluar la presencia de receptores para SP y CGRP en la población de células troncales de la protuberancia. Por medio de un análisis por microscopía confocal se evaluó si la inmunoreactividad de CD34 en la protuberancia colocalizaba con la inmunoreactividad para los receptores NK1 y CLR.
- h) Estimar la longitud de la inervación CGRP⁺ en regiones circundantes al sitio de lesión. Esto permitió conocer las modificaciones de la inervación peptidérgica a las 31h y 61h posherida.

RESULTADOS

Fibras intraepidérmicas PGP⁺ en ratas control y tratadas con capsaicina

La capsaicina es un compuesto ampliamente conocido por sus efectos neurotóxicos en neuronas sensoriales. Sin embargo, se desconoce en qué grado afecta a las fibras que inervan a la epidermis. Por lo tanto, estudiamos los cambios anatómicos al mes, a los tres y a los seis meses después del tratamiento con capsaicina utilizando el marcador neuronal PGP. A pesar de que el patrón general de inervación no se alteró después del tratamiento con capsaicina, hay diferencias muy importantes en el origen, terminación y morfología de las terminales intraepidérmicas. En las ratas control, las terminales intraepidérmicas se originan de dos tipos de plexos en la dermis. La mayoría de las terminales surgen de manera individual del plexo subepidérmico (Fig. 3A, C, E). El resto de las terminales proviene de haces de axones perpendiculares a la epidermis. En general, la distribución de las terminales intraepidérmicas PGP⁺ es heterogénea a lo largo de la epidermis. En ciertas regiones, las fibras PGP⁺ están agrupadas y con muy poca separación entre sí dando lugar a islas de inervación. La mayoría de las fibras PGP⁺ terminan en el estrato granuloso o en el estrato espinoso. Algunas de estas fibras cruzan de manera recta a

través del estrato basal y de las capas bajas del estrato espinoso. En las capas altas del estrato espinoso y granuloso estas fibras serpentean entre los queratinocitos (Fig. 3A, C, E). De manera menos frecuente, las fibras rectas PGP⁺ terminan en el estrato espinoso y estrato basal. Aunque el patrón de islas de inervación se conserva a los tres y seis meses de edad, los agrupamientos de terminales están más separados entre sí. A los tres meses se observó un incremento en el número de fibras arrosariadas (Fig. 3C). También a esta edad, las fibras están más ramificadas y algunas de ellas se entrelazan con otras fibras. A los seis meses se observó una disminución de las fibras más arrosariadas (Fig. 3E).

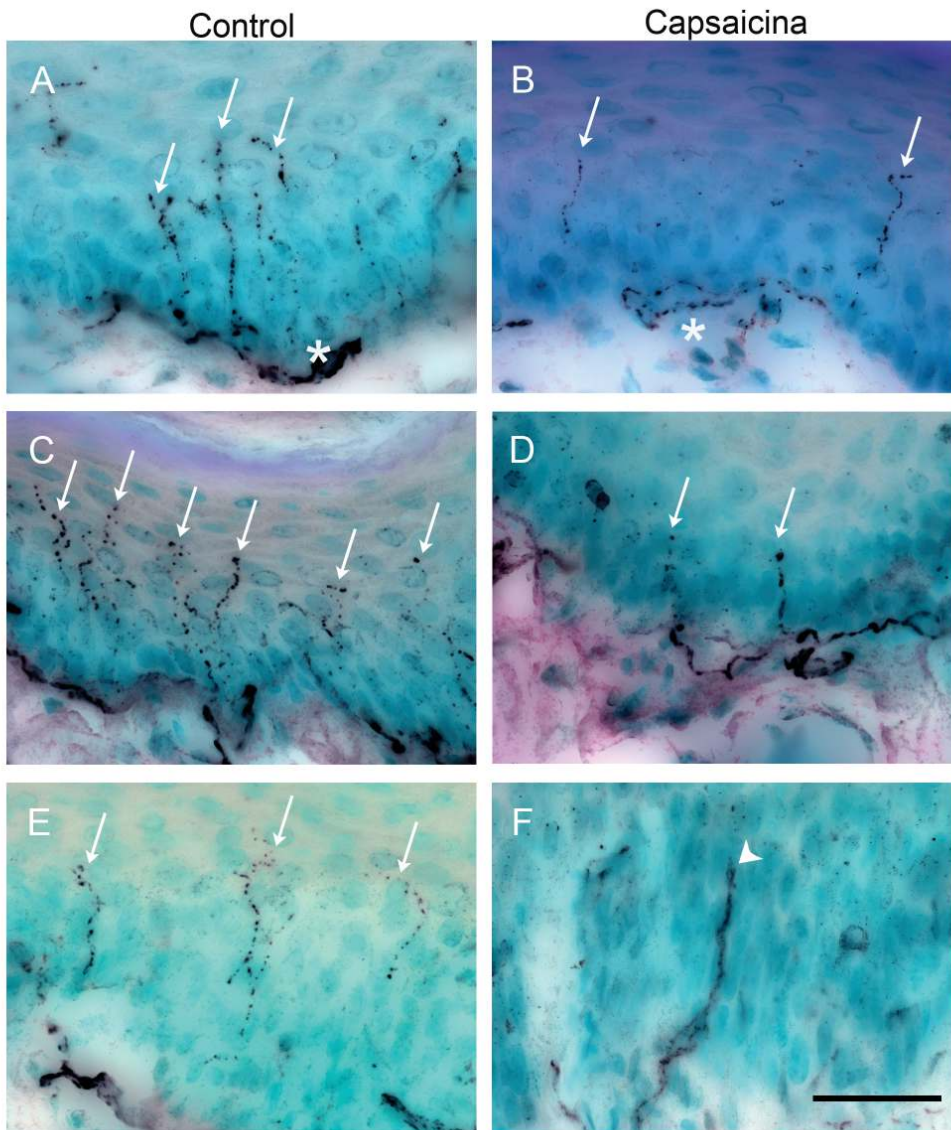


Fig. 3. El tratamiento neonatal con capsaicina disminuyó el número de terminales intraepidérmicas. Los cortes de piel glabra de ratas control y tratadas de un mes (A, B), tres meses (C, D) y seis meses (E, F) fueron inmunoteñidos para PGP (flechas). Nótese que en la piel de ratas tratadas se observan fibras gruesas y aberrantes que penetran a la epidermis (F, cabeza de flecha) y que el plexo subepidérmico (asterisco) está compuesto por menos fibras. Barra de escala = 30µm.

El número de terminales intraepidérmicas PGP⁺ fue reducido considerablemente en todas las edades analizadas de las ratas tratadas con capsaicina. En estos animales, las fibras que se originan del plexo subepidérmico fueron escasas y la mayoría de las fibras presentaron una trayectoria recta (Fig. 3B, D). Tras el tratamiento con capsaicina, las terminales son gruesas en su mayoría y terminan en el estrato espinoso. Sólo algunas terminales penetran al estrato granuloso (Fig. 3F). Además, fue notorio que las islas de inervación en las ratas tratadas estaban constituidas por una o dos fibras, lo que se refleja en una gran separación entre las terminales. De manera general, las terminales intraepidérmicas en las ratas tratadas tienen una morfología recta y están poco ramificadas. Para cuantificar el grado de denervación se utilizó la sonda estereológica denominada "esferas virtuales" con la cual se estima la longitud total de estructuras biológicas filamentosas. La longitud de las fibras intraepidérmicas PGP⁺ fue 83% menor en las ratas tratadas con capsaicina al mes; 81%, a los tres meses; y 77%, a los 6 meses de edad (Fig. 4A).

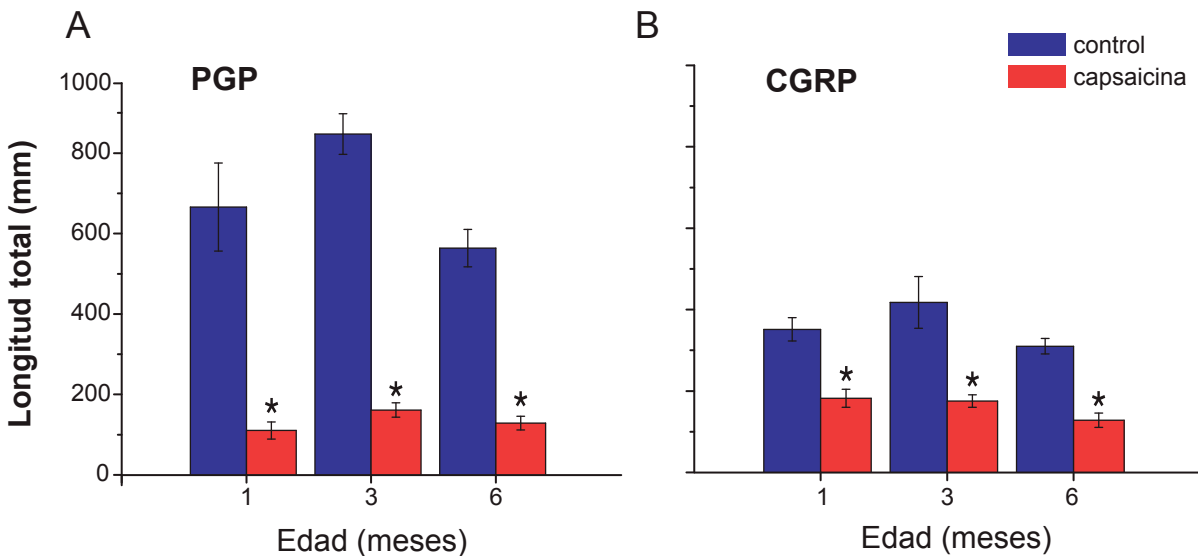


Fig. 4. Longitud total de las fibras intraepidérmicas inmunorreactivas a PGP y CGRP fue menor en la piel glabra de las ratas tratadas con capsaicina. La longitud total fue estimada por medio de la sonda estereológica de las "esferas virtuales". El tratamiento redujo de manera significativa e irreversible la longitud de las fibras intraepidérmicas PGP⁺ (A) y CGRP⁺ (B). *p<0.05 (ANOVA)

Fibras intraepidérmicas CGRP⁺ en ratas control y tratadas con capsaicina

Las fibras inmunorreactivas para CGRP se observaron en la papila dérmica y en la zona central de los cantos de las clavav epidérmicas. A un mes y tres meses de edad, las fibras intraepidérmicas se observaron entrelazadas en grupos de dos a tres terminales; mientras que a los seis meses es más común observar fibras individuales (Fig 5A, C, E). Las fibras CGRP⁺ principalmente terminan en el estrato granuloso, aunque algunas otras terminan en el estrato espinoso, especialmente a los seis meses. Las terminales CGRP⁺ serpentean por las capas de queratinocitos y presentan puntos de ramificación. Algunas terminales después de alcanzar el estrato granuloso regresan al estrato basal (Fig. 5A). En las ratas tratadas con capsaicina, las fibras también se observaron a intervalos regulares, pero en la mayoría de los casos las fibras aparecían de forma individual y resaltó su morfología simple (Fig 5B, D, F). En estos animales, las fibras terminan predominantemente en el estrato espinoso, aunque algunas se encontraron en las capas bajas del estrato granuloso. Las fibras CGRP⁺ en las ratas tratadas tienden a ser gruesas y menos arrosariadas que en los controles. A los seis meses, fueron evidentes unas fibras cortas con la parte terminal abultada que terminan en el estrato espinoso (Fig. 5F). La longitud de las fibras CGRP⁺ fue 48% menor en las ratas tratadas a un mes; 58% a los tres meses; y 58%, a los seis meses (Fig. 4B). En las ratas control, el porcentaje que representa la longitud de las fibras CGRP⁺ respecto de la longitud de las fibras intraepidérmicas PGP⁺ fue de 53% al mes; 49% a los tres meses y 54% a los seis meses. En contraste, la longitud de las fibras CGRP⁺ fue 65% mayor que la longitud de las fibras PGP⁺ a un mes, pero la longitud registrada para las fibras PGP⁺ y CGRP⁺ fue similar a los tres y seis meses.

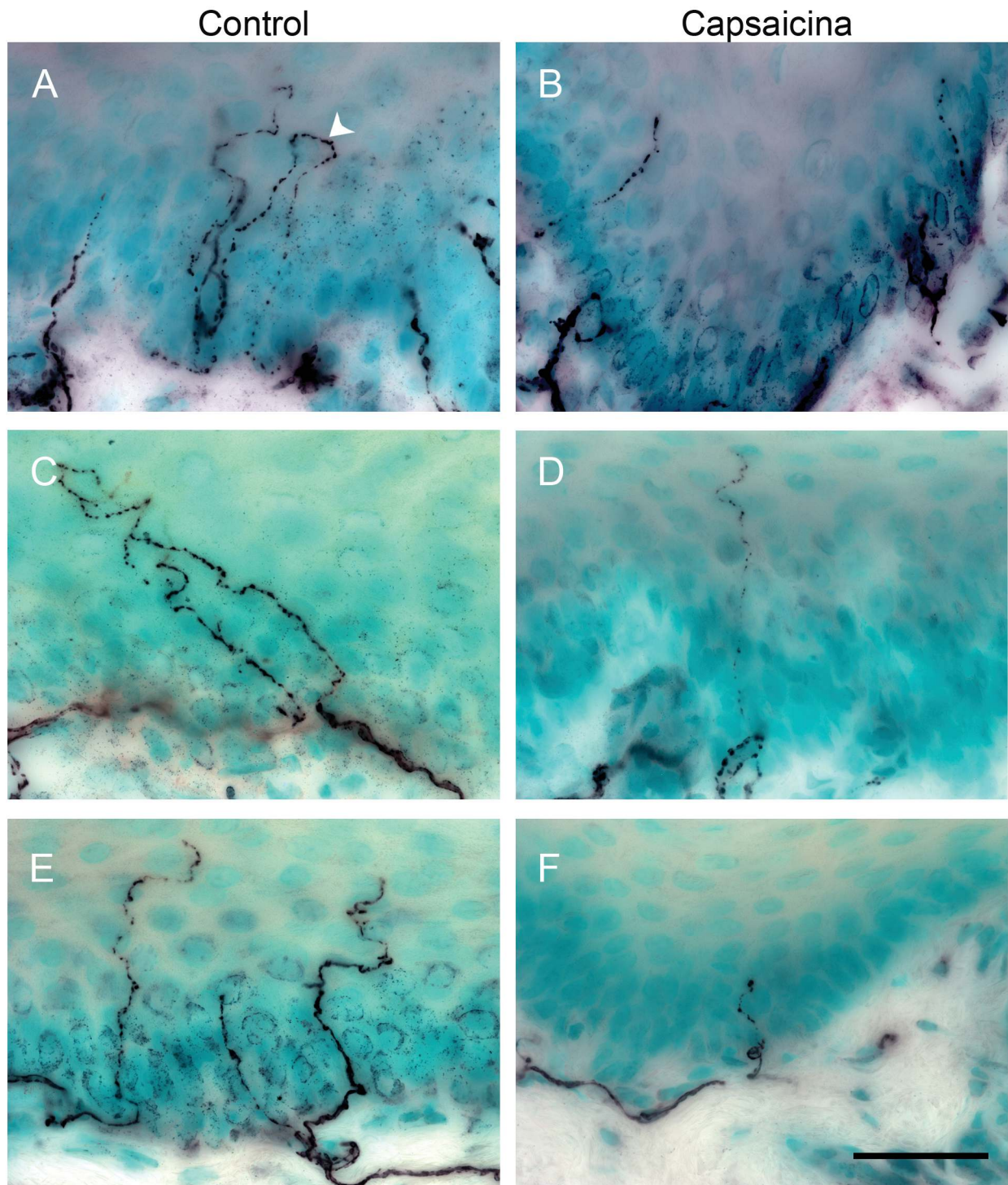


Fig 5. La distribución de las terminales que contienen CGRP se preserva después del tratamiento con capsaicina. Cortes de piel de ratas control (A, C, E) y tratadas con capsaicina (B, D, F) de un mes (A, B), tres (C, D) y seis (E, F) meses de edad fueron inmunoteñidas para CGRP. En las ratas control, las fibras CGRP⁺ tienen una trayectoria compleja entre las capas de queratinocitos y algunas fibras regresan al estrato basal después de haber alcanzado el estrato granuloso (cabeza de flecha). Aunque las fibras CGRP⁺ aparecen a intervalos regulares después del tratamiento, las fibras son menos complejas y frecuentemente aparecen de forma individual. (B, D, F). Barra de escala = 30 μ m.

Doble marcaje de las fibras intraepidérmicas con tubulina β III y CGRP

Para determinar si las fibras que predominan en la epidermis de las ratas tratadas con capsaicina son de tipo peptidérgico se hizo un experimento de doble marcaje con tubulina β III y CGRP. En experimentos preliminares se confirmó que la inmunoreactividad para PGP siempre colocaliza con la inmunoreactividad para tubulina β III (Fig. 6). En la epidermis de ratas control, observamos que el tipo más abundante de fibras fueron las que presentaron marca sencilla para tubulina β III en las tres edades analizadas. Las fibras CGRP⁺ en los controles también fueron inmunoreactivas para tubulina β III (Fig. 7A, C, E). En contraste, las ratas tratadas con capsaicina presentaron algunas fibras CGRP⁺ que no fueron inmunoreactivas para tubulina β III (Fig. 7B). Este fenómeno fue muy común al mes de edad, pero poco frecuente a los tres y a los seis meses. Una diferencia notable en las ratas tratadas fue que sólo algunas fibras del total mostraron marca sencilla para tubulina β III (Fig. 7D). De esta manera, el tipo más abundante de terminales intraepidérmicas en las ratas tratadas fueron las doblemente marcadas (Fig. 7B, D, F)

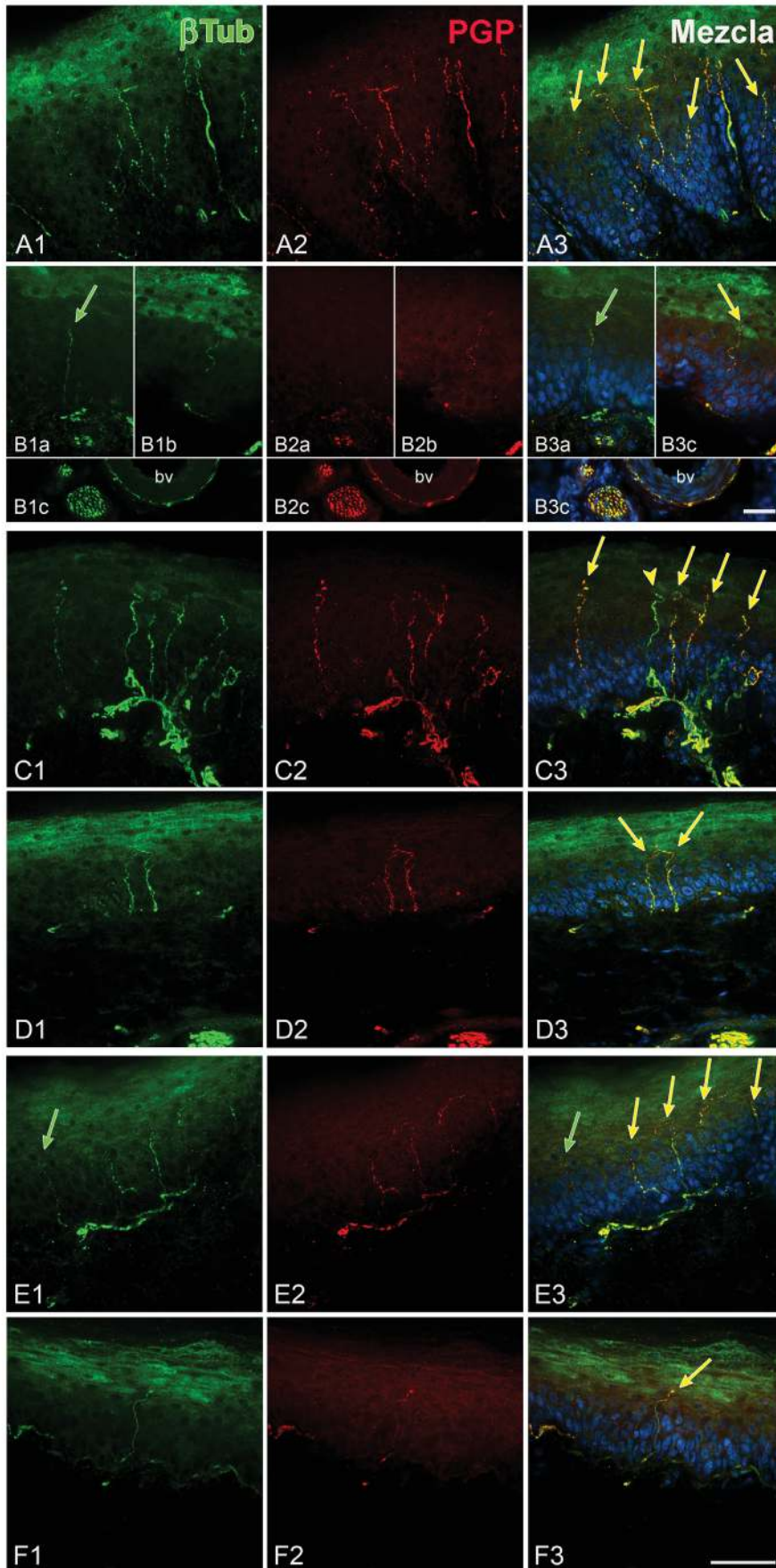


Fig. 6. Inmunofluorescencia de los marcadores panneuronales tubulina β III y PGP en la piel glabra de la rata. Los cortes de piel de ratas control (A, C, E) y de ratas tratadas (B, D, F) de un mes (A, B), tres meses (C, D) y seis meses (E, F) fueron inmunoteñidos para tubulina β III (β Tub) y para PGP. En ambos grupos todas las fibras PGP⁺ colocalaron con las fibras β Tub⁺ (flechas amarillas). Sin embargo, algunas fibras β Tub⁺ no fueron marcadas por PGP (B2a, E1, flechas verdes). La tinción tenue o falta de tinción de PGP parece ser sólo en la parte distal de los axones porque en los plexos nerviosos de la dermis profunda las fibras aparecen doblemente marcadas (B3c). Incluso en la piel de ratas control algunas fibras intraepidérmicas mostraron tenue tinción para PGP (C2, cabeza de flecha amarilla). En ambos grupos se observó tinción con el anticuerpo contra β Tub en los estratos superiores de la epidermis. Las imágenes en la tercera columna mezcladas de las primeras dos imágenes de cada fila. La contratinción en DAPI se muestra en azul. Barra de escala = 50 μ m.

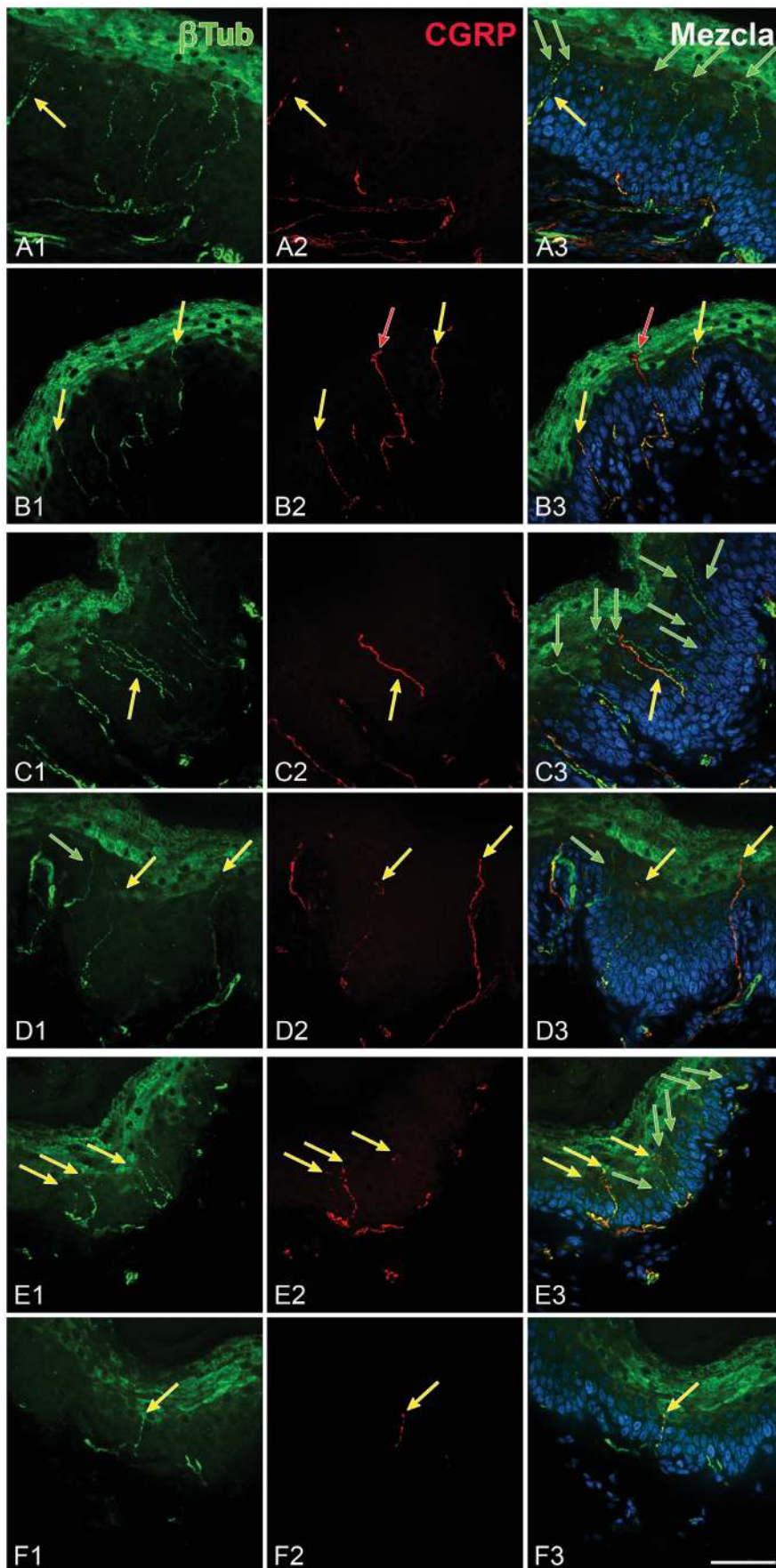


Fig. 7. La epidermis de ratas tratadas con capsaicina contiene predominantemente fibras peptidérgicas. Cortes de piel glabra de ratas control (A, C, E) de un mes (A, B), tres (C, D) y seis (E, F) meses fueron inmunoteñidos para β Tub y CGRP. En las ratas control el tipo más abundante de fibras fueron aquellas inmunorreactivas para β Tub e inmunonegativas para CGRP (flechas verdes), mientras que en las ratas tratadas las más comunes fueron las fibras doblemente marcadas (flechas amarillas). Nótese la presencia de fibras marcadas sólo para CGRP (flechas rojas) en la epidermis de las ratas tratadas. Barra de escala = 50 μ m.

Evaluación de la proliferación de los queratinocitos en la piel glabra

Las terminales intraepidérmicas han sido involucradas en la modulación de la proliferación de los queratinocitos. Por esta razón, se estimó el número total de núcleos BrdU⁺ para determinar si la disminución de terminales intraepidérmicas por capsaicina altera el recambio de los queratinocitos. El número de núcleos BrdU⁺ fue similar entre ambos grupos experimentales. A los tres y seis meses la proliferación tiende a ser menor en las ratas tratadas con capsaicina (Fig. 8). El grosor y número de las capas de la epidermis fue equivalente en ambos grupos (Fig. 9).

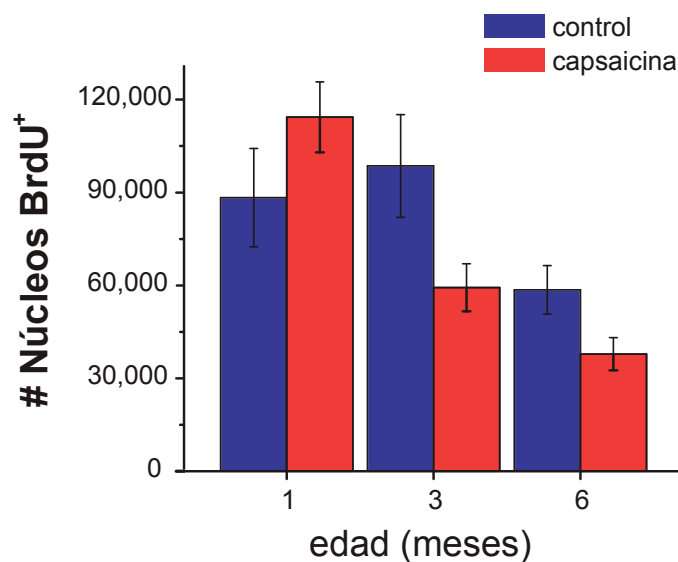


Fig. 8. La denervación con capsaicina no modifica la proliferación de los queratinocitos. El número de núcleos inmunorreactivos a BrdU en los cojinetes de la planta de la pata trasera de la rata se estimó utilizando la sonda estereológica del disector óptico.

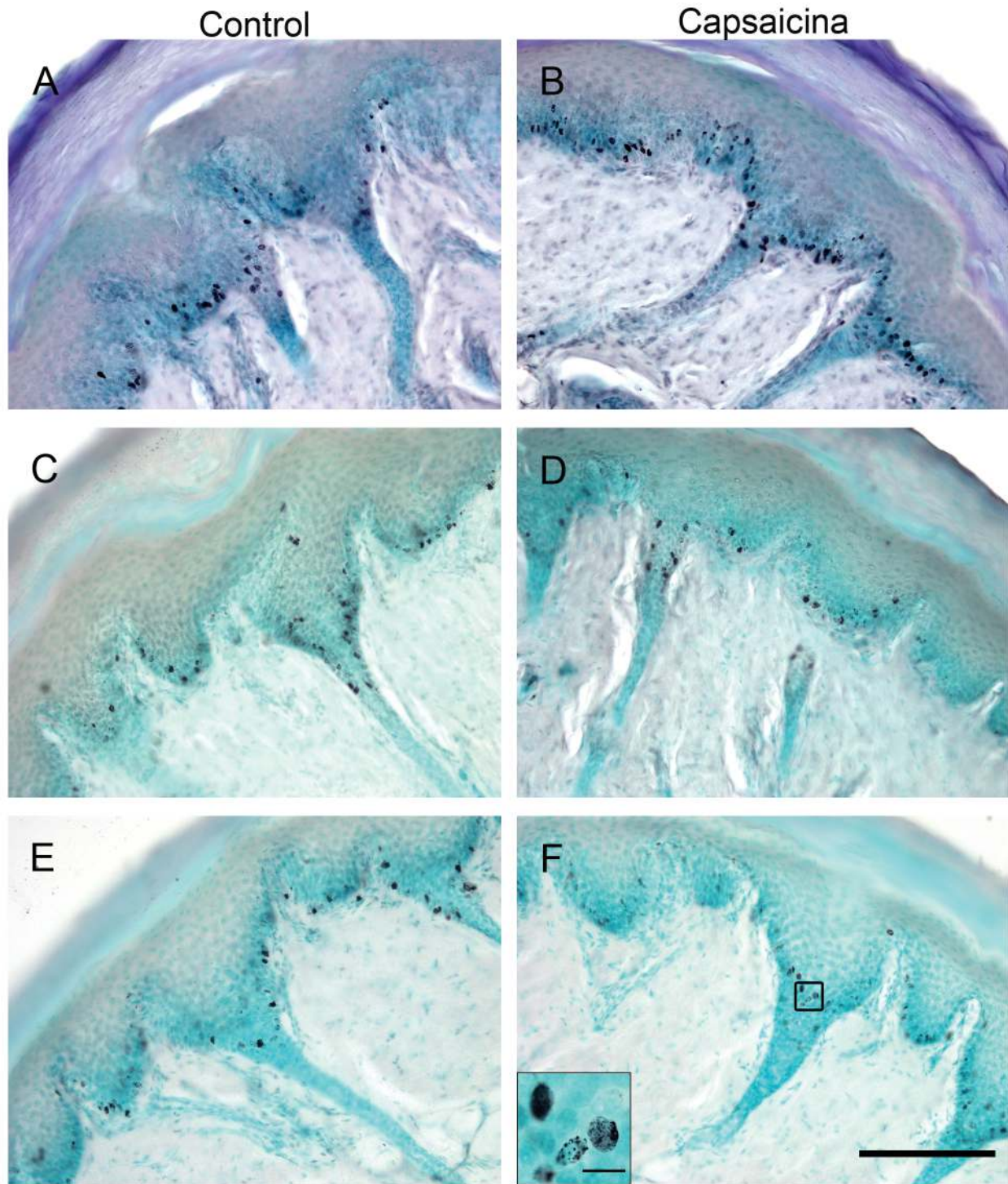


Fig. 9. Marcaje para BrdU en la piel glabra de la rata. Las ratas control (A, C, E) y tratadas con capsaicina (B, D, F) fueron inyectadas con BrdU para determinar el número de queratinocitos proliferando. Cortes de piel de un mes (A, B), tres (C, D) y seis (E, F) meses de edad fueron inmunoteñidos para BrdU. En ambos grupos los núcleos marcados con BrdU se observaron principalmente en el estrato basal de la epidermis y no se apreciaron diferencias en el grosor de la epidermis. En el recuadro en (F) se muestra una amplificación de núcleos inmunorreactivos a BrdU. Barra de escala = 150 µm. Barra de escala del recuadro = 10 µm.

Tiempo de cerrado de las heridas en la piel del lomo

Para conocer cómo el tratamiento con capsaicina modifica la velocidad de reparación del epitelio, se hicieron heridas de tipo escisional en la piel del lomo y se midió el área de la herida hasta su cerrado. La reparación de la herida se atrasó significativamente en las ratas tratadas con capsaicina. El área de la herida se redujo al 50% para el día cuatro en las ratas controles; mientras que, en las ratas tratadas este grado de reparación se logró hasta después del día seis (Fig. 10). El cerrado completo de las heridas se observó a los diez días en la totalidad de las ratas control. Sin embargo, en algunas ratas tratadas con capsaicina se registró una pequeña lesión hasta después del día 13.

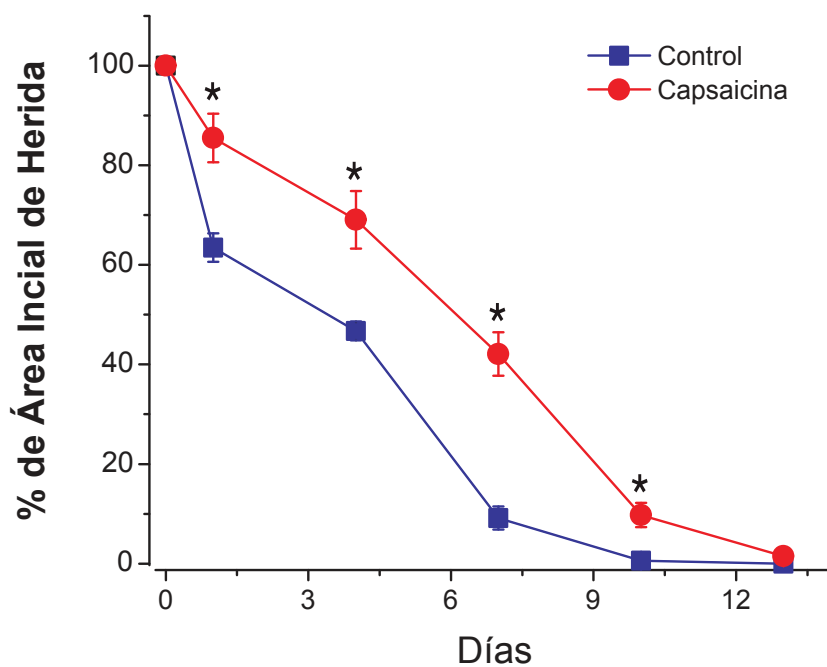


Fig. 10. El cerrado de la herida se retrasa en las ratas tratadas con capsaicina. En la gráfica se muestra el curso temporal del cerrado de una herida de 6 mm en la piel del lomo de ratas control y tratadas con capsaicina. * $p < 0.01$ (ANOVA de dos vías y medidas repetidas)

Evaluación de la proliferación epitelial alrededor de la piel lesionada del lomo

Para determinar si la disminución de la inervación cutánea afecta la activación del epitelio tras una herida, se realizó un marcaje con un pulso de BrdU y se cuantificaron los núcleos BrdU⁺ a lo largo del tiempo. La epidermis de las regiones más cercanas al borde de la lesión fue más gruesa a las 31 h y 47 h posherida en los controles que en las ratas tratadas (Fig. 11). En todos los tiempos analizados fue frecuente observar sitios donde la epidermis estaba necrótica en las ratas tratadas con capsaicina (Fig. 11B). En ambos grupos la cantidad de núcleos marcados disminuyó conforme aumenta la distancia al borde de la herida. Sin embargo, se observó que los núcleos marcados en el caso del control estaban más concentrados hacia el borde de la herida, mientras que en la epidermis de las ratas tratadas se observó una distribución relativamente homogénea de los núcleos a lo largo de la epidermis que presentó activación de la proliferación. Los núcleos BrdU⁺ se contaron en una región que abarcó 2 mm alrededor de la herida (cuadrante interno) y 2 mm a partir del borde de la región interna (cuadrante externo). El número de núcleos marcados en la epidermis a las 31 h posherida fue 50% menor en las ratas tratadas con capsaicina; 36% menor a las 47 h; y sin diferencia a las 61 h (Fig. 12B). En el cuadrante externo de la epidermis sólo a las 31 h posherida se observó un menor número de núcleos BrdU⁺ en las ratas tratadas (Fig. 12A). En los folículos del cuadrante interno no se registraron diferencias entre los dos grupos (Fig. 12D). En tanto que en el cuadrante externo sobresalió el hecho de que el número de núcleos marcados con BrdU aumentó en las ratas tratadas con capsaicina a las 61 h posherida (Fig. 12C).

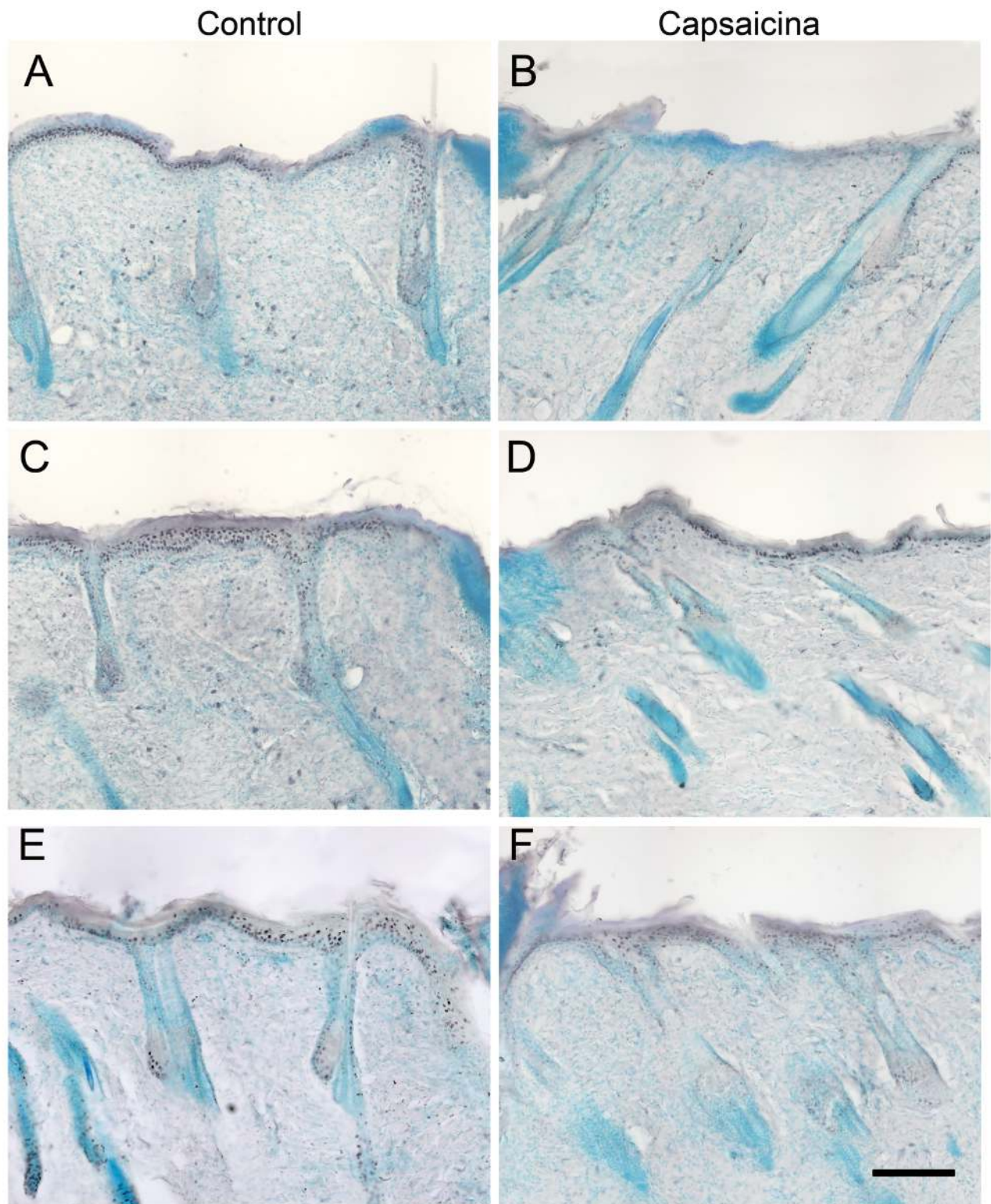


Fig 11. Marcaje para BrdU en la epidermis y folículos cercanos al sitio de la herida. En los paneles se muestran microfotografías de inmunotinciones para BrdU en cortes de piel de ratas control (A, C, E) y ratas tratadas (B, D, F) a las 31 h (A, B), 47 h (C, D) y 61 h (E, F) posherida. La epidermis de las ratas control presentó más núcleos BrdU+ durante las primeras 47 h poslesión. Nótese que la epidermis de las ratas tratadas fue más delgada en este mismo lapso de tiempo. Barra de escala = 200µm.

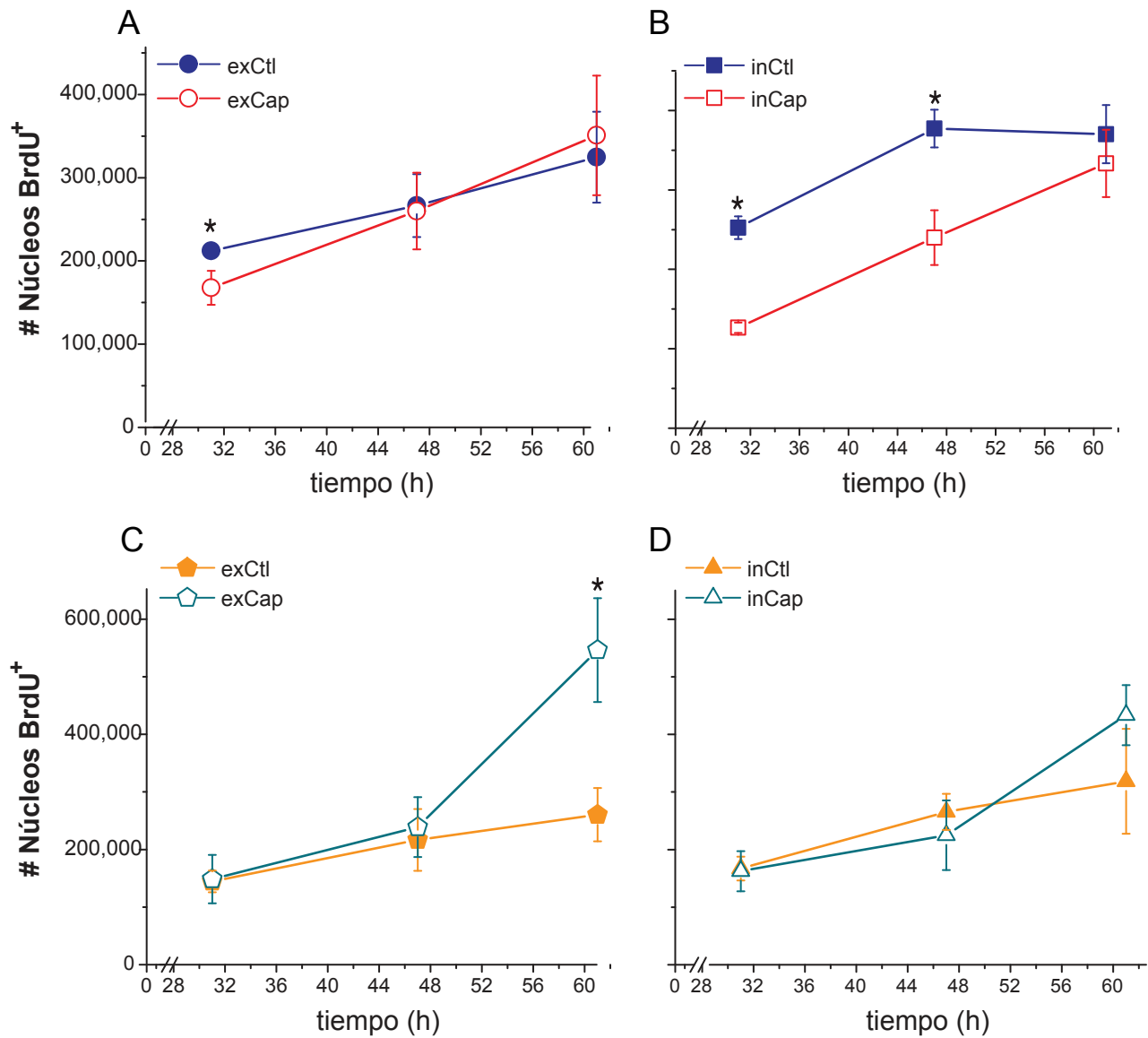


Fig 12. La proliferación de la epidermis de las ratas tratadas con capsaicina disminuye en la región proximal a la lesión. El número total de núcleos inmunorreactivos para BrdU se estimó en la epidermis y folículos alrededor de la herida. Para la cuantificación se demarcaron dos cuadrantes concéntricos a la herida. En la gráfica A se muestra el número total de núcleos marcados para BrdU en la epidermis del cuadrante más distal a la herida (exCtl, exCap); y en B, el cuadrante proximal a la herida (inCtl, inCap). Asimismo, en C y D se presenta el número de núcleos marcados para BrdU en los folículos del cuadrante externo e interno, respectivamente. * $p < 0.05$

Evaluación de la migración celular del folículo a la epidermis

Para determinar si existía una reducción en el flujo de queratinocitos provenientes del nicho de células troncales del folículo hacia la epidermis, se utilizó un doble marcaje con dos análogos de timidina, IdU y CldU. Cada una de estas marcas puede ser detectada de manera independiente y se usan para marcar y seguir poblaciones celulares con dinámicas de proliferación diferentes (Fig. 13). Por lo tanto, las células del folículo pueden ser distinguidas debido a que se dividen más rápido que las células de la epidermis^{92,103}. En las ratas control, las células doblemente marcadas a las 41 h posherida se observaron principalmente concentradas en la parte superior del infundíbulo y en la capa basal de la epidermis perifolicular, mientras que a las 61 h las células doblemente marcadas (IdU⁺/CldU⁺) también estaban presentes en los estratos suprabasales y repartidas homogéneamente a lo largo de la epidermis (Fig. 14C, E). Por el contrario, en las ratas tratadas con capsaicina no se apreció que las células IdU⁺/CldU⁺ estuvieran concentradas en la zona perifolicular. Las pocas células doblemente marcadas se encontraron distribuidas a lo largo de la epidermis en los tres tiempos analizados (Fig. 14B, D, F). Notablemente, las células IdU⁺/CldU⁺ a las 41 h posherida se observaron concentradas en la parte superior de los folículos de las ratas tratadas con capsaicina.

El número de las células IdU⁺/CldU⁺ aumentó a lo largo del tiempo en la epidermis de las ratas control, en tanto que, en las ratas tratadas el número se mantuvo constante (Fig. 15B). En los folículos, el número de células IdU⁺/CldU⁺ a las 32 h posherida fue equivalente en ambos grupos (Fig. 15A). Sin embargo, en los folículos de las ratas tratadas con capsaicina se registró un mayor número de células IdU⁺/CldU⁺ a las 41 h que decreció a las 61 h igualando así al grupo control (Fig. 15A).

Para conocer la fracción de células que representaban las células IdU⁺/CldU⁺ en cada grupo experimental y analizar en mejor detalle al fenómeno migratorio, los datos se expresaron como el porcentaje de células doblemente marcadas respecto del total de

células marcadas (células IdU⁺). En las ratas control la proporción de células IdU⁺/CldU⁺ aumentó en la epidermis de las 32 h a las 61 h posherida; mientras que en los folículos la proporción de estas células tiende a disminuir (Fig. 16). En contraste, la proporción de células IdU⁺/CldU⁺ en la epidermis de las ratas tratadas no sólo fue mayor que en el caso del control a las 32 h, sino que disminuyó a las 61 h. Además, la proporción de células doblemente marcadas disminuyó significativamente de las 32 h a las 61 h en los folículos de ratas tratadas con capsaicina (Fig. 16).

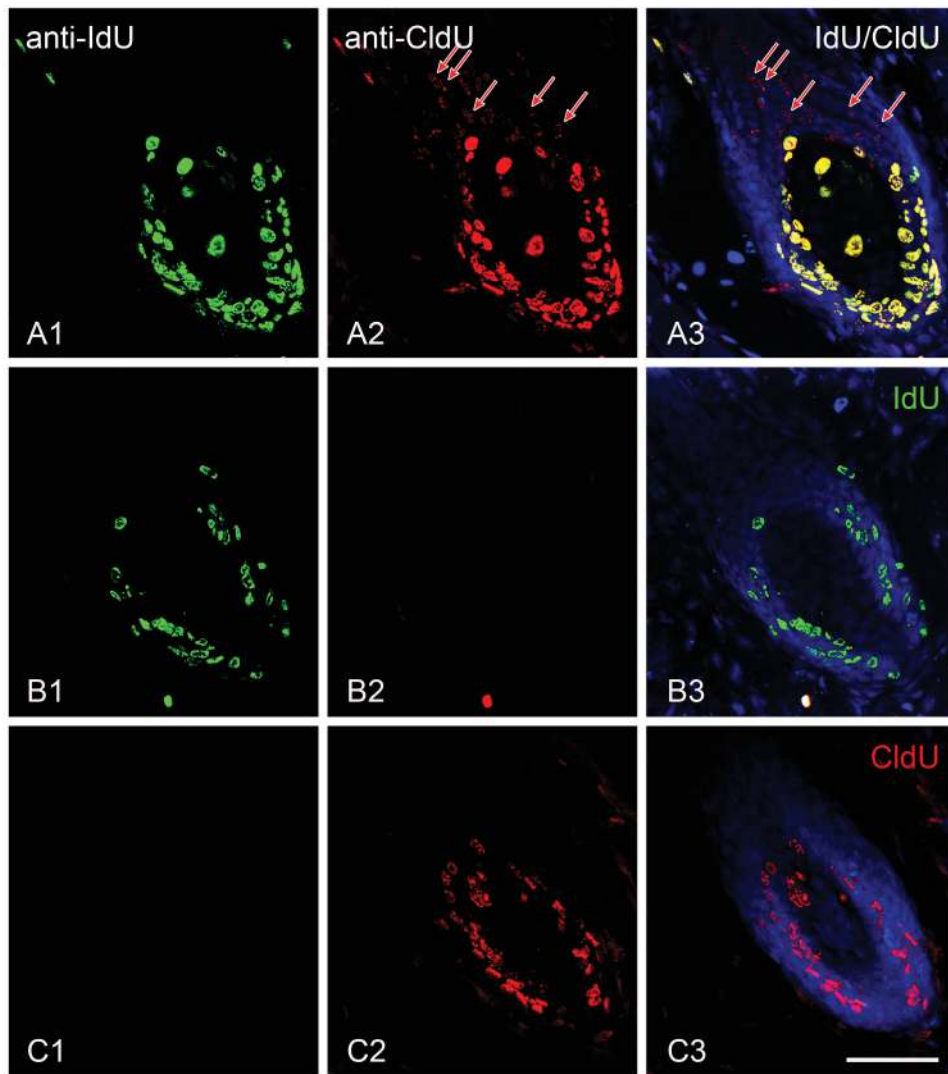


Fig. 13. La detección por inmunofluorescencia puede discriminar entre el marcaje con IdU y CldU. Las ratas fueron inyectadas con una dosis de IdU (B) o de CldU (C) y se sacrificaron una hora después. El tejido de ambos grupos se expuso a los anticuerpos comerciales anti-BrdU marca Becton-Dickinson y Serotec para determinar su especificidad en la discriminación entre los dos análogos de timidina. En el tejido expuesto a IdU sólo el anticuerpo de Becton Dickinson detectó a este análogo (B1); en tanto que, en el tejido expuesto a CldU sólo el anticuerpo de Serotec detectó a este análogo (C2). Para determinar si la separación de la administración de los análogos nos ayudaría a rastrear el destino de una población celular, se inyectó una dosis de CldU

48h antes de una dosis simultánea de IdU y CldU (A). En esta condición, se encontraron células CldU⁺ (A3, flechas rojas) en la parte superior del bulbo lo cual sugiere que estas células salieron de la zona que presentó células doblemente marcadas. Barra de escala = 50 μ m.

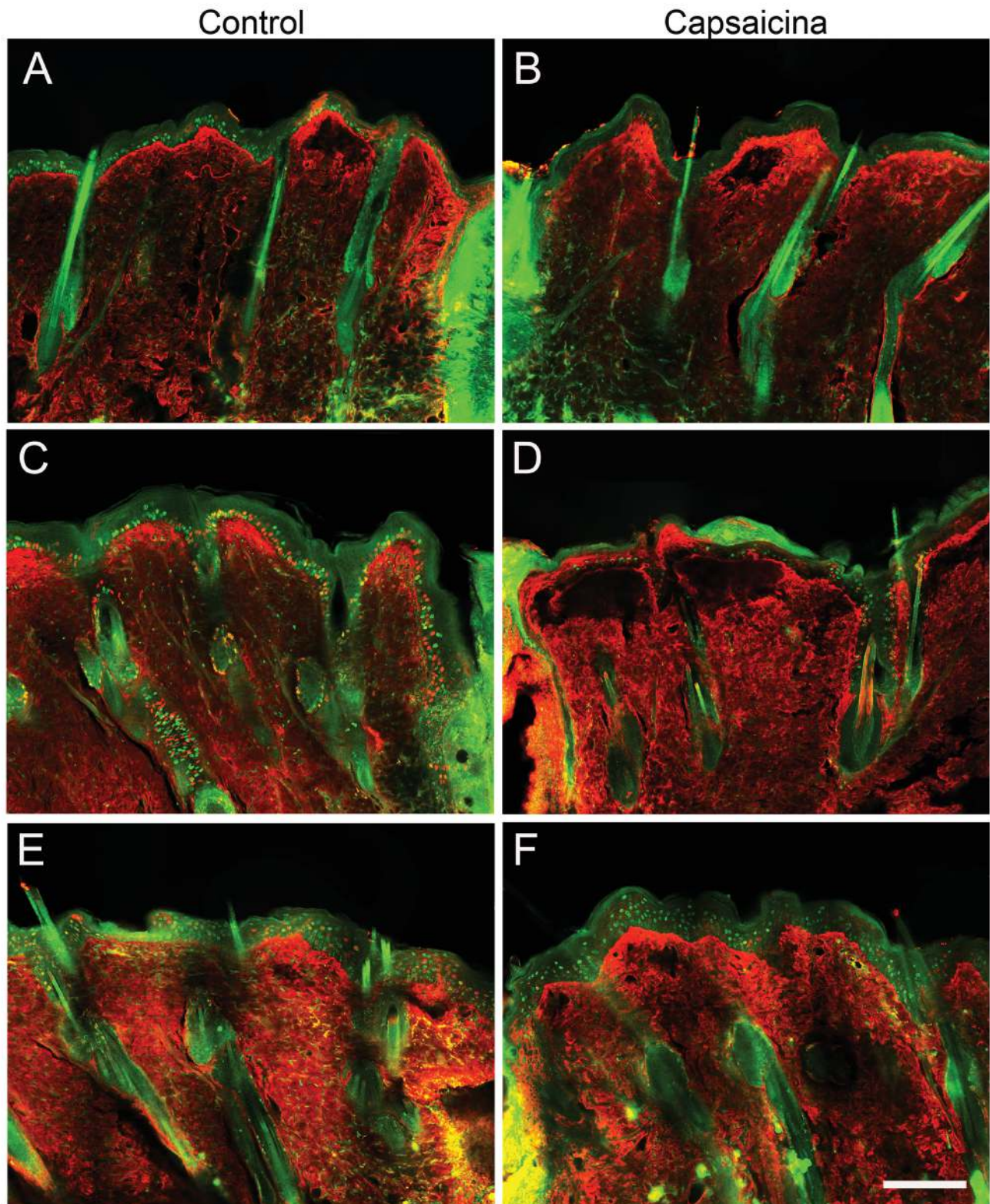


Fig. 14. Inmunofluorescencia para IdU y CldU en la piel lesionada del lomo. Las ratas control (A, C, E) y las ratas tratadas (B, D, F) se inyectaron con IdU veintiuna horas después de lesionar el lomo con un punzón. Diez horas después ambos grupos se inyectaron con una dosis de CldU y la muestra se recolectó a las 32 h (A, B), 41 h (C, D) y 61 h (E, F) poslesión. La marca para IdU se muestra en verde y la de CldU en rojo. La marca roja en la dermis es resultado del pegado inespecífico del anticuerpo secundario hecho en rata. Barra de escala = 100 μ m.

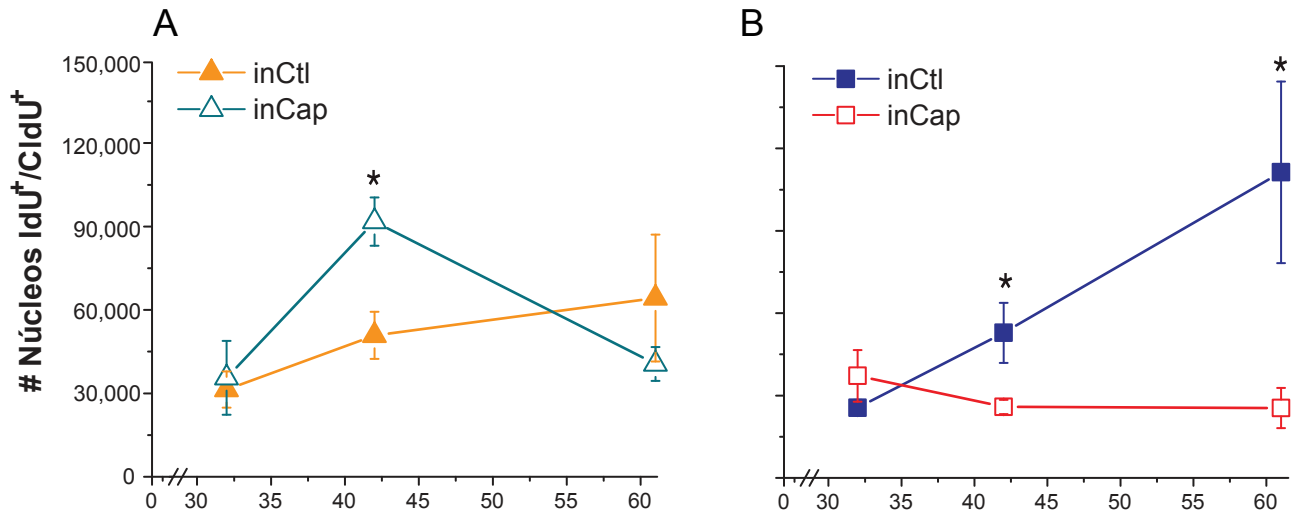


Fig. 15. El número de células IdU⁺/CldU⁺ en la epidermis aumenta con el tiempo sólo en las ratas control. El número total de núcleos inmunopositivos a IdU y CldU en los folículos y en la epidermis se estimó en el cuadrante proximal a la herida (inCtl, inCap) En las gráficas se muestra el número de células IdU⁺/CldU⁺ en los folículos (A) y en la epidermis (B). *p<0.05 (ANOVA).

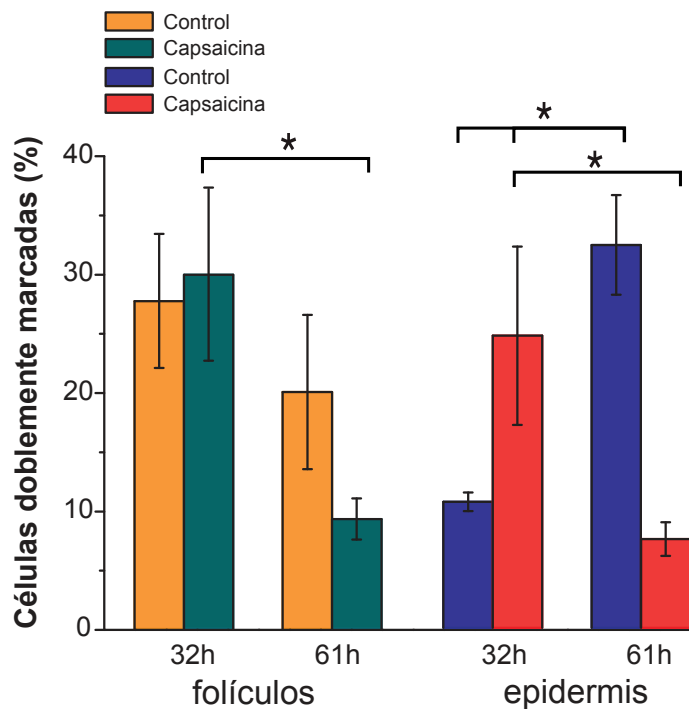


Fig. 16. La migración de células del folículo a la epidermis está alterada en las ratas tratadas con capsaicina. Se determinó la proporción de células IdU⁺/CldU⁺ en la epidermis y folículos a las 32h y 61h posherida respecto del número total de células IdU⁺. La proporción de células IdU⁺/CldU⁺ crece en la epidermis de las ratas control con el tiempo. Sin embargo, en la ratas tratadas decreció con el tiempo. *p<0.05 (ANOVA).

Activación epitelial alrededor de la herida

Para evaluar si en la epidermis de ratas tratadas con capsaicina se enciende algún mecanismo para compensar la falta de células provenientes del folículo, analizamos la expresión de CK-6, el cual es un marcador de activación de la epidermis en respuesta a una herida. A las 32 h posherida, la extensión de la inmunoreactividad de CK-6 fue similar en la epidermis alrededor de la herida en ambos grupos (Fig. 17) Sin embargo, a las 61 h el volumen de la epidermis con expresión de CK-6 fue mayor en las ratas tratadas con capsaicina. El volumen fue 43% y 81% mayor en el cuadrante interno y externo, respectivamente (Fig. 18). En las ratas tratadas fue común observar inmunoreactividad para CK-6 más allá de los límites del cuadrante externo.

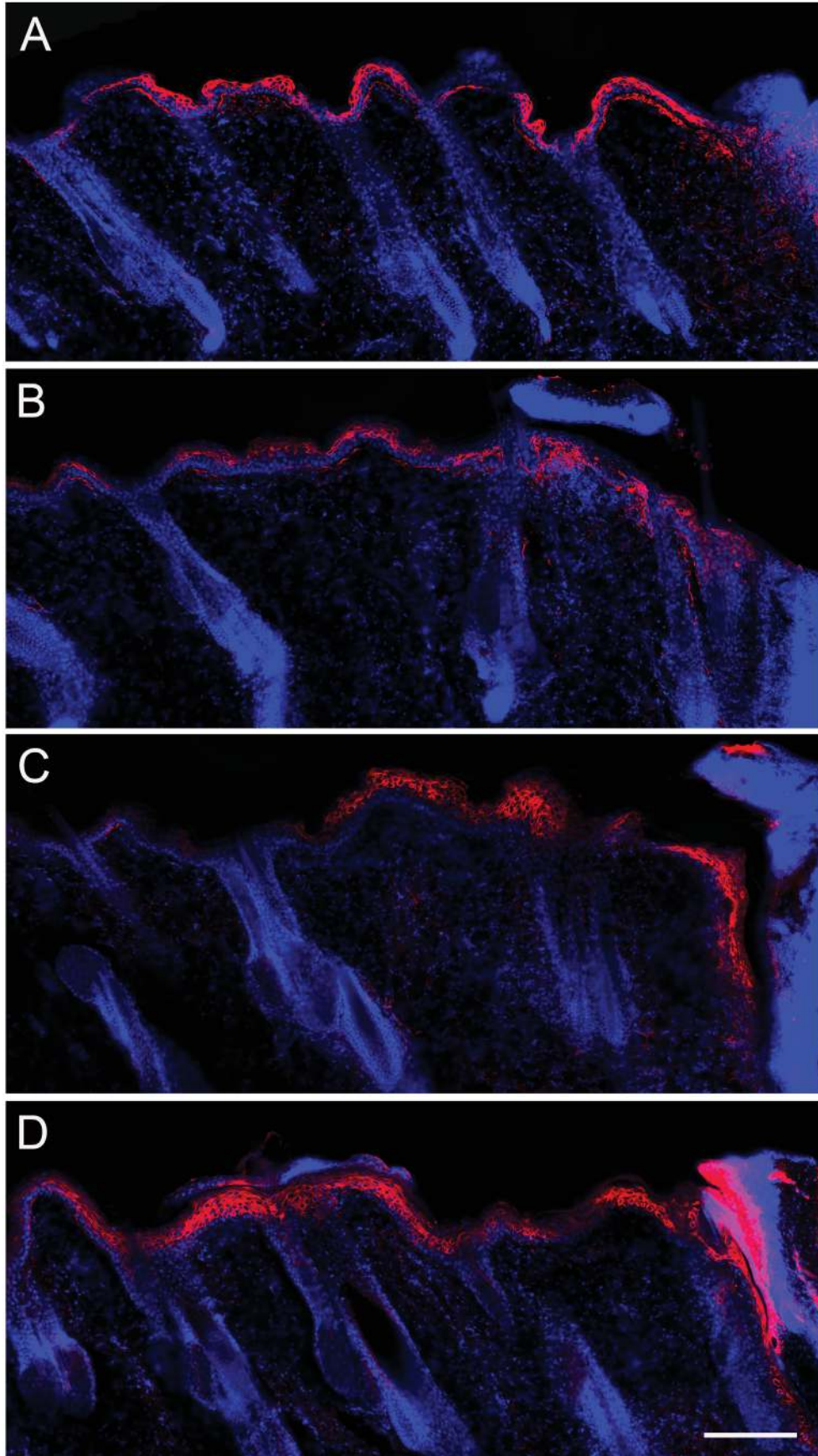


Fig. 17. Inmunofluorescencia para CK6 en la piel lesionada del lomo. En los paneles se muestran microfotografías de inmunotinciones para CK6 en cortes de piel de ratas control (A, C) y ratas tratadas (B, D) a las 32 h (A, B) y 61 h (C, D) posherida. A las 61 h posherida la inmunoreactividad para CK6 abarcó mayor extensión en la epidermis; mientras que en el control la marca para CK6 no fue continua a lo largo de la epidermis. Barra de escala = 100 mm.

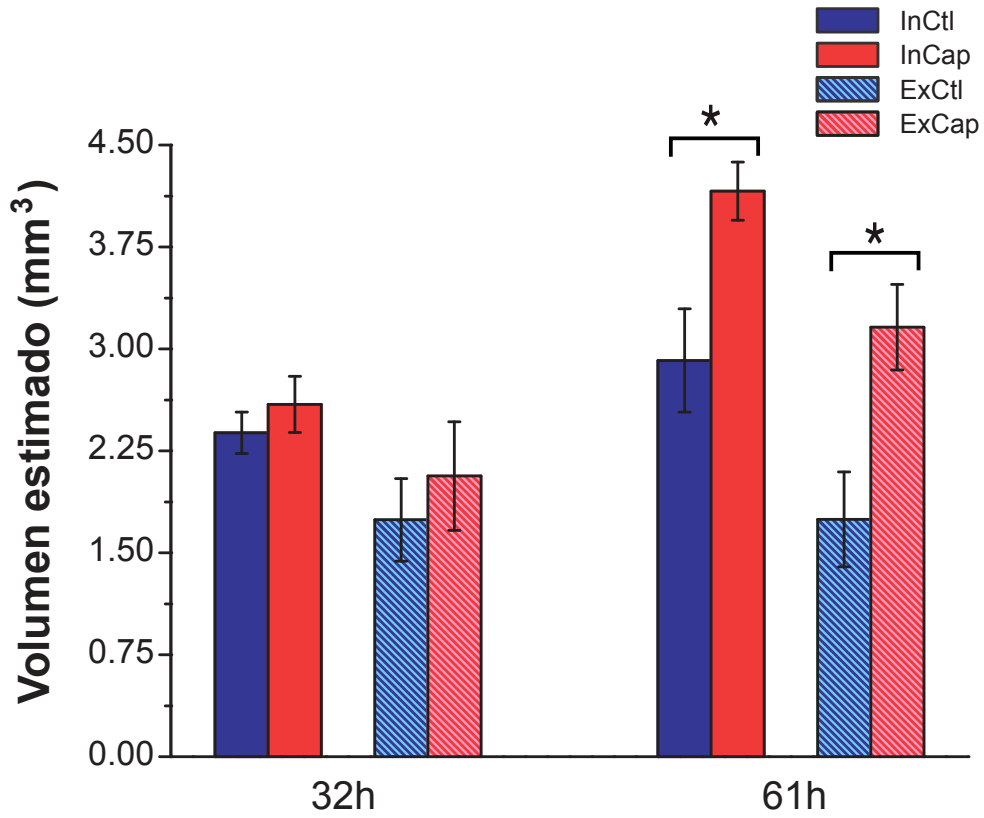


Fig. 18. Una mayor extensión de la epidermis se activa en las ratas tratadas con capsaicina. En la gráfica se muestra la cuantificación del volumen de la expresión de CK6 en la epidermis de ratas control y tratadas con capsaicina. El volumen se estimó por el método estereológico de Cavalieri. El volumen de CK6 fue significativamente mayor en las ratas tratadas a las 61 h. * $p < 0.05$ (ANOVA).

Inervación sensorial alrededor de la herida

Para conocer el estado de la inervación sensorial durante la reparación de la herida, se determinó la longitud total de las fibras inmunorreactivas a CGRP tanto en el epitelio como en la dermis. En la piel de las ratas control las fibras CGRP⁺ se observaron abundantemente en el plexo subepidérmico. De este plexo se originaron las fibras que inervan la epidermis y que rodean el infundíbulo del folículo. Precisamente en la desembocadura del folículo a la epidermis es donde se observó el mayor agrupamiento de terminales intraepidérmicas (Fig. 19A). En el folículo, las fibras CGRP⁺ se observaron rodeando la parte del folículo que está por debajo de la glándula sebácea (Fig. 19B). A las 32 h este patrón fue equivalente tanto en el cuadrante interno como en el externo. Sin embargo, a las 61 h posherida la densidad de fibras presentes en la epidermis y en el folículo disminuyó considerablemente. Además, la marca de las fibras en el cuadrante interno se observó fragmentada y fue el sitio donde menos fibras intraepidérmicas se observaron (Fig. 19E). Incluso en los folículos pilosos de este cuadrante, se observó que el número de anillos de fibras CGRP⁺ fue menor (Fig. 19F). Por su parte, en las ratas tratadas con capsaicina, las fibras intraepidérmicas fueron escasas y generalmente presentes de forma individual y con morfología simple desde las 32 h. El plexo subepidérmico fue prácticamente inexistente en las ratas tratadas (Fig. 19C). En este grupo destacaron unas fibras que corrían de forma paralela a los folículos y que pocas veces llegaban a la epidermis (Fig. 19G). La inervación por debajo de la glándula sebácea sólo estuvo presente en algunos folículos, pero con muy poca densidad de anillos de fibras (Fig. 19D, H). Este patrón general de inervación fue muy similar en los dos tiempos analizados en las ratas tratadas con capsaicina.

En las ratas control, la longitud de las fibras CGRP⁺ disminuyó 43% en el cuadrante interno de las 32 h a las 61 h posherida y 39% en el cuadrante externo en el mismo

periodo de tiempo (Fig. 20). Aun cuando las fibras CGRP⁺ no disminuyeron con el tiempo en las ratas tratadas con capsaicina, la inervación peptidérgica fue menor en los dos tiempos analizados. A las 32 h la longitud de las fibras CGRP⁺ de las ratas tratadas fue 73% y 67% menor en el cuadrante interno y en el cuadrante externo, respectivamente. A las 61 h, la longitud de las fibras en las ratas tratadas fue 38% menor en el cuadrante externo. En general, las fibras SP⁺ fueron menos abundantes que las fibras CGRP⁺. En el caso de las ratas control el plexo subepidérmico consistió de tan sólo una o dos fibras paralelas a la epidermis (Fig. 21A). Al igual que las fibras CGRP⁺, las fibras SP⁺ en la epidermis también se observaron en la desembocadura del folículo a la epidermis pero en mucha menor densidad, incluso en la mayoría de los casos se observaron fibras individuales (Fig. 21B). Además, no se observaron fibras alrededor la zona de la protuberancia. Principalmente las fibras SP⁺ se localizaron en la dermis corriendo de manera paralela a los folículos y asociadas a vasos sanguíneos tanto en la dermis superior como en la profunda (Fig. 21B, F). En contraste, en las ratas tratadas con capsaicina no se observaron fibras SP⁺ en la epidermis (Fig. 21C, G). Las escasas fibras que se observaron en este grupo de animales estaban asociadas a grandes vasos sanguíneos en la dermis o se presentaron en forma de terminales nerviosas libres en la dermis profunda (Fig 21D, H).

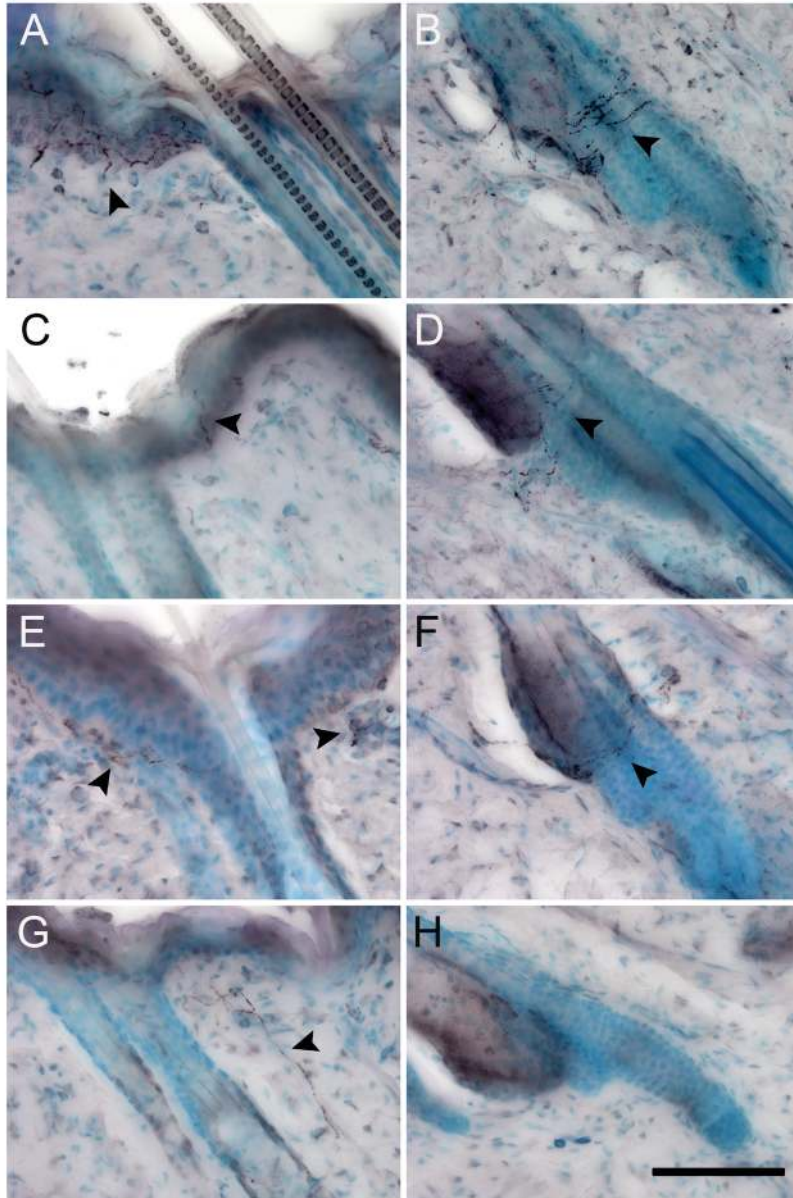


Fig 19. Inmunohistoquímica para CGRP en la piel lesionada del lomo. En los paneles se muestran microfotografías de inmunotinciones para CGRP en cortes de piel de ratas control (A, B, E, F) y ratas tratadas (C, D, G, H) a las 32 h (A, B, C, D) y 61 h (E, F, G, H) posherida. Las fibras CGRP⁺ (cabecitas de flecha) disminuyeron con el tiempo en las ratas control. Sin embargo, la cantidad de fibras asociadas al epitelio de las ratas tratadas fue siempre menor en los dos tiempos estudiados. Barra de escala = 100 μ m

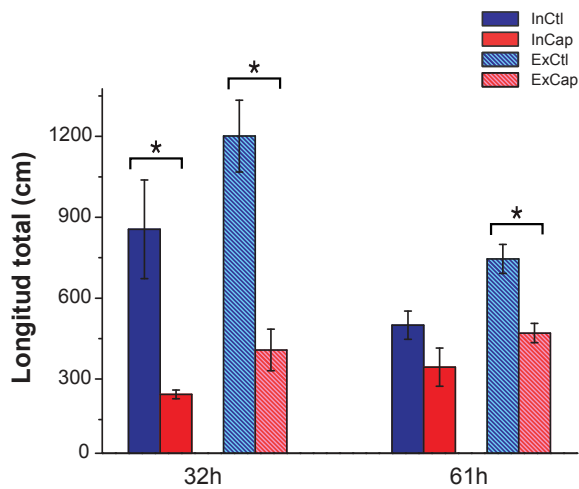


Fig. 20. La inervación peptidérgica es más abundante en las ratas control durante la reparación de la herida. La longitud de las fibras inmunoteñidas para CGRP se cuantificó utilizando el método estereológico de las esferas virtuales. * $p < 0.05$ (ANOVA).

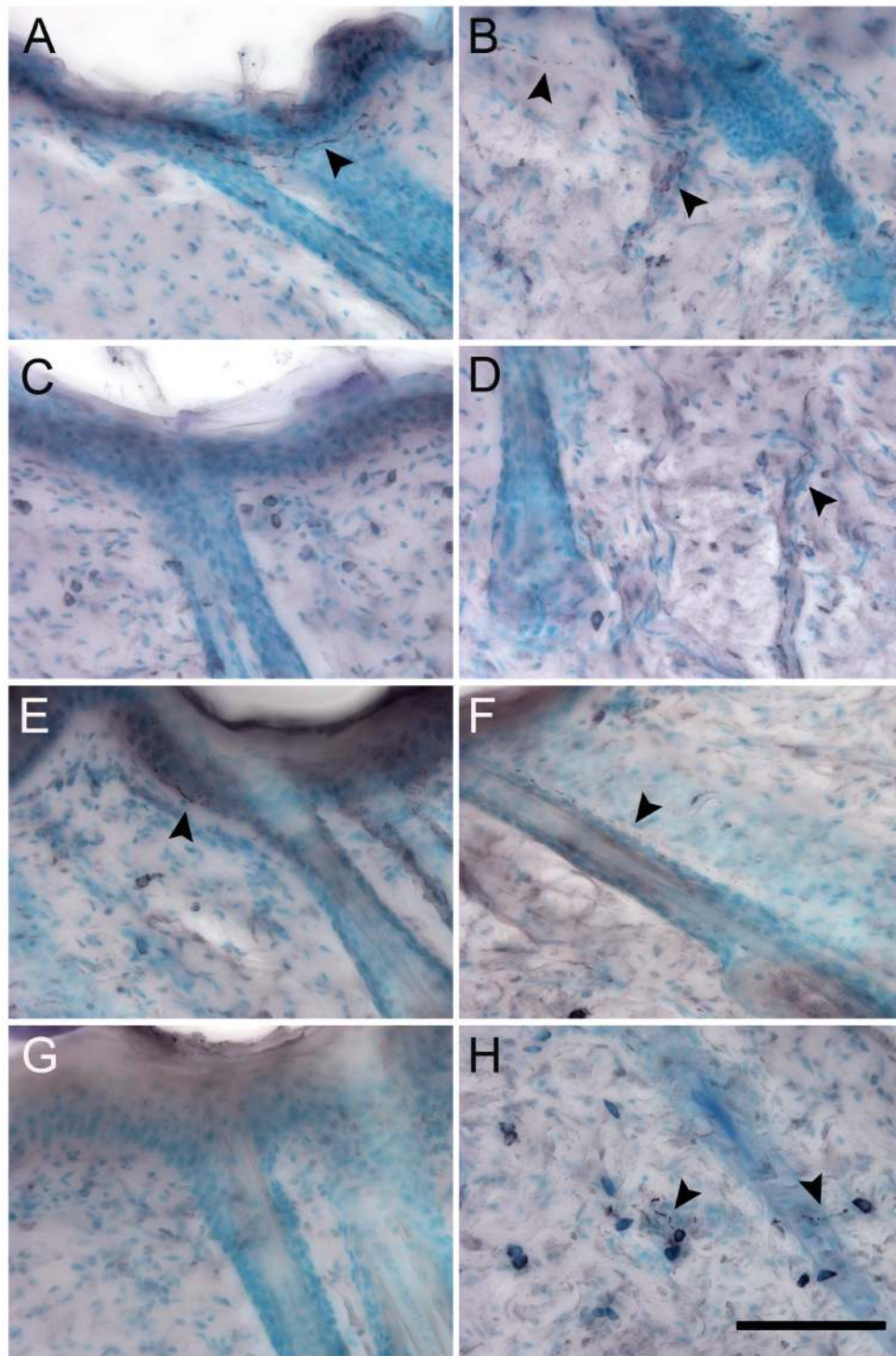


Fig. 21. En las ratas tratadas las fibras inmunorreactivas a SP no están asociadas al epitelio. En los paneles se muestran microfotografías de inmunotinciones para SP en cortes de piel de ratas control (A, B, E, F) y ratas tratadas (C, D, G, H) a las 32 h (A, B, C, D) y 61 h (E, F, G, H) posherida. En la piel del control, las fibras SP+ (cabezas de flecha) se encontraron en la epidermis, plexo subepidérmico, en la cercanía de los folículos y asociadas a vasos sanguíneos. En contraste, en las ratas tratadas sólo se observaron asociadas a vasos sanguíneos y en la dermis profunda. Barra de escala = 100 μ m

Receptores de neuropéptidos en el nicho de la protuberancia

Para determinar si el nicho de células troncales del foliculo tiene la capacidad de recibir mensajes de la inervación sensorial, se determinó por microscopía confocal la presencia de receptores para CGRP y SP. En estos experimentos se utilizaron ratas que recibieron seis dosis de BrdU durante la primera semana de vida y fueron sacrificados a las ocho y diez semanas posnatales. Las células retenedoras de marca fueron ubicadas a las ocho y a las diez semanas en la zona de la protuberancia como se ha descrito anteriormente⁹² (Fig. 22). El marcaje a largo plazo de BrdU tuvo el inconveniente de que solamente marcó a una pequeña fracción de las células y que la marca nuclear

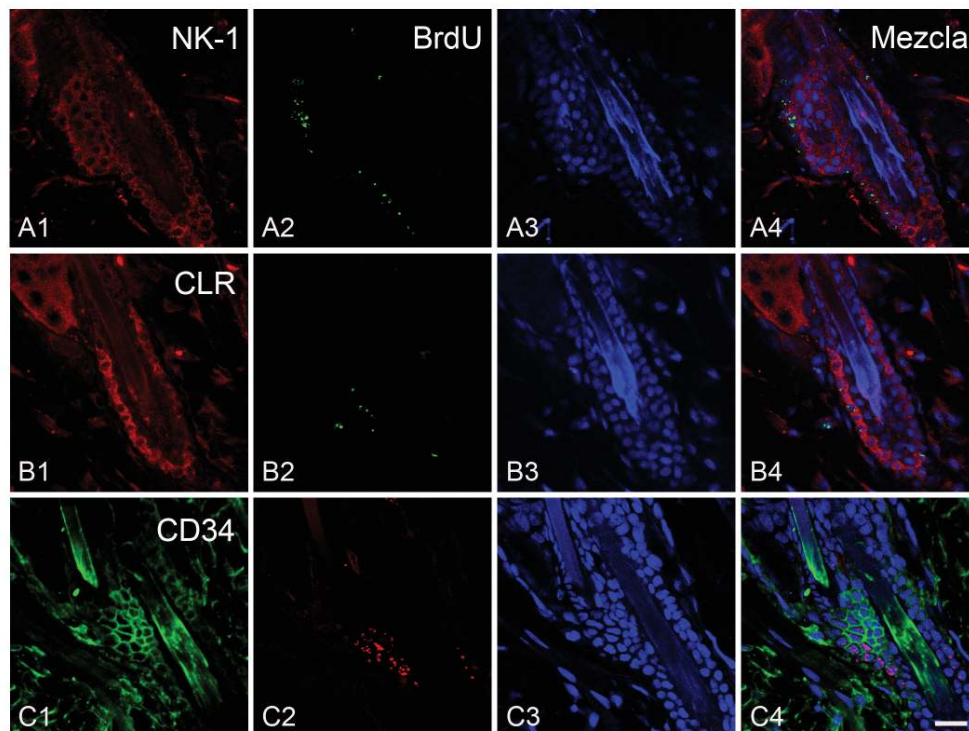


Fig. 22. Las células retenedoras de marca de la protuberancia presentan receptores de neuropéptidos. Por medio de microscopía confocal se evaluó la presencia de receptores a sustancia P (NK-1) y a CGRP (CLR) en las células que retuvieron marca de BrdU después de 8 semanas del marcaje. Asimismo, se corroboró la correspondencia de la marca de BrdU en algunas células que presentaron el marcador CD34. La contra-tinción nuclear se realizó con TOTO-3 (A3 y B3) y con ioduro de propidio (C3). Barra de escala = 20 µm.

estaba en la mayoría de los casos diluida. Para contender con esta limitación, se utilizaron los marcadores de células troncales nestina y CD34. En términos generales, la inmunorreactividad para el receptor de la sustancia P (NK-1) se localizó en la epidermis y en la vaina radicular externa del folículo. No obstante, la intensidad de la inmunorreactividad de NK-1 fue menor en el folículo. En la zona de la protuberancia, las células marcadas con BrdU y con CD34 presentaron inmunorreactividad para NK-1 (Fig. 22A y Fig. 23A). Asimismo, la inmunorreactividad para CLR se encontró en las células BrdU⁺ y CD34⁺. Sin embargo, fue notable que la inmunorreactividad a CLR en algunas células de la región de la protuberancia fuera más intensa que en el resto del folículo (Fig. 22B y Fig. 23B). Para corroborar que el CLR tuviera afinidad para CGRP, se hizo la inmunotinción para la proteína accesoria RAMP-1. La inmunorreactividad para RAMP-1 también se encontró en la vaina radicular externa del folículo. En la protuberancia la marca para RAMP-1 colocalizó con la inmunorreactividad para CD34 (Fig. 23C). El patrón de inmunorreactividad para los receptores fue similar en las ratas tratadas con capsaicina (Fig. 24). Por otro lado, se realizaron inmunotinciones para la proteína de citoesqueleto nestina que también se ha

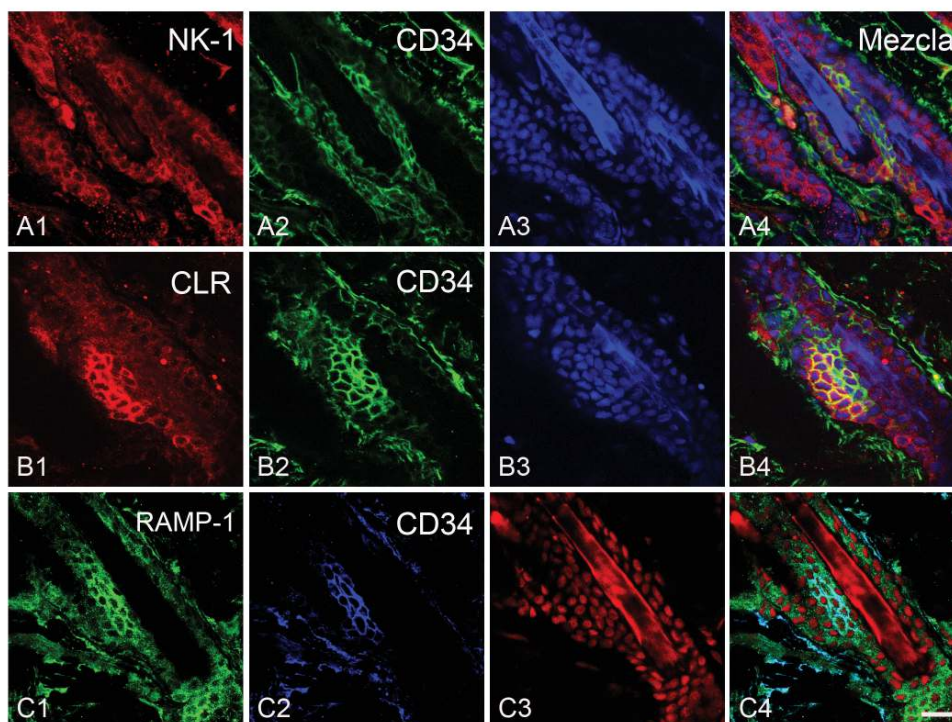


Fig. 23. Las células inmunorreactivas a CD34 de la protuberancia presentan receptores de neuropeptidos. Los receptores NK-1 y CLR están presentes en células CD34⁺. Nótese la intensa inmunorreactividad del receptor CLR en las células CD34⁺. La proteína accesoria RAMP-1 también está presente en las células CD34⁺. La contratinción nuclear se realizó con TOTO-3 (A3, B3 y C3). Barra de escala = 20 μ m.

considerado como marcador de células troncales del folículo piloso¹⁵⁸⁻¹⁶⁰. Sin embargo, no se encontraron células doblemente marcadas para nestina y CD34 (Fig. 25 y Fig. 24B, C). Las células marcadas con nestina rodean la zona de la protuberancia y se localizan de manera externa al epitelio. Además, las células inmunorreactivas a nestina no presentaron colocalización con ninguno de los receptores (Fig. 24 y Fig. 25).

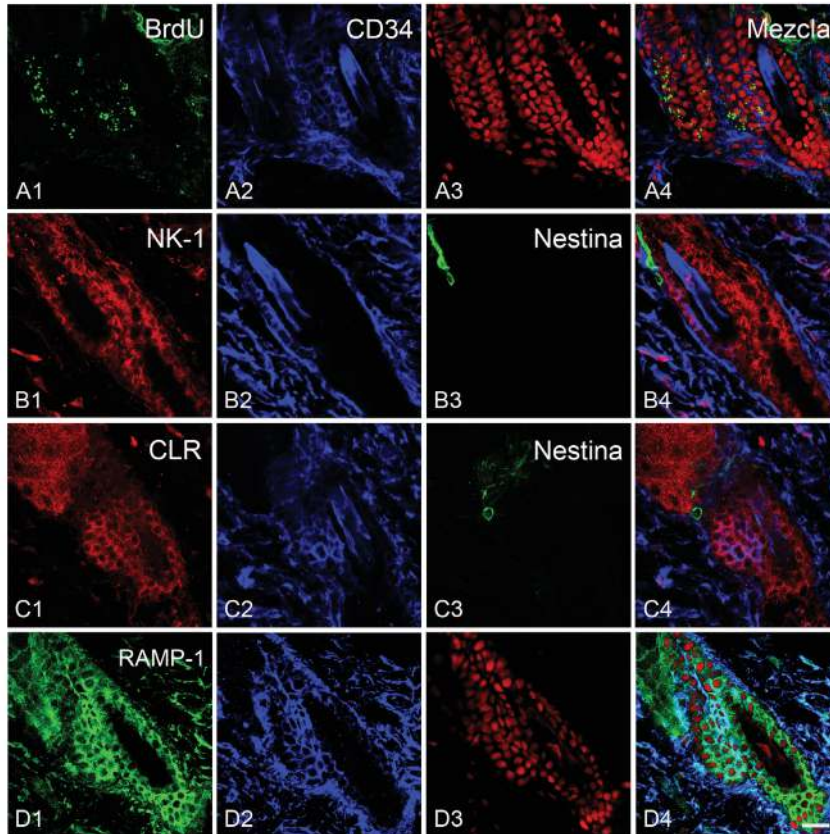


Fig. 24. El nicho de células troncales de la protuberancia no parece afectarse por el tratamiento con capsaicina. En las ratas tratadas también se observó la presencia de células retenedoras de marca y células CD34⁺ en la zona de la protuberancia. Asimismo, los receptores NK-1 y CLR colocalizan con estos marcadores. Nótese, la presencia de células dendríticas externas al epitelio de folículo marcadas con nestina y que no colocalizan con los receptores (B3 y C3). La contratinción nuclear se realizó con yoduro de propidio (A3) y con TOTO-3 (C3). Barra de escala = 20 μ m.

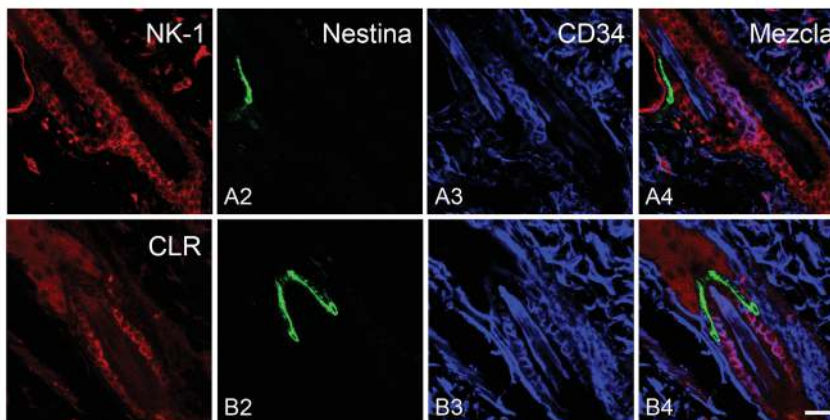


Fig. 25. Las células inmunorreactivas a nestina no forman parte del epitelio del folículo. Los receptores de neuropéptidos no estuvieron presentes en las células inmunorreactivas a nestina. Estas células tienen forma dendrítica y están por fuera de la vaina radicular externa del folículo. Barra de escala = 20 μ m.

DISCUSIÓN

Las neuronas susceptibles a la capsaicina han sido involucradas en el mantenimiento de la integridad epitelial^{147,148}. Sin embargo, desconocen las consecuencias del tratamiento neonatal con capsaicina sobre el recambio epitelial en condiciones normales y de lesión. Tampoco se han caracterizado los efectos del tratamiento sobre el desarrollo de la inervación cutánea, en especial de aquellos nervios que llegan a los epitelios. Aunque la capsaicina eliminó gran parte de las fibras presentes en la epidermis, en este estudio encontramos que el tipo de fibra que predominó en la epidermis fue sorprendentemente de tipo peptidérgico. Además, las terminales nerviosas de las ratas tratadas con capsaicina fueron morfológicamente más simples y generalmente no están presentes en los sitios donde interactúa con el epitelio. Ambas observaciones sugieren que las funciones aferentes como eferentes de los nervios sensoriales están alteradas. En particular este trabajo contribuye a dilucidar el papel de las terminales del DRG que tienen sobre la modulación de precursores epiteliales para mantener la homeostasis de la piel.

La piel de la pata trasera ha sido utilizada frecuentemente como modelo de estudio para la degeneración y regeneración nerviosa^{105,161,162}. Sin embargo, hay pocos datos cuantitativos acerca del desarrollo de la inervación epidérmica en esta región.

Este trabajo proporciona un panorama del desarrollo normal de la inervación epidérmica en la piel glabra y cómo se alteró después del tratamiento neonatal con capsaicina. En primera instancia, este trabajo muestra que aunque el tamaño de la pata aumenta con la edad de la rata, la longitud total de las terminales intraepidérmicas no tuvo cambios sustanciales al mes, tres y seis meses de edad. Esto sugiere que el suministro de inervación permanece relativamente constante, pero que es redistribuido importantemente a lo largo de la vida del organismo. Lo anterior se apoya por la observación de que la forma de organización de los grupos de fibras PGP⁺ es prácticamente el mismo en todas las edades analizadas. Sin embargo, los agrupamientos de terminales intraepidérmicas están más diseminados en la epidermis de las ratas de tres y seis meses. En relación a la plasticidad individual de las fibras nerviosas, la gran diversidad morfológica de las terminales intraepidérmicas sugiere que estas terminales experimentan un continuo remodelamiento. De acuerdo con esta noción, las terminales sensoriales en la córnea del ratón cambian sustancialmente su arborización y su ubicación en el transcurso de un mes¹⁶³. Este hallazgo podría explicar porqué observamos la aparición de fibras altamente arrosariadas a los tres meses y su disminución a los seis meses. En cambio, las terminales intraepidérmicas en las ratas tratadas con capsaicina podrían tener propiedades plásticas más limitadas. Notablemente, el tipo predominante de fibras en las ratas tratadas fue de morfología simple y aspecto grueso. Con base en el aspecto anatómico, estas terminales sensoriales podrían representar un subgrupo de fibras C con morfología alterada o bien fibras A δ que no contienen la proteína GAP-43 (una molécula asociada a la remodelación de los nervios)^{164,165}. Al respecto, la aplicación de capsaicina alrededor del nervio ciático en ratas adultas reduce el número de terminales intraepidérmicas que son inmunorreactivas a GAP-43²⁸. Por lo tanto, la persistente baja cantidad de fibras intraepidérmicas en las ratas tratadas podrían reflejar una capacidad limitada de las fibras PGP⁺ y CGRP⁺ para tener rebrotes axonales. Aunque la relación entre la arborización periférica y el tipo de modalidad sensorial que procesa una neurona apenas empieza a entenderse, es posible que la configuración menos arborizada de las terminales intraepidérmicas en las ratas

tratadas repercute sobre las propiedades de excitación de las fibras y sobre todo que restrinja su campo de activación^{166,167}. Esto se apoya por el hecho de que la detección de estímulos nocivos es afectada por la inyección de capsaicina en la piel del humano¹⁶⁸. Otras alteraciones de tipo sensorial podrían ser causadas por el hecho de que zonas amplias de la epidermis no tienen inervación en las ratas tratadas. Recientemente, se ha mostrado que la lesión mecánica de los nervios sensoriales conlleva a una invasión aberrante de los nervios simpáticos hacia la dermis superficial en la piel de la rata¹⁶¹. En nuestro trabajo también observamos la invasión de terminales nerviosas simpáticas (fibras inmunorreactivas para dopamina- β hidroxilasa; ver figura suplementaria) en el borde entre la dermis y la epidermis, e incluso advertimos algunas fibras que penetraron a la epidermis en las ratas tratadas de tres y seis meses de edad. Si la presencia de fibras simpáticas no vasculares en la dermis superficial de las ratas tratadas con capsaicina es relevante para la fisiología sensorial, tiene que ser investigado.

Recientemente, se ha documentado que en las mismas preparaciones la estimación de la longitud de las fibras intraepidérmicas por estereología correlaciona positivamente con el número de fibras por milímetro¹⁶⁹. Tomando en cuenta que la susceptibilidad a la capsaicina es dada por la expresión del receptor de potencial transitorio V1 (TRPV1)⁵¹, los resultados de este trabajo sugieren que un número considerable de terminales intraepidérmicas en la piel glabra presuntamente contienen este receptor. El TRPV1 es expresado por neuronas del DRG de tipo peptidérgico y no peptidérgico¹⁷⁰⁻¹⁷². Cabe resaltar que las fibras no peptidérgicas son el tipo más abundante de terminales en la epidermis de la piel glabra y la piel con pelo de la rata¹⁷³. Por esta razón, es posible que una subpoblación muy importante de fibras no peptidérgicas sean las más afectadas por el tratamiento con capsaicina. Asimismo, los datos de este trabajo indican que una subpoblación de fibras peptidérgicas también sería afectada por este tratamiento. Al respecto, casi la mitad de las fibras CGRP⁺ podrían estar asociadas a neuronas susceptibles al tratamiento con capsaicina. Este estimado parece ser razonable puesto que el 59% de las neuronas que inervan a la piel correspondientes al dermatoma L6 presentan colocalización de TRPV1

con CGRP¹⁷¹. Algunas de estas neuronas cutáneas podrían presentar ramificaciones en la parte distal de su axón e inervar de esta manera un territorio amplio en la epidermis. Lo anterior no necesariamente implica que todas las terminales de estas neuronas contengan el receptor TRPV1 en la epidermis. De hecho, existe controversia acerca de la proporción de fibras inmunorreactivas a TRPV1 que se localizan en la epidermis de humanos y otros primates^{165,174,175}. Una explicación a estas diferencias podría radicar en que algunas terminales intraepidérmicas, tanto peptidérgicas como no peptidérgicas, provengan de neuronas susceptibles a la capsaicina, pero que no transportan al receptor TRPV1 a esta parte de la terminal; o bien que las terminales intraepidérmicas contengan cantidades por debajo del límite de detección que permite la inmunotinción¹⁷⁰. Para el caso de roedores es necesario estudios adicionales para determinar la proporción exacta de fibras peptidérgicas y no peptidérgicas que colocalizan en la epidermis con TRPV1. Por otra parte, la expresión de TRPV1 se ha reportado en varios tipos celulares que no son neuronales como los queratinocitos¹⁷⁶. Este hallazgo abre la posibilidad de que el tratamiento neonatal con capsaicina pueda tener efectos citotóxicos o que altere la fisiología de los queratinocitos. Sin embargo, se ha mostrado que el TRPV1 no es funcional en queratinocitos humanos presuntamente por la presencia de TRPV1b, que es una forma dominante negativa de TRPV1. Además, los efectos citotóxicos en los queratinocitos sólo son causados por dosis muy altas de vaniloides y estos efectos son independientes de la activación de TRPV1¹⁷⁷.

Otro punto digno de mención es que al mes de edad la longitud de las fibras CGRP⁺ es mayor que la longitud de las fibras PGP⁺ en las ratas tratadas con capsaicina. Esta observación sugiere que en algunas neuronas amielínicas la expresión de PGP esté disminuida o ausente por el tratamiento con capsaicina. Confirmando lo anterior, el marcaje con tubulina β III permitió identificar fibras que no presentaron inmunoreactividad para PGP, en especial al mes del tratamiento con capsaicina. Notablemente, algunas fibras CGRP⁺ tampoco son marcadas por tubulina β III en las ratas tratadas. Al respecto, se ha observado que tras lesionar al nervio ciático en ratas y en muestras de pacientes

con neuralgia posherpética, algunas de las fibras amielínicas presentan poca o nula inmunoreactividad para PGP^{162,175}. Este fenómeno parece temporal y peculiar de condiciones degenerativas. El hecho de que la longitud de las fibras CGRP⁺ y PGP⁺ es similar a los tres y seis meses en ratas tratadas indica que la cantidad de PGP regresa a niveles detectables en algunas fibras. Así, no se puede descartar que un porcentaje de fibras no pudieran ser detectadas con el análisis empleado. Se requieren estudios adicionales para determinar porqué la síntesis o el transporte de PGP y tubulina β III se altera durante la regeneración y degeneración nerviosa y si esto refleja alguna alteración funcional en la terminal sensorial.

Las fibras intraepidérmicas han sido involucradas en la modulación de la proliferación de queratinocitos^{141,142}. Para explorar esta noción, se inyectó una dosis de capsaicina al nacimiento para reducir la cantidad de terminales en la epidermis. A pesar de la disminución de terminales en la epidermis, la proliferación de los queratinocitos no disminuyó significativamente. Una explicación a lo anterior es que a diferencia de la lesión del nervio ciático, el tratamiento con capsaicina no altera ni el movimiento de la extremidad ni el soporte mecánico de la planta de la pata trasera^{143,144}. En este contexto la proliferación de los queratinocitos podría estar modulada por señales derivadas de las fibras no peptidérgicas, las cuales pueden ser activadas por la liberación de ATP proveniente de los queratinocitos después de su estimulación mecánica^{173,178}. Sin embargo, el hecho de la predominancia de terminales peptidérgicas en la epidermis de las ratas tratadas con capsaicina (presente trabajo) y del adelgazamiento de la piel por denervación también ocurre en regiones que no soportan el peso corporal¹⁷⁹⁻¹⁸¹, sugiere mecanismos alternativos. Por ejemplo, es posible que la disminución de señales derivadas de los nervios fuera compensada en condiciones normales por un aumento de la disponibilidad de factores de crecimiento locales. Otra alternativa tentadora es que las terminales peptidérgicas que prevalecen después del tratamiento sean las proveedoras del aporte trófico que la epidermis requiere para mantener su homeostasis. Un estudio reciente mostró que CGRP es uno de los factores que estimula la proliferación

de queratinocitos *in vivo* después de la estimulación con luz ultravioleta¹⁸². Con base en este dato y nuestra observación de que las fibras CGRP⁺ son las predominantes después del tratamiento con capsaicina, proponemos que la disponibilidad de CGRP en las ratas tratadas es suficiente para mantener un adecuado recambio de los queratinocitos en condiciones normales.

Los resultados de este trabajo indican que el tratamiento con capsaicina tuvo un efecto mayor sobre las fibras no peptidérgicas. Esto puede ser explicado bajo los siguientes escenarios. Primero, que tras el tratamiento con capsaicina se induzca o se incremente la expresión de CGRP u otros neuropéptidos en ciertas neuronas amielínicas que inervan la epidermis. El incremento de la expresión de algunos neuropéptidos ha sido observado en condiciones de lesión del nervio ciático en neuronas que normalmente no expresan estos neuropéptidos^{77,183}. La segunda posibilidad involucra que la piel promueva un rebrote axonal para compensar la pérdida de terminales peptidérgicas. Ambos escenarios tienen implícito que la piel, bajo mecanismos no claros, trata de compensar la deficiencia de aporte trófico derivado de los nervios. En nuestro caso representado por la presencia de fibras que contienen CGRP. De confirmarse estos escenarios reafirmarían la relevancia de los neuropéptidos en el recambio epitelial. En este contexto fue interesante evaluar la capacidad proliferativa de la epidermis en ratas tratadas con capsaicina en condiciones de alta demanda de queratinocitos.

Durante varias décadas se ha postulado que la inervación tiene un efecto benéfico sobre la reparación de heridas. Sin embargo, la mayoría de los estudios se han limitado a documentar la repercusión de la denervación sobre el tiempo de cerrado de una herida^{148,150,184-186}. Hasta donde sabemos, no existen trabajos que hayan explorado la posibilidad de que la inervación participe en la activación o en la modulación de los precursores epiteliales que aseguran la reformación del epitelio. En este sentido es importante señalar que no está claro cuáles son las señales que activan y movilizan a las células troncales de la protuberancia durante el proceso de reparación de una herida. En este trabajo

proponemos que a través de la liberación de neuropéptidos la inervación sensorial podría estar involucrada en la fisiología de los nichos de células troncales del epitelio del folículo piloso.

Comúnmente se ha argumentado en casos clínicos y experimentales de denervación cutánea, que el retraso del cierre de una herida es una consecuencia inespecífica originada por el daño recurrente al sitio de lesión debido a la falta de sensibilidad en la piel. Sin embargo, los datos de este trabajo apuntan a que las terminales sensoriales tienen un papel específico en el proceso de reformación del epitelio. Una característica sobresaliente de los roedores tratados al nacimiento con capsaicina es que durante el desarrollo presentan lesiones espontáneas en la cornea y en la piel de la cabeza^{148,187,188}. Las lesiones en la piel aparecen incluso cuando se evita que los animales se acicalen la cabeza¹⁸⁹. Estos datos sugieren que en condiciones de alta demanda celular y en ausencia de inervación, algunos epitelios tienen deficiencias para generar el número de células que requiere la expansión epitelial. De acuerdo con esta noción, en este trabajo observamos que la denervación química con capsaicina tiene efectos adversos sobre la proliferación de la epidermis alrededor de una herida escisional en la piel del lomo. Notablemente, el número inicial de células marcadas con BrdU fue idéntico en los folículos de ambos grupos. Estos resultados indican que la inervación sensorial interactúa diferencialmente con distintos tipos de precursores epiteliales. Si bien, el menor número de células BrdU⁺ en la epidermis durante las primeras 48 h posherida estaría relacionado con una menor cantidad de precursores en fase proliferativa en la epidermis, este efecto pudo combinarse con un menor aporte de precursores epiteliales provenientes del folículo. En apoyo a este punto, observamos un mayor número de células IdU⁺/CldU⁺ en la epidermis de las ratas control a las 61 h posherida, lo cual sugiere que la movilización de células epiteliales del folículo a la epidermis está disminuida en las ratas tratadas con capsaicina. Esto no se debió a una menor activación de los precursores en el folículo porque a las 32 h se encontró que la proporción de células doblemente marcadas era igual en ambos grupos. Además, las células del folículo en las ratas tratadas aparentemente si se dividen

ya que el número de células IdU⁺/CldU⁺ aumentó respecto del control a las 42 h posherida. Aunque la proporción de células doblemente marcadas en los folículos disminuyó en las ratas tratadas de las 32 h a las 61 h, esto no se reflejó en un incremento en las células doblemente marcadas de la epidermis. En conjunto estos datos sugieren que la falta de inervación dificulta el tránsito de las células del folículo a la epidermis. Al respecto cabe destacar que tanto CGRP como SP promueven indirectamente la migración de células epiteliales del intestino en cultivo celular^{190,191}. Por otra parte, el destino de las células doblemente marcadas en los folículos de ratas tratadas no es claro. Una posibilidad es que la supervivencia de las poblaciones amplificadoras dependa de la inervación sensorial. De manera sobresaliente, la SP promueve la supervivencia de fibroblastos humanos a través de la expresión de BCL-2 que es un inhibidor de la muerte celular por apoptosis¹⁹². La falta de inervación también parece repercutir sobre la duración del ciclo celular de algunas poblaciones epiteliales. Esto se demuestra por el hecho de que el número total de células IdU⁺/CldU⁺ en la epidermis es relativamente constante mientras que su proporción disminuye de las 32 h a las 61 h.

Recientemente, se utilizó un ratón transgénico que no presenta folículos en la piel de la cola para investigar el papel funcional de las células derivadas del folículo durante la reparación de la epidermis y el desarrollo posnatal^{102,103}. De estos estudios se concluye que las células provenientes del folículo piloso son una fuente de precursores epiteliales de proliferación alta que aseguran el aporte celular que requiere una rápida expansión de la epidermis. Aunque estas células no son indispensables para la reformación del epitelio después de una herida, su presencia es importante para acelerar el proceso¹⁰². Estos datos coinciden con la observación de que las ratas tratadas con capsaicina presentan un aumento tardío de la proliferación en la epidermis igualando incluso los valores observados en el control. Esto sugiere que ante la ausencia del arribo de células derivadas del folículo, por mecanismos aún desconocidos, se presenta una mayor activación y reclutamiento de precursores epiteliales de la epidermis. En apoyo a esta noción está el hecho de que la epidermis de las ratas tratadas presenta una mayor área de expresión

de CK6. Lo anterior coincide con lo observado en el ratón mutante sin folículos en el cual también la expresión de CK6 abarca mayor extensión de epidermis alrededor de la herida¹⁰². Este mecanismo de reparación implicaría que las células en la epidermis viajen mayor distancia para llegar al borde de la herida, lo cual explicaría el retraso en la reformación del epitelio en condiciones de denervación. También resalta el hecho de que en las ratas tratadas con capsaicina la proliferación se active tardíamente en los folículos más distales al sitio de lesión. Esto también sugiere que la piel compensa la falta de células cercanas al sitio de lesión reclutando mayor cantidad de folículos en zonas alejadas al sitio de lesión. En el futuro será de gran utilidad entender los mecanismos que utiliza la piel para promover la activación de distintas regiones del epitelio para contender de mejor manera a las heridas crónicas.

Por otro lado, la administración de neuropéptidos como CGRP y SP acelera el cerrado de una herida¹⁵⁴. Si bien estos neuropéptidos pueden influir en una diversidad de procesos tales como la angiogénesis¹⁵², los resultados de este trabajo indican una relación de la inervación sensorial con las células troncales del folículo. Por esta razón, evaluamos si el nicho de células troncales en el folículo tiene la capacidad de recibir mensajes de los nervios. Por medio de microscopia confocal, determinamos que los receptores NK-1 y CLR están presentes en las células de la protuberancia que expresan CD34 y en las células retenedoras de marca de BrdU. Esta observación coincide con estudios previos que han reportado la presencia del receptor CLR en la vaina radicular externa del folículo piloso de humano^{193,194}. Es posible que el receptor de CLR que encontramos en la protuberancia sea capaz de responder a CGRP ya que la proteína accesoria RAMP1 también se encuentra en las células CD34⁺⁴⁴. Es importante destacar que CLR y RAMP1 pertenecen a un grupo de genes que tienen mayor expresión respecto del epitelio de la parte superior del folículo piloso^{96,98}. Lo anterior parece ser igual a nivel de proteína ya que en este trabajo se observó mayor intensidad en la inmunoreactividad a CLR en algunas células de la protuberancia respecto del resto del epitelio. En conjunto, estos datos sugieren que los neuropéptidos pueden modular aspectos funcionales de

las células troncales del nicho de la protuberancia no sólo en condiciones de lesión sino también durante el ciclo de crecimiento del pelo. Al respecto, las ratas tratadas con capsaicina presentan una disminución en el crecimiento del pelo y anomalías en el tallo del pelo¹⁴⁸. Además, la SP induce la fase de anágeno en la piel del ratón si se administra durante la fase de telógeno¹¹⁵. También, la SP se ha asociado a la inducción prematura de la fase de catágeno en modelos de estrés auditivo¹⁹⁵. Por su parte, CGRP no promueve la fase de anágeno ni en cultivo de explantes de piel ni al ser liberado de implantes colocados en el lomo del ratón¹¹⁵. El papel específico de cada neuropéptido y sus posibles combinaciones sobre las distintas poblaciones epiteliales tendrá que ser determinado en futuros experimentos. En particular, será importante determinar si CGRP está involucrado en el mantenimiento de las propiedades de las células troncales (quiescencia) o en promover su diferenciación.

En resumen, este trabajo ayuda a entender el papel eferente de las neuronas del ganglio de la raíz dorsal en la reformación del epitelio durante la reparación de heridas. Además, pone de manifiesto la importancia neuronal en la regulación de la fisiología de los nichos de células troncales como también ha sido observado en el sistema hematopoyético¹⁹⁶. En el futuro será imprescindible conocer las vías moleculares que modula el sistema nervioso para entender cómo se regula la activación y diferenciación de células troncales en diferentes nichos del cuerpo y sus posibles implicaciones para la formación de tumores.

CONCLUSIONES

- El tratamiento neonatal con capsaicina disminuyó considerablemente el número de terminales intraepidérmicas. Además, la morfología de las terminales que prevalecen en la epidermis después del tratamiento es simple y poco arborizada.
- El tipo más abundante de fibras intraepidérmicas tras el tratamiento con capsaicina son las fibras de tipo peptidérgico.
- El marcador de inervación PGP no se pudo detectar en algunas fibras que presentaron inmunorreactividad para CGRP o para tubulina β III.
- En condiciones normales, la proliferación de queratinocitos en la epidermis de la piel planta de la pata trasera es similar entre ratas control y tratadas con capsaicina al mes, a los tres y seis meses.
- Después de una herida, la activación de la proliferación en la epidermis de la piel del lomo está disminuida en ratas tratadas con capsaicina.
- Después de una herida, la activación de la proliferación en los folículos no se altera en ratas tratadas con capsaicina.

- La migración de células provenientes del folículo piloso hacia la epidermis en respuesta a una herida está disminuida en ratas tratadas con capsaicina.
- En las ratas tratadas con capsaicina se activa tardíamente la capacidad proliferativa de regiones de la epidermis que están alejadas del borde la herida.
- En las ratas control la inervación peptidérgica disminuye a consecuencia de la herida, mientras que en las ratas tratadas la poca inervación peptidérgica que prevalece se mantiene sin cambios.
- Los receptores para SP y CGRP están presentes en el nicho de células troncales de la protuberancia del folículo. La expresión de estos receptores parece no alterarse en ratas tratadas con capsaicina.
- En términos generales, las neuronas del ganglio de la raíz dorsal con capacidad eferente o también conocidas como nociceptores influyen sobre la proliferación y migración de los precursores epiteliales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

En este estudio se usaron ratas de la cepa Wistar criadas en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Las ratas fueron mantenidas en un cuarto a 21°C con ciclos de luz y oscuridad de 12 h (las luces se encendían a las 6:00 am) y tuvieron acceso *ad libitum* a la comida y agua. Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por la Comisión para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del instituto. Todos los experimentos se diseñaron para usar el menor número de animales y aminorar su posible sufrimiento.

Tratamiento con Capsaicina

El tratamiento con capsaicina durante las primeras 48 h de vida de los roedores es un procedimiento eficaz para eliminar principalmente neuronas amielínicas y poco mielinizadas^{50,51,146}. Para nuestro estudio se utilizó el siguiente protocolo^{146,197}. En un rango de 24 a 36 h después del nacimiento, las crías de las ratas Wistar fueron retiradas de la caja y colocadas en un recipiente con aserrín. De manera individual, las crías fueron colocadas en una cama de hielo molido de 3 a 4 min. Al retirarse del hielo fueron inmediatamente inyectadas de forma subcutánea en el lomo con una aguja del número

30 ya sea con capsaicina (50 mg/kg) o con un volumen equivalente de vehículo (~40µL). El vehículo consistió de etanol al 10% y Tween 80 al 10% disuelto en solución salina al 0.9%. Después de la inyección, las crías se colocaron en una cámara transparente para su observación. En esta cámara las ratas se colocaron entre los dedos de un guante de latex relleno con agua calentada a 37°C. Conforme se colocaba una cría en la cámara se adicionaron dos atomizaciones de salbutamol en aerosol para aliviar las molestias respiratorias inducidas por la capsaicina. En la mayoría de los casos las ratas necesitaron además de masaje en el pecho para ayudar a que recobran la respiración. Una vez que las ocho crías de la camada estaban totalmente recuperadas se colocaron en una caja limpia. Parte del aserrín de la caja original fue transferido a la caja nueva junto con la madre. El comportamiento de la madre fue observado para vigilar la aceptación de las crías. El destete de las crías se realizó al día 22 después del nacimiento.

Ratas para análisis de la inervación y proliferación en la piel glabra.

Ratas hembra control y tratadas con capsaicina de un (n=8), tres (n=6) y seis (n=6) meses de edad fueron inyectadas con una dosis de bromodesoxiuridina (BrdU, 50 mg/kg). La BrdU se disolvió en NaOH 0.007 N y NaCl 0.9%. Las ratas se sacrificaron 1 h después con una sobredosis de pentobarbital sódico. Las plantas de las patas traseras fueron disecadas y sumergidas en fijador de Zamboni (Parafolmaldehído 4%, ácido pícrico saturado 15% (v/v), amortiguador de fosfato 0.1M, pH 7.4) y se almacenaron a 4°C por 48 h. Posteriormente fueron secuencialmente transferidas a soluciones de sacarosa al 20 y al 30%. Las plantas de las patas traseras tienen tres pares de cojinetes. Los cojinetes plantares fueron designados como primero, segundo y tercero de los dedos al talón. El segundo par de cojinetes se embebió en resina para congelación (Tissue-Tek OCT compound; Sakura Seiki Inc, Japón). Los bloques congelados se almacenaron hasta su uso a -80°C. Las muestras se cortaron transversalmente a la epidermis en rebanadas de

50 μm . Cada rebanada se colectó en un pozo de una placa de 96 pozos rellenos con solución crioprotectora (etilenglicol 25%, glicerol 25% y amortiguador de fosfato salino 0.05M). Las cajas se almacenaron a -20°C . Un muestreo aleatorio sistemático fue utilizado para seleccionar las series de rebanadas que se usaron para las inmunohistoquímicas contra antígenos neuronales y BrdU. Para analizar entre 12 y 15 rebanadas por animal se utilizó un intervalo de seis de separación entre rebanadas. Esto quiere decir que la primera rebanada se seleccionó al obtener un número al azar entre uno y seis y las siguientes rebanadas se seleccionaron cada 6 rebanadas a partir del primer número. Todas las muestras estuvieron codificadas durante el análisis.

Inmunohistoquímicas en piel glabra

Las rebanadas seleccionadas se colocaron en laminillas gelatinizadas. Las laminillas fueron lavadas dos veces con amortiguador de fosfatos 0.1M (PB) y una vez con PB con Tritón X-100 al 0.3% (PBT). Posteriormente las laminillas fueron incubadas 1 h en H_2O_2 al 1%. Después de tres lavados con PB, las laminillas se incubaron a 70°C en una solución desenmascaradora de antígenos por 30 min (Immuno/DNA retriever; Bio SB, EE. UU.). Para el caso de BrdU, el DNA se desnaturalizó con una incubación a 30°C en HCl al 1% por 1 h seguido de un lavado con borato de sodio 0.1M (pH 8.5). Después de tres lavados, los cortes se bloquearon con una solución de suero de caballo al 5% por 1 h. Finalmente, las rebanadas se incubaron toda la noche a temperatura ambiente con anticuerpo antiPGP 9.5 de conejo (1:1,000; Chemicon, EE. UU.), antiCGRP de conejo (1:10,000, Peninsula Labs, EE. UU.) o antiBrdU de ratón (1:500; Roche Applied Science, Alemania). Tras los lavados se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado anticonejo o antiratón de burro (Chemicon; 1:500) por 2 h. Finalmente se incubó con el complejo avidina-biotina (ABC kit Vector Laboratories, EE. UU.) por 90 min a una dilución de 1:400. El revelado de la inmunohistoquímica fue obtenido con una solución de 3,3-diaminobencidina (DAB) y níquel (Vector laboratories). Después de un enjuague en agua, las rebanadas fueron

incubadas en un amortiguador de bicarbonato de sodio (pH 9.6) por 10 min. El producto de la reacción fue intensificado utilizando una solución potenciadora de la marca de DAB (DAB enhancing solution; Vector laboratorios). Finalmente, los cortes fueron contrateñidos con verde de metilo.

Para documentar la morfología de las terminales intraepidérmicas se tomaron microfotografías con una cámara digital (MBF CX9000) en un microscopio Olympus BX51 WI. Para mostrar mejor la extensión de las fibras PGP⁺ y CGRP⁺ se tomaron imágenes en diferentes planos focales y posteriormente se generó una imagen compuesta usando la función de gran profundidad de campo (*extended depth of focus*) del programa Image-Pro Plus 5 software (Media Cybernetics, EE. UU.)

Inmunofluorescencia en la piel glabra

Los cortes montados en laminillas fueron lavados dos veces en PB y una vez en PBT. Después se incubaron con el desenmascarador de antígenos a 70°C por 30 min y se lavaron con PB. Los cortes fueron bloqueados con suero de caballo al 5% en PBT por 1 h. Después fueron incubadas toda la noche con anticuerpo antitubulina β III de ratón (1:500, Promega, EE. UU.) y antiCGRP de conejo (1:7,500). Después de los lavados con PB, los cortes fueron incubados 2 h con anticuerpo biotinilado antiratón de cabra (1:500, Chemicon), el cual fue usado para amplificar la señal de la tubulina β III. Al término de los lavados de PB, los cortes fueron incubados por 2 h a temperatura ambiente con una mezcla de anticuerpo anticonejo de burro conjugado a Alexa 594 (1:500; Molecular Probes, EE. UU.) y anticabra de burro conjugado a Alexa 488 (1:500; Molecular Probes). Finalmente, los cortes fueron contrateñidos con DAPI y cubiertos con medio para fluorescencia (Dako Fluorescence Mounting Medium, Dako, EE. UU.). Las terminales intraepidérmicas fueron fotografiadas con una cámara Hamamatsu C9100 CCD acoplada a un microscopio Olympus BX51 WI equipado con una unidad de disco para confocalidad. Las microfotografías compuestas se generaron como se mencionó arriba.

Estimación de la longitud total de las fibras nerviosas intraepidérmicas en la piel glabra

La longitud total de las fibras PGP⁺ y CGRP⁺ se estimó utilizando el método estereológico de las esferas virtuales (space balls)¹⁹⁸. El principio de las esferas virtuales es que el número de intersecciones entre una estructura filamentosa y el borde de la esfera es proporcional a la longitud total de la estructura filamentosa en el tejido. Los datos fueron obtenidos en un microscopio Olympus BX51 WI equipado con objetivos de 4x y 60xwi (inmersión en agua, 1.2 NA), una platina motorizada en los ejes X-Y-Z y el programa StereoInvestigator 8 (MBFBioscience, EE. UU.). Los límites de la epidermis fueron trazados, excluyendo al estrato córneo. Las semiesferas virtuales generadas por el programa fueron dispuestas de manera aleatoria y sistemática a lo largo del trazo de la epidermis. Sólo se consideró como intersección cuando las fibras inmunorreactivas estaban en foco y cruzaban el borde de la semiesfera. Las intersecciones se buscaron en el eje Z en cada sitio muestreado. Como fibras intraepidérmicas se consideraron sólo a aquellas que cruzaron claramente el borde entre la epidermis y la dermis¹⁹⁹. Los parámetros estereológicos fueron los siguientes: cuadrícula de muestreo, 225 x 155 µm; radio de la semiesfera, 13 µm; zona de guardia 10% del grosor del corte. El promedio del grosor de los cortes fue de 32.8±2 (x±DE), el cual fue medido cada quinto sitio. La longitud de las fibras fue calculada por la ecuación $N = \sum Q^- * \frac{t}{h} * \frac{1}{ssf}$. Donde $\sum Q^-$ es la suma del número de intersecciones de las fibras nerviosas intraepidérmicas y la semiesfera, V es el volumen asociado a los parámetros de la cuadrícula y el grosor de la rebanada, a es la superficie de la semiesfera y ssf se refiere a la periodicidad de muestreo. Los resultados son expresados como la longitud total de las fibras como ha sido reportado previamente

Quantificación de la proliferación en la piel glabra

El número de núcleos BrdU⁺ fue estimado por medio del método estereológico del fraccionador óptico. Los datos se obtuvieron en un microscopio Nikon Labophot-2 equipado con objetivos de 10x y 100x (inmersión en aceite, 1.35 NA) una platina motorizada en los ejes X-Y-Z y acoplado al programa Stereoinvestigator. Los núcleos BrdU⁺ fueron contados en sitios muestreados de manera aleatoria sistemática dentro del trazo de la epidermis. El tamaño de la cuadrícula fue de X= 318 μm y Y= 104 μm con un cuadro de conteo cuyas dimensiones fueron de 36 x 30 y una altura de 20 μm. La zona de guardia fue del 10% del grosor promedio de los cortes (25.1 ± 2.5) el cuál fue medido en cada sitio de muestreo. El número total de núcleos BrdU⁺ se calculó usando la fórmula: $L = 2 * (\sum \varrho) * \frac{V}{a} * \frac{1}{ssf}$, donde $(\sum \varrho)$ es el número de partículas contadas, t es el grosor promedio de los cortes, h es la altura del cuadro de conteo y ssf es la relación entre el área de conteo y el área de la cuadrícula de muestreo.

Heridas en la piel del lomo

El protocolo para las heridas en la piel del lomo se hizo de acuerdo a procedimientos ya publicados^{92,100,201}. Para esta parte del estudio se utilizaron ratas macho de 8 semanas de edad inyectadas con vehículo o con capsaicina. La anestesia de las ratas se indujo con 4% de isoflurano y durante el resto del experimento se mantuvieron anestesiadas con 1% de isoflurano (15 min aproximadamente). La parte del lomo que corresponde a las vértebras torácicas se rasuró y limpió con etanol al 70%. Con un punzón dérmico de 6 mm se hizo una herida de tipo escisional. Las heridas se dejaron al descubierto y en los casos donde se presentó sangrado se limpió con algodón estéril. Al término de la cirugía las ratas fueron colocadas de forma individual en cajas con aserrín para vigilar su recuperación de la anestesia. Finalmente, las ratas fueron devueltas a su caja original.

Para determinar el tiempo de cerrado de la herida en ambos grupos (n=8) se tomaron fotografías los días 0, 1,4, 7, 10 y 13. El área de la herida en cada caso se midió con la ayuda del programa Image J.

Proliferación

Para determinar el efecto de la denervación con capsaicina en la activación de la proliferación en la epidermis y en los folículos, las ratas se inyectaron vía intraperitoneal veintiuna horas después de la herida con una dosis de BrdU (50mg/kg). La piel circundante a la lesión se recolectó a las 31 h, 47 h y 61 h posherida. Las ratas (n=5) fueron anestesiadas con pentobarbital sódico y se perfundieron vía cardiaca con NaCl al 0.9% seguido de fijador Zamboni. El bloque de piel recolectado se posfijó por 24 h más en el mismo fijador. Las muestras se transfirieron a sacarosa al 20% y al 30%. La muestra se congeló de tal manera que se conservara la orientación longitudinal de los folículos pilosos y se almacenó a -70°C hasta su utilización⁸¹.

Migración

Para determinar si la denervación altera la migración de las poblaciones amplificadoras del folículo a la epidermis, se utilizó un doble marcaje con análogos de timidina^{92,202,203}. El fundamento de este protocolo radica en que las células amplificadoras del folículo se dividen más rápidamente que las células de la epidermis⁹². Por este motivo, veintiuna horas después de la lesión, las ratas (n=5) se inyectaron con una dosis de iododesoxiuridina (IdU; 150 nmolas/g). Diez horas más tarde (31 h posherida) se inyectaron con una dosis de clorodesoxiuridina (CldU; 150 nmolas/g). Para este experimento, se recolectó la muestra de piel a las 32, 42 y 61 h posherida como se describió en la sección anterior.

Inmunohistoquímica de BrdU en la piel del lomo

Los bloques de piel fueron cortados en criostato en rebanadas de un grosor de 50 μm . Los cortes fueron recolectados en solución anticongelante y almacenados a -20°C . Para el análisis se consideró un cuadrante proximal a la herida que abarcó 2 mm desde el borde de la herida (cuadrante interno) y uno distal que abarcó 2 mm a partir del cuadrante proximal (cuadrante externo). Esto dio como resultado la recolección de 280 cortes que comprendieron un cuadrante de 14 mm X 14 mm. Para la cuantificación estereológica se seleccionaron de manera aleatoria y sistemática 14 cortes con una separación de 20 cortes entre cada uno. La inmunohistoquímica para BrdU se hizo de acuerdo al protocolo utilizado para la piel glabra, aunque con algunas diferencias. La incubación en HCl al 1% se hizo a 25°C por 30 min. Después del borato de sodio se utilizó el kit de avidina y biotina (Vector Laboratories) para eliminar la tinción inespecífica de la glándula sebácea del folículo piloso. La avidina (100 $\mu\text{L}/\text{mL}$) se diluyó en PB y los cortes se incubaron por 30 min con esta solución. Tras un enjuague con PB los cortes se incubaron con solución de biotina (100 $\mu\text{L}/\text{mL}$) por 30 min. Después de este paso adicional se siguió con el resto del protocolo mencionado arriba.

Cuantificación de la proliferación en la piel del lomo

La cuantificación de las células inmunorreactivas a BrdU se realizó utilizando la sonda estereológica del fraccionador óptico. El tamaño de la cuadrícula de muestreo para la epidermis en las muestras de 31 h posherida fue de $X= 927 \mu\text{m}$ y de $Y= 34 \mu\text{m}$ con un cuadro de conteo de 30 x 25 y una altura de 21 μm ; para 47 h, $X= 716 \mu\text{m}$ y $Y= 78 \mu\text{m}$ con un cuadro de conteo de 30 x 25 y una altura de 25 μm ; para 61 h, de $X= 480 \mu\text{m}$ y de $Y= 180 \mu\text{m}$ con un cuadro de conteo de 30 x 25 y una altura de 24 μm . El tamaño de la cuadrícula de muestreo para los folículos en las muestras de 31 h fue de $X= 172 \mu\text{m}$ y de $Y= 200 \mu\text{m}$ con un cuadro de conteo de 43 x 32 y una altura de 22 μm ; para 47 h y

61 h, X= 344 μm y Y= 180 μm con un cuadro de conteo de 43 x 32 y una altura de 24 μm . En todos los casos la zona de guardia fue el 10% del grosor del corte. El número total de núcleos BrdU⁺ se estimó como se mencionó anteriormente.

Inmunofluorescencia de IdU/CIdU

Los 14 cortes seleccionados de manera aleatoria y sistemática se colocaron en laminillas gelatinizadas. Las laminillas se lavaron dos veces con salina amortiguada con Tris (TBS) seguido de un lavado de TBS con Tritón X-100 al 0.3% (TTBS). Posteriormente, las laminillas se incubaron a 70°C en solución desenmascaradora de antígenos por 30 min. Al término de tres lavados, las laminillas se incubaron a 37°C en HCl 1N por 1 h seguido de un lavado con borato de sodio 0.1M. Los cortes se bloquearon por 1 h con suero de cabra al 5% y albúmina sérica de bovino al 5% en TTBS. Los anticuerpos primarios se diluyeron en este suero de bloqueo y se incubaron de 12 a 16 h a temperatura ambiente. La detección de los análogos de timidina halogenados se consiguió utilizando antiBrdU de ratón (Becton Dickinson; clona B44) a una dilución 1:1,000 para IdU y el antiBrdU de rata (Serotec; clona BU1/75) a una dilución 1:300 para CIdU. Después de tres lavados, los cortes se incubaron con antiratón acoplado a Alexa 488 (1:1,000) y antirata acoplado a Alexa 584 (1:1,500). Después de lavados con TBS, los cortes fueron contrateñidos con DAPI y montados con medio para fluorescencia DAKO.

Cuantificación de la migración celular en la piel del lomo

Los datos fueron obtenidos en un microscopio Olympus BX51 WI equipado con objetivos de 4x y 100x (inmersión en aceite, 1.4 NA), una platina motorizada, una unidad de disco para confocalidad, una cámara Hamamatsu CCD y el programa StereoInvestigator 8. El estimado del número de células doblemente marcadas en el cuadrante interno se obtuvo utilizando el fraccionador óptico. El tamaño de la cuadrícula de muestreo para la epidermis en las muestras de 32 h fue de X= 392 μm y de Y= 74 μm con un cuadro de

conteo de 65 x 65 y una altura de 30 μm ; para 42 h y 62h, X= 498 μm y Y= 82 μm con un cuadro de conteo de 65 x 65 y una altura de 26 μm . El tamaño de la cuadrícula de muestreo para los folículos en todas las muestras fue de X= 137 μm y de Y= 250 μm . El un cuadro de conteo fue de 65 x 50 y una altura de 30 μm (32 h) o de 26 μm (42 h y 62 h). En todos los casos la zona de guardia fue el 10% del grosor del corte. El número total de núcleos doblemente marcados se estimó como se mencionó anteriormente. El porcentaje de núcleos doblemente marcados se obtuvo al determinar la fracción que representaban estos núcleos en relación al total de núcleos marcados con IdU.

Estimación del volumen de expresión de citoqueratina 6.

La inmunofluorescencia para detectar citoqueratina 6 (CK-6) se realizó en una serie de 14 cortes seleccionados de manera aleatoria y sistemática. Las laminillas con los cortes se lavaron con PB y PBT. Después de la incubación con el desenmascarador de antígenos se incubó 30 min. en PBT con suero de caballo al 5%. El anticuerpo monoclonal antiCK6 de ratón (1:500 Biocare Medical, EE. UU.) se incubó toda la noche a temperatura ambiente. Tras los lavados con PB, se incubó por 2 h con antiratón Alexa 594 (1:500). Después de la contratinción con DAPI los cortes se montaron con medio para fluorescencia DAKO.

El volumen de expresión de CK-6 en la epidermis se estimó por el método estereológico de Cavalieri en un microscopio Olympus BX51 controlado por el programa Stereoinvestigator. El principio del método consiste en que el volumen de un objeto de forma compleja puede ser obtenido considerando el área de los perfiles del objeto que aparecen en rebanadas separadas por una distancia conocida. La sonda de Cavalieri consiste en colocar de manera aleatoria una cuadrícula de puntos sobre la imagen del tejido y contar los puntos que caen sobre la región de interés. El espaciado entre los puntos fue de 120 μm .

Estimación de la longitud de las fibras CGRP⁺

La longitud de las fibras CGRP⁺ en el cuadrante interno y externo alrededor de la herida se cuantificó por medio del método de las esferas virtuales. La inmunohistoquímica se hizo de acuerdo al protocolo para la inmunotinción de BrdU en la piel del lomo (antiCGRP, 1:10,000). Los datos fueron obtenidos en el microscopio Olympus BX51 WI controlado por el programa Stereoinvestigator. La región analizada incluyó desde la epidermis hasta la zona de la protuberancia y se consideraron tanto fibras en el epitelio como en la dermis. Los parámetros estereológicos fueron los siguientes: cuadrícula de muestreo, X = 711 y Y = 78 μm ; radio de la esfera, 12 μm ; y zona de guardia 13% del grosor del corte. También se realizaron inmunotinciones para sustancia P en otra serie de cortes, los cuáles fueron analizados de manera cualitativa ya que todas las fibras que contienen SP también contienen CGRP.

Inmunofluorescencia para NK-1 y CLR

Ratas control y tratadas con capsaicina de 4 días de edad fueron inyectadas dos veces al día con BrdU (50mg/kg) durante tres días. Estas ratas se mantuvieron en el bioterio hasta 8 y 10 semanas de edad. Después de la perfusión, la piel del dorso fue recolectada y posfijada por 24 h, transferida a sacarosa 20 % y 30%. Se obtuvieron rebanadas de 30 μm que se almacenaron en solución crioprotectora. Después de lavados con TBS, las rebanadas se montaron en laminillas gelatinizadas. Las laminillas se incubaron 30 min en la solución para desenmascarar antígenos, en HCl 1N a 25°C por 1 h, y se lavaron con borato de sodio. Después de lavados con TBS, se bloqueó por 1 h con suero de caballo al 5%. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: antireceptor de neuroquinina 1 de conejo (NK-1, 1:300, Chemicon), antireceptor similar al receptor de calcitonina de conejo (CLR, 1:1,000, anticuerpo donado por el Dr. Nigel W. Bunnet), anti-BrdU de ratón (1:300, Roche Applied Science), antiCD34 de cabra (1:100, Santa Cruz laboratories), antinestina de ratón (1:300, Chemicon) y antiRAMP1 de conejo (1:100, Santa Cruz Laboratories). Los

anticuerpos secundarios de burro que se utilizaron fueron los siguientes antiratón Alexa 488 (1:500), anticonejo Alexa 594 (1:500) y anticabra Alexa 647 (1:300). Los cortes se contratiñieron con yoduro de propidio (PI) o con TOTO-3 dependiendo de la combinación de anticuerpos. Para conocer la localización de los receptores a neuropéptidos sensoriales en el nicho de células troncales en la protuberancia del folículo se hicieron las siguientes combinaciones: NK/BrdU/TOTO, NK/CD34/PI, CLR/BrdU/TOTO, CLR/CD34/PI, CLR/BrdU/TOTO, BrdU/CD34/TOTO, Nes/CD34/PI, NK/Nes/CD34, CLR/Nes/CD34 y RAMP1/CD34/TOTO.

Estadística

Los datos se expresan como el promedio \pm error estándar. El análisis estadístico fue hecho usando el programa Origin Pro 8. Las diferencias estadísticas entre los grupos fueron determinados por un análisis de t de Student de dos colas. Las comparaciones múltiples fueron realizadas usando una prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguida de una prueba *post hoc* de Tukey y de Holm-Sidack.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kruger, L. The functional morphology of thin sensory axons: some principles and problems. *Prog. Brain Res.* **113**, 255-72 (1996).
2. Holzer, P. & Maggi, C.A. Dissociation of dorsal root ganglion neurons into afferent and efferent-like neurons. *Neuroscience* **86**, 389-98 (1998).
3. Szolcsanyi, J. & Bartho, L. Capsaicin-sensitive afferents and their role in gastroprotection: an update. *J. Physiol. Paris* **95**, 181-8 (2001).
4. Hukkanen, M. *et al.* Innervation of bone from healthy and arthritic rats by substance P and calcitonin gene related peptide containing sensory fibers. *J. Rheumatol.* **19**, 1252-9 (1992).
5. Hosoi, J. *et al.* Regulation of Langerhans cell function by nerves containing calcitonin gene-related peptide. *Nature* **363**, 159-63 (1993).
6. Hara, M. *et al.* Innervation of melanocytes in human skin. *J. Exp. Med.* **184**, 1385-95 (1996).
7. Egan, C.L. *et al.* Characterization of unmyelinated axons uniting epidermal and dermal immune cells in primate and murine skin. *J. Cutan. Pathol.* **25**, 20-9 (1998).
8. Bayliss, W. On the origin of the vaso-dilator fibres of the hindlimb, and on the nature of these fibers. *J Physiol* **26**, 173-209 (1901).
9. Lewis, T. *Blood vessels of the human skin and their responses*, xv, 322 p., [15] leaves of plates (Shaw & Sons, London, 1927).
10. Lawson, S.N. The postnatal development of large light and small dark neurons in mouse dorsal root ganglia: a statistical analysis of cell numbers and size. *J. Neurocytol.* **8**, 275-94 (1979).
11. Lawson, S.N., Caddy, K.W. & Biscoe, T.J. Development of rat dorsal root ganglion neurones. Studies of cell birthdays and changes in mean cell diameter. *Cell Tissue Res.* **153**, 399-413 (1974).
12. Lawson, S.N., Harper, A.A., Harper, E.I., Garson, J.A. & Anderton, B.H. A monoclonal antibody against neurofilament protein specifically labels a subpopulation of rat sensory neurones. *J. Comp. Neurol.* **228**, 263-72 (1984).
13. Lawson, S.N. Morphological and Biochemical Cell Types of Sensory Neurons. in *Sensory neurons : diversity, development, and plasticity* (ed. Scott, S.A.) 27-59 (Oxford University Press, New York, 1992).
14. Goldstein, M.E., House, S.B. & Gainer, H. NF-L and peripherin immunoreactivities define distinct classes of rat sensory ganglion cells. *J. Neurosci. Res.* **30**, 92-104 (1991).

15. Harper, A.A. & Lawson, S.N. Conduction velocity is related to morphological cell type in rat dorsal root ganglion neurones. *J Physiol* **359**, 31-46 (1985).
16. Lawson, S.N. & Waddell, P.J. Soma neurofilament immunoreactivity is related to cell size and fibre conduction velocity in rat primary sensory neurons. *J Physiol* **435**, 41-63 (1991).
17. Fang, X. *et al.* trkA Is Expressed in Nociceptive Neurons and Influences Electrophysiological Properties via Nav1.8 Expression in Rapidly Conducting Nociceptors. *J. Neurosci.* **25**, 4868-78 (2005).
18. Perl, E.R. Function of Dorsal Root Ganglion Neurons: An Overview. in *Sensory neurons : diversity, development, and plasticity* (ed. Scott, S.A.) 3-23 (Oxford University Press, New York, 1992).
19. Lee, K.H., Chung, K., Chung, J.M. & Coggeshall, R.E. Correlation of cell body size, axon size, and signal conduction velocity for individually labelled dorsal root ganglion cells in the cat. *J. Comp. Neurol.* **243**, 335-46 (1986).
20. Fang, X., McMullan, S., Lawson, S.N. & Djouhri, L. Electrophysiological differences between nociceptive and non-nociceptive dorsal root ganglion neurones in the rat in vivo. *J. Physiol. (Lond).* **565**, 927-43 (2005).
21. Lawson, S.N., Crepps, B.A. & Perl, E.R. Relationship of substance P to afferent characteristics of dorsal root ganglion neurones in guinea-pig. *J. Physiol. (Lond).* **505**, 177-91 (1997).
22. Djouhri, L., Bleazard, L. & Lawson, S.N. Association of somatic action potential shape with sensory receptive properties in guinea-pig dorsal root ganglion neurones. *J. Physiol. (Lond).* **513**, 857-72 (1998).
23. Holford, L.C., Case, P. & Lawson, S.N. Substance P, neurofilament, peripherin and SSEA4 immunocytochemistry of human dorsal root ganglion neurons obtained from post-mortem tissue: a quantitative morphometric analysis. *J. Neurocytol.* **23**, 577-89 (1994).
24. McCarthy, P.W. & Lawson, S.N. Cell type and conduction velocity of rat primary sensory neurons with substance P-like immunoreactivity. *Neuroscience* **28**, 745-53 (1989).
25. Gibson, S.J. *et al.* Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the spinal cord of man and of eight other species. *J. Neurosci.* **4**, 3101-11 (1984).
26. McCarthy, P.W. & Lawson, S.N. Cell type and conduction velocity of rat primary sensory neurons with calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity. *Neuroscience* **34**, 623-32 (1990).
27. Lawson, S.N., Crepps, B. & Perl, E.R. Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity and afferent receptive properties of dorsal root ganglion neurones in guinea-pigs. *J. Physiol. (Lond).* **540**, 989-1002 (2002).
28. Dux, M., Sann, H., Schemann, M. & Jancsó, G. Changes in fibre populations of the rat hairy skin following selective chemodeneration by capsaicin. *Cell Tissue Res.* **296**, 471 (1999).
29. Goldstein, M.E., Grant, P., House, S.B., Henken, D.B. & Gainer, H. Developmental regulation of two distinct neuronal phenotypes in rat dorsal root ganglia. *Neuroscience* **71**, 243 (1996).
30. Hall, A.K. *et al.* The Generation of Neuronal Heterogeneity in a Rat Sensory Ganglion. *J. Neurosci.* **17**, 2775-84 (1997).
31. O'Brien, C., Woolf, C.J., Fitzgerald, M., Lindsay, R.M. & Molander, C. Differences in the chemical expression of rat primary afferent neurons which innervate skin, muscle or joint. *Neuroscience* **32**, 493-502 (1989).
32. Wimalawansa, S.J. Amylin, calcitonin gene-related peptide, calcitonin, and adrenomedullin: a peptide superfamily. *Crit. Rev. Neurobiol.* **11**, 167-239 (1997).
33. Amara, S.G. *et al.* Expression in brain of a messenger RNA encoding a novel neuropeptide homologous to calcitonin gene-related peptide. *Science* **229**, 1094-7 (1985).
34. Steenbergh, P.H., Hoppener, J.W., Zandberg, J., Lips, C.J. & Jansz, H.S. A second human calcitonin/CGRP gene. *FEBS Lett.* **183**, 403-7 (1985).
35. Gangula, P.R.R. *et al.* Regulation of Calcitonin Gene-Related Peptide Expression in Dorsal Root Ganglia of Rats by Female Sex Steroid Hormones. *Biol. Reprod.* **62**, 1033-9 (2000).

36. Sternini, C. & Anderson, K. Calcitonin gene-related peptide-containing neurons supplying the rat digestive system: differential distribution and expression pattern. *Somatosens. Mot. Res.* **9**, 45-59 (1992).
37. Schutz, B., Mauer, D., Salmon, A.M., Changeux, J.P. & Zimmer, A. Analysis of the cellular expression pattern of beta-CGRP in alpha-CGRP-deficient mice. *J. Comp. Neurol.* **476**, 32-43 (2004).
38. Amara, S.G., Jonas, V., Rosenfeld, M.G., Ong, E.S. & Evans, R.M. Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature* **298**, 240-4 (1982).
39. Rosenfeld, M.G. *et al.* Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature* **304**, 129-35 (1983).
40. Wimalawansa, S.J. Calcitonin gene-related peptide and its receptors: molecular genetics, physiology, pathophysiology, and therapeutic potentials. *Endocr. Rev.* **17**, 533-85 (1996).
41. Dennis, T., Fournier, A., St Pierre, S. & Quirion, R. Structure-activity profile of calcitonin gene-related peptide in peripheral and brain tissues. Evidence for receptor multiplicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **251**, 718-25 (1989).
42. Mimeault, M., Fournier, A., Dumont, Y., St-Pierre, S. & Quirion, R. Comparative affinities and antagonistic potencies of various human calcitonin gene-related peptide fragments on calcitonin gene-related peptide receptors in brain and periphery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **258**, 1084-90 (1991).
43. Wisskirchen, F.M., Burt, R.P. & Marshall, I. Pharmacological characterization of CGRP receptors mediating relaxation of the rat pulmonary artery and inhibition of twitch responses of the rat vas deferens. *Br. J. Pharmacol.* **123**, 1673-83 (1998).
44. McLatchie, L.M. *et al.* RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* **393**, 333-9 (1998).
45. Marchand, J.E., Zaccheo, T.S., Connelly, C.S. & Kream, R.M. Selective in situ hybridization histochemical analyses of alternatively spliced mRNAs encoding beta- and gamma-preprotachykinins in rat central nervous system. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **17**, 83-94 (1993).
46. Harmar, A.J., Hyde, V. & Chapman, K. Identification and cDNA sequence of delta-preprotachykinin, a fourth splicing variant of the rat substance P precursor. *FEBS Lett.* **275**, 22-4 (1990).
47. Carraway, R. & Leeman, S.E. The amino acid sequence of bovine hypothalamic substance P. Identity to substance P from colliculi and small intestine. *J. Biol. Chem.* **254**, 2944-5 (1979).
48. Chang, M.M. & Leeman, S.E. Isolation of a Sialogogic Peptide from Bovine Hypothalamic Tissue and Its Characterization as Substance P. *J. Biol. Chem.* **245**, 4784-90 (1970).
49. Okamoto, A., Lovett, M., Payan, D.G. & Bunnett, N.W. Interactions between neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) and the substance P (NK1) receptor expressed in mammalian cells. *Biochem. J.* **299 (Pt 3)**, 683-93 (1994).
50. Jancso, G., Kiraly, E. & Jancso-Gabor, A. Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. *Nature* **270**, 741 (1977).
51. Hiura, A. Neuroanatomical effects of capsaicin on the primary afferent neurons. *Arch. Histol. Cytol.* **63**, 199-215 (2000).
52. Caterina, M.J. & Julius, D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 487-517 (2001).
53. Wang, H. & Woolf, C.J. Pain TRPs. *Neuron* **46**, 9-12 (2005).
54. Caterina, M.J. *et al.* The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* **389**, 816-24 (1997).
55. Tominaga, M. *et al.* The Cloned Capsaicin Receptor Integrates Multiple Pain-Producing Stimuli. *Neuron* **21**, 531 (1998).
56. Petho, G., Izydorczyk, I. & Reeh, P.W. Effects of TRPV1 receptor antagonists on stimulated iCGRP release from isolated skin of rats and TRPV1 mutant mice. *Pain* **109**, 284 (2004).

57. Kessler, F., Habelt, C., Averbeck, B., Reeh, P.W. & Kress, M. Heat-induced release of CGRP from isolated rat skin and effects of bradykinin and the protein kinase C activator PMA. *Pain* **83**, 289 (1999).
58. Sauer, S.K., Reeh, P.W. & Bove, G.M. Noxious heat-induced CGRP release from rat sciatic nerve axons in vitro. *Eur. J. Neurosci.* **14**, 1203-8 (2001).
59. Zygmunt, P.M. *et al.* Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* **400**, 452-7 (1999).
60. Smart, D. *et al.* The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). **129**, 227 (2000).
61. Hua, X.Y. & Yaksh, T.L. Pharmacology of the effects of bradykinin, serotonin, and histamine on the release of calcitonin gene-related peptide from C-fiber terminals in the rat trachea. *J. Neurosci.* **13**, 1947-53 (1993).
62. Oprea, A. & Kress, M. Involvement of the Proinflammatory Cytokines Tumor Necrosis Factor-alpha , IL-1beta , and IL-6 But Not IL-8 in the Development of Heat Hyperalgesia: Effects on Heat-Evoked Calcitonin Gene-Related Peptide Release from Rat Skin. *J. Neurosci.* **20**, 6289-93 (2000).
63. Helyes, Z., Nemeth, J., Pinter, E. & Szolcsanyi, J. Inhibition by nociceptin of neurogenic inflammation and the release of SP and CGRP from sensory nerve terminals. *Br. J. Pharmacol.* **121**, 613-5 (1997).
64. Bartho, L. *et al.* An opioid peptide inhibits capsaicin-sensitive vasodilatation in the pig's skin. *Neuropeptides* **23**, 227-37 (1992).
65. Ray, N.J., Jones, A.J. & Keen, P. Morphine, but not sodium cromoglycate, modulates the release of substance P from capsaicin-sensitive neurones in the rat trachea in vitro. *Br. J. Pharmacol.* **102**, 797-800 (1991).
66. Yaksh, T.L. Substance P release from knee joint afferent terminals: modulation by opioids. *Brain Res.* **458**, 319-24 (1988).
67. Yonehara, N., Imai, Y., Chen, J.Q., Takiuchi, S. & Inoki, R. Influence of opioids on substance P release evoked by antidromic stimulation of primary afferent fibers in the hind instep of rats. *Regul. Pept.* **38**, 13-22 (1992).
68. Kress, M., Guthmann, C., Averbeck, B. & Reeh, P.W. Calcitonin gene-related peptide and prostaglandin E2 but not substance P release induced by antidromic nerve stimulation from rat skin in vitro. *Neuroscience* **89**, 303 (1999).
69. Igwe, O.J. c-Src kinase activation regulates preprotachykinin gene expression and substance P secretion in rat sensory ganglia. *Eur. J. Neurosci.* **18**, 1719-30 (2003).
70. Supowit, S.C., Zhao, H., Wang, D.H. & DiPette, D.J. Regulation of Neuronal Calcitonin Gene-Related Peptide Expression : Role of Increased Blood Pressure. *Hypertension* **26**, 1177-80 (1995).
71. Supowit, S.C., Gururaj, A., Ramana, C.V., Westlund, K.N. & DiPette, D.J. Enhanced Neuronal Expression of Calcitonin Gene-Related Peptide in Mineralocorticoid-Salt Hypertension. *Hypertension* **25**, 1333-8 (1995).
72. Yang, Y. *et al.* Immunocytochemical analysis of sex differences in calcitonin gene-related peptide in the rat dorsal root ganglion, with special reference to estrogen and its receptor. *Brain Res.* **791**, 35 (1998).
73. Supowit, S.C., Ramana, C.V., Westlund, K.N. & DiPette, D.J. Calcitonin gene-related peptide gene expression in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* **21**, 1010-4 (1993).
74. Saggese, G., Bertelloni, S., Baroncelli, G.I., Pelletti, A. & Benedetti, U. Evaluation of a peptide family encoded by the calcitonin gene in selected healthy pregnant women. A longitudinal study. *Hormone Res.* **34**, 240-4 (1990).
75. Stevenson, J.C., Macdonald, D.W., Warren, R.C., Booker, M.W. & Whitehead, M.I. Increased concentration of circulating calcitonin gene related peptide during normal human pregnancy. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed).* **293**, 1329-30 (1986).
76. Bergman, E. *et al.* Neuropeptides, nitric oxide synthase and GAP-43 in B4-binding and RT97 immunoreactive primary sensory neurons: normal distribution pattern and changes after peripheral nerve transection and aging. *Brain Res.* **832**, 63 (1999).

77. Zhang, X., Aman, K. & Hokfelt, T. Secretory pathways of neuropeptides in rat lumbar dorsal root ganglion neurons and effects of peripheral axotomy. *J. Comp. Neurol.* **352**, 481-500 (1995).
78. Fuchs, E. Epidermal differentiation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2**, 1028-35 (1990).
79. Haake, A., Scott, G.A. & Holbrook, K.A. Structure and function of the skin: overview of the epidermis and dermis. in *The biology of the skin* (eds. Freinkel, R.K. & Woodley, D.) 19-45 (Parthenon Pub. Group, New York, 2001).
80. Tobin, D.J. Biochemistry of human skin--our brain on the outside. *Chem Soc Rev* **35**, 52-67 (2006).
81. Paus, R. *et al.* A comprehensive guide for the recognition and classification of distinct stages of hair follicle morphogenesis. *J. Invest. Dermatol.* **113**, 523-32 (1999).
82. Ito, M. *et al.* Wnt-dependent de novo hair follicle regeneration in adult mouse skin after wounding. *Nature* **447**, 316-20 (2007).
83. Muller-Rover, S. *et al.* A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages. *J. Invest. Dermatol.* **117**, 3-15 (2001).
84. Ikawa, A. *et al.* Age-related changes in the dorsal skin histology in Mini and Wistar rats. *Histol. Histopathol.* **17**, 419-26 (2002).
85. Umeda-Ikawa, A., Ishii, Y. & Doi, K. Hair cycle induction by hair plucking in Mini rats. *Exp. Mol. Pathol.* **80**, 306-7 (2006).
86. Stenn, K.S. & Paus, R. Controls of Hair Follicle Cycling. *Physiol. Rev.* **81**, 449-94 (2001).
87. Cotsarelis, G. Epithelial Stem Cells: A Folliculocentric View. *J. Invest. Dermatol.* **126**, 1459-68 (2006).
88. Schneider, M.R., Schmidt-Ullrich, R. & Paus, R. The Hair Follicle as a Dynamic Miniorgan. *Curr. Biol.* **19**, R132-R42 (2009).
89. Fuchs, E. Scratching the surface of skin development. *Nature* **445**, 834-42 (2007).
90. Blanpain, C., Horsley, V. & Fuchs, E. Epithelial Stem Cells: Turning over New Leaves. *Cell* **128**, 445-58 (2007).
91. Cotsarelis, G., Sun, T.-T. & Lavker, R.M. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: Implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell* **61**, 1329-37 (1990).
92. Taylor, G., Lehrer, M.S., Jensen, P.J., Sun, T.-T. & Lavker, R.M. Involvement of Follicular Stem Cells in Forming Not Only the Follicle but Also the Epidermis. *Cell* **102**, 451 (2000).
93. Oshima, H., Rochat, A., Kedzia, C., Kobayashi, K. & Barrandon, Y. Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell* **104**, 233-45 (2001).
94. Liu, Y., Lyle, S., Yang, Z. & Cotsarelis, G. Keratin 15 promoter targets putative epithelial stem cells in the hair follicle bulge. *J. Invest. Dermatol.* **121**, 963-8 (2003).
95. Trempus, C.S. *et al.* Enrichment for Living Murine Keratinocytes from the Hair Follicle Bulge with the Cell Surface Marker CD34. **120**, 501-11 (2003).
96. Blanpain, C., Lowry, W.E., Geoghegan, A., Polak, L. & Fuchs, E. Self-Renewal, Multipotency, and the Existence of Two Cell Populations within an Epithelial Stem Cell Niche. *Cell* **118**, 635-48 (2004).
97. Morris, R.J. *et al.* Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nat Biotech* **22**, 411 (2004).
98. Tumber, T. *et al.* Defining the Epithelial Stem Cell Niche in Skin. *Science* **303**, 359-63 (2004).
99. Levy, V., Lindon, C., Harfe, B.D. & Morgan, B.A. Distinct Stem Cell Populations Regenerate the Follicle and Interfollicular Epidermis. *Dev. Cell* **9**, 855 (2005).
100. Ito, M. *et al.* Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. *Nat. Med.* **11**, 1351 (2005).
101. Levy, V., Lindon, C., Zheng, Y., Harfe, B.D. & Morgan, B.A. Epidermal stem cells arise from the hair follicle after wounding. *FASEB J.* **21**, 1358-66 (2007).
102. Langton, A.K., Herrick, S.E. & Headon, D.J. An Extended Epidermal Response Heals Cutaneous Wounds in the Absence of a Hair Follicle Stem Cell Contribution. *J. Invest. Dermatol.* **128**, 1311-8 (2007).

103. Heath, J. *et al.* Hair Follicles Are Required for Optimal Growth during Lateral Skin Expansion. *J. Invest. Dermatol.* **129**, 2358-64 (2009).
104. Kruger, L., Silverman, J.D., Mantyh, P.W., Sternini, C. & Brecha, N.C. Peripheral patterns of calcitonin-gene-related peptide general somatic sensory innervation: Cutaneous and deep terminations. *J. Comp. Neurol.* **280**, 291-302 (1989).
105. Navarro, X., Verdu, E., Wendelschafer-Crabb, G. & Kennedy, W.R. Innervation of cutaneous structures in the mouse hind paw: a confocal microscopy immunohistochemical study. *J. Neurosci. Res.* **41**, 111-20 (1995).
106. Zylka, M.J., Rice, F.L. & Anderson, D.J. Topographically distinct epidermal nociceptive circuits revealed by axonal tracers targeted to Mrgprd. *Neuron* **45**, 17-25 (2005).
107. Peters, E.M. *et al.* Developmental timing of hair follicle and dorsal skin innervation in mice. *J. Comp. Neurol.* **448**, 28-52 (2002).
108. Fundin, B.T., Pfaller, K. & Rice, F.L. Different distributions of the sensory and autonomic innervation among the microvasculature of the rat mystacial pad. *J. Comp. Neurol.* **389**, 545-68 (1997).
109. Rice, F.L. *et al.* Differential dependency of unmyelinated and A delta epidermal and upper dermal innervation on neurotrophins, trk receptors, and p75LNGFR. *Dev. Biol.* **198**, 57-81 (1998).
110. Fundin, B.T. *et al.* Comprehensive immunofluorescence and lectin binding analysis of intervibrissal fur innervation in the mystacial pad of the rat. *J. Comp. Neurol.* **385**, 185-206 (1997).
111. Rice, F.L., Fundin, B.T., Arvidsson, J., Aldskogius, H. & Johansson, O. Comprehensive immunofluorescence and lectin binding analysis of vibrissal follicle sinus complex innervation in the mystacial pad of the rat. *J. Comp. Neurol.* **385**, 149-84 (1997).
112. Kruger, L., Kavookjian, A.M., Kumazawa, T., Light, A.R. & Mizumura, K. Nociceptor structural specialization in canine and rodent testicular "free" nerve endings. *J. Comp. Neurol.* **463**, 197-211 (2003).
113. Messlinger, K., Pawlak, M., Steinbach, H., Trost, B. & Schmidt, R.F. A new combination of methods for the localization, identification, and three-dimensional reconstruction of the sensory endings of articular afferents characterized by electrophysiology. *Cell Tissue Res.* **281**, 283-94 (1995).
114. Botchkarev, V.A., Eichmuller, S., Johansson, O. & Paus, R. Hair cycle-dependent plasticity of skin and hair follicle innervation in normal murine skin. *J. Comp. Neurol.* **386**, 379-95 (1997).
115. Peters, E.M., Botchkarev, V.A., Botchkareva, N.V., Tobin, D.J. & Paus, R. Hair-cycle-associated remodeling of the peptidergic innervation of murine skin, and hair growth modulation by neuropeptides. *J. Invest. Dermatol.* **116**, 236-45 (2001).
116. Botchkarev, V.A., Peters, E.M., Botchkareva, N.V., Maurer, M. & Paus, R. Hair cycle-dependent changes in adrenergic skin innervation, and hair growth modulation by adrenergic drugs. *J. Invest. Dermatol.* **113**, 878-87 (1999).
117. Willis, W.D. Dorsal root potentials and dorsal root reflexes: a double-edged sword. *Exp. Brain Res.* **124**, 395-421 (1999).
118. Deng, P.Y. & Li, Y.J. Calcitonin gene-related peptide and hypertension. *Peptides* **26**, 1676-85 (2005).
119. Fundin, B.T., Rice, F.L. & Ernfors, P. Patterned gene programs and target remodeling following axotomy at a major site for sensory innervation. *J. Neurobiol.* **53**, 370-80 (2002).
120. Meisel, C., Schwab, J.M., Prass, K., Meisel, A. & Dirnagl, U. Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome. *Nat Rev Neurosci* **6**, 775-86 (2005).
121. Morley, J., Marsh, S., Drakoulakis, E., Pape, H.C. & Giannoudis, P.V. Does traumatic brain injury result in accelerated fracture healing? *Injury* **36**, 363-8 (2005).
122. Scholzen, T. *et al.* Neuropeptides in the skin: interactions between the neuroendocrine and the skin immune systems. *Exp. Dermatol.* **7**, 81-96 (1998).

123. Peng, Y.B., Wu, J., Willis, W.D. & Kenshalo, D.R. GABAA and 5-HT₃ Receptors Are Involved in Dorsal Root Reflexes: Possible Role in Periaqueductal Gray Descending Inhibition. *J. Neurophysiol.* **86**, 49-58 (2001).
124. Ansel, J.C. *et al.* Interactions of the skin and nervous system. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **2**, 23-6 (1997).
125. Brain, S.D. Sensory neuropeptides: their role in inflammation and wound healing. *Immunopharmacology* **37**, 133-52 (1997).
126. Barker, A.R., Rosson, G.D. & Dellon, A.L. Wound healing in denervated tissue. *Ann. Plast. Surg.* **57**, 339-42 (2006).
127. Roosterman, D., Goerge, T., Schneider, S.W., Bunnett, N.W. & Steinhoff, M. Neuronal Control of Skin Function: The Skin as a Neuroimmunoendocrine Organ. *Physiol. Rev.* **86**, 1309-79 (2006).
128. Brogden, K.A., Guthmiller, J.M., Salzet, M. & Zasloff, M. The nervous system and innate immunity: the neuropeptide connection. *Nat Immunol* **6**, 558-64 (2005).
129. Beresford, L., Orange, O., Bell, E.B. & Miyan, J.A. Nerve fibres are required to evoke a contact sensitivity response in mice. *Immunology* **111**, 118-25 (2004).
130. Song, I.S. *et al.* Substance P induction of murine keratinocyte PAM 212 interleukin 1 production is mediated by the neurokinin 2 receptor (NK-2R). *Exp. Dermatol.* **9**, 42-52 (2000).
131. Fernandez, S., Knopf, M.A., Shankar, G. & McGillis, J.P. Calcitonin gene-related peptide indirectly inhibits IL-7 responses in pre-B cells by induction of IL-6 and TNF-[alpha] in bone marrow. *Cell. Immunol.* **226**, 67 (2003).
132. Kemeny, A. *et al.* Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide Deficiency Enhances Oxazolone-Induced Allergic Contact Dermatitis in Mice. *J. Mol. Neurosci.*, 1-7 (2010).
133. Legat, F.J. *et al.* The role of calcitonin gene-related peptide in cutaneous immunosuppression induced by repeated subinflammatory ultraviolet irradiation exposure. *Exp. Dermatol.* **13**, 242-50 (2004).
134. Saade, N.E. *et al.* Upregulation of proinflammatory cytokines and nerve growth factor by intraplantar injection of capsaicin in rats. *J Physiol* **545**, 241-53 (2002).
135. Scholzen, T.E. *et al.* Neutral Endopeptidase Terminates Substance P-Induced Inflammation in Allergic Contact Dermatitis. *J. Immunol.* **166**, 1285-91 (2001).
136. Ding, W., Stohl, L.L., Wagner, J.A. & Granstein, R.D. Calcitonin Gene-Related Peptide Biases Langerhans Cells toward Th2-Type Immunity. *J. Immunol.* **181**, 6020-6 (2008).
137. Stankovic, N., Johansson, O. & Hildebrand, C. Increased occurrence of PGP 9.5-immunoreactive epidermal Langerhans cells in rat plantar skin after sciatic nerve injury. *Cell Tissue Res.* **298**, 255-60 (1999).
138. Chan, J., Smoller, B.R., Raychaudhuri, S.P., Jiang, W.Y. & Farber, E.M. Intraepidermal nerve fiber expression of calcitonin gene-related peptide, vasoactive intestinal peptide and substance P in psoriasis. *Arch. Dermatol. Res.* **289**, 611-6 (1997).
139. Takahashi, K., Nakanishi, S. & Imamura, S. Direct Effects of Cutaneous Neuropeptides on Adenylyl Cyclase Activity and Proliferation in a Keratinocyte Cell Line: Stimulation of Cyclic AMP Formation by CGRP and VIP/PHM, and Inhibition by NPY Through G Protein-Coupled Receptors. *J Investig Dermatol* **101**, 646-51 (1993).
140. Yu, X.-J., Li, C.-Y., Xu, Y.-H., Chen, L.-M. & Zhou, C.-L. Calcitonin gene-related peptide increases proliferation of human HaCaT keratinocytes by activation of MAP kinases. *Cell Biol. Int.* **33**, 1144-8 (2009).
141. Hsieh, S.T. & Lin, W.M. Modulation of keratinocyte proliferation by skin innervation. *J. Invest. Dermatol.* **113**, 579-86 (1999).
142. Huang, I.T., Lin, W.M., Shun, C.T. & Hsieh, S.T. Influence of cutaneous nerves on keratinocyte proliferation and epidermal thickness in mice. *Neuroscience* **94**, 965-73 (1999).
143. Stankovic, N., Johansson, O., Oqvist, G. & Hildebrand, C. Indirect effect of sciatic nerve injury on the epidermal thickness of plantar glabrous skin in rats. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand Surg.* **33**, 273-9 (1999).

144. Li, Y. *et al.* Sensory and motor denervation influence epidermal thickness in rat foot glabrous skin. *Exp. Neurol.* **147**, 452-62 (1997).
145. Kruger, L. *et al.* Thin-fiber cutaneous innervation and its intraepidermal contribution studied by labeling methods and neurotoxin treatment in rats. *Somatosens. Res.* **2**, 335-56 (1985).
146. Nagy, J.I., Iversen, L.L., Goedert, M., Chapman, D. & Hunt, S.P. Dose-dependent effects of capsaicin on primary sensory neurons in the neonatal rat. *J. Neurosci.* **3**, 399-406 (1983).
147. Beuerman, R.W. & Schimmelpfennig, B. Sensory denervation of the rabbit cornea affects epithelial properties. *Exp. Neurol.* **69**, 196-201 (1980).
148. Maggi, C.A. *et al.* Cutaneous lesions in capsaicin-pretreated rats. A trophic role of capsaicin-sensitive afferents? *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **336**, 538-45 (1987).
149. Holzer, P. Efferent-like roles of afferent neurons in the gut: Blood flow regulation and tissue protection. *Auton. Neurosci.* **125**, 70 (2006).
150. Carr, R.W., Delaney, C.A., Westerman, R.A. & Roberts, R.G. Denervation impairs cutaneous microvascular function and blister healing in the rat hindlimb. *Neuroreport* **4**, 467-70 (1993).
151. Smith, P.G. & Liu, M. Impaired cutaneous wound healing after sensory denervation in developing rats: effects on cell proliferation and apoptosis. *Cell Tissue Res.* **307**, 281-91 (2002).
152. Toda, M. *et al.* Roles of calcitonin gene-related peptide in facilitation of wound healing and angiogenesis. *Biomed. Pharmacother.* **62**, 352-9 (2008).
153. Engin, C. Effects of calcitonin gene-related peptide on wound contraction in denervated and normal rat skin: A preliminary report. *Plast. Reconstr. Surg.* **101**, 1887-90 (1998).
154. Delgado, A.V., McManus, A.T. & Chambers, J.P. Exogenous administration of Substance P enhances wound healing in a novel skin-injury model. *Exp Biol Med (Maywood)* **230**, 271-80 (2005).
155. Rook, J.M., Hasan, W. & McCarron, K.E. Morphine-induced early delays in wound closure: Involvement of sensory neuropeptides and modification of neurokinin receptor expression. *Biochem. Pharmacol.* **77**, 1747-55 (2009).
156. Botchkarev, V.A. Stress and the Hair Follicle: Exploring the Connections. *Am. J. Pathol.* **162**, 709-12 (2003).
157. Hendrix, S., Picker, B., Liezmann, C. & Peters, E.M.J. Skin and hair follicle innervation in experimental models: a guide for the exact and reproducible evaluation of neuronal plasticity. *Exp. Dermatol.* **17**, 214-27 (2008).
158. Amoh, Y. *et al.* Implanted hair follicle stem cells form Schwann cells that support repair of severed peripheral nerves. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 17734-8 (2005).
159. Amoh, Y., Li, L., Katsuoka, K., Penman, S. & Hoffman, R.M. Multipotent nestin-positive, keratin-negative hair-follicle bulge stem cells can form neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 5530-4 (2005).
160. Li, L. *et al.* Nestin expression in hair follicle sheath progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 9958-61 (2003).
161. Yen, L.D., Bennett, G.J. & Ribeiro-da-Silva, A. Sympathetic sprouting and changes in nociceptive sensory innervation in the glabrous skin of the rat hind paw following partial peripheral nerve injury. *J. Comp. Neurol.* **495**, 679-90 (2006).
162. Ma, W. & Bisby, M.A. Calcitonin gene-related peptide, substance P and protein gene product 9.5 immunoreactive axonal fibers in the rat footpad skin following partial sciatic nerve injuries. *J. Neurocytol.* **29**, 249-62 (2000).
163. Harris, L.W. & Purves, D. Rapid remodeling of sensory endings in the corneas of living mice. *J. Neurosci.* **9**, 2210-4 (1989).
164. Albrecht, P.J. *et al.* Pathologic alterations of cutaneous innervation and vasculature in affected limbs from patients with complex regional pain syndrome. *Pain* **120**, 244 (2006).

165. Pare, M. *et al.* Differential hypertrophy and atrophy among all types of cutaneous innervation in the glabrous skin of the monkey hand during aging and naturally occurring type 2 diabetes. *J. Comp. Neurol.* **501**, 543-67 (2007).
166. MacIver, M.B. & Tanelian, D.L. Structural and functional specialization of A delta and C fiber free nerve endings innervating rabbit corneal epithelium. *J. Neurosci.* **13**, 4511-24 (1993).
167. Woodbury, C.J. & Koerber, H.R. Central and peripheral anatomy of slowly adapting type I low-threshold mechanoreceptors innervating trunk skin of neonatal mice. *J. Comp. Neurol.* **505**, 547-61 (2007).
168. Simone, D.A., Nolano, M., Johnson, T., Wendelschafer-Crabb, G. & Kennedy, W.R. Intradermal Injection of Capsaicin in Humans Produces Degeneration and Subsequent Reinnervation of Epidermal Nerve Fibers: Correlation with Sensory Function. *J. Neurosci.* **18**, 8947-59 (1998).
169. McArthur, J.C., Stocks, E.A., Hauer, P., Cornblath, D.R. & Griffin, J.W. Epidermal Nerve Fiber Density: Normative Reference Range and Diagnostic Efficiency. *Arch. Neurol.* **55**, 1513-20 (1998).
170. Guo, A., Vulchanova, L., Wang, J., Li, X. & Elde, R. Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X(3) purinoceptor and IB4 binding sites. *Eur. J. Neurosci.* **11**, 946-58 (1999).
171. Hwang, S.J., Min Oh, J. & Valtschanoff, J.G. Expression of the vanilloid receptor TRPV1 in rat dorsal root ganglion neurons supports different roles of the receptor in visceral and cutaneous afferents. *Brain Res.* **1047**, 261 (2005).
172. Price, T.J. & Flores, C.M. Critical Evaluation of the Colocalization Between Calcitonin Gene-Related Peptide, Substance P, Transient Receptor Potential Vanilloid Subfamily Type 1 Immunoreactivities, and Isolectin B4 Binding in Primary Afferent Neurons of the Rat and Mouse. *The Journal of Pain* **8**, 263-72 (2007).
173. Taylor, A.M., Peleshok, J.C. & Ribeiro-da-Silva, A. Distribution of P2X(3)-immunoreactive fibers in hairy and glabrous skin of the rat. *J. Comp. Neurol.* **514**, 555-66 (2009).
174. Lauria, G. *et al.* Expression of capsaicin receptor immunoreactivity in human peripheral nervous system and in painful neuropathies. *J. Peripher. Nerv. Syst.* **11**, 262-71 (2006).
175. Petersen, K.L., Rice, F.L., Suess, F., Berro, M. & Rowbotham, M.C. Relief of post-herpetic neuralgia by surgical removal of painful skin. *Pain* **98**, 119-26 (2002).
176. Stander, S. *et al.* Expression of vanilloid receptor subtype 1 in cutaneous sensory nerve fibers, mast cells, and epithelial cells of appendage structures. *Exp. Dermatol.* **13**, 129-39 (2004).
177. Pecze, L. *et al.* Human keratinocytes are vanilloid resistant. *PLoS ONE* **3**, e3419 (2008).
178. Koizumi, S., Fujishita, K., Inoue, K., Shigemoto-Mogami, Y. & Tsuda, M. Ca²⁺ waves in keratinocytes are transmitted to sensory neurons: the involvement of extracellular ATP and P2Y2 receptor activation. *Biochem. J.* **380**, 329-38 (2004).
179. Burgess, P.R., English, K.B., Horch, K.W. & Stensaas, L.J. Patterning in the regeneration of type I cutaneous receptors. *J Physiol* **236**, 57-82 (1974).
180. English, K.B. The ultrastructure of cutaneous type I mechanoreceptors (Haarscheiben) in cats following denervation. *J. Comp. Neurol.* **172**, 137-63 (1977).
181. Nurse, C.A., Macintyre, L. & Diamond, J. A quantitative study of the time course of the reduction in Merkel cell number within denervated rat touch domes. *Neuroscience* **11**, 521-33 (1984).
182. Seike, M., Ikeda, M., Morimoto, A., Matsumoto, M. & Kodama, H. Increased synthesis of calcitonin gene-related peptide stimulates keratinocyte proliferation in murine UVB-irradiated skin. *J. Dermatol. Sci.* **28**, 135 (2002).
183. Weissner, W., Winterson, B.J., Stuart-Tilley, A., Devor, M. & Bove, G.M. Time course of substance P expression in dorsal root ganglia following complete spinal nerve transection. *J. Comp. Neurol.* **497**, 78-87 (2006).
184. Harsum, S., Clarke, J.D. & Martin, P. A reciprocal relationship between cutaneous nerves and repairing skin wounds in the developing chick embryo. *Dev. Biol.* **238**, 27-39 (2001).

185. Westerman, R.A., Carr, R.W., Delaney, C.A., Morris, M.J. & Roberts, R.G. The role of skin nociceptive afferent nerves in blister healing. *Clin. Exp. Neurol.* **30**, 39-60 (1993).
186. Fukai, T., Takeda, A. & Uchinuma, E. Wound healing in denervated rat skin. *Wound Repair Regen.* **13**, 175-80 (2005).
187. Buck, S.H. *et al.* Characterization of the peptide and sensory neurotoxic effects of capsaicin in the guinea pig. *J. Neurosci.* **3**, 2064-74 (1983).
188. Fujita, S. *et al.* Capsaicin-induced neuroparalytic keratitis-like corneal changes in the mouse. *Exp. Eye Res.* **38**, 165-75 (1984).
189. Carrillo, P. *et al.* Cutaneous Wounds Produced by Capsaicin Treatment of Newborn Rats Are Due to Trophic Disturbances. *Neurotoxicol. Teratol.* **20**, 75 (1998).
190. Bulut, K. *et al.* Sensory neuropeptides and epithelial cell restitution: the relevance of SP- and CGRP-stimulated mast cells. *Int. J. Colorectal Dis.* **23**, 535-41 (2008).
191. Felderbauer, P. *et al.* Substance P induces intestinal wound healing via fibroblasts--evidence for a TGF-beta-dependent effect. *Int. J. Colorectal Dis.* **22**, 1475-80 (2007).
192. Jing, C., Jia-Han, W. & Hong-Xing, Z. Double-edged effects of neuropeptide substance P on repair of cutaneous trauma. *Wound Repair Regen.* **18**, 319-24 (2010).
193. Hagner, S. *et al.* Expression and distribution of calcitonin receptor-like receptor in human hairy skin. *Peptides* **23**, 109 (2002).
194. Muller, F.B. *et al.* Adrenomedullin: expression and possible role in human skin and hair growth. *Br. J. Dermatol.* **148**, 30-8 (2003).
195. Arck, P.C. *et al.* Stress Inhibits Hair Growth in Mice by Induction of Premature Catagen Development and Deleterious Perifollicular Inflammatory Events via Neuropeptide Substance P-Dependent Pathways. *Am. J. Pathol.* **162**, 803-14 (2003).
196. Katayama, Y. *et al.* Signals from the Sympathetic Nervous System Regulate Hematopoietic Stem Cell Egress from Bone Marrow. *Cell* **124**, 407 (2006).
197. Newson, P. *et al.* Intrinsic sensory deprivation induced by neonatal capsaicin treatment induces changes in rat brain and behaviour of possible relevance to schizophrenia. *Br. J. Pharmacol.* **146**, 408 (2005).
198. Mouton, P.R., Gokhale, A.M., Ward, N.L. & West, M.J. Stereological length estimation using spherical probes. *J. Microsc.* **206**, 54-64 (2002).
199. Lauria, G. *et al.* EFNS guidelines on the use of skin biopsy in the diagnosis of peripheral neuropathy. *Eur. J. Neurol.* **12**, 747-58 (2005).
200. Stocks, E.A., McArthur, J.C., Griffen, J.W. & Mouton, P.R. An unbiased method for estimation of total epidermal nerve fibre length. *J. Neurocytol.* **25**, 637-44 (1996).
201. Gerharz, M. *et al.* Morphometric analysis of murine skin wound healing: standardization of experimental procedures and impact of an advanced multitissue array technique. *Wound Repair Regen.* **15**, 105-12 (2007).
202. Burns, K.A. & Kuan, C.-Y. Low doses of bromo- and iododeoxyuridine produce near-saturation labeling of adult proliferative populations in the dentate gyrus. *Eur. J. Neurosci.* **21**, 803-7 (2005).
203. Vega, C.J. & Peterson, D.A. Stem cell proliferative history in tissue revealed by temporal halogenated thymidine analog discrimination. *Nat Meth* **2**, 167 (2005).

ANEXOS

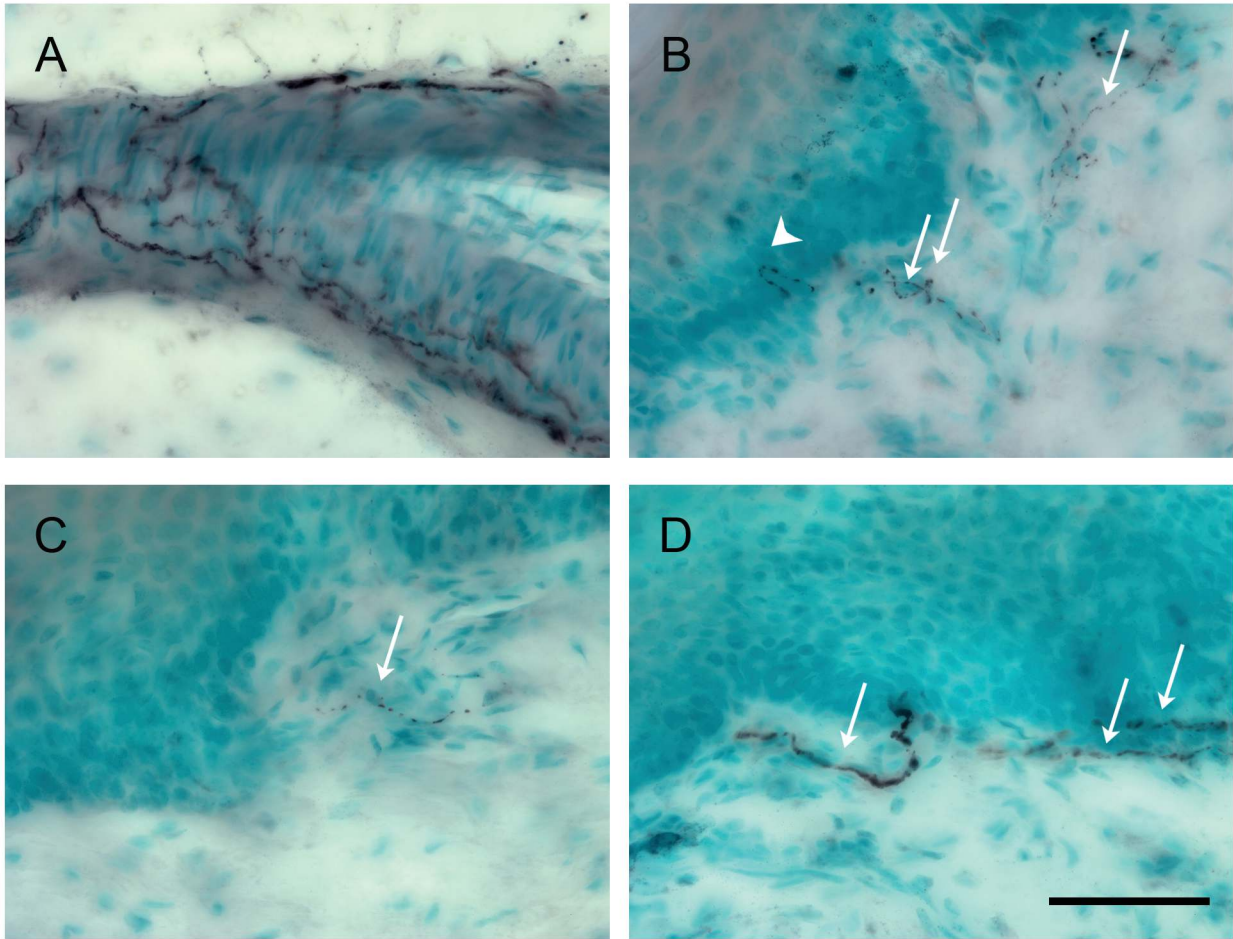


Figura Suplementaria. Fibras inmunorreactivas a dopamina- β hidroxilasa (DBH⁺) en la dermis superficial de ratas tratadas con capsaicina. En la piel de ratas control, las fibras DBH⁺ se localizan alrededor de los vasos sanguíneos (A) y de las glándulas sudoríparas al mes (no mostrado), tres meses y seis meses (no mostrado) de edad. Al mes y tres meses, las fibras DBH⁺ no fueron observadas en el borde entre la dermis y la epidermis de ratas control. Asimismo, en las ratas tratadas de un mes de edad raramente se observaron fibras DBH⁺ en la dermis superficial. Sin embargo, a los tres meses, las ratas tratadas mostraron numerosas fibras DBH⁺ cerca del borde entre la epidermis y la dermis (B, flechas). Además, algunas fibras DBH⁺ fueron observadas dentro de la epidermis (B, cabeza de flecha). A los seis meses, las fibras DBH⁺ (flechas) fueron observadas en la dermis superficial de las ratas control (C) y de las ratas tratadas (D). No obstante, en las ratas tratadas las fibras DBH⁺ fueron más gruesas y más numerosas que en la dermis de las ratas control. Otra diferencia a esta edad fue que las ratas tratadas presentaron fibras DBH⁺ en la epidermis. A los seis meses muchas de las fibras DBH⁺ en la dermis del control presentaron una trayectoria transversal a la epidermis. En cambio, en las ratas tratadas estas fibras presentaron una distribución paralela a la epidermis. Barra de escala = 100 μ m.

Long-Term Effects of Neonatal Capsaicin Treatment on Intraepidermal Nerve Fibers and Keratinocyte Proliferation in Rat Glabrous Skin

EDUARDO MARTÍNEZ-MARTÍNEZ,^{1,2*} BRENDA TOSCANO-MÁRQUEZ,¹ AND GABRIEL GUTIÉRREZ-OSPINA¹

¹Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Tercer Circuito Exterior S/N, Coyoacán, D. F. 04510, México

²Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM

AQ1

ABSTRACT

Innervation is required to preserve several aspects of skin homeostasis. Previous studies in rodents have shown that sciatic nerve transection leads to epidermal thinning and reduced keratinocyte proliferation. As the sciatic nerve is composed of sensory and motor axons, it is not clear whether skin alterations reflect motor or sensory disturbances. In this study, we used neonatal capsaicin treatment to evaluate whether sensory chemical denervation affects keratinocyte proliferation at 1, 3, and 6 months of age. Using design-based stereological methods, we estimated the total length of intraepidermal nerve fibers (IENF) that were of peptidergic type and the number of bromodeoxyuridine-labeled (BrdU⁺) nuclei in the hind paw glabrous epidermis of control and capsaicin-treated rats. We found that the treatment decreased the total fiber length of IENF immunoreactive for both protein gene product 9.5 (PGP⁺) and of IENF immunoreactive for calcitonin gene-related peptide (CGRP⁺). The length of PGP⁺ fibers decreased by 83%, 81%, and 77% and that of CGRP⁺ fibers decreased by 48%, 58%, and 58% at 1, 3, and 6 months, respectively. Double-immunofluorescence staining for neural beta III tubulin and CGRP revealed that the majority of the remaining fibers in the epidermis after capsaicin treatment were of peptidergic type. The number of BrdU⁺ nuclei was similar in both groups. Our findings suggest that IENF present after capsaicin treatment are sufficient to maintain epidermal replacement. Anat Rec, 00:000–000, 2010. © 2010 Wiley-Liss, Inc.

Key words: capsaicin; calcitonin gene-related peptide; PGP 9.5; skin innervation; stereology

The skin is innervated by nonpeptidergic and peptidergic neurons located in sensory ganglia. However, the peptidergic neurons are not exclusively devoted to convey mechanical, chemical, or thermal information to the central nervous system (Kruger, 1996; Roosterman et al., 2006). In the dermis, the peptidergic nerve fibers terminate in close proximity to blood vessels, hair follicles, and immune cells. In the epidermis, peptidergic fibers establish synaptic-like contacts with Langerhans cells, melanocytes, and keratinocytes (Hosoi et al., 1993; Hilliges et al., 1995; Hara et al., 1996). Although the mechanisms are not yet fully understood, peptidergic

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Grant sponsor: PAPIIT; Grant number: IN210105; Grant sponsor: CONACyT; Grant numbers: 38615N, 45872M, 53194.

*Correspondence to: Eduardo Martínez-Martínez, Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Tercer Circuito Exterior S/N, Apartado Postal 70228, Coyoacán, D. F. 04510, México. Fax: +52 55 56 22 91 98. E-mail: serendipia@yahoo.com

Received 3 December 2009; Accepted 6 July 2010

DOI 10.1002/ar.21237

Published online 00 Month 2010 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

terminals are involved in the regulation of skin gene expression, skin pigmentation, blood flow, immune response, and wound healing (Hosoi et al., 1993; Hara et al., 1996; Fundin et al., 2002; Smith and Liu, 2002).

A critical process for epidermal homeostasis is the continual replacement of keratinocytes. Besides cutaneous growth factors, it is believed that nerve-derived factors may regulate keratinocyte proliferation. In psoriasis, for instance, the hyperproliferation of keratinocytes has been associated with an increased density of peptidergic fibers (Chan et al., 1997). Furthermore, sensory derived neuropeptides act as mitogens in cultures of cell lines of human melanocytes and keratinocytes (Takahashi et al., 1993; Hara et al., 1996). In addition, it has been found that sciatic nerve transection decreases epidermal thickness and keratinocyte proliferation (Hsieh and Lin, 1999). However, sciatic nerve lesions not only damage sensory innervation but also destroy autonomic and motor axons. Consequently, the epidermal changes might be caused by postural abnormalities or by alterations in the vascular supply (Li et al., 1997; Stankovic et al., 1999). Therefore, experiments that are designed to modify more selectively the intraepidermal nerve fibers (IENF) are needed to better define their role in the regulation of keratinocyte proliferation.

Neonatal capsaicin treatment induces the death of a great number of small sensory neurons that give rise to C and Aδ axons. These axons, especially the C fibers, innervate different layers of the living strata of the epidermis. The consequent reduction in the density of peripheral endings after capsaicin treatment has been proposed to alter the normal epithelial replacement in the cornea and in the skin (Beuerman and Schimmelfennig, 1980; Maggi et al., 1987). However, the effects of chemical denervation on normal epithelial proliferation have not yet been evaluated. Although it is known that the neonatal capsaicin treatment diminishes the content of substance P and calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the sensory ganglia and spinal cord (Carr et al., 1990), it is not well defined how the capsaicin treatment affects the peptidergic innervation of the skin during development. Our work had two goals. First, we wanted to quantify the IENF loss of immunoreactive fibers in capsaicin-treated rats for the neuronal marker protein gene product 9.5 (PGP⁺) or CGRP⁺. Second, we wanted to investigate the long-term effect of chemical sensory denervation in keratinocyte proliferation. To do this, we used design-based stereological methods on our histological preparations to measure the total fiber length of IENF and the number of bromodeoxyuridine-labeled nuclei in glabrous skin of the rat. We found that capsaicin severely reduced epidermal fibers, but did not completely eliminate peptidergic fibers. The loss of IENF was associated with a mild, but not significant effect on keratinocyte proliferation.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Female Wistar rats were raised in the animal facility of the Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Rats were kept in a colony room at 21°C on a 12 hr illumination cycle (lights on at 6:00 am) with free access to food and water. The experimental procedures were approved by the local ani-

mal rights committee and carefully followed the guidelines of the Código Bioético para la Investigación con Animales published by the Instituto de Investigaciones Biomédicas. All efforts were made to minimize the number of animals used and their potential suffering.

A single dose of capsaicin was administered to reduce sensory innervation as described elsewhere (Newson et al., 2005). Briefly, capsaicin was dissolved in a vehicle consisting of 10% ethanol, 10% Tween 80, and in 0.9% saline. Within 24–36 hr after birth, rats pups (mean weight = 7.8 g) were anesthetized by hypothermia and injected subcutaneously in the back skin with 40–60 µL of either vehicle or capsaicin solution (50 mg/kg). After the injection, the rats were put into a clear chamber, placed between the fingers of latex gloves filled with 37°C water. As apnea is an acute consequence of capsaicin injection, three puffs of salbutamol aerosol were sprayed into the chamber each time a rat pup was introduced. This procedure helps to alleviate respiratory difficulties. In addition, some rat pups required chest massage to reinstate their normal respiration. Rats were returned to their mother until respiratory difficulties disappeared.

One (N = 8), three (N = 6), and six (N = 6) months after birth, both vehicle and capsaicin-treated rats were intraperitoneally injected with bromodeoxyuridine (BrdU; 50 mg/kg) dissolved in 0.007 N NaOH/0.9%NaCl. Rats were killed 1 hr later by administering an overdose of sodium pentobarbital. The entire plantar hind paw skin was dissected and fixed in Zamboni's fixative [4% paraformaldehyde; 15% (v/v) saturate picric acid, 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4] at 4°C for 48 hr and then transferred successively to 20 and 30% sucrose. The plantar hind paws have three pair of pads. The footpads were designated as first, second, and third from the toes to the heel. The second pair of footpads were embedded in Tissue-Tek OCT compound (Sakura Seiki, Tokyo, Japan) and sectioned transversely into 50 µm slices in a cryostat. The sections were individually collected in 96-well plates filled with cryoprotectant solution (25% ethylene glycol and 25% glycerol in a 0.05 M phosphate buffer) and stored at -20°C. A systematic random sampling procedure was used to select the series of sections for neuronal antigens or BrdU immunohistochemistry. To analyze 12–15 sections per animal, a sampling interval of six was used. The first sampled section was selected at random between the first and the sixth section, then each successive section was sampled systematically every sixth section. All samples were coded and the observers were blinded to the coding information.

Immunohistochemistry

Series of sections were put onto gelatinized slides, washed 2× with 0.1 M phosphate buffer (PB), rinsed 1× with 0.3% Triton X-100 in PB (PBT), and incubated with 1% H₂O₂ in PB for 2 hr. After three PB rinses, sections were incubated with Immuno/DNA retriever at 70°C for 30 min (Bio SB, Santa Barbara), and then washed with PB. For BrdU immunodetection, DNA was denaturated with 1 N HCl at 30°C for 1 hr and neutralized with 0.1 M sodium borate buffer. Finally, sections were blocked with 5% normal horse serum in PBT for 1 hr. The sections were incubated overnight with either rabbit anti-PGP 9.5 (1:1000, Chemicon, Temecula), rabbit anti-

CGRP (1:10000, Peninsula Labs, San Diego), or mouse anti-BrdU (1:500, Roche Applied Science, Penzberg, Germany). After PB rinses, sections were incubated with the appropriated biotinylated secondary antibodies (Chemicon) for 2 hr and then with the avidin-biotin complex (Vector Laboratories, Burlingame) for 90 min. The immunohistochemistry reaction was made visible by 3-3'-diaminobenzidine/nickel precipitation (Vector Laboratories). After a rinse in water, sections were incubated in 0.05 M sodium bicarbonate buffer pH 9.6 for 10 min and then exposed to DAB enhancing solution (Vector laboratories). Finally, sections were counter-stained with methyl green. High-magnification digital photomicrographs of intraepidermal nerve fibers were taken with a video camera attached to an Olympus BX51 WI microscope. To better display the extent of PGP⁺ and CGRP⁺ fibers, multiple images were captured at different focal planes and merged into a composite micrograph using the extended depth of focus function of the Image-Pro Plus 5 software (Media Cybernetics).

Double Immunofluorescence

Hind paw sections were put onto gelatinized slides, washed 2x with PB, rinsed 1x with PBT, and incubated with Immuno/DNA retriever at 70°C for 30 min. and then washed with PB. Then, sections were blocked with 5% normal horse serum in PBT for 1 hr. The sections were incubated overnight with mouse anti-neural III beta-tubulin (1:500, Promega, Madison) and rabbit anti-CGRP (1:7500, Chemicon). After PB rinses, sections were incubated with biotinylated goat anti-mouse IgG (1:500, Chemicon), which was used to amplify the signal of beta III tubulin signal. Following PB rinses, sections were incubated for 2 hr at room temperature with a mixture of donkey anti-rabbit IgG conjugated to Alexa 594 (1:500 Molecular Probes, Eugene) and donkey anti-goat IgG conjugated to Alexa 488 (1:500, Molecular Probes). Finally, sections were counter-stained with DAPI and coverslipped with Dako Fluorescence Mounting Medium (Dako, Carpinteria). High-magnification digital photomicrographs of intraepidermal nerve fibers were taken with a Hamamatsu C9100CCD camera attached to an Olympus BX51 WI microscope equipped with a disk scanning unit. Composite micrographs were generated as above.

Stereological Quantification

PGP⁺ or CGRP⁺ fiber total length was quantified by using the space balls method for design-based stereology (Mouton et al., 2002). Space balls are based on the principle that the number of probe-object intersections is proportional to the total length of linear objects in the tissue. Data were obtained with an Olympus BX51 WI microscope equipped with a 4x and 60x (water immersion, 1.2 NA) objectives, a motorized x-y-z stage control, and the StereoInvestigator Software 8 (MBF Bioscience, Williston). Briefly, the boundaries of the epidermis were traced, excluding the stratum corneum. The virtual hemispheres generated by the software were systematically and randomly placed through the epidermal tracing. Intersections of immunoreactive fibers with hemispheres were marked while focusing through the z-axis of each sample site. Only those fibers within the ep-

idermis and clearly crossing dermal-epidermal border were considered for quantification (Lauria et al., 2005). The stereological parameters were as follows: sampling grid, 225 x 155 μm; radius of the hemisphere, 26 μm; and guard zones, 10% of section thickness. The mean section thickness was 32.8 ± 2 (Mean ± SD), measured every fifth sampling site. The fiber length was calculated by the equation $L = 2 * (\Sigma Q) * V/a * 1/ssf$. Where (ΣQ) is the sum of the number of intersections of IENF and hemispheres, V is the volume associated with grid parameters and section thickness, a is the surface area of the sphere, and ssf is the serial section fraction and refers to the periodicity of sampling. The results were expressed as total fiber length as described previously (Stocks et al., 1996).

Quantification of Keratinocyte Proliferation

The number of BrdU⁺ nuclei in the epidermis was estimated by the optical fractionator procedure for design-based stereology. Data were obtained with a Nikon Labophot-2 microscope equipped with 10x and 100x (oil immersion, 1.4 NA) objectives, a motorized x-y-z stage control, and interfaced with StereoInvestigator. BrdU⁺ nuclei were counted at uniformly random sampled sites within the epidermal tracing. The size of the grid was $X = 318 \mu m$ and $Y = 104 \mu m$ with a counting frame measuring 36×30 and a height of $20 \mu m$. The guard zone was 10% of the mean section thickness of 25.1 ± 2.5 , which was measured at every sampling site. The total number of BrdU⁺ nuclei was calculated by using the formula: $N = \Sigma Q^- * t/h * 1/asf * 1/ssf$, where ΣQ^- is the number of particles counted, t the mean section thickness, h the counting frame height, and asf is the relation of the area of counting frame to the area of sampling grid.

Statistics

Data are expressed as Mean ± SEM. Statistical analysis was performed using Origin Pro 8. Statistical differences between groups were determined by a two-tailed Student's *t* test. Multiple comparisons were performed by using one-way ANOVA test followed by a Holm-Sidak *post hoc* test. Any difference with $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

PGP+ IENF in Normal and Capsaicin-Treated Rats

The anatomical changes of the epidermal innervation in glabrous skin at 1 (1 M), 3 (3 M), and 6 months (6 M) after neonatal capsaicin treatment were analyzed with the neuronal marker PGP. Despite the fact that the general innervation pattern was preserved following capsaicin treatment, there were obvious differences in the origin, termination layer, and morphology of the IENF. In control rats, IENF originated from two types of bundles in the dermis. The majority of the IENF arose from the subepidermal plexus as fine single fibers (Fig. 1A,C,E). The rest of the IENF came from axonal bundles running perpendicular to the epidermis. In general, the distribution of the IENF immunoreactive for PGP was heterogeneous throughout the epidermis. In some

277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346

347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416

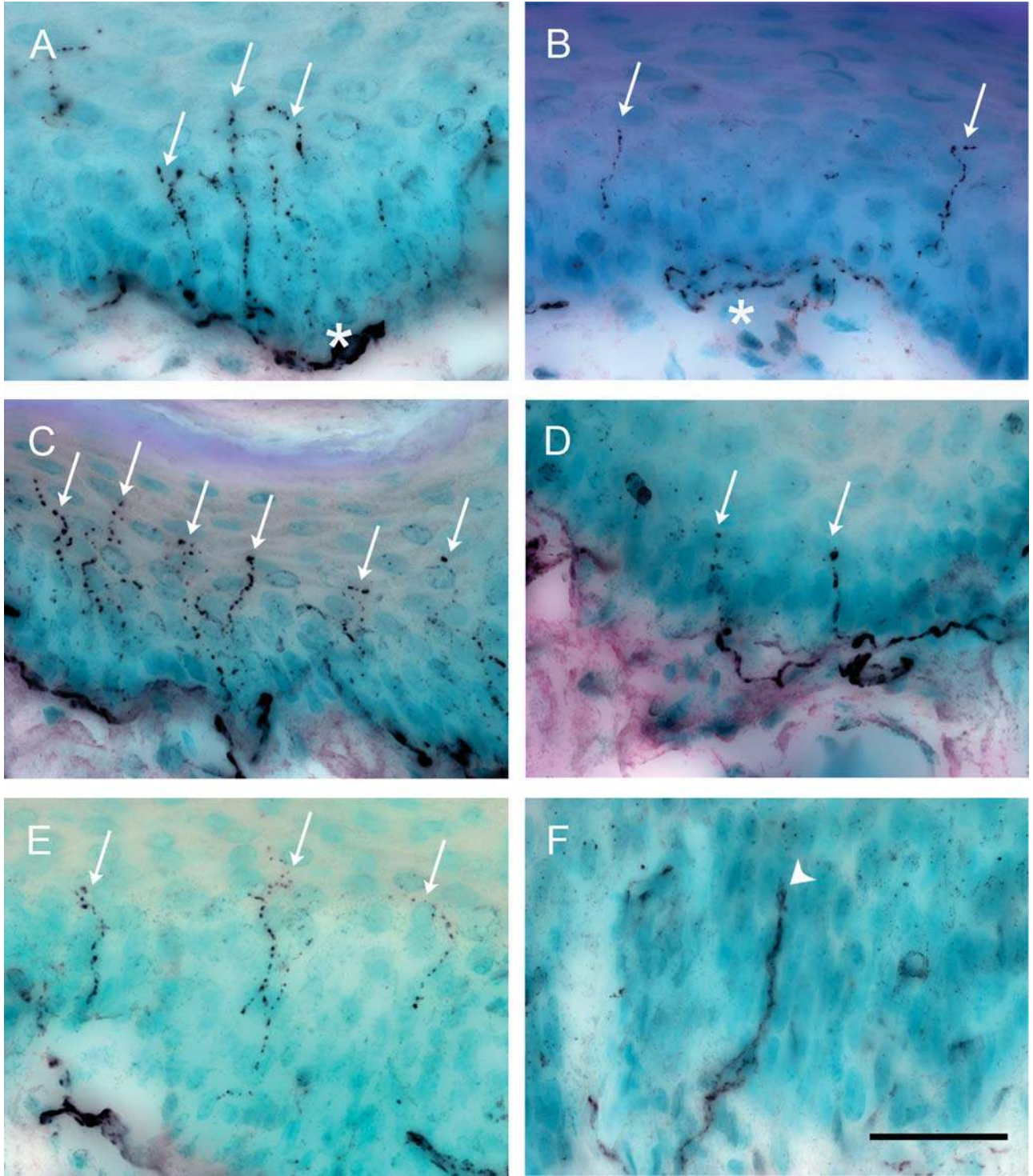


Fig. 1. Neonatal capsaicin treatment decreased the number of intraepidermal nerve fibers. Glabrous skin sections from control and capsaicin-treated rats of 1 M (A and B), 3 M (C and D), and 6 M (E and F) were immunostained for protein gene product 9.5 (PGP,

arrows). Note that capsaicin-treated rats showed aberrant thick fibers that penetrate to epidermis (F, arrowhead) and that the subepidermal plexus (asterisk) has fewer fibers in capsaicin-treated rats. Scale bar = 30 μ m.

epidermal regions, we observed the PGP⁺ fibers to be grouped in high density patches of nerve endings. Within these patches, the nerve endings were separated

one from the other for a short distance. Most of the PGP⁺ fibers terminated either in stratum spinosum (SS) or granulosum (SG). Some of these fibers coursed

417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486

487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556

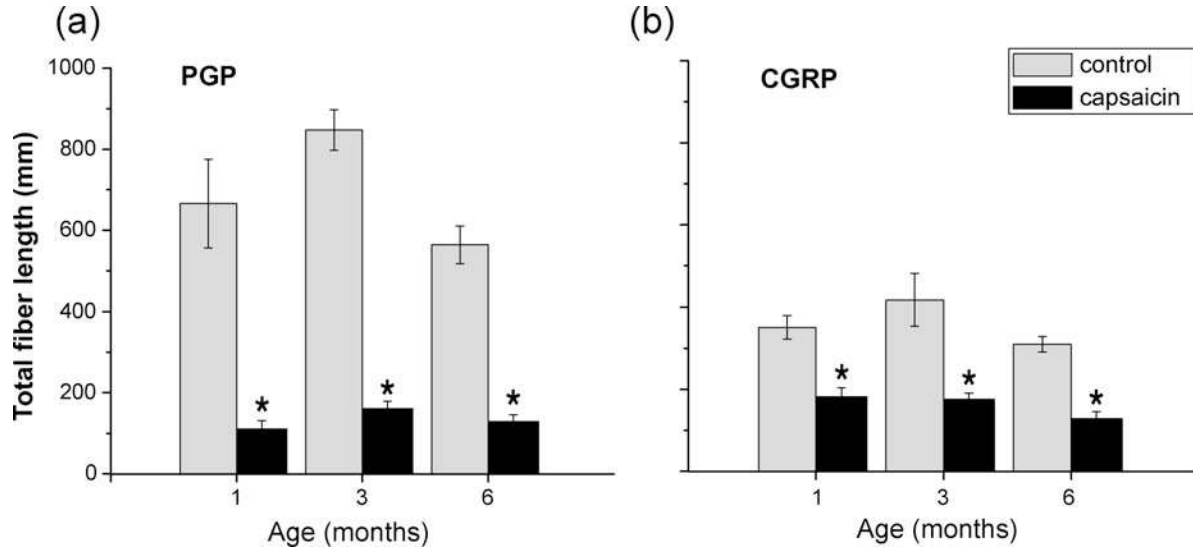


Fig. 2. Total fiber length of PGP⁺ and CGRP⁺ fibers was reduced in the glabrous epidermis of capsaicin-treated rats. The mean total length of intraepidermal axons was estimated with the stereological probe of space balls. The length of immunoreactive PGP (A) and CGRP (B) fibers is significantly reduced at 1 M, 3 M, and 6 M after capsaicin treatment (**P* < 0.05).

straight through the stratum basalis (SB) and the lower layers of the SS and then meandered in the upper layers of the SS and SG (Fig. 1A,C,E). Less frequently, PGP⁺ fibers with a straight trajectory terminated either in the SS or in the SB. Although the IENF patch clustering was similar at 3 M and 6 M, these groups of terminals were more distant from each other. At 3 M, there was an increase of the number of very thin and strikingly beaded fibers (Fig. 1C). In addition, some fibers became more branched and some of them were tightly or loosely intertwined. At 6 M, the number of very thin and beaded fibers tends to decrease (Fig. 1E).

In capsaicin-treated rats, there was a clear-cut diminution of PGP⁺ epidermal fibers at all the analyzed ages. The fibers separating from subepidermal plexus were scarce and almost all of the IENF had straight trajectories (Fig. 1B,D,F). The majority of the IENF were thick and terminated in the SS, and only a few penetrated into the SG. As in the epidermis of controls rats, the distribution of the IENF was also heterogeneous. It is noteworthy that patches of fibers in capsaicin-treated rats were composed of two or three fibers, which resulted in greater separation between terminals (Fig. 1B,D). Overall, IENF in capsaicin-treated rats had a straight morphology and were poorly ramified. The total length of IENF was reduced 83%, 81%, and 77% in the epidermis of capsaicin-treated rats of 1 M, 3 M, and 6 M, respectively (Fig. 2A). We did not observe differences in the number and intensity of PGP immunoreactive dendritic cells in both groups of animals.

CGRP⁺ IENF in Normal and Capsaicin-Treated Rats

In normal rats, CGRP⁺ fibers were observed in dermal papilla and in the central zone of the rete pegs. In 1 M and 3 M, fibers were commonly found in groups of two to three intertwined terminals, whereas at 6 M, the

axon terminals were frequently observed as individual fibers (Fig. 3A,C,E). CGRP⁺ fibers predominantly ended in the SG, although some fibers terminated in the SS, especially at 6 M (Fig. 3E). CGRP⁺ terminals meandered through keratinocyte layers and exhibited branching points. After reaching the SG, some terminals formed loops that returned to lower strata (Fig. 3A,C).

In capsaicin-treated rats, CGRP⁺ fibers were also distributed at regular intervals, but in most cases fibers were unbranched and frequently terminated in the SS. Just a few of the CGRP⁺ fibers reached the lower layers of the SG (Fig. 3B,D,F). CGRP⁺ fibers in capsaicin-treated rats tended to be thicker and less beaded than in controls. At 6 M, thick knob-like terminations were evident in the SS (Fig. 3F). Capsaicin reduced by 48%, 58%, and 58% the total length of CGRP⁺ fibers at 1 M, 3 M, and 6 M, respectively (Fig. 2B).

In control rats, the length of CGRP⁺ fibers represented 53%, 49%, and 54% of the length of PGP⁺ fibers at 1 M, 3 M, and 6 M, respectively. In capsaicin-treated rats, the CGRP⁺ fiber length was significantly higher (65%, *t* test, *P* < 0.05) than that of the PGP⁺ fibers at 1 M, but the length of PGP⁺ and CGRP⁺ fibers was similar at 3 M and 6 M.

Double Labeling for βIII Tubulin and CGRP

To judge whether the predominant fibers in the epidermis of capsaicin-treated rats were of peptidergic type we performed a double labeling experiment for β III tubulin and CGRP. In preliminary experiments, we confirmed that PGP immunoreactivity always colocalized with β III tubulin immunoreactivity (Supporting Information Fig. 1). In the epidermis of control rats we observed that the most abundant type of fibers was the single labeled for β III tubulin at 1 M, 3 M, and 6 M. The CGRP⁺ fibers in these animals were also immunoreactive for β III tubulin (Fig. 4A,C,E). In contrast, the

6

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ ET AL.

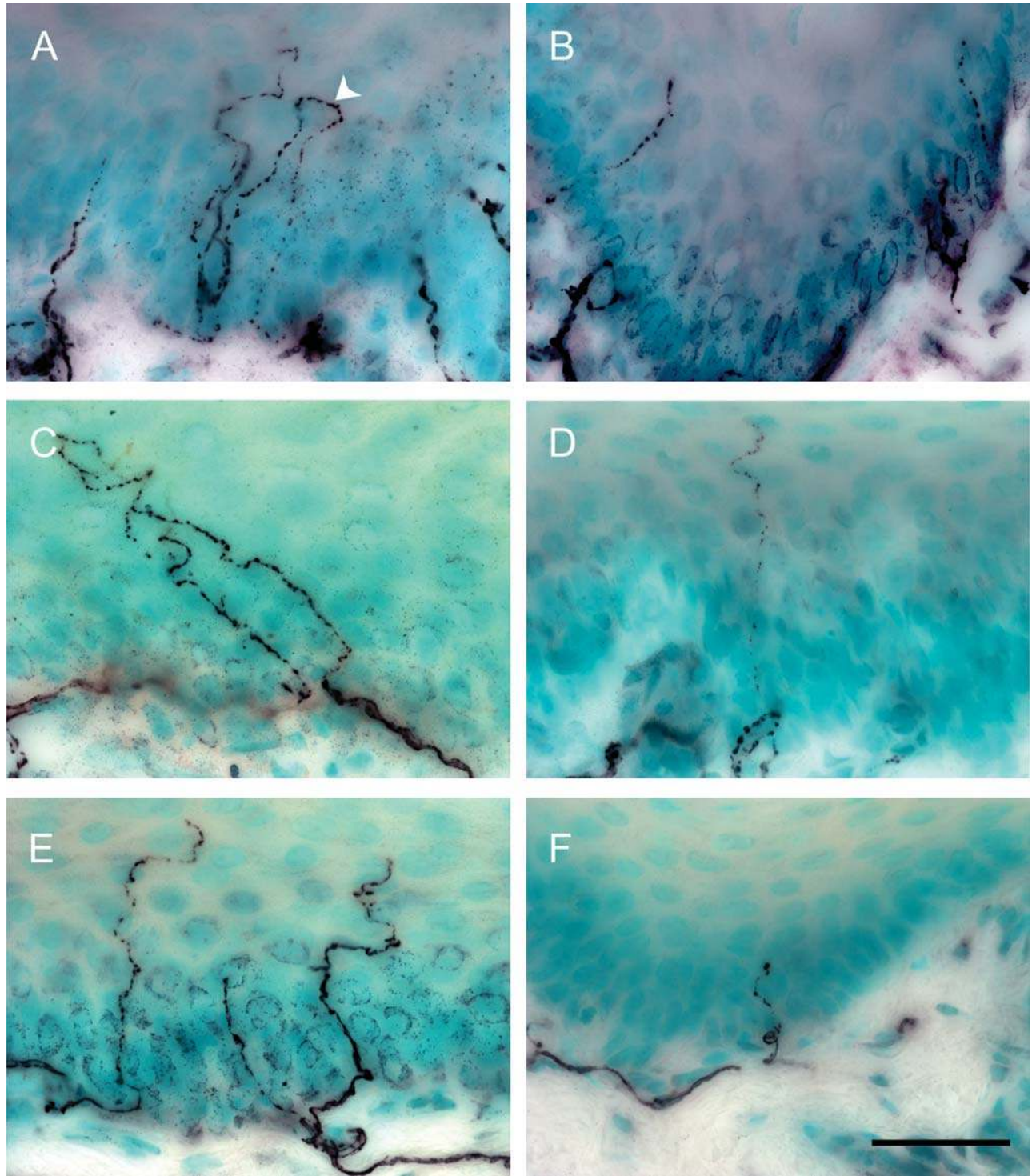


Fig. 3. CGRP fiber location in the epidermis is preserved following neonatal capsaicin treatment. Glabrous skin sections from control and capsaicin-treated rats of 1 M (A and B), 3 M (C and D), and 6 M (E and F) were immunostained for CGRP. In control rats (A, C, and E), CGRP+ fibers meander through keratinocyte layers and some fibers

show terminal loop configuration (arrowhead). Although the CGRP fibers appear at regular intervals after capsaicin treatment, these nerve endings are less complex and frequently appear alone (B, D, and F). Also, in the treated rats we observed the presence of knob-like termination, especially at 6 M. Scale bar = 30 μ m.

capsaicin-treated rats exhibited some CGRP+ fibers that were not immunoreactive for β III tubulin (Fig. 4B). This phenomenon was very common at 1 M, but barely

seen at 3 M and 6 M. An additional difference between the control and treated rats was that only a few fibers of the total were single labeled for β III tubulin in the

697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766

767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836

837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906

907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977

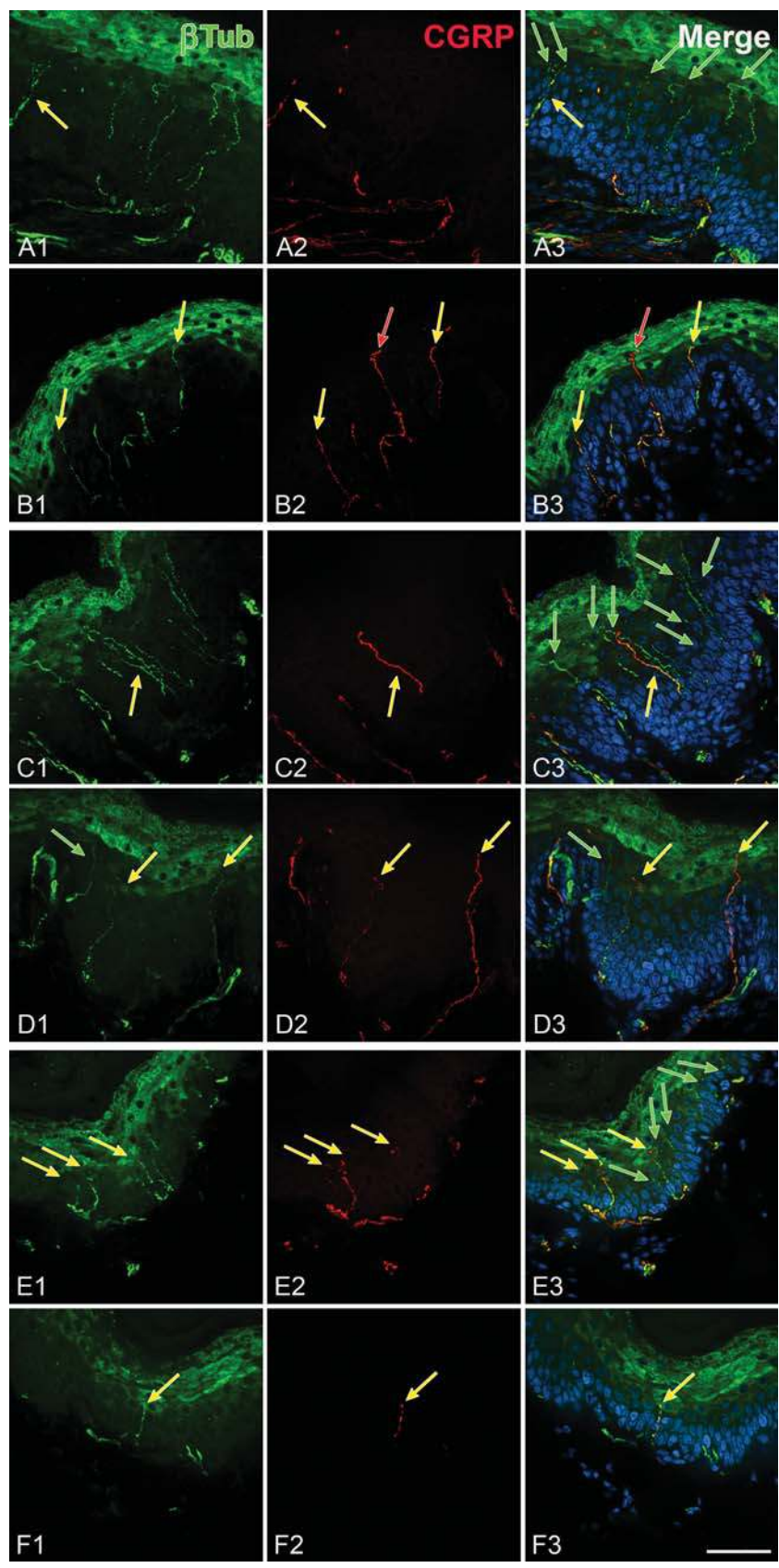


Fig. 4. The epidermis of the capsaicin-treated rats predominantly contains peptidergic fibers. Skin sections from control (A, C, and E) and capsaicin-treated rats (B, D, and F) of 1 M (A and B), 3 M (C and D), and 6 M (E and F) were immunostained for neural beta III tubulin (β Tub) and for CGRP. In control rats, the most abundant type of fibers was immunopositive for β Tub and immunonegative for CGRP (green arrows), whereas in treated rats the most common type of fibers was double labeled for β Tub and CGRP (yellow arrows). Note that in treated rats there were fibers single labeled for CGRP (red arrows). Images at the third column represent merged images of the first two images in each row. Counterstaining with DAPI is shown in blue. Scale bar = 50 μ m.

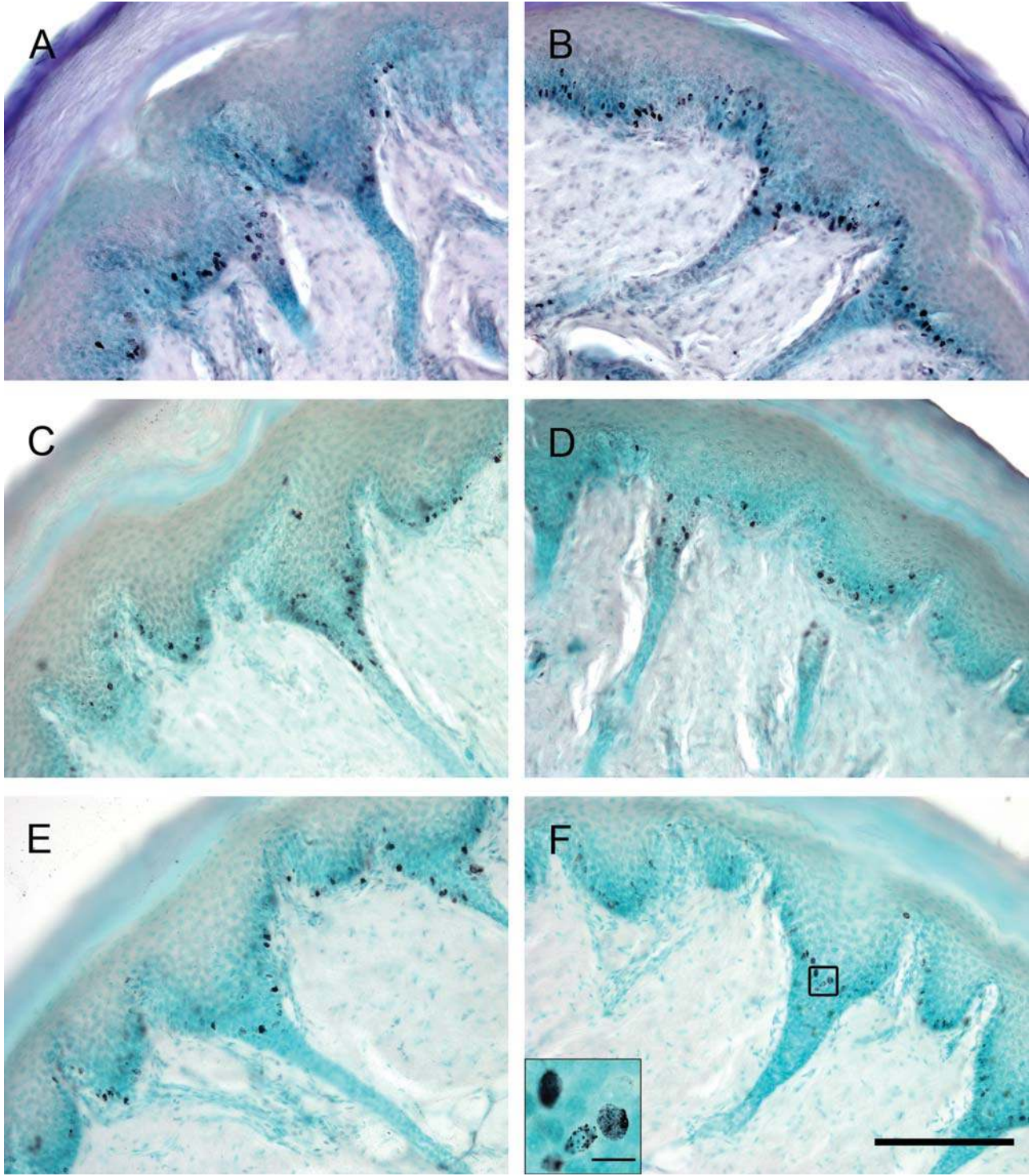


Fig. 5. Bromodeoxyuridine labeling in rat glabrous skin. Skin sections from control (A, C, and E) and capsaicin-treated (B, D, and F) of 1 M (A and B), 3 M (C and D), and 6 M (E and F) were immunostained for bromodeoxyuridine (BrdU). In both groups, the BrdU nuclei were

mainly observed in basal stratum of epidermis and there were no appreciable differences in epidermal thickness. The inset in F shows a magnification of BrdU⁺ nuclei. Scale bar = 150 μm. Inset scale bar = 10 μm.

treated rats (Fig. 4D). Hence, the most abundant type of IENF in the treated rats was the double labeled ones (Fig. 4B,D,F).

Evaluating Keratinocyte Proliferation

IENF have been implicated in the maintenance of keratinocyte proliferation. Thus, the total number of BrdU⁺

977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000
1001
1002
1003
1004
1005
1006
1007
1008
1009
1010
1011
1012
1013
1014
1015
1016
1017
1018
1019
1020
1021
1022
1023
1024
1025
1026
1027
1028
1029
1030
1031
1032
1033
1034
1035
1036
1037
1038
1039
1040
1041
1042
1043
1044
1045
1046

1047
1048
1049
1050
1051
1052
1053
1054
1055
1056
1057
1058
1059
1060
1061
1062
1063
1064
1065
1066
1067
1068
1069
1070
1071
1072
1073
1074
1075
1076
1077
1078
1079
1080
1081
1082
1083
1084
1085
1086
1087
1088
1089
1090
1091
1092
1093
1094
1095
1096
1097
1098
1099
1100
1101
1102
1103
1104
1105
1106
1107
1108
1109
1110
1111
1112
1113
1114
1115
1116

CAPSAICIN DENERVATION AND EPIDERMAL PROLIFERATION

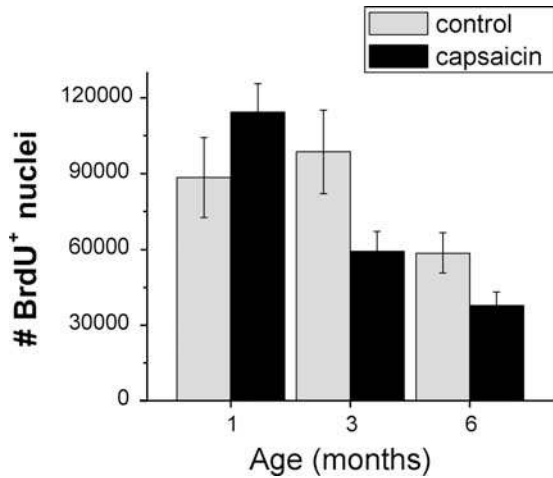


Fig. 6. Capsaicin denervation did not affect keratinocyte proliferation. The number of BrdU⁺ nuclei in the central pads of the hind paw was estimated using the stereological probe of the optical fractionator.

nuclei was estimated to determine whether the reduction of epidermal innervation by capsaicin could provoke alterations of keratinocyte replacement. The number of BrdU⁺ nuclei was found to be similar between control and capsaicin-treated rats at 1 M, 3 M, and 6 M (Fig. 6). The thickness of epidermis and number of layers were equivalent in both control and capsaicin-treated rats (Fig. 5). In addition, the number of BrdU⁺ nuclei tended to decrease with age in both experimental groups.

DISCUSSION

Capsaicin-sensitive sensory neurons have been proposed to maintain epithelial integrity (Beuerman and Schimmelpfennig, 1980; Maggi et al., 1987). However, information is lacking concerning the effect of neonatal capsaicin treatment on the time course of development of epidermal innervation and of keratinocyte proliferation. In this study, we have found that although capsaicin treatment severely reduced IENF number, a significant proportion of peptidergic fibers was retained. At the same time, the epidermis of capsaicin-treated rats presented normal characteristics. Overall, the epidermal innervation in the capsaicin-treated rats was morphologically simpler than in controls and there were changes in the epidermal stratum where the IENF terminate. Both observations may imply that there are alterations in both the afferent and efferent functions of the sensory nerves.

The rodent hind paw skin has been frequently used as an experimental model to study nerve degeneration and regeneration (Navarro et al., 1995; Ma and Bisby, 2000; Yen et al., 2006). However, there is little published quantitative data about the development of epidermal innervation in this skin region. Our report provides insights into the normal development of epidermal innervation in the glabrous skin and how it is altered following capsaicin treatment. Our data show that although the footpad increases in size as an animal matures, the IENF length was substantially unchanged in control rats at 1 M, 3 M, and 6 M. This suggests that the supply of IENF remains relatively constant, but is redistributed through

the epidermis as the animal ages. Indeed, we observed that the clustering organization of PGP⁺ fibers is essentially constant at the three analyzed ages, but the patches of IENF appear more dispersed at 3 M and 6 M. With regard to fiber plasticity, the IENF seem to undergo continual remodeling as suggested by the morphological diversity of the IENF observed in the three analyzed ages. In agreement with this notion, the sensory endings in the mouse cornea showed substantial changes in the arborization and location of nerve terminals over a 1-month-period (Harris and Purves, 1989). These findings would explain why we observed the appearance of finely beaded fibers at 3 M, and then their decline at 6 M. In contrast, the IENF of capsaicin-treated rats may possess limited plastic properties. Remarkably, a relatively high number of thick nerve fibers were observed terminating in the epidermis of treated rats. On the basis of fiber appearance, these sensory terminals could be a subset of C fibers with an altered morphology or perhaps Aδ fibers that do not contain GAP43 [a molecule associated with nerve remodeling (Albrecht et al., 2006; Pare et al., 2007)]. In this regard, the perineural application of capsaicin in adult rats reduces the number of epidermal fibers containing GAP43 (Dux et al., 1999). Thus, the constant low levels of epidermal innervation in the treated rats may reflect a limited sprouting ability of the PGP⁺ or CGRP⁺ fibers that remain. Although the direct relation between peripheral arborization and specific sensory modalities is beginning to be understood, it is plausible that less branched arbor configuration of IENF in treated rats, may alter fiber excitability and circumscribe its area of activation (MacIver and Tanelian, 1993; Woodbury and Koerber, 2007). We note that the detection of noxious stimuli is impaired by capsaicin injection in human skin (Simone et al., 1998). Moreover, additional sensory alterations may come from the fact that ample zones of epidermis were devoid of innervation in treated rats. Recently, it has been shown that a lesion of sensory nerves lead to aberrant sprouting of sympathetic fibers into the upper dermis of the rat (Yen et al., 2006). We observed such aberrant dopamine-β-hydroxylase immunoreactive fibers in the dermal-epidermal border and also noted some fibers penetrating the epidermis in capsaicin rats of ages 3 M and 6 M (Supporting Information Fig. 2). Whether the presence of nonvascular sympathetic fibers in the upper dermis of capsaicin-treated rats is relevant to sensory physiology remains to be investigated.

Recently, it has been documented that stereological estimation of intraepidermal fiber length is positively correlated with the number of fibers per millimeter in the same sections (McArthur et al., 1998). Considering that neuronal capsaicin sensitivity is given by the expression of the transient receptor potential V1 (TRPV1) (Hiura, 2000), our findings suggest that a considerable number of intraepidermal nerve fibers in the glabrous epidermis of the rat presumably contain this receptor. The TRPV1 is present in small neurons of the dorsal root ganglia of nonpeptidergic and peptidergic type (Guo et al., 1999; Hwang et al., 2005; Price and Flores, 2007). We note here that recently, it has been shown that nonpeptidergic fibers are the most abundant type of fibers within the epidermis in glabrous and hairy skin of the rat (Taylor et al., 2009). Thus, it is plausible that a subpopulation of nonpeptidergic fibers may be among the fibers that were more affected by capsaicin

treatment. To go along with this, our results also indicate that a subpopulation of peptidergic fibers is also affected by the capsaicin treatment. In this regard, almost half of the CGRP⁺ fibers in epidermis could be associated with capsaicin-sensitive neurons. This estimate seems reasonable since 59% of the neurons innervating the skin of the L6 dermatome exhibited colocalization of TRPV1 with CGRP (Hwang et al., 2005). A fraction of these cutaneous neurons may project to the epidermis and innervate there an ample territory by way of distal axonal branching. This would not necessarily imply that all terminals contain the TRPV1 in the epidermis. Indeed, there is a discrepancy in the proportion of IENF immunoreactive for TRPV1 in human and primate skin (Petersen et al., 2002; Lauria et al., 2006; Pare et al., 2007). One possible explanation of these disparate results is that some peptidergic or nonpeptidergic fibers in the epidermis come from capsaicin-sensitive neurons in which TRPV1 is not transported to the same peripheral ending or that these endings contain undetectable levels of this receptor (Guo et al., 1999). Further studies in rodents are needed to determine the exact proportions of peptidergic and nonpeptidergic intraepidermal endings colocalizing with TRPV1. Finally, the existence of TRPV1 expression has been reported in various non-neuronal tissues such as keratinocytes (Stander et al., 2004). This finding raises the possibility that neonatal capsaicin treatment may have a cytotoxic effect or may alter the physiology of the keratinocytes. However, it has been shown that TRPV1 is not functional in human keratinocytes probably due to the presence of TRPV1b, which is a dominant negative splice variant of TRPV1. Furthermore, cytotoxic effects on keratinocytes were only observable with high doses of vanilloids and these effects were attributable to a TRPV1-independent pathway (Pecze et al., 2008).

An additional point worthy of mention is that at 1 M the CGRP⁺ fiber length was greater than the PGP⁺ fiber length in capsaicin-treated rats. This observation suggests that PGP may be absent or downregulated in a subset of unmyelinated axons after capsaicin treatment. Confirming this, in double labeling experiments we observed that some fibers could be detected with β III tubulin but not with PGP especially at 1 M in treated rats (Supporting Information Fig. 2). In addition, some CGRP⁺ fibers did not label for β III tubulin. In this regard, it has been observed that after sciatic nerve constriction in rats and in skin samples of a human patient with herpetic neuralgia, there are some unmyelinated fibers that display faint or no immunoreactivity for PGP (Ma and Bisby, 2000; Petersen et al., 2002). This phenomenon seems to be temporal and particular to a degenerative condition. The fact that PGP⁺ and CGRP⁺ fiber length is similar in 3 M and 6 M in treated rats may indicate that the levels of PGP return to detectable levels in certain fibers. We point out that we cannot rule out the possibility that a percentage of fibers could not be detected with our present analysis. Additional studies are required to determine why the synthesis or transport of PGP and β III tubulin is altered during nerve regeneration and degeneration and whether this reflects some sort of functional alteration of the nerve ending.

IENF have been proposed to modulate keratinocyte proliferation (Hsieh and Lin, 1999). To explore this notion further we injected rat pups with a single dose of

capsaicin to reduce the epidermal nerve supply. We found that despite the significant decrease in epidermal innervation, epidermal thickness and keratinocyte proliferation were not altered in capsaicin-treated rats. One possible explanation is that normal keratinocyte proliferation in treated rats resulted from adequate mechanical load and motor performance which are altered following sciatic nerve lesion (Li et al., 1997; Stankovic et al., 1999). The normal keratinocyte proliferation could be modulated by signals derived from the remaining non-peptidergic C fibers which can be activated by ATP released from keratinocytes after mechanical stimulation (Koizumi et al., 2004; Taylor et al., 2009). However, epidermal thinning is also produced following denervation of skin regions that do not support body weight (Burgess et al., 1974; English, 1977; Nurse et al., 1984). This data suggests additional mechanisms that could act alone or in concert in the capsaicin-treated rats. For instance, it is possible that the diminishment of nerve-derived signals may be compensated in non-injury conditions by increasing the availability of local growth factors. An additional alternative is that also the remaining peptidergic fibers are involved in providing the trophic support that epidermis requires for normal homeostasis. A recent study has shown that CGRP is one of the factors that stimulates keratinocyte proliferation *in vivo* after ultraviolet irradiation (Seike et al., 2002). On the basis of this data and our observation that peptidergic fibers were the predominant type of fibers after capsaicin treatment, it is possible that CGRP availability in treated rats contributes to maintain adequate keratinocyte replacement in non-injury conditions. Interestingly, capsaicin-treated rats develop spontaneous skin wounds in the head region and show delayed wound healing (Maggi et al., 1987; Smith and Liu, 2002). Moreover, wound repair is accelerated by exogenous administration of CGRP (Engin, 1998). In this context, the restricted lateral expanse of IENF in treated rats probably complicates fiber stimulation, leading to a reduction of nerve-derived signals release during conditions where skin demands high rates of cell proliferation. Therefore, the efferent role of IENF on keratinocyte replacement might be best evaluated with respect to damaged tissue conditions.

We conclude that neonatal capsaicin treatment decreases the density of both nonpeptidergic and peptidergic fibers in the epidermis. However, the loss of peptidergic fibers was less severe. It seems that the remaining epidermal innervation is sufficient to support functional requirements for epithelial replacement in non-injury conditions.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Patricia Padilla for their technical and administrative assistance and Georgina Díaz Herrera and Adolfo Herrera Juárez for providing animal care. They are also grateful to Dr. Edmund Glaser for helpful criticisms and careful editing. They also thank MicroBrightField Inc. of Williston, VT, USA, for donating one of the systems used to carry out the stereological analyses. Additional funding came from Programa de Apoyos Integrales para la Formación de Doctores en Ciencias, CONACyT (53194). E.M.M. and B.T.M. were fellows from CONACyT. E.M.M. was also sponsored by

CAPSAICIN DENERVATION AND EPIDERMAL PROLIFERATION

Dirección General de Estudios de Posgrado-UNAM and IMPULSA-02.

LITERATURE CITED

Albrecht PJ, Hines S, Eisenberg E, Pud D, Finlay DR, Connolly MK, Pare M, Davar G, Rice FL. 2006. Pathologic alterations of cutaneous innervation and vasculature in affected limbs from patients with complex regional pain syndrome. *Pain* 120:244.

Beurman RW, Schimmelpfennig B. 1980. Sensory denervation of the rabbit cornea affects epithelial properties. *Exp Neurol* 69:196-201.

Burgess PR, English KB, Horch KW, Stensaas LJ. 1974. Patterning in the regeneration of type I cutaneous receptors. *J Physiol* 236:57-82.

Carr PA, Yamamoto T, Nagy JI. 1990. Calcitonin gene-related peptide in primary afferent neurons of rat: co-existence with fluoride-resistant acid phosphatase and depletion by neonatal capsaicin. *Neurosci* 36:751-760.

Chan J, Smoller BR, Raychauduri SP, Jiang WY, Farber EM. 1997. Intraepidermal nerve fiber expression of calcitonin gene-related peptide, vasoactive intestinal peptide and substance P in psoriasis. *Arch Dermatol Res* 289:611-616.

Dux M, Sann H, Schemann M, Jancsó G. 1999. Changes in fibre populations of the rat hairy skin following selective chemodeneration by capsaicin. *Cell Tissue Res* 296:471.

Engin C. 1998. Effects of calcitonin gene-related peptide on wound contraction in denervated and normal rat skin: a preliminary report. *Plast Reconstr Surg* 101:1887-1890.

English KB. 1977. The ultrastructure of cutaneous type I mechanoreceptors (Haarscheiben) in cats following denervation. *J Comp Neurol* 172:137-163.

Fundin BT, Rice FL, Ernfors P. 2002. Patterned gene programs and target remodeling following axotomy at a major site for sensory innervation. *J Neurobiol* 53:370-380.

Guo A, Vulchanova L, Wang J, Li X, Elde R. 1999. Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X(3) purinoceptor and IB4 binding sites. *Eur J Neurosci* 11:946-958.

Hara M, Toyoda M, Yaar M, Bhawan J, Avila EM, Penner IR, Gilchrist BA. 1996. Innervation of melanocytes in human skin. *J Exp Med* 184:1385-1395.

Harris LW, Purves D. 1989. Rapid remodeling of sensory endings in the corneas of living mice. *J Neurosci* 9:2210-2214.

Hilliges M, Wang L, Johansson O. 1995. Ultrastructural evidence for nerve fibers within all vital layers of the human epidermis. *J Invest Dermatol* 104:134-137.

Hiura A. 2000. Neuroanatomical effects of capsaicin on the primary afferent neurons. *Arch Histol Cytol* 63:199-215.

Hosoi J, Murphy GF, Egan CL, Lerner EA, Grabbe S, Asahina A, Granstein RD. 1993. Regulation of Langerhans cell function by nerves containing calcitonin gene-related peptide. *Nature* 363:159-163.

Hsieh ST, Lin WM. 1999. Modulation of keratinocyte proliferation by skin innervation. *J Invest Dermatol* 113:579-586.

Hwang SJ, Min Oh J, Valtschanoff JG. 2005. Expression of the vanilloid receptor TRPV1 in rat dorsal root ganglion neurons supports different roles of the receptor in visceral and cutaneous afferents. *Brain Res* 1047:261.

Koizumi S, Fujishita K, Inoue K, Shigemoto-Mogami Y, Tsuda M. 2004. Ca2+ waves in keratinocytes are transmitted to sensory neurons: the involvement of extracellular ATP and P2Y2 receptor activation. *Biochem J* 380:329-338.

Kruger L. 1996. The functional morphology of thin sensory axons: some principles and problems. *Prog Brain Res* 113:255-272.

Lauria G, Cornblath DR, Johansson O, McArthur JC, Mellgren SI, Nolano M, Rosenberg N, Sommer C. 2005. EFNS guidelines on the use of skin biopsy in the diagnosis of peripheral neuropathy. *Eur J Neurol* 12:747-758.

Lauria G, Morbin M, Lombardi R, Capobianco R, Camozzi F, Pareyson D, Manconi M, Geppetti P. 2006. Expression of capsaicin re-

ceptor immunoreactivity in human peripheral nervous system and in painful neuropathies. *J Periph Nerv Syst* 11:262-271.

Li Y, Hsieh ST, Chien HF, Zhang X, McArthur JC, Griffin JW. 1997. Sensory and motor denervation influence epidermal thickness in rat foot glabrous skin. *Exp Neurol* 147:452-462.

Ma W, Bisby MA. 2000. Calcitonin gene-related peptide, substance P and protein gene product 9.5 immunoreactive axonal fibers in the rat footpad skin following partial sciatic nerve injuries. *J Neurocytology* 29:249-262.

MacIver MB, Tanelian DL. 1993. Structural and functional specialization of A delta and C fiber free nerve endings innervating rabbit corneal epithelium. *J Neurosci* 13:4511-4524.

Maggi CA, Borsini F, Santicoli P, Geppetti P, Abelli L, Evangelista S, Manzini S, Theodorsson-Norheim E, Somma V, Amenta F. 1987. Cutaneous lesions in capsaicin-pretreated rats. A trophic role of capsaicin-sensitive afferents? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 336:538-545.

McArthur JC, Stocks EA, Hauer P, Cornblath DR, Griffin JW. 1998. Epidermal nerve fiber density: normative reference range and diagnostic efficiency. *Arch Neurol* 55:1513-1520.

Mouton PR, Gokhale AM, Ward NL, West MJ. 2002. Stereological length estimation using spherical probes. *J Microsc* 206:54-64.

Navarro X, Verdu E, Wendelschafer-Crabb G, Kennedy WR. 1995. Innervation of cutaneous structures in the mouse hind paw: a confocal microscopy immunohistochemical study. *J Neurosci Res* 41:111-120.

Newson P, Lynch-Frame A, Roach R, Bennett S, Carr V, Chahl LA. 2005. Intrinsic sensory deprivation induced by neonatal capsaicin treatment induces changes in rat brain and behavior of possible relevance to schizophrenia. *Br J Pharmacol* 146:408.

Nurse CA, Macintyre L, Diamond J. 1984. A quantitative study of the time course of the reduction in Merkel cell number within denervated rat touch domes. *Neuroscience* 11:521-533.

Pare M, Albrecht PJ, Noto CJ, Bodkin NL, Pittenger GL, Schreyer DJ, Tigno XT, Hansen BC, Rice FL. 2007. Differential hypertrophy and atrophy among all types of cutaneous innervation in the glabrous skin of the monkey hand during aging and naturally occurring type 2 diabetes. *J Comp Neurol* 501:543-567.

Pecze L, Szabo K, Szell M, Josvay K, Kaszas K, Kusz E, Letoha T, Prorok J, Koncz I, Toth A, Kemeny L, Vizler C, Olah Z. 2008. Human keratinocytes are vanilloid resistant. *PLoS One* 3:e3419.

Petersen KL, Rice FL, Suess F, Berro M, Rowbotham MC. 2002. Relief of post-herpetic neuralgia by surgical removal of painful skin. *Pain* 98:119-126.

Price TJ, Flores CM. 2007. Critical evaluation of the colocalization between calcitonin gene-related peptide, substance P, transient receptor potential vanilloid subfamily type 1 immunoreactivities, and isolectin B4 binding in primary afferent neurons of the rat and mouse. *J Pain* 8:263-272.

Roosterman D, Goerge T, Schneider SW, Bunnett NW, Steinhoff M. 2006. Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoenocrine organ. *Physiol Rev* 86:1309-1379.

Seike M, Ikeda M, Morimoto A, Matsumoto M, Kodama H. 2002. Increased synthesis of calcitonin gene-related peptide stimulates keratinocyte proliferation in murine UVB-irradiated skin. *J Dermatol Sci* 28:135.

Simone DA, Nolano M, Johnson T, Wendelschafer-Crabb G, Kennedy WR. 1998. Intradermal injection of capsaicin in humans produces degeneration and subsequent reinnervation of epidermal nerve fibers: correlation with sensory function. *J Neurosci* 18:8947-8959.

Smith P, Liu M. 2002. Impaired cutaneous wound healing after sensory denervation in developing rats: effects on cell proliferation and apoptosis. *Cell Tissue Res* 307:281-291.

Stander S, Moormann C, Schumacher M, Buddenkotte J, Artuc M, Shpacovitch V, Brzoska T, Lippert U, Henz BM, Luger TA, Metzger D, Steinhoff M. 2004. Expression of vanilloid receptor subtype 1 in cutaneous sensory nerve fibers, mast cells, and epithelial cells of appendage structures. *Exp Dermatol* 13:129-139.

Stankovic N, Johansson O, Oqvist G, Hildebrand C. 1999. Indirect effect of sciatic nerve injury on the epidermal thickness of planter

1467
1468
1469
1470
1471
1472
1473
1474
1475
1476
1477
1478
1479
1480
1481
1482
1483
1484
1485
1486
1487
1488
1489
1490
1491
1492
1493
1494
1495
1496
1497
1498
1499
1500
1501
1502
1503
1504
1505
1506
1507
1508
1509
1510
1511
1512
1513
1514
1515
1516
1517
1518
1519
1520
1521
1522
1523
1524
1525
1526
1527
1528
1529
1530
1531
1532
1533
1534
1535
1536

1537
1538
1539
1540
1541
1542
1543
1544
1545
1546
1547
1548
1549
1550
1551
1552
1553
1554
1555
1556
1557
1558
1559
1560
1561
1562
1563
1564
1565
1566
1567
1568
1569
1570
1571
1572
1573
1574
1575
1576
1577
1578
1579
1580
1581
1582
1583
1584
1585
1586
1587
1588
1589
1590
1591
1592
1593
1594
1595
1596
1597
1598
1599
1600
1601
1602
1603
1604
1605
1606

12

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ ET AL.

glabrous skin in rats. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 33:273-279.
Stocks EA, McArthur JC, Griffen JW, Mouton PR. 1996. An unbiased method for estimation of total epidermal nerve fibre length. *J Neurocytol* 25:637-644.
Takahashi K, Nakanishi S, Imamura S. 1993. Direct effects of cutaneous neuropeptides on adenylyl cyclase activity and proliferation in a keratinocyte cell line: stimulation of cyclic AMP formation by CGRP and VIP/PHM, and inhibition by NPY through G protein-coupled receptors. *J Invest Dermatol* 101:646-651.

Taylor AM, Peleshok JC, Ribeiro-da-Silva A. 2009. Distribution of P2X(3)-immunoreactive fibers in hairy and glabrous skin of the rat. *J Comp Neurol* 514:555-566.
Woodbury CJ, Koerber HR. 2007. Central and peripheral anatomy of slowly adapting type I low-threshold mechanoreceptors innervating trunk skin of neonatal mice. *J Comp Neurol* 505:547-561.
Yen LD, Bennett GJ, Ribeiro-da-Silva A. 2006. Sympathetic sprouting and changes in nociceptive sensory innervation in the glabrous skin of the rat hind paw following partial peripheral nerve injury. *J Comp Neurol* 495:679-690.

1607
1608
1609
1610
1611
1612
1613
1614
1615
1616
1617
1618
1619
1620
1621
1622
1623
1624
1625
1626
1627
1628
1629
1630
1631
1632
1633
1634
1635
1636
1637
1638
1639
1640
1641
1642
1643
1644
1645
1646
1647
1648
1649
1650
1651
1652
1653
1654
1655
1656
1657
1658
1659
1660
1661
1662
1663
1664
1665
1666
1667
1668
1669
1670
1671
1672
1673
1674
1675
1676



Author Proof

**Modulatory role of sensory innervation on hair bulge stem cell progeny during
wound healing in the rat skin**

Eduardo Martínez-Martínez¹, Claudio I. Galván-Hernández¹, Brenda Toscano-Márquez¹,
and Gabriel Gutiérrez-Ospina¹

¹Departamento de Biología Celular y Fisiología-Grupo Multidisciplinario de
Investigación en Células Troncales, Instituto de Investigaciones Biomédicas-
Coordinación de la Investigación Científica, Universidad Nacional Autónoma de México
Apartado Postal 70228, Coyoacán, D. F., 04510, México

Abstract

The bulge region of the hair follicle contains resident epithelial stem cells (SCs). Bulge SCs are activated and mobilized during hair follicle growth and epidermal repair. The signals that modulate SC proliferation and migration have not been fully characterized. Nevertheless, the fact that peripheral terminals of dorsal root ganglion neurons (DRG) are anatomically related with the bulge region suggests that nerve signals might be involved in both processes. Accordingly, clinical and experimental observations show that a reduced supply of DRG innervation is associated with delayed wound healing. Although this delay has been attributed to the lack of sensation because of repeated trauma, there is experimental evidence suggesting that some DRG nerve terminals contain neuropeptides that promote tissue renewal and maintenance. The overall aims of this work were to determine if DRG innervation is involved in the activation of the hair bulge stem cell niche and whether DRG innervation modulates transit-amplifying (TA) cell mobilization towards the epidermis. To accomplish these goals we made excisional wounds with 6mm punch in back skin of 8 weeks old rats that were neonatally treated with capsaicin. First, we quantified bromodeoxyuridine (BrdU) labeled cells in hair follicles and epidermis with the stereological probe of the optical fractionator. The number of BrdU labeled cells decreased 48% in the epidermis of capsaicin-treated rats within the first 45h after being wounded. Hence, DRG innervation modulates acute epithelial activation during wound repair. The second aim was approached by differentially labeling and stereologically counting epithelial precursors from the follicle with iododesoxyuridine and chlorodesoxyuridine (IdU+/CIdU+). The number of IdU+/CIdU+ cells in the epidermis of control rats increase over time, while in the epidermis of capsaicin-treated rats the number of IdU+/CIdU+ cells was lower and constant in the same period of time. Accordingly, hair follicles of capsaicin-treated rats presented the double number of IdU+/CIdU+ cells within the first 45h following skin wounding. This result suggests that capsaicin denervation impairs TA cell egress from the hair follicle. We further evaluated the presence of substance P and calcitonin gene-related peptide receptors in the bulge area through immunofluorescence and confocal microscopy. Immunoreactivity for both receptors was present in CD34+ or BrdU-retaining cells. Overall, our results support the notion that peptidergic messengers released by DRG innervation modulate SCs physiology by acting through specific receptors.

Introduction

Both clinical and experimental observations indicate that dorsal root ganglion (DRG) neurons are involved in the process of wound healing (Barker et al., 2006). In general, a reduction of the sensory innervation of the skin is associated with a greater surface area of the wound which results in longer times for healing (Maggi et al., 1987, Carr et al., 1993, Harsum et al., 2001, Smith and Liu, 2002, Fukai et al., 2005). It is thought that DRG neurons with unmyelinated C-fibers or poorly myelinated A δ -fibers have a beneficial effect in wound healing. Besides their role in sensory transduction (afferent function), this kind of neurons can release stored neuropeptides, such as CGRP and SP, to induce a significant biological response in the innervated target (efferent function) (Kruger, 1996, Roosterman et al., 2006). Until recently, the use of antibodies against peptidergic and neuronal markers has revealed that peptidergic innervation is closely related to the skin epithelium. This anatomical relationship raises the question whether peptidergic terminals from the DRG may be involved in maintaining epithelial tissue homeostasis.

Epithelial homeostasis is a process that depends on the presence of stem cells (SC). In recent studies, it has been documented the existence of a stem cell niche in the region called the bulge which comprises the lower end of the permanent portion of the hair follicle (HF) (Cotsarelis et al., 1990, Taylor et al., 2000, Trempus et al., 2003). These SCs participate in hair growth and epidermal repair. Epidermal wounds result in bulge SC activation and the mobilization of transient amplifying cells to the epidermis which ensures the acceleration of reepithelialization (Taylor et al., 2000, Ito et al., 2005, Langton et al., 2007). Although great advances have been made in recent years about the intracellular pathways involved in the maintenance of SC quiescence and self-renewal, less is known about the molecular signals coming from the surrounding tissue that influence bulge SC (Blanpain and Fuchs, 2006, Fuchs and Horsley, 2008). These signals may come from the cellular elements such as blood vessels, fibroblast and nerve endings which altogether conform the bulge stem cell niche. In this regard, it has been shown that sympathetic neurons are involved in the retention of hematopoietic SCs in the bone endosteal surfaces (Katayama et al., 2006). As mechanisms and molecular effectors are

conserved among SC niches, this finding suggests that the peripheral nervous system may influence the activation, mobilization, or differentiation in other SC niches. Nevertheless, it has not been investigated whether sensory derived neuropeptides are among the factors that govern SC exit from the bulge and mobilization to the epidermis.

The reepithelialization is among the stages of wound repair process that could be influenced by the peptidergic terminals. Neonatal capsaicin treatment, which reduces peptidergic nerve supply to the skin, provokes delayed reepithelialization of full-thickness skin wounds (Smith and Liu, 2002, Toda et al., 2008). Moreover, the exogenous administration of CGRP and substance P promote wound closure, whereas the lack of CGRP or the administration of a CGRP antagonist results in delayed wound healing (Engin, 1998, Delgado et al., 2005, Toda et al., 2008, Rook et al., 2009). Nevertheless, the mechanism by which these peptides have these effects remained poorly understood. Interestingly, sensory neuropeptides, in special CGRP, can promote epithelial proliferation both in vivo and in vitro (Seike et al., 2002, Yu et al., 2009). Additionally, peptidergic terminals are closely associated with the bulge region of the HF and also there is nerve fiber remodeling around the HF and perifollicular epidermis during the hair growth cycle (Peters et al., 2002, Hendrix et al., 2008). Overall, these findings rise the possibility that peptidergic innervation may influence bulge SC and their progeny. In this study, we used neonatal capsaicin treatment to explore if sensory nerves may activate bulge SCs after an epidermal wound and favor cell migration from the follicles to the epidermis to accelerate reepithelialization. By employing design-based stereology analysis, we follow the fate of cutaneous epithelial cells labeled with thymidine analogs under different protocols. Our results indicate that sensory innervation participate in the activation of epidermal progenitors around the wound and facilitate SC progeny traffic to the epidermis. Furthermore, we find that bulge SC niche contains receptors to sensory neuropeptides which reinforce the idea that sensory nerves modulate epidermal repair and hair growth.

Results

Sensory denervation affects the activation of epidermal cell proliferation

To determine whether chemical denervation altered the cell proliferation of the skin epithelium after wounding, we injected a single pulse of BrdU to control and capsaicin treated rats and quantified the BrdU labeled (BrdU⁺) nuclei at 31, 47, and 61h postwounding. The epidermis of control rats which was proximal to the edge of the wound was thicker than the epidermis of the treated rats at 31 h and 47 h (Fig. 1). At all the analyzed times, the capsaicin treated rats showed some regions of necrotic epidermis (Fig. 1B). In both groups, the number of labeled nuclei decreased with increasing distance from the edge of the wound. However, it was observed that in the case of control rats the labeled nuclei were more concentrated toward the edge of the wound, whereas in the treated rats the epidermis showed a relatively homogeneous distribution of labeled nuclei throughout the activated epidermis. The BrdU⁺ nuclei were counted in a region spanning 2 mm around the wound (inner region) and 2 mm from the edge of the inner region (outer region). The number of labeled nuclei in the epidermis at 31 h postwound was 50% lower in treated rats with capsaicin, 36% lower at 47 h, and with no difference at 61 h (Fig.). In the outer region of the epidermis, the number of BrdU⁺ nuclei was XX% lower in treated rats than in control, but only at 31 h post-wound (Fig.). In the follicles of the inner region there were no differences between both groups (Fig. 12D). In contrast, we found that there was an increased of labeled nuclei in the follicles of the outer region of capsaicin treated rats at 61h post-wound (Fig.).

Follicle cell migration is impaired in capsaicin treated rats

To determine whether there was a reduction in the flow of keratinocytes from the SC niche of the follicle to the epidermis, we used double labeling with two thymidine analogs, IDU and CldU. Each of these analogs can be detected independently and are used to label and follow cell populations with different dynamics of proliferation. Therefore, the follicle cells can be distinguished because they divide more rapidly than

the cells of the epidermis (Taylor et al., 2000, Heath et al., 2009). In the control rats, the double labeled cells (IdU⁺ / CldU⁺) at 41 h post-wound were concentrated mainly in the top of the infundibulum and in the basal layer of the perifollicular epidermis, whereas at 61 h the IdU⁺/ CldU⁺ were also present in the suprabasal layers and spread evenly throughout the epidermis (Fig.). In contrast, capsaicin treated rats did not present IdU⁺ / CldU⁺ cells concentrated in the perifollicular region. The few double-labeled cells were distributed throughout the epidermis in the three times analyzed (Fig.). Noteworthy, the IdU⁺/ CldU⁺ cells at 41 h post-wound were concentrated at the upper part of the follicles in the treated rats.

The number of IdU⁺/ CldU⁺ increased over time in the epidermis of the control rats, whereas in the treated rats the number remained constant (Fig.). In the follicles, the number of IdU⁺/ CldU⁺ cells at 32 h post-wound was equivalent in both groups (Fig.). However, in the follicles of capsaicin treated rats there was a greater number of IDU⁺ / CldU⁺ cells at 41 h which decreased at 61h to levels equivalent to the control group at (Fig.).

To determine the fraction of cells that represent the IdU⁺/ CldU⁺ cells in each experimental group and to analyze in more detail the migration phenomenon, the data were expressed as the percentage of double labeled cells from the total labeled cells (cells IdU⁺). In control rats the proportion of IdU⁺/ CldU⁺ cells increased in the epidermis from 32 h to 61 h post-wound, while the proportion in the follicles of these cells tends to decrease (Fig.). In contrast, the proportion of IdU⁺/ CldU⁺ cells in the epidermis of treated rats was not only higher than in the case of control rats at 32 h, but also decreased to 61 h. In addition, the proportion of double-labeled cells significantly decreased from 32 h to 61 h in the follicles of capsaicin treated rats (Fig.).

Epidermal Activation is increased in capsaicin treated rats

To assess whether the epidermis of treated rats turn on some mechanism to compensate for the lack of cells from the follicle, we analyzed the expression of CK-6, which is a marker of activation of the epidermis in response to a wound. At 32 h post-wound, the

extent of CK-6 I However, at 61 h the volume of the epidermis with CK-6 expression was higher in capsaicin treated rats. Immunoreactivity was similar in the epidermis around the wound in both groups (Fig.). The volume was 43% and 81% higher in the inner and outer region, respectively (Fig. 18). In the treated rats, it was common to observe immunoreactivity for CK-6 beyond the limits of the outer region.

CGRP⁺ fibers decreased in control rats after wound

To evaluate how wound repair altered sensory innervation, we estimate the total length of immunoreactive fiber for CGRP in the epithelium and the dermis. In the skin of control rats the CGRP⁺ fibers were observed abundantly in the subepidermal plexus. This plexus was the origin from the fibers that penetrate to the epidermis and fibers that are around the neck of the follicle. In the region where epidermis is continuous with hair follicle were the place where more intraepidermal fibers were observed (Fig) In the lower part of the permanent follicle, the CGRP⁺ fibers were also observed around the region that is below the sebaceous gland (Fig) At 32h this pattern of innervation was similar in both outer and inner region. However, at 61h post-wound the density of fibers in the epidermis and the hair follicle were greatly diminished. Furthermore, the labeling pattern of fibers in the inner region appeared discontinuous and also it was the region where less intraepidermal fibers were observed (Fig). Also in the follicles of this region, there were fewer ring of CGRP⁺ fibers around the bulge area.

In the capsaicin treated rats, intraepidermal fibers were rare and usually appeared individually and with simple morphology since 32h. The subepidermal plexus was practically inexistent in treated rats (Fig). Also in this group there were fibers that were positioned parallel to the hair follicle and rarely reach the epidermis. This type of fibers were not common in control rats. (Fig). The innervation below the sebaceous gland was present in only some follicles. In those follicles where it was present there were less rings of CGRP⁺ than in controls (Fig). The innervation pattern in capsaicin treated rats was similar at 31 and 61 h post-wound.

In control rats, the length of CGRP⁺ fibers decreased 43% from 32h to 61h in the inner region and 39 % in the outer region in the same period of time (Fig). Although CGRP⁺

fibers did not decreased with time in the treated rats, the amount of peptidergic innervation was always lower than in controls. At 32h the length of CGRP⁺ fibers in the treated rats was 73% and 67% lower in the inner and outer region, respectively. At 61 h, the length of CGRP⁺ fibers in the outer region was 38% lower in capsaicin treated rats.

Bulge stem cell niche presented immunoreactivity for sensory neuropeptides

To evaluate if stem cell niche has the ability to receive messages from sensory innervation, we determined by confocal microscopy the presence of CGRP and SP receptors. We found that immunoreactivity for NK-1 receptors was localized in the epidermis and the external root sheath of the follicle. Notably, the immunoreactivity was less intense in the follicular region. In the bulge region, the label retaining cells and CD34⁺ showed immunoreactivity for NK-1(Fig). To a similar extent, the CLR immunoreactivity colocalized with BrdU and CD34 immunoreactivity. However, it was noteworthy that some cells from the bulge region displayed intense immunoreactivity for CLR in comparison with other cells of the external root sheath (Fig). To determine whether the CLR present in the hair follicle had the ability for binding CGRP, we performed immunostaining for the accessory protein RAMP-1. The label for this protein was also observed in the external root sheath. In the bulge region the label for RAMP-1 colocalized with the label for CD34 (Fig). The staining pattern of the neuropeptide receptors was similar in capsaicin treated rats.

Discussion

For decades it has been postulated that innervation has a beneficial role in wound repair. Nevertheless, almost all the efforts have been limited to document the impact of denervation upon time the time of wound closure (Maggi et al., 1987, Carr et al., 1993, Westerman et al., 1993, Harsum et al., 2001, Fukai et al., 2005). As far as we know, it has not been investigated whether the cutaneous innervation participate in the activation or modulation of the epithelial progenitors that participate in reepithelialization. In this regard, little is known about the signals needed to mobilize bulge SCs to reepithelialize epidermal wounds (Blanpain and Fuchs, 2006). In this work we propose that sensory innervation by releasing neuropeptides may be involved in the physiology of the bulge SC niche.

It has been argued that in both clinical and experimental cases of cutaneous denervation, the delay in wound closure is an unspecific consequence of the recurrent damage to the wound site because of the lack of sensation. However, our results reveal that sensory nerves have a specific role in the process of reepithelialization. An outstanding characteristics of rodents that were neonatally treated with capsaicin is that during development they showed spontaneous lesions in cornea and in the skin of head region (Buck et al., 1983, Fujita et al., 1984, Maggi et al., 1987). The skin lesions appear even when self-grooming and scratching behaviors are prevented with a plastic collar (Carrillo et al., 1998). Altogether these data suggest that in conditions of high cell demand and denervation, some epithelia present deficiencies to generate the number of cells that are required for epithelial expansion. Consistent with this notion, in this study we observed that chemical denervation with capsaicin have adverse effects on the epidermal proliferation around an excisional wound in the back skin. Notably, the initial number of BrdU⁺ cells was almost identical in both groups. This result indicates that sensory innervation differentially interacts with distinct populations of epithelial progenitors. Although the low number of BrdU⁺ cells in the epidermis of treated rats (48 h) could mainly result from a reduced number of epithelial progenitors in proliferative phase, this effect could also combine with an impairment of the mobilization of TA cells from the follicle. In agreement with this notion, we observed that the percentage of IdU⁺/CldU⁺ cells remained constant in capsaicin treated rats, but only increased over time

in the control group. This effect was not a consequence of a minor activation of progenitors in the hair follicle, because at 32 h pw we found an equal proportion of double-labeled cells in both groups. Furthermore, the cells in the follicle of treated rats apparently continue with cell division because the number of IdU⁺/CldU⁺ increases at 42h post-wound. Interestingly, the proportion of double-labeled cells in the hair follicle decreases in the treated rats from 32 h to 61 h, but this reduction did not reflect in an increase of IdU⁺/CldU⁺ in the epidermis of treated rats. Overall these results suggest that deficiencies in nerve supply hampered the traffic of follicle cell toward the epidermis. Regarding this issue, it is noteworthy that in cell culture CGRP and SP indirectly promote the migration of epithelial cells of the intestine (Felderbauer et al., 2007, Bulut et al., 2008). An additional point worthy of mention is that the fate of double labeled cells in the hair follicles of treated rats is not clear. A possible explanation is that the survival of TA cells depends on sensory innervation. Recent studies have shown that SP promote the survival of human fibroblast by promoting the expression of BCL-2 which is an inhibitor of apoptosis (Jing et al., 2010). The lack of innervation also seems to affect cell cycle duration of some epithelial populations. In support of this notion is the fact that the total number of IdU⁺/CldU⁺ in the epidermis is relatively constant while its proportion decreases from 32h to 61h.

Recently, a transgenic mice that does not have hair follicles in the skin of the tail was used to investigate the functional role of the cells derived from the follicle during epidermal repair after wounding and during postnatal development (Langton et al., 2007, Heath et al., 2009). From these studies it was concluded that cells from the hair follicles are a source of epithelial precursors with high proliferative capacity that allow a rapid epidermal expansion. Although cells from the follicle are not indispensable to the reepithelialization, their presence accelerate the process (Langton et al., 2007). This data is in agreement with our observation that capsaicin treated rats showed a late increase of epidermal proliferation which also reached the level of proliferation found in control. Based on this data, it seems that in the absence of arrival of the cells derived from the follicle, by unknown mechanisms, there is an extended recruitment of epithelial precursors in the wounded epidermis. Consistent with this notion, the capsaicin treated rats presented an increased area of CK6 immunoreactivity in the epidermis. The same

phenomenon was observed in the hairless tail of the mutant mice in which the expression of CK6 also is extended around the wound (Langton et al., 2007). This mechanism of wound repair implies that epithelial precursors migrate for a long distance to reach the border of the wound which would explain the delay in reepithelialization in denervated tissue. It is also outstanding in the capsaicin treated rats the late increase of cell proliferation in distal follicles from the lesion site. In the future it will be useful to understand the mechanisms that skin employs to promote the activation of distinct regions of the epithelium to better contend with chronic wounds.

The administration of neuropeptides such as CGRP and SP accelerate wound closure (Engin, 1998, Delgado et al., 2005). Although this neuropeptides could also influence a variety of processes like the angiogenesis (Toda et al., 2008), our results provide the first documentation that sensory innervation are functionally related with SC of the hair follicle. In addition, we evaluate whether the SC niche of the bulge has the capacity to receive messages from the nerves. By confocal microscopy, we determined that NK-1 and CLR receptors are present in CD34⁺ cells and in labeling-retaining cells from the bulge. This observation is in accordance with previous studies in which it was described that CLR is present in the external root sheet of human hair follicle (Hagner et al., 2002, Muller et al., 2003). It is possible that CLR protein that we found in the bulge could bind CGRP because we found that RAMP1 protein is also contained in CD34⁺ cells of the bulge (McLatchie et al., 1998). It is noteworthy that CLR y RAMP1 belong to a group of genes that are overexpressed in the bulge region (Blanpain et al., 2004, Tumber et al., 2004). The latter also occur at the level of protein because we observed an intense immunoreactivity of CLR in some cells of the bulge. The role of neuropeptides will no be limited to modulate only functional aspects of bulge SCs during wound healing, but also during hair growth cycle. In this regard, the capsaicin treated rats showed less fur regrowth after shaving and abnormalities in the hair (Maggi et al., 1987). Furthermore, SP induce anagen in mice skin when administered during telogen phase (Peters et al., 2001). Also the SP has been associated with premature induction of catagen in models of auditive stress (Arck et al., 2003). Whereas, CGRP does not promote anagen neither in culture of skin explants nor in vivo experiments (Peters et al., 2001). The specific role of each neuropeptide and its possible combinations on distinct epithelial populations needs

to be determined in future experiments. In particular, it will be important to determine whether CGRP is involved in maintaining SC properties (quiescence) or in promoting cell differentiation.

In summary, our work helps to understand the efferent role of dorsal root ganglion neurons on reepithelialization during wound healing. In addition, highlights the importance of neural regulation on epithelial SC physiology as it was also documented in hematopoietic system (Katayama et al., 2006). In the future will be essential to understand the molecular pathways that nervous system modulate to understand how the activation and differentiation of SC is regulated in different niches of the body and its possible implications for tumor formation.

Draft

References

- Arck PC, Handjiski B, Peters EMJ, Peter AS, Hagen E, Fischer A, Klapp BF, Paus R (2003) Stress Inhibits Hair Growth in Mice by Induction of Premature Catagen Development and Deleterious Perifollicular Inflammatory Events via Neuropeptide Substance P-Dependent Pathways. *American Journal of Pathology* 162:803-814.
- Barker AR, Rosson GD, Dellon AL (2006) Wound healing in denervated tissue. *Ann Plast Surg* 57:339-342.
- Blanpain C, Fuchs E (2006) Epidermal Stem Cells of the Skin. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 22.
- Blanpain C, Lowry WE, Geoghegan A, Polak L, Fuchs E (2004) Self-Renewal, Multipotency, and the Existence of Two Cell Populations within an Epithelial Stem Cell Niche. *Cell* 118:635-648.
- Buck SH, Walsh JH, Davis TP, Brown MR, Yamamura HI, Burks TF (1983) Characterization of the peptide and sensory neurotoxic effects of capsaicin in the guinea pig. *Journal of Neuroscience* 3:2064-2074.
- Bulut K, Felderbauer P, Deters S, Hoeck K, Schmidt-Choudhury A, Schmidt WE, Hoffmann P (2008) Sensory neuropeptides and epithelial cell restitution: the relevance of SP- and CGRP-stimulated mast cells. *International Journal of Colorectal Disease* 23:535-541.
- Carr RW, Delaney CA, Westerman RA, Roberts RG (1993) Denervation impairs cutaneous microvascular function and blister healing in the rat hindlimb. *Neuroreport* 4:467-470.
- Carrillo P, Camacho M, Manzo J, Martinez-Gomez M, Salas M, Pacheco P (1998) Cutaneous Wounds Produced by Capsaicin Treatment of Newborn Rats Are Due to Trophic Disturbances. *Neurotoxicology and Teratology* 20:75.
- Cotsarelis G, Sun T-T, Lavker RM (1990) Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: Implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell* 61:1329-1337.
- Delgado AV, McManus AT, Chambers JP (2005) Exogenous administration of Substance P enhances wound healing in a novel skin-injury model. *Exp Biol Med (Maywood)* 230:271-280.
- Engin C (1998) Effects of calcitonin gene-related peptide on wound contraction in denervated and normal rat skin: A preliminary report. *Plast Reconstr Surg* 101:1887-1890.
- Felderbauer P, Bulut K, Hoeck K, Deters S, Schmidt WE, Hoffmann P (2007) Substance P induces intestinal wound healing via fibroblasts--evidence for a TGF-beta-dependent effect. *International Journal of Colorectal Disease* 22:1475-1480.
- Fuchs E, Horsley V (2008) More than one way to skin. *Genes Dev* 22:976-985.
- Fujita S, Shimizu T, Izumi K, Fukuda T, Sameshima M, Ohba N (1984) Capsaicin-induced neuroparalytic keratitis-like corneal changes in the mouse. *Experimental Eye Research* 38:165-175.
- Fukai T, Takeda A, Uchinuma E (2005) Wound healing in denervated rat skin. *Wound Repair Regen* 13:175-180.

- Hagner S, Haberberger RV, Overkamp D, Hoffmann R, Voigt KH, McGregor GP (2002) Expression and distribution of calcitonin receptor-like receptor in human hairy skin. *Peptides* 23:109.
- Harsum S, Clarke JD, Martin P (2001) A reciprocal relationship between cutaneous nerves and repairing skin wounds in the developing chick embryo. *Dev Biol* 238:27-39.
- Heath J, Langton AK, Hammond NL, Overbeek PA, Dixon MJ, Headon DJ (2009) Hair Follicles Are Required for Optimal Growth during Lateral Skin Expansion. *J Invest Dermatol* 129:2358-2364.
- Hendrix S, Picker B, Liezmann C, Peters EMJ (2008) Skin and hair follicle innervation in experimental models: a guide for the exact and reproducible evaluation of neuronal plasticity. *Experimental Dermatology* 17:214-227.
- Ito M, Liu Y, Yang Z, Nguyen J, Liang F, Morris RJ, Cotsarelis G (2005) Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. *Nat Med* 11:1351.
- Jing C, Jia-Han W, Hong-Xing Z (2010) Double-edged effects of neuropeptide substance P on repair of cutaneous trauma. *Wound Repair and Regeneration* 18:319-324.
- Katayama Y, Battista M, Kao W-M, Hidalgo A, Peired AJ, Thomas SA, Frenette PS (2006) Signals from the Sympathetic Nervous System Regulate Hematopoietic Stem Cell Egress from Bone Marrow. *Cell* 124:407.
- Kruger L (1996) The functional morphology of thin sensory axons: some principles and problems. *Progress in Brain Research* 113:255-272.
- Langton AK, Herrick SE, Headon DJ (2007) An Extended Epidermal Response Heals Cutaneous Wounds in the Absence of a Hair Follicle Stem Cell Contribution. *J Invest Dermatol* 128:1311-1318.
- Maggi CA, Borsini F, Santicioli P, Geppetti P, Abelli L, Evangelista S, Manzini S, Theodorsson-Norheim E, Somma V, Amenta F, et al. (1987) Cutaneous lesions in capsaicin-pretreated rats. A trophic role of capsaicin-sensitive afferents? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 336:538-545.
- McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG, Foord SM (1998) RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 393:333-339.
- Muller FB, Muller-Rover S, Korge BP, Kapas S, Hinson JP, Philpott MP (2003) Adrenomedullin: expression and possible role in human skin and hair growth. *British Journal of Dermatology* 148:30-38.
- Peters EM, Botchkarev VA, Botchkareva NV, Tobin DJ, Paus R (2001) Hair-cycle-associated remodeling of the peptidergic innervation of murine skin, and hair growth modulation by neuropeptides. *J Invest Dermatol* 116:236-245.
- Peters EM, Botchkarev VA, Muller-Rover S, Moll I, Rice FL, Paus R (2002) Developmental timing of hair follicle and dorsal skin innervation in mice. *J Comp Neurol* 448:28-52.
- Rook JM, Hasan W, McCarson KE (2009) Morphine-induced early delays in wound closure: Involvement of sensory neuropeptides and modification of neurokinin receptor expression. *Biochemical Pharmacology* 77:1747-1755.

- Roosterman D, Goerge T, Schneider SW, Bunnett NW, Steinhoff M (2006) Neuronal Control of Skin Function: The Skin as a Neuroimmunoendocrine Organ. *Physiol Rev* 86:1309-1379.
- Seike M, Ikeda M, Morimoto A, Matsumoto M, Kodama H (2002) Increased synthesis of calcitonin gene-related peptide stimulates keratinocyte proliferation in murine UVB-irradiated skin. *Journal of Dermatological Science* 28:135.
- Smith P, Liu M (2002) Impaired cutaneous wound healing after sensory denervation in developing rats: effects on cell proliferation and apoptosis. *Cell and Tissue Research* 307:281-291.
- Taylor G, Lehrer MS, Jensen PJ, Sun T-T, Lavker RM (2000) Involvement of Follicular Stem Cells in Forming Not Only the Follicle but Also the Epidermis. *Cell* 102:451.
- Toda M, Suzuki T, Hosono K, Kurihara Y, Kurihara H, Hayashi I, Kitasato H, Hoka S, Majima M (2008) Roles of calcitonin gene-related peptide in facilitation of wound healing and angiogenesis. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 62:352-359.
- Trempus CS, Morris RJ, Bortner CD, Cotsarelis G, Faircloth RS, Reece JM, Tennant RW (2003) Enrichment for Living Murine Keratinocytes from the Hair Follicle Bulge with the Cell Surface Marker CD34. *Journal of Cell Biology* 120:501-511.
- Tumbar T, Guasch G, Greco V, Blanpain C, Lowry WE, Rendl M, Fuchs E (2004) Defining the Epithelial Stem Cell Niche in Skin. *Science* 303:359-363.
- Westerman RA, Carr RW, Delaney CA, Morris MJ, Roberts RG (1993) The role of skin nociceptive afferent nerves in blister healing. *Clin Exp Neurol* 30:39-60.
- Yu X-J, Li C-Y, Xu Y-H, Chen L-M, Zhou C-L (2009) Calcitonin gene-related peptide increases proliferation of human HaCaT keratinocytes by activation of MAP kinases. *Cell Biology International* 33:1144-1148.