



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Expresión *in vitro* del receptor de Ectodisplina
A1 (EDAR) en queratinocitos humanos
estimulados con activina A**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

NADIA ADRIANA VÁZQUEZ TORRES



DIRECTOR DE TESIS:

M. EN C. MIGUEL ÁNGEL HERRERA ENRÍQUEZ

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

FORMATO-EJEMPLO

1. Datos del alumno

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

2. Datos del tutor

Grado
Nombre (s)
Apellido paterno
Apellido materno

3. Datos del sinodal 1

Grado
Nombre (s)
Apellido paterno
Apellido materno

4. Datos del sinodal 2

Grado
Nombre (s)
Apellido paterno
Apellido materno

5.- Datos del sinodal 3

Grado
Nombre (s)
Apellido paterno
Apellido materno

6.- Datos del sinodal 4

Grado
Nombre (s)
Apellido paterno
Apellido materno

7. Datos del trabajo escrito

Título

Subtítulo
Número de páginas
Año

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno

Vázquez
Torres
Nadia Adriana
(01735) 35 3 07 98
Universidad Nacional Autónoma de México
Biología
40707468

2. Datos del tutor

M. en C.
Miguel Ángel
Herrera
Enríquez

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Patricia
Rivas
Manzano

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Leticia
Parra
Gámez

5. Datos del sinodal 3

Dra.
María Isabel
García
Peláez

6. Datos del sinodal 4

M. en C.
Gabriela
Piñón
Zárate

Expresión *in vitro* del receptor de Ectodisplasia A1 (EDAR) en queratinocitos humanos estimulados con activina A.

73 p
2011

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS

ABREVIATURAS	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 PIEL.....	4
1.1.1 Epidermis	4
1.1.1.1 Capas de la epidermis.....	8
1.1.2 Dermis.....	9
1.1.2.1 Capas de la dermis.....	10
1.1.2.2 Unión dermo-epidérmica.....	11
1.1.3 Hipodermis.....	12
1.2 ANEXOS O APÉNDICES CUTÁNEOS.....	13
1.2.1 PELO.....	13
1.2.1.1 Estructura.....	14
1.2.1.2 Tipos de pelo.....	15
1.2.1.3 Funciones.....	16
1.2.1.4 Embriología.....	17
1.2.1.5 Ciclo de pelo.....	18
1.2.1.6 Morfogénesis.....	19
1.2.1.7 Mediadores moleculares de la morfogénesis.....	22
1.3 ECTODISPLASINA A1 (EDA).....	23
1.3.1 Localización y expresión.....	24
1.3.2 Papel de EDA en el desarrollo.....	26
1.3.3 Estudios experimentales con EDA.....	27
1.4 RECEPTOR DE ECTODISPLASINA A1 (EDAR).....	29
1.4.1 Localización.....	30
1.4.2 Funciones.....	30
1.4.3 Mutaciones en EDAR.....	31

1.4.4 Señalización...de EDAR.....	33
1.4.5 Patrones de expresión EDA-EDAR.....	35
1.4.6 Regulación de EDAR.....	36
1.4.7 EDAR en el ciclo del pelo.....	37
1.4.8 EDAR en la evolución	38
1.5 ACTIVINA	39
1.5.1 Efecto de la activina en el desarrollo del pelo.....	40
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	43
3. HIPÓTESIS.....	43
4. OBJETIVOS.....	43
4.1 Objetivos generales.....	43
4.2 Objetivos particulares.....	43
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	44
5.1 Poblaciones celulares.....	44
5.1.1 Queratinocitos adultos humanos.....	44
5.1.1.1. Digestión enzimática y aislamiento de queratinocitos	45
5.1.2 Línea celular 3T3 (células alimentadoras).....	46
5.1.2.1 Irradiación de células 3T3.....	46
5.1.3 Línea celular queratinocitos neonatales humanos.....	46
5.2 Cultivo primario de queratinocitos.....	47
5.3 Cultivo secundario de queratinocitos neonatales.....	47
5.4 Estimulación de queratinocitos con activina.....	47
5.5 Evaluación de expresión de EDAR.....	47
5.5.1 Inmunohistoquímica.....	47
5.5.2 Citometría de flujo.....	47
5.6 Análisis estadístico.....	48
5.5 Reactivos.....	48
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50

6.1. Aislamiento de queratinocitos humanos adultos ,,,,,,	50
6.2. Cultivo de queratinocitos.....	52
6.2.1. Cultivo primario de queratinocitos aislados.....	52
6.2.2. Cultivo de secundario de queratinocitos neonatales.....	53
6.3. Expresión del receptor de ectodisplasia A1(EDAR)	54
6.3.1. Inmunohistoquímica.....	54
6.3.2. Citometría de flujo.....	55
7. CONCLUSIONES	63
8. BIBLIOGRAFÍA	64

AGRADECIMIENTOS

A Dios por todas las bendiciones que me ha dado en la vida.

A mis padres que siempre han confiado en mí y me permitieron venirme a estudiar lejos de ellos, teniendo su apoyo aún en la distancia. Espero que con este momento pueda retribuirles un poco de todo su amor y sacrificios que han tenido para formarme y llegar hasta donde ahora estoy.

A mi hermano, que con sus acertadas palabras y consejos ha sido para mí un gran guía y un amigo desde la infancia. Te quiero mucho manito.

A David, por los ánimos y su amor acompañándome todo este tiempo de lucha.

A mi familia, seres queridos y amigos de toda la vida, que siempre estuvieron apoyándome y pendientes de mis estudios superiores.

A los integrantes de mi jurado:

Dra. María Isabel García Peláez

M. en C. Miguel Ángel Herrera Enríquez

Dra. Leticia Parra Gámez

M. en C. Gabriela Piñón Zarate

Dra. Patricia Rivas Manzano

por haber aceptado asesorarme y apoyarme con la premura de la revisión de este trabajo. Gracias por el tiempo que dedicaron a leer mi tesis, aún con mil pendientes.

De manera especial, el agradecimiento para el Dr. Andrés Eliú Castell Rodríguez, por su comprensión, ayuda y tiempo brindado, las palabras de aliento para enfrentar lo que se presentaba, Dr. Siempre tendré en cuenta lo que hizo por mí.

A mis amigos de la carrera que fueron mi familia en esta enorme ciudad.

A todos mis compañeros del laboratorio, por tantas anécdotas juntos, por su apoyo en este trabajo.

A todos mis maestros de la licenciatura, especialmente aquellos que dejaron huella en mi persona, su trayectoria me motiva a superarme cada día y considerarlos un ejemplo a seguir. Gracias por sus consejos.

Finalmente, quiero dedicar este trabajo a mi abuelito, el Sr. Librado Vázquez Torres, a quien quiero mucho y hoy tengo la fortuna de poder compartir con él este logro tan importante para mí.

ABREVIATURAS

BMP: Proteína Morfogénica de Hueso

CD1a: Proteína de membrana especializada en la presentación de antígenos lipídicos

C3b: Tercer componente del complemento

EDA: Ectodisplasina

EDAR: Receptor de Ectodisplasina A1

EDARRAD: Adaptador citoplásmico de EDAR asociado a dominios de muerte

FADD: Proteína Asociada a FAD con Dominio de Muerte

Fc: Fracción cristalizable de inmunoglobulinas

FGF: Factor de Crecimiento de Fibroblastos

FGFr2: Receptor 2 del Factor de Crecimiento de Fibroblastos

HED: Displasia Ectodérmica Hipohidrótica

Ig E: Inmunoglobulina E

Ig G: Inmunoglobulina G

IKK: Cinasa I κ B

I κ B: Inhibidor de NF- κ B

K14: Queratina 14

LFA: Molécula Asociada a la Función Leucocitaria

Linfocitos Th: Linfocitos cooperadores

Linfocitos Tc: Linfocitos citotóxicos

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

NF- κ B: Factor Nuclear κ B

NCAM: Molécula de Adhesión Celular Neural

PCR-RT: Reacción en Cadena de la Polimerasa en Transcripción Reversa

RPM: Revoluciones por minuto

SHH: Sonic Hedgehog

TAB2: Proteína 2 unida a TAK1

TAK1: Cinasa 1 activada por TGF β

TGF- β 2: Factor de Crecimiento Transformante Beta

TGF- β R-II: Receptor tipo II del Factor de Crecimiento Transformante β

TNF: Factor de Necrosis Tumoral

TNFR: Receptores del Factor de Necrosis Tumoral

TRADD: Proteína de Dominio de Muerte asociada a receptor tipo I de TNF

TRAF: Factor Asociado al Receptor de TNF; proteínas adaptadoras intracelulares

Tri/EDTA: Tripsina / ácido etilendiaminotetraacético

TROY: Receptor de TNF "huérfano" similar a EDARXEDAR: Receptor de Ectodisplasina A2

XIAP: Proteína Inhibidora de Apoptosis Ligada a cromosoma X

1. INTRODUCCIÓN

La piel es una interfaz entre el medio interno y externo, que desempeña diversas funciones como la protección contra agentes químicos, físicos y biológicos, la termorregulación, el control hídrico y de electrolitos y la sensibilidad contra estímulos dolorosos, de temperatura y de presión fina y profunda. Así, la piel es un órgano muy importante en la economía del cuerpo humano; por ejemplo, se destaca su importancia en pacientes quemados o que sufren de la pérdida de continuidad de la piel en heridas o úlceras de diversa etiología, mismos que requieren del trasplante de injertos, o bien de piel construida en laboratorio. En este sentido se han elaborado constructos cutáneos en laboratorio mediante ingeniería de tejidos para suplir la alta demanda de piel ya sea por patologías u otras causas, aunada a las limitantes para obtenerla como la ausencia de piel sana candidata a ser donada, o bien porque en nuestro país la cultura de donación de órganos no está bien cimentada. Sin embargo, en la actualidad es posible transplantar constructos cutáneos a pacientes quemados o con úlceras de diferente etiología, con la salvedad de que la piel fabricada carece de melanocitos, terminaciones nerviosas, elementos del sistema inmunológico y de anexos cutáneos, como pelo y glándulas sudoríparas y sebáceas.

La carencia de estos anexos cutáneos en los distintos constructos ya existentes a la fecha, o alguna falla genética que cause su deficiencia en la piel de los organismos, ha llevado a numerosos investigadores a la búsqueda, mediante estudios de genética y biología molecular, de los elementos que intervienen en su morfogénesis y fisiología, para que de alguna manera puedan revertirse las fallas en aquellas patologías que afecten a alguno de los anexos, o bien, con una visión ambiciosa, poder lograr un constructo que cubra con las funciones de una piel completa.

De esta forma, el presente trabajo, desde su fase inicial, y tomando en cuenta el trascendente papel que juega la vía de señalización EDA-EDAR durante la morfogénesis de los anexos cutáneos al contar con una función esencial en la inducción de las placodas, aunado al antecedente de que la administración de EDA exógenamente ha ayudado a revertir los efectos de alguna mutación durante el desarrollo de los mismos, busca aumentar la expresión del receptor de EDA A1 para tener una señalización de vías más eficientes involucradas en la formación de placodas, y a partir de ahí, de acuerdo al tipo de anexo que se desee desarrollar, propiciar las señales y condiciones idóneas para poder llegar a la formación particular de cada anexo.

Este trabajo tiene como objetivo último el de aportar conocimientos que puedan incidir en el tratamiento de enfermedades como la alopecia en donde existe escaso pelo, o bien, el hirsutismo en donde la presencia de pelo es exagerada. También, estos conocimientos podrían contribuir al tratamiento de Displasias Ectodérmicas Hipohidróticas (HED) en donde no sólo el pelo se ve afectado; incluso simplemente aminorar el impacto estético que puede experimentar el paciente debido a la ausencia de pelo en zonas en donde normalmente crece.

1.1 PIEL

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano y con una gran complejidad, que representa el 16% del peso corporal (Gartner et al, 2002) y que protege del medio ambiente pero que simultáneamente permite la interacción de éste con su medio exterior y va más allá de ser una barrera estática impenetrable contra posibles agresiones externas (Chu et al, 2005). Por lo que además de ser una barrera física de impermeabilidad y proporcionar un recubrimiento para la totalidad de la superficie, la piel desempeña muchas funciones adicionales que incluyen: protección contra lesiones, invasión bacteriana y desecación; regulación de temperatura corporal; recepción de sensaciones continuas del ambiente (tacto, temperatura y dolor); excreción de glándulas sudoríparas; y absorción de la radiación ultravioleta (UV) del sol para la síntesis de vitamina D (Gartner et al, 2002).

La piel es una estructura dinámica y compleja integrada por células, tejidos y elementos de la matriz extracelular que median una variedad de funciones; se constituye básicamente de dos capas, una epidermis externa y una capa de tejido conectivo profunda, la dermis. La hipodermis constituida por tejido adiposo y que esta subyacente a estas dos capas, no es parte de la piel sino que constituye la fascia superficial de la disección anatómica a simple vista que recubre la totalidad del cuerpo, justo profunda a la piel.

En relación directa con los diversos estímulos a los que puede estar sometida la piel en las distintas regiones corporales, se pueden distinguir histológicamente dos variedades de piel, conocidas como: piel gruesa y piel delgada. La piel gruesa recubre las palmas de las manos y plantas de los pies. Su epidermis se caracteriza por la presencia bien definida de los cinco estratos que la constituyen (basal, espinoso, granuloso, lúcido y córneo). La piel gruesa carece de folículos pilosos y glándulas sebáceas, pero posee abundantes glándulas sudoríparas. La piel delgada recubre la mayor parte del resto del cuerpo. Su epidermis a diferencia de la piel gruesa tiene un estrato córneo delgado, carece de estrato lúcido y su estrato granuloso es poco definido, aunque se encuentran células individuales de esas capas en sus situaciones apropiadas (Gartner et al, 2002). La piel delgada tiene folículos pilosos, músculos erectores del pelo, glándulas sebáceas y glándulas sudoríparas (Welsch et al, 2008).

1.1.1 Epidermis

La epidermis tiene entre 0.07 y 0.12 mm de grosor en la mayor parte del cuerpo, con engrosamiento localizado en las palmas de las manos y las plantas de los pies (donde puede alcanzar hasta 0.8 mm y 1.4 mm de grosor, respectivamente). La piel más gruesa en las palmas y plantas de los pies es obvia en el feto, pero su empleo y la presión y la fricción que se le aplican con el tiempo originan incrementos continuos del grosor de la piel en estas áreas (Gartner et al, 2002).

La epidermis es un epitelio escamoso y estratificado en constante renovación que se cornifica. Embriológicamente proviene del ectodermo, capa germinal de la cual también se originan estructuras epiteliales, como pelo, uñas y glándulas (Gilbert, 2005). Esta capa de la piel está compuesta de cuatro poblaciones de células:

- Queratinocitos

- Melanocitos
- Células de Langerhans
- Células de Merkel

Queratinocitos de la epidermis

El queratinocito es una célula derivada del ectodermo que forma al menos el 80% de las células epidérmicas, siendo de este modo, la población más abundante de la epidermis. Todos los queratinocitos contienen filamentos intermedios de queratina y forman desmosomas con las células adyacentes. Otras características de estas células dependen de su localización en la epidermis, ya que están dispuestos en cinco capas identificables. Puesto que los queratinocitos se descaman en forma continua de la superficie de la piel, esta población celular debe renovarse constantemente; ello se logra mediante la actividad mitótica de los queratinocitos en el estrato basal de la epidermis. Los queratinocitos se dividen por mitosis durante la noche conforme las nuevas células se forman, las que se sitúan arriba se empujan hacia la superficie. Las células se diferencian a lo largo de su camino a esta última y comienzan a acumular filamentos de queratina en su citoplasma. Por último, cuando ya están cerca de la superficie, las células mueren y se descaman, un proceso que requiere de 20 a 30 días.

La morfología de los queratinocitos durante la migración de la capa basal de la epidermis a su superficie permite identificar cinco zonas o estratos de epidermis con características morfológicas distintas. De la capa más interna a la externa, son: 1) estrato basal (germinativo), 2) estrato espinoso, 3) estrato granuloso, 4) estrato lúcido y 5) estrato córneo (Figura 1). La piel se clasifica como gruesa o delgada según el grosor de la epidermis, sin embargo, estos dos tipos también se distinguen por la presencia o ausencia de ciertas capas epidérmicas y de complejos pilo-sébaseos

Las tres poblaciones celulares restantes, se distribuyen entre los queratinocitos formando unidades inmunológicas, sensoriales y de pigmentación.



Fig. 1. Corte de piel gruesa humana. Hematoxilina-eosina 200x. En esta figura podemos observar la dermis (D) y la epidermis conformada por los estratos basal [1], espinoso [2], granuloso [3], lúcido [4] y córneo [5].

Células de Langerhans

Aunque se encuentran dispersas en la totalidad de la epidermis, donde en condiciones normales representan del 2 al 4% de la población total de células epidérmicas, las células de Langerhans, también llamadas células dendríticas se localizan sobre todo en el estrato espinoso [Gartner et al, 2002]. Emiten numerosas y finas prolongaciones citoplásmicas y no están unidas a células vecinas por medio de desmosomas.

Las células de Langerhans realizan una función importante en las respuestas inmunológicas innata y adquirida ya que son células presentadoras de antígenos derivadas de precursores presentes en la médula ósea que han migrado a la epidermis en donde pueden captar antígenos que se han introducido ahí. Cuentan con receptores para la Fc de la IgG y de la IgE y para el tercer componente del complemento (C3b), expresan grandes cantidades de moléculas clase I y II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), CD1a, Langerina y moléculas de adhesión como LFA. Las células de Langerhans endocitan, procesan y reexpresan antígenos en contexto de las moléculas del MHC en su membrana para presentarlos a linfocitos Th y Tc [Ross et al, 2007]. Para eficientar esta presentación de antígenos, las células de Langerhans migran hacia los ganglios linfáticos de drenaje regional a través de los vasos linfáticos, donde presentan los epítopes de antígenos extraños procesados a las diferentes variedades de linfocitos T.

Células de Merkel

Las células de Merkel, están localizadas entre los queratinocitos del estrato basal de la epidermis, son en especial abundantes en las yemas de los dedos, los labios, y en la base de los folículos pilosos. Estas células se originan de células epiteliales de la epidermis fetal temprana. Con anterioridad se había sugerido que estas células se originaban en las crestas neurales, sin embargo, recientemente se demostró que derivan de queratinocitos con los cuales comparten algunos marcadores, como la queratina (Van Keymeulen et al, 2009). Aunque las células de Merkel suelen encontrarse como células únicas con orientación paralela a la lámina basal, pueden extender sus prolongaciones entre los queratinocitos, a los cuales están unidas por desmosomas (Gartner et al, 2002).

Hay nervios sensoriales amielínicos que se aproximan a las células de Merkel y que atraviesan la lámina basal y dan como resultado de la formación de complejos axón - célula de Merkel. Estos complejos funcionan como mecanorreceptores. Estas células muestran inmunorreactividad a la sinaptofisina, que indica que las células de Merkel pueden liberar neurotransmisores o moléculas de tipo neuroendocrino.

Melanocitos

Los melanocitos, derivan de las crestas neurales y se localizan entre las células del estrato basal, aunque también pueden residir en las porciones superficiales de la dermis.

Los melanocitos son células de aspecto dendrítico con prolongaciones largas y ondulantes que se extienden desde las áreas superficiales de las células y penetran en los espacios intercelulares del estrato espinoso. Sus prolongaciones no establecen uniones desmosómicas con queratinocitos vecinos, no obstante, los melanocitos que están cerca de la membrana basal poseen estructuras semejantes a hemidesmosomas. Los melanocitos conservan la capacidad de replicarse durante toda su vida, aunque a un ritmo mucho más lento que los queratinocitos (Ross et al, 2007).

Los melanocitos se encuentran en una proporción de 1 por cada 36 queratinocitos y tiene la función primordial de producir melanina. La melanina es un pigmento endógeno derivado del aminoácido tirosina que es transformado mediante la enzima tirosina hidroxilasa. La melanina tiene una gran capacidad de atrapar radicales libres como los que se generan cuando hay exposición a la luz ultravioleta, de hecho la función principal de este pigmento es proteger al organismo de los efectos deletéreos de la irradiación ultravioleta no ionizante. Los melanosomas, estructuras en donde se sintetiza dicho pigmento, transfieren su contenido de melanina a los queratinocitos vecinos por donación pigmentaria (Ross et al, 2007).

Es de notar que el número de melanocitos es similar en todos los grupos étnicos humanos, sin embargo, la capacidad de producir melanina y el tipo de pigmento que se produce es diferente.

1.1.1.1 Capas de la epidermis

Estrato basal

Es la capa más profunda de la epidermis, se apoya en una membrana basal y se asienta en la dermis, lo que forma una interfaz regular. El estrato basal consiste en una capa de células cuboidales a cilíndricas con actividad mitótica que contienen citoplasma basófilo y un núcleo grande. Es en este estrato donde son frecuentes las figuras mitóticas porque esta capa es la que se encarga de la renovación de células en el epitelio. Cuando se forman nuevas células por mitosis, la capa previa de células empuja a las siguientes hacia la superficie para unirse a la capa adyacente de la epidermis, el estrato espinoso. Aunque el estrato basal es el sitio primario de las células epidérmicas con actividad mitótica, no todas las células basales presentan el mismo potencial proliferativo. De acuerdo con estudios cinéticos, en esta etapa coexisten tres poblaciones: células madre, células amplificadoras transitorias y células posmitóticas [Watt, 1998].

Los filamentos de queratina de las células basales se organizan en haces pequeños alrededor del núcleo y se conectan con los desmosomas y los hemidesmosomas. Las queratinas 5 y 14 se expresan en la capa basal y otros epitelios estratificados. Sin embargo, existen otras queratinas como la 15 y 19 que están asociadas a células madre [Michel et al, 1996; Beer et al, 2000].

Estrato espinoso

Este estrato es la capa más gruesa, está compuesta por células poliédricas a aplanadas y se les conoce como espinoso, por la apariencia de espinas de sus bordes en los cortes histológicos que no son más que numerosos desmosomas, modificaciones de la superficie celular dependientes de calcio que favorecen la adhesión de las células epidérmicas y la resistencia a los factores mecánicos. Las células espinosas suprabasales tienen forma poliédrica y núcleos esféricos. Las células más superficiales de la capa espinosa son más grandes y más aplanadas. Los queratinocitos localizados en el estrato espinoso cerca del estrato basal, también pueden tener actividad mitótica y los dos estratos en conjunto, se denominan capa malpighiana o de Malpigi, y tienen a su cargo el recambio de queratinocitos en la epidermis. Hay una gran abundancia de filamentos intermedios de queratina.

Las queratinas 5 y 14 se mantienen estables y permanecen en las capas espinosas, no obstante se sintetizan otras, como la 1 y la 10 que son características de un patrón de diferenciación de tipo epidérmico y por ello se les conoce como queratinas de diferenciación [Chu et al, 2005].

Estrato granuloso

Consiste de tres a cinco capas de queratinocitos aplanados y es la capa más superficial de la epidermis en la que las células aún tienen núcleo. El citoplasma de estos queratinocitos contiene gránulos de queratohialina grandes, de forma irregular, gruesos y basófilos que no están unidos a la membrana. A través de estos gránulos pasan haces de filamentos de queratina. Las células del estrato granuloso también contienen gránulos o cuerpos laminares que contienen proteínas (hidrolasas ácidas) y lípidos diversos como esteroides de colesterol y ceramidas [Gartner et al, 2002]. Estos cuerpos laminares se originan en el estrato espinoso, pero persisten hasta el estrato granuloso. El contenido de estos gránulos se libera mediante exocitosis al espacio

extracelular y forman láminas de sustancia rica en lípidos que actúan como barrera impermeable. Esta capa impermeable impide que el líquido tisular y el agua del medio externo pasen a través del estrecho espacio intercelular. La importancia de estos lípidos se manifiesta en condiciones en las que la epidermis se ha destruido como en las quemaduras extensas, donde los pacientes tienen una gran pérdida de líquido tisular que conduce a una grave deshidratación.

Estrato lúcido

Es la capa delgada homogénea superficial al estrato granuloso. Esta capa eosinófila sólo se encuentra en la piel gruesa y es una zona de transición entre las capas más profundas de células vivas y las células cornificadas superficiales muertas. Aunque las células aplanadas del estrato lúcido carecen de organelos y núcleo, contienen filamentos de queratina agrupados en forma densa, orientados en haces paralelos a la superficie de la piel junto con la proteína eleidina, un producto de transformación de la queratohialina. La cara citoplasmática de la membrana plasmática de estas células tiene un aspecto engrosado producido por la adhesión de una serie de proteínas como la involucrina, la transglutaminasa y la proteína rica en glicina que permiten la estabilidad de la membrana plasmática para que no se rompa justo cuando los procesos metabólicos de los queratinocitos han dejado de funcionar en una célula cuyo núcleo ha desaparecido.

Estrato córneo

La capa más superficial de la epidermis, es el estrato córneo, se compone de numerosas capas de células cornificadas, aplanadas y muertas. Estas células carecen de núcleos y organelos pero están llenas con filamentos de queratina incluidos en una matriz amorfa. En el estrato córneo las células pierden del 50 al 80% del agua y están compuestas principalmente por queratina. Las células en este estrato continúan unidas por desmosomas y se descaman en grupos o columnas.

El estrato córneo forma una barrera muy eficaz que protege al organismo de diferentes agentes lesivos presentes en el medio externo, por otro lado, ayuda al mantenimiento de la homeostasis del medio interno.

1.1.2 Dermis

La dermis es el tejido conjuntivo especial de la piel se sitúa justo debajo de la epidermis y deriva del mesodermo. La dermis varía de grosor de 0.6 mm en los párpados a 3 mm más o menos en la palma de la mano y la planta del pie. Esta capa es un sistema integrado de elementos fibrosos, amorfos y celulares del tejido conjuntivo, en el que se localizan las redes vasculares y nerviosas, los apéndices derivados de la epidermis y contiene muchas células residentes, como fibroblastos, macrófagos, mastocitos y linfocitos. La dermis es el componente más grande de la piel y le confiere su flexibilidad, elasticidad y fuerza tensil. Protege al cuerpo de lesiones mecánicas, fija agua, contribuye a la regulación térmica e incluye receptores de los estímulos sensoriales [Welsch et al, 2008].

1.1.2.1 Capas de la dermis

De afuera hacia adentro, la dermis puede dividirse en dos capas: capa papilar y capa reticular.

Capa papilar de la dermis

La capa papilar es el estrato superficial de la dermis y se interdigita con la epidermis formando rebordes dérmicos (papilas). Está compuesta de un tejido conjuntivo laxo cuyas fibras de colágena tipo III delgadas (fibras reticulares) y fibras elásticas están dispuestas en redes laxas. Se extiende desde la lámina basal con fibrillas de fijación, compuestas de colágena tipo IV, a la capa papilar, situación que permite la adherencia de la epidermis a la dermis. La capa papilar contiene fibroblastos, macrófagos, células plasmáticas y cebadas, otras células comunes al tejido conjuntivo.

La capa papilar también posee numerosas asas capilares, que se extienden a la interfaz de epidermis y dermis. Estos capilares regulan la temperatura corporal y nutren a las células de la epidermis que es avascular. En algunas papilas dérmicas se encuentra el corpúsculo de Meissner encapsulado en forma de pera, que son los mecanorreceptores especializados para responder a la deformación leve de la piel. Estos receptores son más comunes en áreas de la piel muy sensibles a la estimulación táctil (labios, genitales externos y pezones). Otro mecanorreceptor encapsulado que se halla en la capa papilar es el bulbo terminal de Krause sin función conocida hasta ahora.

Capa reticular de la dermis

La interfaz entre la capa papilar y la capa reticular de la dermis no se distingue con claridad porque ambas capas se continúan una con la otra. De manera característica la capa reticular se compone de tejido conjuntivo colagenoso denso, irregular, que muestra fibras de colágena tipo I gruesas, que están agrupadas densamente en haces grandes que se encuentran dispuestos en distintas direcciones. Con las fibras de colágena se entremezclan redes de fibras elásticas gruesas que aparecen con especial abundancia cerca de las glándulas sebáceas y sudoríparas. Los intersticios de la capa reticular están llenos de proteoglucanos, con abundancia de dermatán sulfato. Las células son más escasas en esta capa que en la papilar. Incluyen fibroblastos, células cebadas, linfocitos, macrófagos y con frecuencia, células adiposas en las capas más profundas de la capa reticular.

Las glándulas sudoríparas, las glándulas sebáceas y los folículos pilosos derivados de la epidermis invaden la dermis y la hipodermis durante la embriogénesis, donde se localizan de manera permanente. También hay grupos de células musculares lisas en las regiones más profundas de la capa reticular en sitios particulares, como la piel del pene y el escroto, y la areola alrededor de los pezones. Las contracciones de estos grupos musculares arrugan la piel de estas regiones. Otras fibras de músculo liso, denominadas músculos erectores del pelo, se insertan en los folículos pilosos. Asimismo, en la capa superficial se origina un grupo particular

de músculos estriados localizados en la cara, partes del cuello anterior y el cuero cabelludo (músculos de la expresión facial) que se insertan en la dermis.

En las porciones más profundas de la dermis se localizan cuando menos dos tipos de mecanorreceptores encapsulados: 1) los corpúsculos de Pacini, que responden a la presión y vibraciones, y 2) los corpúsculos de Ruffini, que responden a fuerzas de tensión. Estos últimos son más abundantes en la dermis de las plantas de los pies. (Gartner et al, 2002)

1.1.2.2 Unión dermo-epidérmica

Es aquella interfaz en la que tienen lugar muchas interacciones que originan la especificación o diferenciación de las características de la dermis y de la epidermis. Esta zona tiene membrana basal, matriz extracelular de células basales y las estructuras superficiales en su mayoría fibrilares, de la dermis papilar. La dermis y la epidermis forman esta región, encontrándose entrelazadas por crestas papilares epidérmicas y las papilas dérmicas correspondientes, y por microproyecciones citoplásmicas con forma de pie de las células basales que se extienden hasta indentaciones correspondientes de la dermis. La unión dermo-epidérmica está reforzada por hemidesmosomas responsables del anclaje de las células basales a la lámina basal a su vez ésta se encuentra unida a la dermis mediante filamentos y microfibrillas de anclaje.

La unión dermo-epidérmica de 100 nm de espesor constituye la región anatómica situada entre la epidermis y la dermis determinando la cohesión dermo-epidérmica y la resistencia a las fuerzas de tracción cutánea (Puig et al, 2001). Es aquella interfaz en la que tienen lugar muchas interacciones que originan la especificación o diferenciación de las características de la dermis y de la epidermis (Chu et al, 2005). Al microscopio electrónico la unión dermo-epidérmica aparece constituida por tres capas: a) membrana celular del polo basal de los queratinocitos basales, que contienen hemidesmosomas, b) la membrana basal propiamente dicha que al microscopio se aprecia conformada por dos láminas: la lúcida y la densa y c) la región situada por debajo de la lámina densa, que contiene las fibrillas de anclaje y los haces de microfibrillas de colágena (Puig et al, 2001). La membrana basal del polo basal de los queratinocitos basales contiene los hemidesmosomas constituidos por una placa densa intracelular denominada placa de anclaje sobre la que se apoyan los tonofilamentos de queratina. Enfrente de esta placa y dentro de la lámina lúcida se encuentra la placa densa sub-basal ambas placas están unidas mediante los denominados filamentos de anclaje, algunos de los cuales se extienden hasta la lámina densa.

La composición de las estructuras extracelulares que se asocian con los hemidesmosomas es menos conocida, y se han identificado diversas proteínas asociadas con los filamentos de anclaje que atraviesan la lámina lúcida: la laminina 5 (que se une a la integrina $\alpha 6\beta 4$ presente en los queratinocitos basales) la laminina, la unceína y la entactina/nidógeno. El armazón enrejado de la lámina densa está formado por colágena de tipo IV al que se unen diversos componentes: lamininas, proteoglucanos, entactina/nidógeno, fibronectina y diversas integrinas ($\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$). La colágena tipo VII sintetizado por los queratinocitos y los fibroblastos constituye el principal componente de las fibrillas de anclaje, y se une a la laminina. También forma parte de la lámina densa el colágeno tipo V. En la red de microfibrillas situada por debajo de la lámina densa se han identificado otros diversos componentes (Puig et al, 2001).

1.1.3 Hipodermis

Es la región subcutánea rica en el tejido adiposo. Los adipocitos derivados del mesénquima son las células más importantes de la hipodermis. Están organizados en lóbulos limitados por tabiques de tejido conjuntivo fibroso. Los nervios, los vasos sanguíneos y linfáticos están localizados entre los tabiques y otorgan una rica inervación e irrigación a la región. Aunque la hipodermis este en estrecha continuidad con la dermis y sean regiones distintas anatómicamente, están bien integradas estructural y funcionalmente por redes nerviosas y vasculares y la continuidad de los anexos epidérmicos. Los folículos pilosos en crecimiento activo penetran en la grasa subcutánea y las glándulas sudoríparas apocrinas y ecrinas suelen estar confinadas en esta capa profunda de la piel.

El tejido hipodérmico actúa como aislante del cuerpo, sirve como reservorio energético, actúa como amortiguador y protector de la piel y permite su movilidad sobre las estructuras adyacentes. Tiene un efecto estético en el modelado de la silueta del cuerpo.

1.2 ANEXOS O APÉNDICES CUTANEOS

Los anexos cutáneos derivan de las proliferaciones en profundidad que surgen del epitelio epidérmico durante el desarrollo embrionario y comprenden las estructuras siguientes:

- Los folículos pilosos y su producto, el pelo
- Glándula sebácea y su producto, secreción sebácea
- Glándula sudorípara ecrina y su producto, el sudor
- Glándula sudorípara apocrina y su producto mixto
- Glándula mamaria
- Uñas que están formadas por queratina dura y sirven como protección

Tanto los pelos como las glándulas sudoríparas cumplen funciones específicas en la regulación de la temperatura corporal. Las glándulas sebáceas secretan una sustancia oleosa que tendría funciones protectoras. Las glándulas apocrinas producen una secreción serosa que contienen feromonas que actúan como sustancias de atracción sexual en los animales y quizás también en los seres humanos. El epitelio de los anexos cutáneos puede servir como fuente de células epiteliales nuevas en la reparación de las heridas de la piel.

Los apéndices cutáneos (pelo, uñas y glándulas sebáceas, sudoríparas y mamarías en los mamíferos, y plumas y escamas en aves y reptiles respectivamente) están regulados por dos componentes diferentes: una porción epidérmica, que origina el producto final diferenciado, y el componente dérmico que regula la diferenciación del apéndice. Durante el desarrollo embrionario, las interacciones dermo-epidérmicas son críticas para la inducción y la diferenciación de estas estructuras. La interrupción de estas señales tiene con frecuencia profundas influencias en el desarrollo de los apéndices (Loomis et al, 2009). Aunque una vez que los apéndices están totalmente formados varían considerablemente en forma y función, sus etapas tempranas en desarrollo son notablemente similares tanto molecular como morfológicamente (Mikkola et al, 2006; Mikkola et al, 2007).

Para fines de este trabajo, el enfoque fundamental es el pelo, con el objetivo de implementar los resultados de esta investigación en los constructos dérmicos que se han desarrollado ya con anterioridad.

1.2.1 PELO

Los pelos son estructuras filamentosas, queratinizadas que se proyectan de la superficie epidérmica de la piel. El pelo crece en la mayor parte del cuerpo, excepto en la zona del bermellón de los labios, las palmas y sus superficies laterales, las plantas y los lados de los pies, el dorso de las falanges distales de los dedos de las manos y de los pies, el glande del pene, el clítoris, los labios menores y la superficie vestibular de los labios menores (Gartner et al, 2002).

1.2.1.1 Estructura

En el pelo pueden distinguirse el tallo piloso, que sobresale de la piel y está compuesto por queratina dura, y el folículo piloso. Ambos son estructuras epiteliales puras.

Tallo del pelo

El tallo piloso es lo que se conoce comúnmente como pelo y es el filamento delgado que se extiende a la superficie de la epidermis y a través de ella. Está constituido por tres regiones: médula, corteza y cutícula del pelo (Gartner et al, 2002) (Figura 2, A Y B). Su principal componente es la corteza gruesa de células cornificadas muy juntas que en esencia están formadas por queratina dura. Por fuera la corteza está cubierta por la cutícula del pelo, que consiste en células cornificadas planas dispuestas como las tejas de un tejado. Sólo en el interior de los pelos terminales hay un cordón delgado de células cornificadas más grande y espacios llenos de aire que forman lo que se conoce como médula (Welsch et al, 2009).

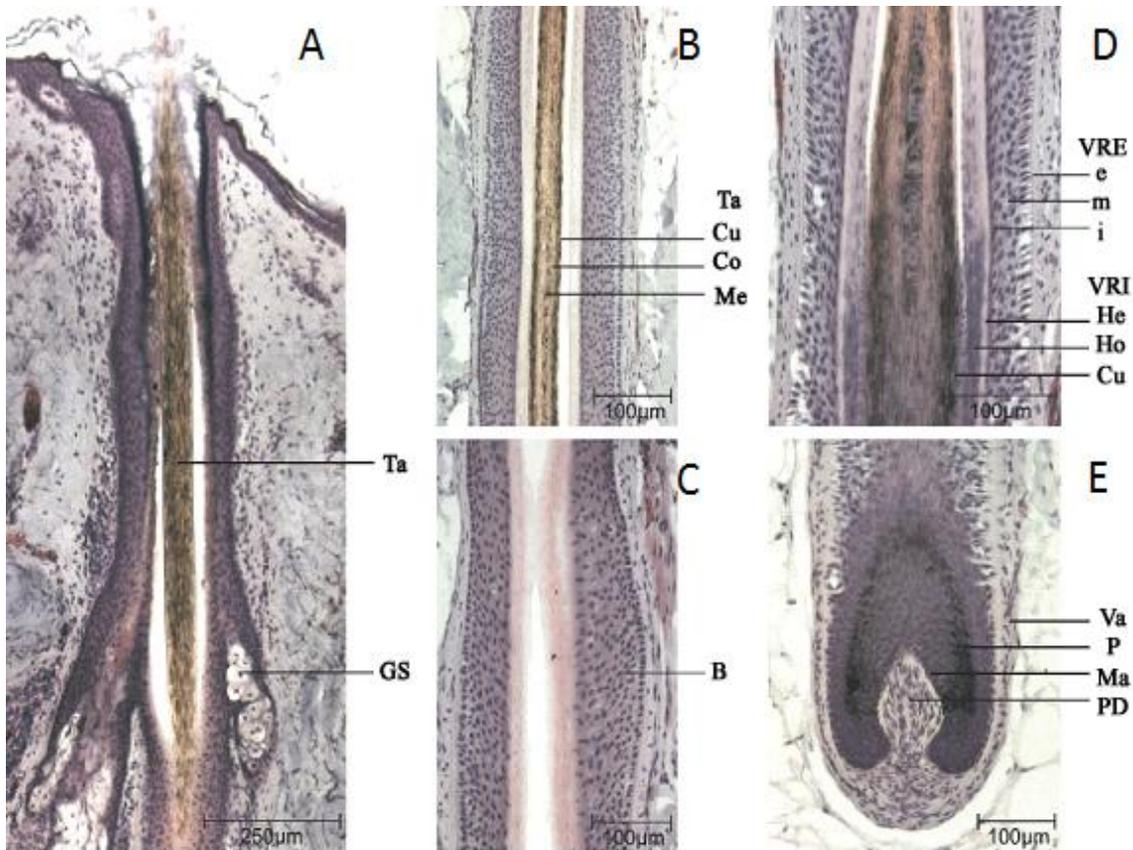


Fig. 2. Cortes de folículo terminal humano. En (A) se observa el tallo del pelo (Ta) y su glándula sebácea (GS). En (B) observamos las 3 regiones del tallo de pelo: médula (Me), corteza (Co) y cutícula (Cu). En (C) observamos la región del bulbo piloso (B). En panel (D), la vaina del pelo, que abarca la vaina radicular externa [VRE] dividida en las regiones externa (e), media (m) e interna (i), mientras que la vaina radicular interna cuenta con tres capas: Henle (He), Huxley (Ho) y Cutícula de la vaina radicular [Cu]. Por último en (E) tenemos la región del bulbo piloso en donde se aprecia la vaina del pelo [Va], los melanocitos que transfieren el pigmento (P) a los queratinocitos, la matriz del pelo (Ma) y la papila dérmica (PD). (Modificada de Vogt et al, 2008)

Folículo piloso

Es una invaginación tubular de la epidermis que tiene a su cargo el crecimiento del pelo, así como su renovación y que consiste en:

El bulbo piloso. Segmento terminal engrosado del folículo que se sitúa en la dermis (vello) o en la hipodermis (pelo terminal). En el bulbo piloso se invagina desde abajo una papila del tejido conjuntivo llamada también papila dérmica. (Figura 2, B y E) Los fibroblastos de la papila dérmica regulan la actividad mitótica de las células matriciales. Las células epiteliales basales del bulbo proliferan y forman el tallo del pelo y la vaina radicular interna. La región profunda del bulbo, es equivalente con el estrato basal de la epidermis y se caracteriza por las células en proliferación, también conocidas como matriz o células matriciales. En la región de la matriz también hay melanocitos muy ramificados que suministran melanina a las células en proceso de cornificación del tallo del pelo (Welsch et al, 2009).

La vaina radicular interna. En contacto directo con el pelo, también se origina en la región de la matriz. Rodea al pelo en crecimiento y se encuentra entre él y la vaina radicular externa. Esta vaina termina a la mitad de la altura del folículo. Cuenta con tres capas de queratina blanda de cornificación rápida. De adentro hacia afuera se distinguen: la cutícula de la vaina radicular, la capa de Huxley y la capa de Henle (Figura 2, D) (Welsch et al, 2009).

La vaina radicular externa. Ésta corresponde a la invaginación digitiforme de la epidermis en cuya profundidad se forma el pelo. En las regiones superiores tiene la misma estructura que la epidermis pero por debajo de la desembocadura de las glándulas sebáceas pierde el estrato granuloso y el estrato córneo. Se torna más delgada y en el piso del folículo se continúa con la zona de la matriz del pelo. Por arriba de la desembocadura de las glándulas sebáceas en el folículo piloso la vaina radicular externa está separada del pelo por un espacio llamado infundíbulo piloso. Por debajo de la desembocadura de las glándulas sebáceas las vainas radiculares interna y externa están unidas (Figura 2, D) (Welsch et al, 2009).

1.2.1.2 Tipos de pelo

Basado en la estructura, textura y la forma de la fibra del pelo, el grosor y tiempo de aparición en el cuerpo, varios tipos de folículos pueden ser diferenciados, dependiendo de las especies. Generalmente, en los seres humanos se pueden diferenciar folículos de pelo lanugo, de vello, de pelo intermedio y de pelo terminal (Rook 1965). Un folículo piloso puede moverse de una categoría a otra de acuerdo a sus cambios de tamaño y producción de fibra sobre el tiempo, de acuerdo a la siguiente tabla.

CLASIFICACIÓN ESTRUCTURAL Y MORFOLÓGICA DEL PELO HUMANO

Pelo lanugo	Vello	Pelo intermedio	Pelo terminal
<p>Es fino, suave, pobremente pigmentado y no tiene medula central. Producido en el útero, es el primer pelo que crece y que recubre al feto y que por lo general se desprende antes del nacimiento. El pelo lanugo puede también ser observado en adultos con varios formas de hipertrichosis (Strumia, 2009).</p>	<p>El vello no tiene medula, es fino y es pobremente pigmentado, continua creciendo a lo largo de la vida. Quizás en ciertas aéreas, usualmente solo haya pelo terminal, como en el cuero cabelludo, el vello puede representar del 7-25% del pelo presente. El vello del cuero cabelludo alcanza una longitud menor que 1 cm.</p>	<p>Son los primeros pelos observados postnatalmente, después del crecimiento del pelo lanugo, empieza a crecer este tipo de pelo en el cuero cabelludo. El pelo intermedio se caracteriza por una cutícula áspera, pigmentación escasa y una medula fragmentada o ausente; miden alrededor de 1cm de largo</p>	<p>Este tipo de pelo tiene el diámetro de sección cruzada más largo con respecto a tipos de fibra de los otros. Es de aquellos pelos afectados por canities y crecimiento considerable ya que crecen más de 1cm. El tamaño y la forma del pelo terminal varía con la ubicación del cuerpo y la función potencial. Los pelos terminales de cuero cabelludo juegan un papel como protectores contra la luz UV y como aislamiento contra el calor y el frío. Pelos terminales especializados como las cejas y pestañas pueden proteger los ojos de fluidos y polvo [referido en Vogt et al, 2008]. Las pestañas tiene el diámetro más grande de todo el pelo del cuerpo, pigmentación intensa y una fase relativamente corta de crecimiento. Los pelos de la nariz pueden jugar un papel previendo la entrada de insectos u otros materiales en la cavidad nasal.</p>

En el ratón, existen cuatro tipos de pelo: "guard", "awls", "auchene" y "zigzag". Los pelos "guard" son gruesos, rectos y representan casi el 5-10% de los pelos en el ratón. Los pelos "awl" son también rectos y gruesos pero más cortos que los pelos "guard". Los pelos "auchene" son similares a los pelos "awl" en longitud excepto en que tienen un solo pico. Por último, los pelos "zigzag" comprenden aproximadamente el 70% de los pelos en el ratón y muestran dos picos (Botchkarev et al, 2005).

1.2.1.3 Funciones del pelo

El pelo pareciera no tener una función vital, para los seres humanos, sin embargo la importancia psicológica del pelo es considerable. Su pérdida lleva a la depresión, autoestima baja y humillación

Los pelos pueden haber servido para proteger el organismo de la pérdida de calor y proporcionarle a la epidermis subyacente una primera línea de defensa contra la abrasión y la penetración de agentes químicos nocivos. Posiblemente, en los primeros pobladores que emigraron de ecosistemas fríos a cálidos, se acompañó de la pérdida gradual de la dependencia en el pelo como aislante, por lo que en los seres humanos actuales éste es casi un vestigio. Si bien el pelo corporal en el ser humano posee escaso valor protector, los especializados, como las pestañas y las cejas, así como los pelos de las narinas y el oído externo, proporcionan cierta protección frente al entorno. Además, el crecimiento profuso del pelo del cuero cabelludo ofrece una protección excelente ante lesiones cutáneas producidas por las radiaciones electromagnéticas emitidas por el sol (Lavker et al, 2005).

Otra función del pelo está involucrado con la percepción sensorial (Hardy, 1992). Todos los folículos pilosos poseen numerosas terminaciones nerviosas sensitivas que responden a la presión sobre el tallo del pelo, lo que permite casi todas las modalidades de sensibilidad táctil, Además, los animales poseen senos pilosos especializados en la piel de los labios superior e inferior, el hocico y encima de las cejas. Estos pelos táctiles (vibrátiles), circundados por un seno sanguíneo y con más de 2000 terminaciones nerviosas sensitivas, ayudan a los animales nocturnos a orientarse y funcionan como otro par de "ojos". El pelo también actúa como un medio que dispersa los olores de las secreciones glandulares sebáceas y apocrinas. Por último, en el hombre, es un componente importante de la imagen corporal, que transmite una gran cantidad de mensajes sexuales y sociales a través de su color y el estilo de peinado.

Mientras que el tallo del pelo puede no tener una función importante, la naturaleza cíclica del folículo piloso hizo de este derivado epidérmico un modelo excelente para el estudio de varios problemas biológicos, como la morfogénesis, la regulación del crecimiento, la diferenciación celular, la formación de patrones y el control del ciclo de crecimiento. Dado que el mesénquima influye en muchos de estos procesos, el folículo piloso también es un sistema ideal para la investigación de las interacciones entre el mesénquima y el epitelio. Asimismo, se considera que desempeña un papel importante en el mantenimiento de la epidermis, además de participar en la curación de heridas y en la génesis de tumores de la piel (Lavker et al, 2005).

1.2.1.4 Embriología

En los fetos humanos, los primeros folículos pilosos primordiales se forman aproximadamente a las 9 semanas de gestación y están distribuidos sobre todo en las áreas de las cejas, el labio superior y el mentón. La mayor parte de los folículos pilosos restantes comienza a desarrollarse entre los 4 y 5 meses de gestación en una dirección cefalocaudal. Durante la vida fetal la producción de los folículos se produce en varias ondas intercaladas. El pelo lanugo fino se desarrolla en una onda que avanza de la parte frontal a la occipital del cuero cabelludo y esta

onda se elimina por la semana 36 de gestación. Una segunda capa de pelo lanugo aparece y se elimina en un patrón de capa sincronizada a los 3 ó 4 meses de vida. El parche occipital sin pelo visto en bebés es fisiológicamente usual, resultando de la pérdida sincronizada de la onda final de pelo lanugo en fase telógena antes y por reemplazamiento por los pelos normales del cuero cabelludo (referido en Vogt et al, 2008). El mayor número de folículos en el cuero cabelludo se presenta en el nacimiento, por lo que la densidad de folículos pilosos es alta en los neonatos y disminuye progresivamente durante la infancia y adolescencia como el cuero cabelludo se expande sobre el cráneo hasta que este se estabiliza en adultos (250-350 pelos por cm²) (referido en Vogt et al, 2008).

El folículo secundario se desarrolla a cada lado del primario, lo que produce grupos típicos de tres pelos. Cerca de 5 millones de folículos pilosos se desarrollan tanto en hombres como en mujeres. Las diferencias entre los dos sexos en cuanto a la distribución de las clases de pelo se deben a las concentraciones variantes de las hormonas sexuales esteroideas circulantes.

1.2.1.5 Ciclo del pelo

Los folículos pilosos experimentan ciclos de crecimiento, involución y reposo.

Anágeno

Puede subdividirse en 6 subestadios (I a VI), los primeros cinco denominados en forma colectiva proanágenos. El sexto estadio, metágeno, se define por la salida del tallo del pelo por encima de la superficie cutánea. En este estadio el folículo anágeno penetra en profundidad en la grasa subcutánea. La duración del anágeno varía en grado notable en función de lugar del cuerpo y la especie. Se estimó que el anágeno de los folículos piloso del ser humano dura de 2 a 6 años en el cuero cabelludo, de 19 a 26 semanas en la pierna, 6 a 12 semanas en el brazo y 4 a 14 semanas en el labio superior (Kligman, 1959).

Catágeno

Al final del anágeno, el folículo piloso entra en la fase catágena, con cambios morfológicos y moleculares que son característicos de la muerte celular programada o apoptosis (Seiberg et al, 1995). Al inicio del catágeno los pelos del cuero cabelludo exhiben un adelgazamiento gradual y disminución de la pigmentación en la base del tallo del pelo. Los melanocitos en la porción matriz del bulbo dejan de producir melanina, reabsorben sus dendritas y sufren apoptosis (Stenn et al, 2001). Los queratinocitos de la matriz dejan de proliferar de forma abrupta para pasar a la diferenciación terminal, de modo que los folículos más bajos involucionan y retrogradan. Las células de la papila folicular se reúnen y permanecen contenidas en la vaina de tejido conectivo, que se contraen, y empuja a la papila folicular condensada hacia el fondo de la porción epitelial del folículo en regresión. La vaina del tejido conectivo también comienza a engrosarse durante el catágeno (Kligman, 1959). Al final del catágeno, la papila folicular entra en reposo en el fondo de la porción permanente del folículo piloso.

Telógeno

Dentro del pelo telógeno tiene un extremo proximal en forma de clava, que en los casos típicos se desprende del folículo durante el telógeno o el anágeno siguientes. El pelo nuevo producido en el anágeno nuevo no “expulsa” el pelo del ciclo anterior y a veces puede encontrarse junto al pelo telógeno retenido dentro del folículo. La vaina radicular interna, que suele desintegrarse en el folículo anágeno a nivel de la apertura del conducto sebáceo, está ausente del folículo telógeno. Por último, se produce una nueva fase de crecimiento, y el ciclo se repite.

En el cuero cabelludo del ser humano el período anágeno por lo general es bastante prolongado; sin embargo, el catágeno solo dura unas 2 semanas y el telógeno de 1 a 3 meses (Kligman, 1959).

Exógeno

El término exógeno se acuñó para denominar la fase de desprendimiento del pelo. (Lavker et al, 2005). Este término describe la relación entre el tallo del pelo y la base del folículo telógeno más que la actividad cíclica del folículo subyacente (Stenn et al, 2001). Dado que los pelos pueden retenerse por más de un ciclo, la fase del desprendimiento tiende a ser independientemente del anágeno y el telógeno. Aun cuando es poco lo que se sabe sobre el control del exógeno, se involucraron vías proteolíticas en la formación del pelo en “clava” (Stenn et al, 2001).

Aunque la naturaleza cíclica del crecimiento del pelo descrita es similar en seres humanos y animales, el patrón de crecimiento y reposo, y la tasa de crecimiento varían según las especies y el lugar del cuerpo. Durante la vida uterina y el período posnatal temprano los seres humanos también presentan un crecimiento del pelo en ondas, este tipo de ciclo se pierde en etapas posteriores de la vida. Entre las semanas 26 y 28 de gestación, la mayor parte de los folículos del cuero cabelludo humano experimenta la transición al telógeno siguiendo un patrón en ondas que se propaga desde las regiones frontales hasta las parietales y que es característico del último estadio del primer ciclo del pelo (Barman et al, 1967). Muchos de estos pelos primarios se desprenden dentro del útero, (Kligman, 1961) aunque el proceso puede retrasarse en algunos individuos, y se puede observar abundante pelo al nacer (Barman et al, 1967).

En cualquier momento dado, cerca del 85% al 90% de los folículos pilosos del cuero cabelludo está en el anágeno, alrededor del 13% se encuentra en el telógeno y menos del 1%, en el catágeno. (Kligman, 1959). Se cree que cada folículo atraviesa el ciclo de crecimiento del pelo entre 10 y 20 veces en la vida.

1.2.1.6 Morfogénesis

La formación de apéndices como el folículo piloso involucra una secuencia compleja de señales entre el mesénquima dermal y el epitelio subyacente. Los estímulos precisos que la inician aún no están totalmente definidos. Morfológicamente, se han identificado las fases de inducción, organogénesis y la citodiferenciación, así como una división del desarrollo en ocho etapas de la formación del folículo piloso en humanos y roedores (Figura 3) (Schmidt-Ullrich et al, 2005). El desarrollo de los primeros folículos humanos inicia entre la semana 8 y 12 de gestación. Probablemente en respuesta a los elementos señalizantes dérmicos, los cuales son expresados en gradiente sobre el desarrollo del feto, resultando en el engrosamiento del epitelio primitivo que forma placodas que inducen la agregación de las células dérmicas subyacentes a

condensados mesenquimales (Ebling, 1980). A esta fase del desarrollo folicular se le conoce como la primera etapa en el desarrollo del folículo piloso. Una placoda epitelial puede ser considerada como la unidad básica de la organogénesis ectodérmica y un centro de señalización de más de 10 diferentes señales, entre ellas Wnt, las proteínas morfogénicas de hueso (BMP), factores de crecimiento de fibroblastos y Soni Hedgehog (SHH), mismas que son auto expresadas por las placodas, o bien por el mesénquima subyacente (Millar, 2002; Thesleff y Mikkola, 2002; Pispá y Thesleff, 2003; Veltmaat et al, 2003). Las placodas son engrosamientos locales del epitelio formados por un agrupamiento de queratinocitos epiteliales en respuesta a señales emitidas por la dermis, posteriormente cada placoda manda un mensaje de retroalimentación a la dermis induciendo la formación de agregados de células mesenquimales conocidos como condensados dérmicos (Mikkola, 2007). Las primeras placodas de folículos pilosos han sido vistas en la ceja, arriba del labio y en la región de la barbilla. La formación de placodas se expande subsecuentemente en una onda caudalmente y ventralmente sobre la piel del feto. Los condensados dérmicos inducen a las células que conforman sus placodas subyacentes ectodérmicas a proliferar e inician la penetración de la dermis. En conjunto estos procesos conforman la segunda etapa del desarrollo. Como las células epiteliales crecen hacia abajo dentro de la dermis, el condensado de células dérmicas permite precisamente esa invaginación. Los folículos pilosos crecen dentro de la dermis en un ángulo a la superficie de la piel, con un grado de ángulo dependiendo de la localización del folículo (referido en Vogt et al, 2008). La etapa inicial de la formación de placodas da origen a un brote o yema, situación que es característica de la tercera etapa del desarrollo folicular. Durante la semana 12-14 de gestación, la base epitelial de la yema en el cuero cabelludo se invagina y envuelve al condensado de células dérmicas y forma la papila dérmica. Esta etapa de desarrollo es descrita como la etapa de yema bulbosa o cuarta etapa en el desarrollo folicular (referido en Vogt et al, 2008).

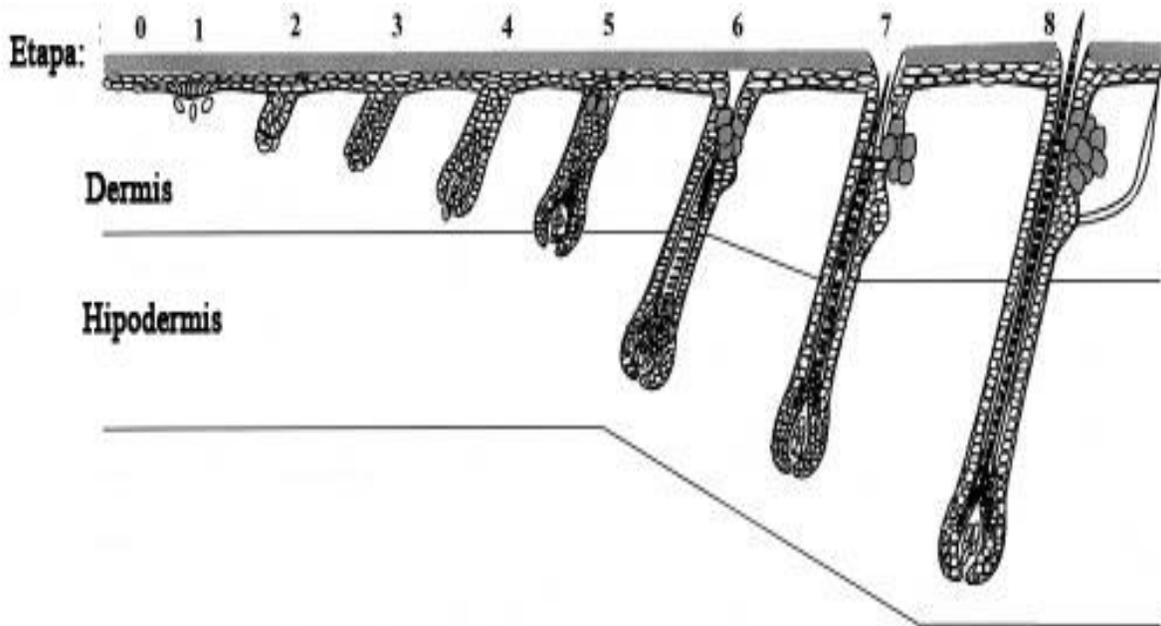


Fig.3. Morfogénesis del folículo piloso humano. La formación del folículo es producida por la interacción de varios eventos de señalización entre el mesénquima y el epitelio. (Modificada de Paus et al, 1999)

En la quinta etapa, en las semanas 13-16 de gestación, las porciones superficiales de los folículos desarrollan dos distintas protuberancias de células en la parte posterior del folículo, el cual ésta en un obtusángulo con respecto a la superficie de la piel. La protuberancia superior cercana a la superficie de la piel forma eventualmente las glándulas sebáceas, mientras la protuberancia inferior es el lugar de inserción del músculo erector del pelo que lo ancla al folículo, además de ser una región que presenta células multipotenciales provenientes del epitelio interfolicular. El músculo erector del pelo se desarrolla independientemente del folículo y es visto eventualmente primero en la dermis cerca de la glándula sebáceas en desarrollo (referido en Vogt et al, 2008). El músculo erector del pelo crece hacia abajo para conectarse con la región del bulbo como si el folículo empujara hacia el fondo dentro de la dermis. Notablemente, el músculo erector del pelo no se desarrolla en los folículos que están creciendo perpendiculares a la piel, tales como los folículos de las pestañas, folículos del canal auditivo exterior y aquellos del orificio nasal. Las células externas del bulbo, destinadas a ser glándulas sebáceas, proliferan y algunas se diferencian en células lipogénicas que progresivamente acumulan lípidos. Las hormonas maternas provocan la hipertrofia de las glándulas sebáceas e incrementan temporalmente las síntesis y secreción de sebo durante el segundo y tercer trimestre. Con la liberación bajo la influencia de las hormonas maternas, las glándulas sebáceas llegan a ser relativamente quiescentes hasta que la producción endógena incrementa en la pubertad. En humanos, algunos folículos pilosos desarrollan una tercera protuberancia superficial de células por encima de las células destinadas a ser glándulas sebáceas. El desarrollo de esta tercera protuberancia indica la formación de una glándula apocrina (Holbrook et al, 1991). En humanos los folículos con la mayor asociación a glándulas sebáceas están en la cara y el cuero cabelludo. Sin embargo, los folículos asociados a glándulas apocrinas también se encuentran en axila, genitales y ano.

En el segundo trimestre, los folículos pilosos se diferencian para formar eventualmente las siete capas de células en cilindros concéntricos característicos de folículos maduros. Hacia el final de la etapa 4 o al inicio de la etapa 5, un grupo de células epiteliales separadas de las células epiteliales periféricas las cuales después llegan a ser la vaina externa de la raíz, continúan con el epitelio no folicular. Este grupo de células epiteliales descansan en la parte superior de la pila dérmica, promoviendo la diferenciación en la vaina interna de la raíz de Henle, Huxley y la capa de cutícula, y el grupo central de células de la matriz que proliferan y originan la cutícula del tallo del pelo, la corteza y, después en los pelos terminales, la medula (referido en Vogt et al, 2008). La sexta etapa es definida por el desarrollo y el crecimiento visible del tallo del pelo. Como el tallo del pelo y su vaina interna de la raíz se alargan, las células epiteliales periféricas se mueven a un lado permitiendo el cono de las células del grupo central que se mueve hacia arriba de la protuberancia. Durante las semanas de gestación 19-21, los folículos en desarrollo llegan a la séptima etapa, en la cual los canales del pelo se forman, En la octava etapa, los folículos están totalmente formados y las primeras fibras de pelo nacen de la piel. El pelo lanugo inicial de la primera fase anágena del crecimiento del pelo crece hasta las semanas 24-28 de gestación.

1.2.1.7 Mediadores moleculares de la morfogénesis del folículo

Los eventos de la morfogénesis del folículo están controlados por una red compleja de patrones de señalización secuenciales de activación e inactivación, autocrinos, paracrinos y endocrinos. Investigaciones recientes han identificado múltiples factores regulatorios y la esencial naturaleza de su influencia en el desarrollo del folículo, pero esos reguladores moleculares aún no están bien estudiados (Millar, 2002).

Actualmente, las evidencias sugieren que la primera señal emana del mesodermo embrionario, pero se desconoce si el epitelio juega un papel puramente pasivo en la inducción de la primera señal. El patrón molecular más temprano conocido involucra a la β -catenina, un mediador intracelular de la expresión de genes. Estudios han mostrado que la β -catenina es esencial para que los queratinocitos que son células madre tomen algún destino (Watt, 1998). La expresión de la β -catenina estabilizada en la epidermis de ratones transgénicos induce la morfogénesis de folículos de *novio*, demostrando su importancia fundamental en el desarrollo de los folículos pilosos (Gat et al 1998).

Con la iniciación de la primera señal y la formación de placodas, un exceso de mediadores intra y extracelulares es expresado. Las señales de WNT transducidas por β -catenina y LEF1 puede provocar la expresión de Ectodisplasia (EDA). Experimentalmente, la expresión de EDA, la activación de su receptor (EDAR) o su subsecuentemente activación de la señalización de NK- κ β mediada por EDAR permitirá el desarrollo del folículo piloso (Cui et al, 2006). EDA-EDAR es un componente temprano y necesario para la formación de placodas en todas las estructuras que derivan del ectodermo. EDAR es uno de los marcadores más tempranos de placodas formadas (Pispa y Thesleff, 2003) y su ligando es un activador de placodas (Mikkola, 2007). La expresión de LEF1 también induce la formación del folículo así como la expresión de Noggin, Factor de Crecimiento Transformante β 2 (TGF- β 2), TGF β R-II, integrina B1 y molécula de adhesión celular neural (NCAM). Factores de Crecimiento de Fibroblastos FGF1, FGF2, FGF4 y su receptor FGFR2 pueden también tener un papel inductivo en los folículos, esto basado en los estudios hechos con embriones de pollo y la promoción de la formación de plumas (referido en Vogt et al, 2008).

La interacción compleja entre activadores e inhibidores de la formación de folículos, y los respectivos reguladores de los activadores e inhibidores probablemente determinen la distribución de los folículos en la piel (Stenn et al, 2001).

1.3 ECTODISPLASINA (EDA)

La familia de ligandos de ectodisplasia presenta proteínas transmembrana triméricas tipo II con un dominio intracelular amino terminal corto; una región transmembrana; un gran dominio extracelular carboxilo terminal que contiene 19 repeticiones (G-X-Y) que media la trimerización del dominio de colágena al que también está unido y una interrupción seguida por el dominio homólogo a TNF (Figura 4) (Mikkola et al, 1999).

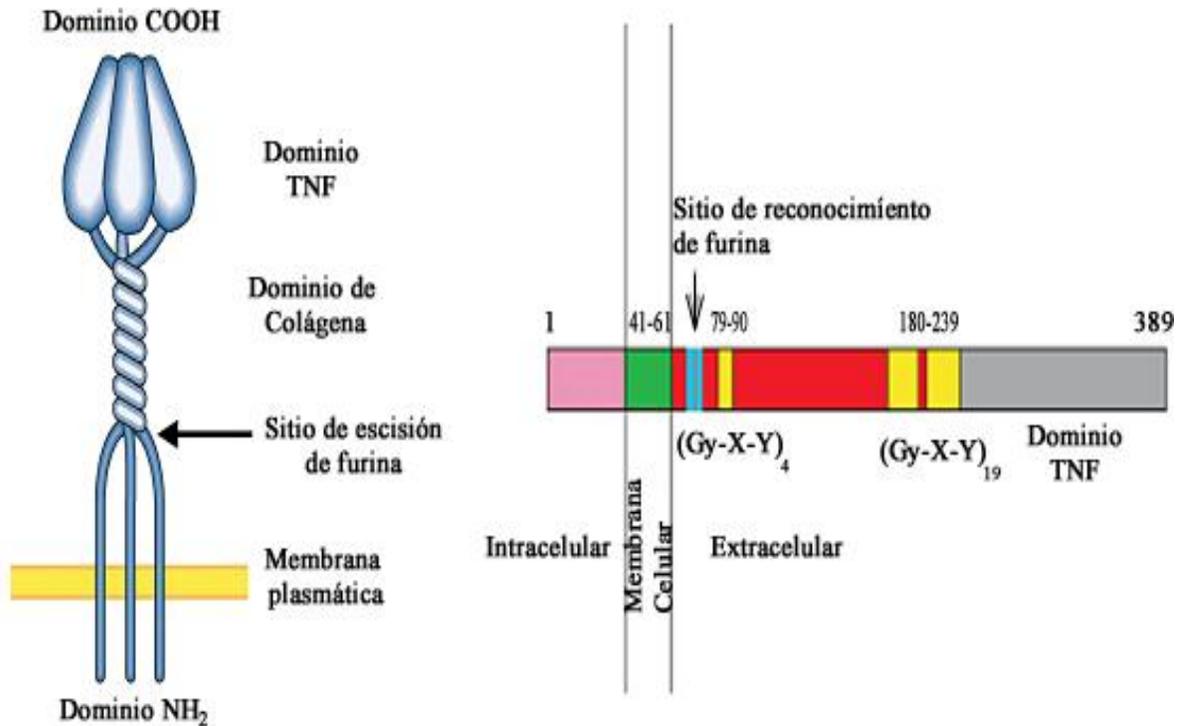


Fig. 4. Representaciones esquemáticas de la estructura de ectodisplasia (Modificada de Mikkola et al 2003, y Wisniewski et al, 2002 respectivamente)

Ectodisplasia es codificada por el gen EDA ligado al cromosoma X en el humano, su gen ortólogo en el ratón es el gen Tabby. El gen EDA es sometido a cortes alternativos extensos, produciendo varios transcritos, la isoforma original y la más corta es EDA-O, la más larga es EDA-A y otras isoformas más (EDA-B, -C, -D, -E, -F) (Bayes et al 1998). Todos los transcritos tienen el mismo primer exón que codifica para un dominio intracelular corto, un único dominio transmembrana y un dominio extracelular de 66 aminoácidos. El gen EDA está altamente conservado evolutivamente a través de la filogenia ya que EDA-A y sus contrapartes en el ratón poseen una homología de 94,6%. El gen Tabby del ratón también sufre corte alternativo y se han descrito las isoformas EDA-A,-B,-C (Srisvastava et al 1997).

Las dos isoformas funcionales de EDA son EDA-A1 Y EDA-A2 mismas que difieren solo por la presencia de dos aminoácidos adicionales en el motivo TNF (Yan et al 2000, Hymowitz et al, 2003) de manera que EDA-A1 contiene 391 aminoácidos y EDA-A2 solo 389. A pesar de esas diferencias estructurales mínimas, EDA-A1 y EDA-A 2 muestran muy alta especificidad con sus

respectivos receptores EDAR y XEDAR (Bayes et al, 1998, Yan et al 2000, Hymowitz et al 2003). Otras características que tiene EDA y que comparte con otros miembros de la familia TNF son que es una proteína de membrana tipo II glucosilada y oligomérica (Mikkola et al, 1999; Ezer et al, 1999). La diferencia más notable entre la ectodisplasina y otros TNF's es la presencia de dos regiones cortas ligadas a colágena en EDA, mismas que son requeridas para la actividad biológica de esta proteína (Bayes et al, 1998, Monreal et al, 1999).

La ruptura de EDA-A1/A2 por una enzima como furina permite la liberación del ligando EDA, una molécula extracelular soluble que posteriormente forma trímeros activos que son capaces de interactuar con sus correspondientes receptores y mediar las señales (Chen et al 2001, Elomaa et al, 2001). Los trimeros solubles de EDA inician la señalización de EDA por la unión a receptor EDAR (Yan et al, 2000). Fue demostrado que EDA A1 se une específicamente a EDAR y que no tiene afinidad por ningún otro miembro de la familia TNF (Yan et al, 2000). El dominio muerto de EDAR se une a su adaptador de señales citoplasmático EDARADD, éste se une al complejo TRAF6/TAK 1/TAB2 para activar el complejo IKK (Cinasa IκB)

1.3.1 Localización y expresión

EDA se expresa de manera diferencial en la membrana, ya que se encuentra en la superficie apical y lateral de las células, asociada con estructuras del citoesqueleto como filamentos de actina (Ezer et al, 1999). A través de análisis de expresión e inmunohistoquímica se encontró que EDA se localiza en la membrana de los queratinocitos y en los apéndices cutáneos, mientras que estaban ausentes en ratones Tabby donde EDA se ve afectada. (Ezer et al 1999; Elomaa et al 2001).

Elomaa y cols (2001) demostraron que la EDA es expresada en el desarrollo del epitelio y también en células en tejidos adultos. Durante el desarrollo de la piel, en la semana 20 de gestación, a través de estudios de hibridación *in situ* e inmunohistoquímicas, mostraron que tanto EDA como EDAR se expresaban en la epidermis, mientras que la dermis y el músculo liso no las presentaban. También mostraron que EDA estaba expresada en la epidermis mientras EDAR estaba restringida al peridermo (Figura 5). Sin embargo EDAR está asociado con las placodas que son las estructuras en donde se inicia la formación de los apéndices cutáneos (Elomaa et al, 2001). En contraste, en el desarrollo de piel murina, en los días 14/ 15 antes de la aparición de las placodas, la expresión llega a ser focalmente regulada de manera positiva y mantiene una expresión alta en las células epiteliales del folículo que están en contacto con la condensación dérmica que se encuentra en la base de la invaginación del folículo (Headon et al, 1999). Los patrones de expresión para EDA-A1 y EDA-A2 en el desarrollo de piel murina son diferentes en tiempo y espacio, lo que indica que estas dos isoformas pueden tener distintos papeles en el desarrollo (Yan et al, 2000).

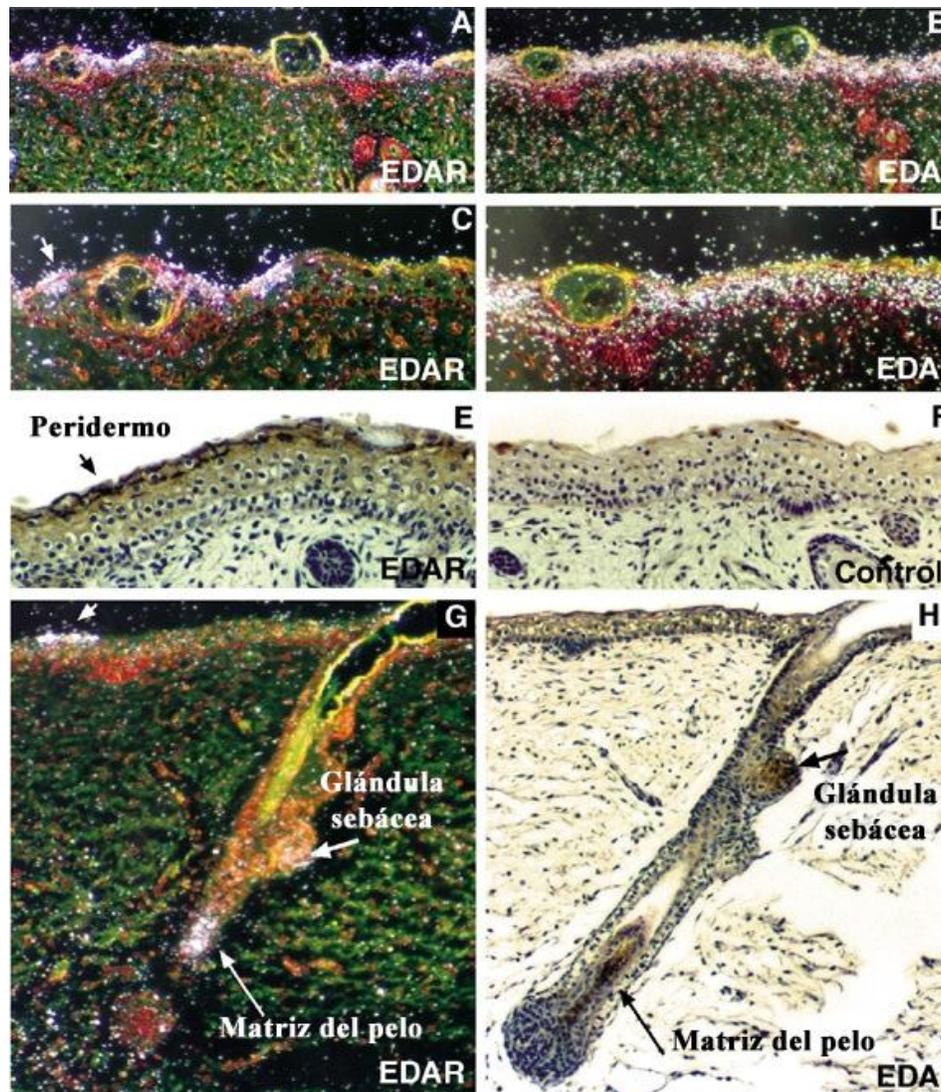


Fig. 5. Cortes histológicos de piel humana en la semana 20 de gestación, procesados mediante hibridación *in situ* e inmunohistoquímica para evidenciar la presencia de EDA y EDAR. En A) y C) se observa mediante hibridación la localización en el peridermo de EDAR, mientras que en B) y D) la localización de EDAR en la epidermis. En E) y F) se observa el mismo patrón de localización mediante inmunohistoquímica. En G) y H) se muestra con las mismas técnicas la localización de EDAR y EDA correspondientemente en el folículo piloso. (Modificada de Elomaa et al, 2001).

Aunque la expresión de EDA está distribuida ampliamente en la piel, su señalización es específica para el desarrollo de apéndices cutáneos porque EDAR y EDARADD están expresados únicamente en los apéndices cutáneos (Headon et al, 1999, Headon et al, 2001)

EDA es expresada en el epitelio del cuerpo y en los folículos pilosos durante el desarrollo embrionario, pero continúa también en la edad adulta, en apéndices cutáneos maduros (Kere et al, 1996; Bayes et al, 1999). Esta expresión de EDA en células epiteliales adultas podría ser sólo una expresión basal sin consecuencias funcionales o podría deberse a que EDA está involucrada en vías adicionales no relacionadas con el desarrollo de la piel. De manera alternativa, EDA podría participar también en vías de señalización implicadas en la regeneración continua de la piel adulta (Ezer et al, 1999).

1.3.2 Papel de EDA en el desarrollo

EDA regula la iniciación de la formación de apéndices cutáneos

El patrón regular del folículo piloso se origina como el resultado de una competencia entre la promoción de las placodas y las señales inhibitorias emergentes de la placoda o del mesénquima condensado (Mikkola et al 2006; Millar 2002). Mientras que los factores WNT y FGFs son considerados como activadores de la diferenciación de las placodas, las proteínas BMPs (en particular BMP2 Y BMP4) son generalmente consideradas como supresoras del destino placodal de pelo. Varios estudios han confirmado que EDA-A1/EDAR juegan un papel central como reguladores tempranos de la formación de placodas. En la ausencia de EDA las placodas de pelo primarios no se forman y consecuentemente la expresión de los marcadores de placodas está ausente (Laurikkala et al, 2002; Headon et al 1999).

Por otra parte, el exceso de EDA-A 1 hace a las placodas de pelo más grandes y causa su fusión entre sí tanto *in vitro* como *in vivo*. La expresión transgénica de EDA A1 está regulada por el promotor de queratina 14 (K14) que eleva considerablemente los niveles de EDA-A1 varios días antes de la aparición de los primeros folículos, aún cuando esto no cause la iniciación precoz del desarrollo del pelo (Mustonen et al, 2004). Las consecuencias de la sobre expresión de EDA son similares en muchos apéndices cutáneos y quizás los efectos de EDA son medidos por los mismos genes blancos en cada uno de los apéndices epiteliales.

Se ha demostrado que EDA también es esencial para la formación de glándulas submucosas en el tracto respiratorio en ratón (Grüneberg et al, 1971; Rawlins et al, 2005). Es de notar que pacientes con Displasias Ectodérmicas Hipohidroticas (HED) tiene un riesgo mayor de padecer enfermedades pulmonares debido a la carencia de glándulas mucosas en el tracto respiratorio, como se ha visto en modelos experimentales de perros (Casal et al, 2007). EDA tiene también participación en la inducción del desarrollo de glándulas sudoríparas y sebáceas. (Grüneberg et al. 1971; Cui et al. 2003; Newton et al. 2004, Mustonen et al. 2003)

Por otra parte, no se ha reportado que EDA-A2 tenga efectos en el desarrollo de los apéndices cutáneos (Mustonen et al, 2003; Zhang et al, 2003; Newton et al, 2004 ; Cui et al, 2003)

EDA en la morfogénesis

Análisis de embriones deficientes para EDA y EDAR indican que estas proteínas son esenciales en la morfogénesis del diente (Mikkola et al 2003). Se ha observado que EDA también regula el desarrollo de glándulas salivales submandibulares (Nordgarden et al, 2004; Jaskoll et al, 2003) y además regula la morfogénesis de las glándulas mamarias, en particular del pezón. En cerca del 30% de los pacientes varones con HED se observan anomalías de los pezones ya que se encuentran ausentes o hipoplásicos mientras que en las mujeres que padecen esta enfermedad tienen problemas para el amamantamiento debido a que las glándulas mamarias son hipoplásicas (Clarke et al, 1987)

EDA y su participación en la formación de la vaina del pelo y ciclo del pelo

Ratones deficientes de EDA presentan una estructura fina anormal de las vainas de todos los tipos de pelo indicando el papel de esta proteína en la formación del filamento del pelo.

EDA tiene una función específica en la producción de pelos “zigzag” en el ratón. La señalización de EDA junto con la de WNT controla la asimetría molecular y morfológica de los folículos pilosos de pelos zigzag y la formación de la vaina del pelo (Hammerschmidt et al, 2007).

La relación entre los tipos de pelo murinos y humanos no es clara [Schlake, 2007]. Sin embargo, ahora es evidente que EDA está involucrado en variaciones normales de la morfología del cuero cabelludo en humanos. Estudios recientes han revelado el papel de EDA en el ciclo del pelo. Análisis de expresión indican que los componentes de la vía de EDA fluctúan durante el ciclo del pelo de tal manera que están más expresadas en la fase anágena tardía y la fase catágena temprana. Por otro lado, la pérdida de EDAR y su inhibición farmacológica resulta en una considerable aceleración de la catágena [Fessing et al, 2006].

La entrada a la fase catágena está retrasada por varios días en los ratones que sobre expresan EDA A1 [Mustonen et al, 2003]. Lo anterior sugirió que los efectos de EDAR podrían al menos en parte, estar mediados por su habilidad de regular la expresión de la proteína Inhibidora de apoptosis ligada a cromosoma X (XIAP) [Fessing et al, 2006].

1.3.3 Estudios experimentales con EDA

El papel de EDA-A1 durante el desarrollo de apéndices cutáneos es muy claro ya se tiene identificado el fenotipo de las mutaciones en alguno de sus componentes de la su señalización. A continuación se enlistan algunos de estos trabajos.

Srivastava y cols [1997], estudiaron las consecuencias de la expresión de EDA-A1 *in vivo* en un modelo de ratón, generando una línea de ratones transgénicos que tuvieran un transgen que codificara para la isoforma EDA-A1. La expresión de EDA-A1 en machos “Tabby” resultó en la restauración del crecimiento del pelo, crestas dermales y glándulas sudoríparas, así como un efecto positivo en el desarrollo de diente ya que aunque no se corrigió la forma ni el tamaño, si lo hizo con el número de molares.

Mustonen y cols [2004], analizaron la formación y la morfología de placodas usando modelos *in vivo* e *in vitro* en donde tanto el tiempo de exposición como la dosis aplicada de EDA-A1 fueron variadas. En embriones transgénicos que sobre expresaban EDA-A1 bajo el promotor queratina 14, las placodas de pelo fueron agrandadas y fusionadas y se desarrollaron placodas extras de la lámina dental y de la línea mamaria por lo que promovió un destino placodal en el desarrollo de glándulas mamarias, dientes y en la primera onda de folículos pilosos en el ratón; sugiriendo que EDAR tiene una función similar durante las etapas tempranas del desarrollo de la mayoría de los apéndices cutáneos. Mientras que en la piel embrionaria de día 13 expuesta a la proteína recombinante EDA-A1 se estimuló el crecimiento y también la fusión de las placodas detectando que este aumento de tamaño estaba en proporción directa a la dosis administrada a los explantes. En este último caso EDA-A1 estimuló un destino placodal sobre el destino interfolicular. En ninguno de los dos casos, se aceleró la iniciación de los folículos pilosos, ya que EDA-A1 no puede cubrir el requerimiento necesario de la primera señal dérmica que se presenta en la morfogénesis del pelo, de manera que aunque EDA-A1 no regule la inducción primaria de las placodas epiteliales, si tiene un papel clave en los pasos siguientes, como en la expansión de las placodas.

Gaide y Schneider [2003], administraron la proteína EDA recombinante en diferentes tiempos durante el desarrollo y después determinaron el grado del rescate de fenotipo en animales adultos. Hicieron un tratamiento en ratones “Tabby” preñados con EDA-A1 recombinante generada de tal modo que fuera capaz de cruzar la barrera placentaria y para rescatar el fenotipo “Tabby en la progenie, así que hicieron que la proteína recombinante contuviera el

dominio que se une al receptor de EDA y lo fusionaron con el Carbono terminal del dominio Fc de IgG1. El complejo fue administrado intravenosamente al ratón "Tabby" preñado en los días 11, 13 y 15. Los efectos de la exposición de Fc:EDA-A1 durante la embriogénesis persistían a través de la edad adulta. El mismo complejo pero con EDA-A2 no tuvo efectos en la reversión del fenotipo Tabby. No obstante, se evaluó el efecto si se administraban las dos isoformas juntas, quizás EDA-A2 tenía sinergia con EDA-A1, pero no hubo evidencia de rescate.

El tratamiento con Fc-EDA-A1 fue incapaz de rescatar dos rasgos característicos del ratón "Tabby": la composición anormal del pelo y la presencia del tercer molar que los ratones Tabby no tienen. La administración de EDA-A1 también se realizó después del nacimiento, sin embargo la administración de EDA efectuada a mitad de la gestación muestra un rescate más amplio de los fenotipos mutantes que el tratamiento que se hace postnatalmente.

Gaide y Schneider (2003), encontraron que el periodo crítico en el cual la acción de EDA es necesaria para producir un apéndice particular generalmente es el mismo el tiempo en el cual el desarrollo de esta estructura es iniciada normalmente, de esta manera la secuencia de los eventos en el desarrollo que permiten el tratamiento exitoso de los ratones "Tabby" con Fc:EDA-A1 es conservado en esencia con el de humano.

Cui y cols (2009), también estudiaron el tiempo de acción en el desarrollo de apéndices, pero con una perspectiva diferente, ellos usaron un ratón Tabby en el cual el único recurso de EDA es un transgen que puede ser prendido y apagado por la administración de tetraciclina, encontrando que EDA-A1 restauraba las glándulas sudoríparas y los cuatro tipos de pelo presentes en el ratón, pero siempre y cuando EDA-A1 fuera activado en el tiempo adecuado: día embrionario 17 para pelo "guard", 19 para "awl" y el 18 para "zigzag" y "auchen". La señalización de EDA-A1 en tiempos específicos es suficiente para la determinación de los subtipos, la iniciación, la progresión del pelo pero no para la maduración de los folículos pilosos ni las glándulas sudoríparas. Por otro lado se ha observado que los folículos secundarios necesitaban concentraciones altas de EDA-A1 para diferenciarse y crecer. Además también se ha demostrado que la acción de EDA define la estructura del apéndice, en el caso del pelo puede modular el grosor del pelo y la forma de su fibra en folículos pilosos adultos. Por lo tanto, la concentración y el tiempo en el que EDA debe estar presente tienen efectos significativos en el fenotipo externo.

Mustonen y cols (2003) trabajaron con ratones transgénicos que sobre expresaban EDA-A1 Y EDA-A2 introduciendo al gen mediante un vector y utilizando enzimas de restricción, en donde el fragmento de ADN de EDA-A1 y EDA-A2 se integra al DNA del ratón en el promotor de K14. Por principio de cuenta la sobreexpresión de EDA-A2 no causó ningún fenotipo detectable. En contraste la sobre expresión de la otra isoforma provocó dientes y glándulas mamarias extras, algo que no se había reportado antes en este tipo de ratones. En cuanto al pelo, su composición y estructura fue anormal, y su ciclo fue alterado haciendo que la fase anágena fuera más prolongada de lo común. El pelo y las uñas fueron más largos de lo normal, los dientes tenían una forma alterada y la formación del esmalte en los incisivos se vio dificultada. Con respecto a las glándulas, las sudoríparas fueron estimuladas en su función y las sebáceas se observaron aumentadas de tamaños.

1.4 RECEPTOR DE ECTODISPLASINA A1 (EDAR)

La familia de Receptores de Factor de Necrosis Tumoral (TNFR) está presente en todos los linajes celulares, se conocen al menos 30 miembros de esta familia en genomas de mamíferos (Locksley et al, 2001). Esta amplitud está relacionada con la adquisición de funciones en novedades evolutivas de vertebrados, tales como las adaptaciones del sistema inmune, hueso, glándulas mamarias y los apéndices cutáneos (Locksley et al, 2001). La familia de TNFR puede ser clasificada de dos formas, por la similitud de las secuencias en los dominios de unión de ligando extracelulares de sus receptores, o bien, de acuerdo a su modo de señalización el cual está relacionado con la presencia o la ausencia de dominios de muerte intracelularmente. Algunos miembros de esta familia de receptores, entre ellos, EDAR, contienen “dominios de muerte” celular (estos dominios son capaces de inducir apoptosis) en el carbono terminal que les ayuda a reclutar una proteína adaptadora a esta región (Wajant, H., 2003) que a su vez se unen a miembros de la familia de los TRAFs (Factor Asociado a Receptor TNF) que transducen las señales. La mayoría de los TNFRs no contienen un “dominio de muerte” e inician la señalización por el reclutamiento de TRAFs directamente a su región citoplasmática (Inoue et. al, 2000). El receptor de Ectodisplasia A1 y otros dos receptores estructuralmente similares, como: XEDAR y TROY, son miembros de dicha familia de receptores (Mikkola 2003).

Estructuralmente, los receptores de TNF son proteínas de membrana tipo I comprometidas con ligandos triméricos (Bash, 1999), con un dominio de unión ligando extracelular, una región transmembranal simple y una región citoplasmática con funciones celulares activas. La homología en la secuencia es significativa y es detectada dentro del dominio extracelular que consiste de 1-6 repeticiones de 40 residuos en cisteínas (Orlinick et al, 1998). La activación de los receptores de TNF a través de la trimerización de ligando inducido permite respuestas pleiotrópicas incluyendo sobrevivencia celular, proliferación, diferenciación o incluso muerte celular. Dichos eventos son iniciados por el reclutamiento de proteínas adaptadoras intracelulares (TRAFs), que eventualmente conducen la activación del factor nuclear κ B (NF κ B) (Koppinen et al, 2001)

EDAR es una proteína con 448 aminoácidos que está conformado por un péptido señal amino-terminal, un dominio extracelular maduro de 159 aminoácidos que consiste en un dominio rico en cisteína con 14 residuos de este aminoácidos (en donde su ligando extracelular se une a la región amino terminal), seguidos por una región única transmembranal simple y un dominio intracelular carboxi-terminal de 277 aminoácidos. El dominio intracelular de EDAR contiene un dominio de muerte (Figura 6) (Headon, et al, 1999).

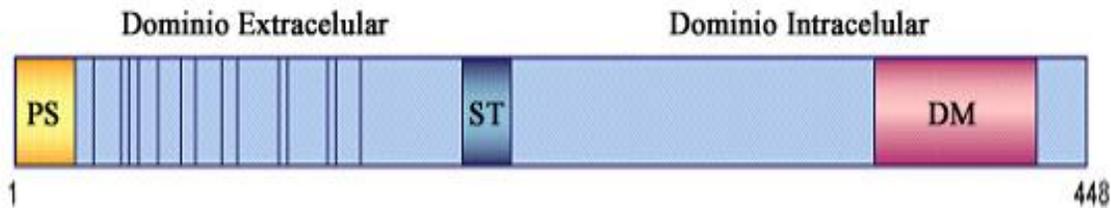


Fig 6 Estructura de EDAR, nótese la péptido señal (PS), el dominio extracelular, la secuencia transmembrana (ST) y la región intracelular incluyendo el dominio de muerte (DM) (Modificada de Headon et al, 1999).

El dominio de unión a ligando es más similar a un miembro de la superfamilia TNF recientemente identificado como TNFRSF19 también llamado TAJ o TROY (Orlinick et al, 1998, Kojima et al, 2000, Eby et al, 2000). Interesantemente, el patrón de expresión de TROY es muy similar a EDAR en el desarrollo de la piel (Kojima et al, 2000). Los dominios intracelulares son conservados en menor grado. Sin embargo, un número de TNFR's contienen un dominio de aproximadamente 80 residuos cercanos a Carboxi - terminal llamado dominio de muerte (Orlinick et al, 1998).

1.4.1 Localización

Bajo inmunofluorescencia, muchos miembros de la familia de receptores de TNF son apenas detectados en la membrana plasmática, sin embargo con citometría de flujo, que es un método sensible, es fácil detectarlo en la superficie celular. Koppinen y cols (2001) encontraron que EDAR es principalmente localizado en estructuras intracelulares. La importancia de que EDAR sea intracelular permanece desconocida. Quizás podría actuar como un reservorio del cual el receptor puede ser expuesto a la superficie celular de manera regulada.

1.4.2 Funciones

Los miembros de TNFR tienen una participación en la inmunidad, inflamación y muerte celular, sin embargo también se cree que puedan mediar la morfogénesis del folículo piloso (Bash, 1999).

EDA y EDAR son la primera pareja TNF/TNFR conocida en regular la morfogénesis embrionaria. Sin embargo es muy poco lo conocido acerca de las funciones de los TNF durante la organogénesis (Koppinen et al, 2001).

EDAR es uno de los marcadores más tempranos en cuanto a la formación de las placodas y su señalización regula el destino placodal de las células, promoviendo (Mustonen et al, 2004). EDAR también se ha descrito en la formación de plumas (Drew et al, 2007).

Los receptores de TNF con “dominios de muerte” son a menudo capaces de inducir la muerte celular ya sea porque recluten directa o indirectamente a otras moléculas adaptadoras promotoras de muerte, como FADD. Sin embargo EDAR no se une a FADD ni a TRADD (Yan 2002; Kumar et al, 2001), ni tampoco se ha estudiado si EDARADD (molécula adaptadora del receptor de EDA asociada a los dominios de muerte) tiene la habilidad para reclutar estas dos moléculas. Lo que si se ha estudiado aunque con resultados no concluyentes, es acerca de la habilidad de EDAR a inducir la muerte celular en células transfectadas (Kumar et al, 2001). Dado que los pacientes con HED y los ratones transgénicos correspondientes presentan la ausencia completa de los órganos afectados o bien, su desarrollo es hipoplásico; es más plausible que la función fisiológica de EDAR sea más bien aumentar la sobrevivencia que promover la muerte celular (Koppinen et al 2001, Yan et al, 2000) Durante el desarrollo temprano del folículo piloso, sólo pocas células apoptóticas han sido detectadas. (Schmidt-Urllrich et al, 2001) y no se han visto localizadas en sitios en donde se sepa que se exprese EDAR. Sin embargo, se ha detectado un aumento en la apoptosis en el desarrollo de folículos piloso de los ratones transgénicos $I\kappa\beta\alpha$ que son miméticos con el fenotipo “Tabby”/”downless” (Schmidt-Urllrich et al, 2001)

Por otro lado, Mustonen y cols (2003) reportaron la formación de placodas de pelo más grandes y fusionadas cuando estimulaban la señalización de EDAR a través de la aplicación de EDA-A1 recombinante en cultivos de piel embrionaria murina.

1.4.3 Mutaciones en EDAR

El descubrimiento del gen *dl* se remonta a los estudios de Sofaer (1969), quien evidenció que las mutaciones localizadas en dos *loci* de cromosomas diferentes en ratón, eran designados como “downless” (*dl*) y “crinkled” (*cr*) provocando las mismas anomalías de dientes y pelos como los ya observados en ratones “Tabby”. Posteriormente, Headon et al, 1999 y Monreal cols. 1999 quienes identificaron que el gen “downless” (*dl*) codificaba un nuevo receptor perteneciente a la familia de TNF. El genotipo mutante y el patrón de expresión *dl*, sugieren que este gen codifica un receptor de superficie celular involucrado en la inducción al destino folicular y responsable de la diferenciación del diente y folículos pilosos. Su ligando posiblemente es producto del gen “Tabby” (*Ta*). Estos resultados soportan la hipótesis de que la proteína downless es el receptor de ectodisplasina (EDAR). Otros estudios por diversos grupos han verificado que EDA-A1 y EDAR interactúan físicamente (Yan et al, 2000; Elomaa et al, 2001; Tucker et al, 2000, Kumar et al, 2001).

Monreal y cols. (1999) aislaron y caracterizaron el gen homólogo humano al gen *dl*, designado gen DL o EDAR, encontrando una similitud del 91% con la proteína producto del gen murino *dl*. También demostraron que el gen DL se localizaba en el cromosoma 2q11-q13. El análisis estructural del gen mostró la presencia de 12 exones y sus secuencias intrónicas adyacentes. Se encontró similitud en las secuencias al dominio muerto de la familia de receptores TNF. El producto del gen DL es un receptor capaz de unirse a EDA 1 y sus mutaciones son responsable de los síntomas clínicos de las formas autosomales de las displasias ectodérmicas. (Wisniewski et al, 2002) y en condiciones similares en ratones (Rögemüller et al, 2003).

Los síntomas típicos de HED son la falta o el escaso pelo (atricosis o hipohidrosis), la falta de dientes (anodontia o hipodontia) o la malformación de éstos, y la ausencia o la reducida presencia de glándulas sudoríparas (anhidrosis o hipohidrosis) (Figura 7). Los rasgos clínicos característicos incluyen también la resequedad de la piel, ojos, vías respiratorias y membrana de la mucosa presumiblemente debido al desarrollo defectuoso de varias glándulas exócrinas como las sebáceas, salivales, de Meibomio y lagrimales (Reed et al, 1970). No obstante, la HED puede estar asociada con anomalías craneofaciales características y defectos en las uñas y ocasionalmente con la ausencia de pezones. La HED afecta el cuero cabelludo y el pelo corporal pero no el vello facial y púbico (Bash, 1999).

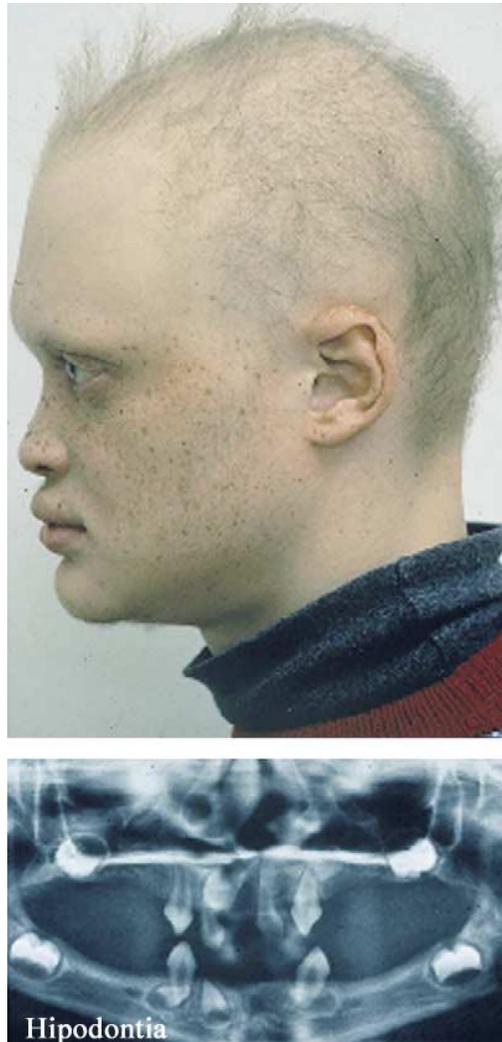


Fig 7. Características fenotípicas de HED. Nótese el pelo escaso y la falta de dientes en los pacientes con esta enfermedad. [Modificada de Mikkola et al, 2003]

Existen 4 ratones mutantes con similitudes fenotípicas a las que muestra HED descritos a mediados de los 90´s. [Falconer 1952] El mutante “Tabby” está relacionado a una mutación en EDA, el ratón downless a EDAR en el *locus* recesivo, ratón “Sleek” en donde EDAR está afectado en el *locus* dominante. [Headon et al, 1999]. Similarmente, mutaciones en humanos de EDAR pueden causar ambas formas de HED , la recesiva y la dominante [Monreal et al, 1999]. El mutante “crinkled” muestra alteraciones en EDARADD [Headon et al, 2001]. Las mutaciones en estos tres genes en humanos causan los mismos defectos que en ratones.

Son pocas las mutaciones en EDAR que puedan presentarse en pacientes con HED, la mayor parte son originadas por su ligando, EDA, causando la forma más común de HED siendo la forma más recurrente de aproximadamente 150 displasias ectodérmicas congénitas distintas clínicamente [Pinhero et al, 1994], la cual se presenta más frecuentemente en hombres por ser ésta ligada al cromosoma X [Mikkola et al, 2008].

Sin embargo además de HED, Schmidt y cols [2006] reportaron que la mutación en el gen EDAR causa la detención de la formación de la placoda en el estado de desarrollo de pre-placoda (p0-p1) durante la embriogénesis murina, en donde el desarrollo del folículo está dividido en ocho distintas etapas (Schmidt-Ullrich y Paus, 2005) y la etapa 1 se caracteriza por la aparición temprana de placodas, un grupo de queratinocitos que se rearreglan en la epidermis para dividirse e irse invaginando en el mesodermo y propiciar las siguientes etapas para finalmente formar el folículo (Paus et al, 1999).

1.3.4 Señalización de EDAR

La señalización por los receptores de TNF permite respuestas pleiotrópicas dependiendo del tipo celular y de otras señales que las células reciban, sin embargo el resultado común es la activación del factor de transcripción NF-κB (Figura 8). La señal de EDAR permite la activación del factor de transcripción NF-κB, su translocación al núcleo y modulación de su actividad de los correspondientes genes blanco (Bodemer et al, 2002). Existe evidencia *in vivo* que apoya la importancia de la activación de NF-κB en la traducción de la señalización EDAR, por ejemplo Schmidt-Ullrich 2001, en sus ensayos *in vivo* sugieren que la señalización EDAR es mediada en mayor medida, si no es que totalmente, por NF-κB. También Mikkola [2008] sugiere que la activación del factor de transcripción NF-κB es necesaria para la señalización de EDAR *in vivo* y que la señal correcta de NF-κB es esencial para el desarrollo de apéndices cutáneos. Varios estudios *in vitro* han demostrado la capacidad de EDAR para activar el factor de transcripción NF-κB (Mikkola et al, 2003; Cui et al, 2006). Por otro lado, Koppinen y cols [2001] demostraron que EDAR es capaz de activar NF-κB en una manera dosis dependiente.

La mayoría de los estudios en la transducción de señal de EDAR se han enfocado en su capacidad de activar NF-κB, y la participación de otras vías han permanecido en gran parte inexploradas. Sin embargo es posible que EDAR active otras vías y no sólo a la de NF-κB en algunas líneas celulares transfectadas (Kumar et al 2001) así como en explantes de piel embrionarios cultivados (Mikkola datos no publicados).

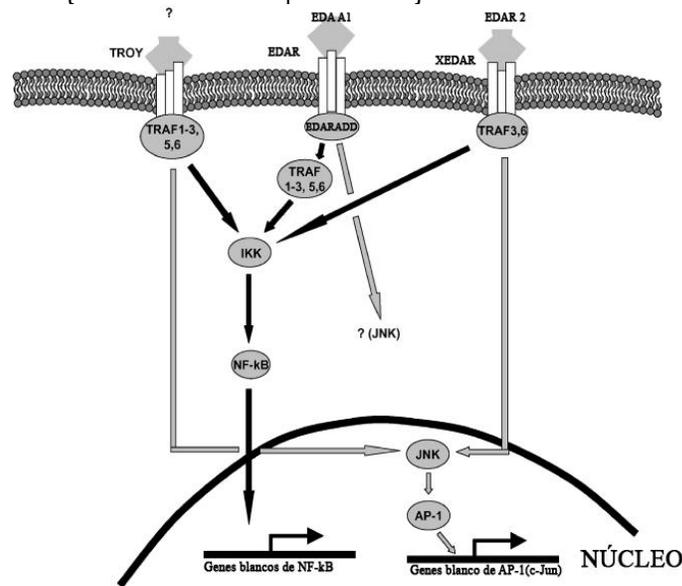


Fig 8. Participación de las moléculas en la vía de señalización, y la activación común de NF-κB [Modificada de Botchakarev et al, 2005]

Cuando EDAR falla su unión directa a algunos de los TRAFs, utiliza una molécula adaptadora exclusiva llamada EDARADD (en ratón, codificada por el gen “crinkled”) que se une al “dominio de muerte” del receptor permitiendo la transducción de la señal (Headon 2001, Yan 2002). EDARADD, por su parte, es una proteína de 208 aminoácidos conformada por una secuencia consenso amino terminal y una dominio de muerte celular asociada al extremo carbono terminal que se une a TRAF. EDARADD interactúa con TRAF 1-3, posiblemente con TRAF 5 y 6, pero no con TRAF 4 (Headon et al, 2001, Yan et al, 2002) (Figura 9). No ha sido publicado ningún patrón de expresión de moléculas TRAF durante el desarrollo de órganos ectodérmicos, y sólo la expresión de TRAF6 está involucrada en el desarrollo de folículos pilosos (Naito, 2002) aunque aún no es claro si todos o sólo algunos de estos adaptadores son utilizados *in vivo*.

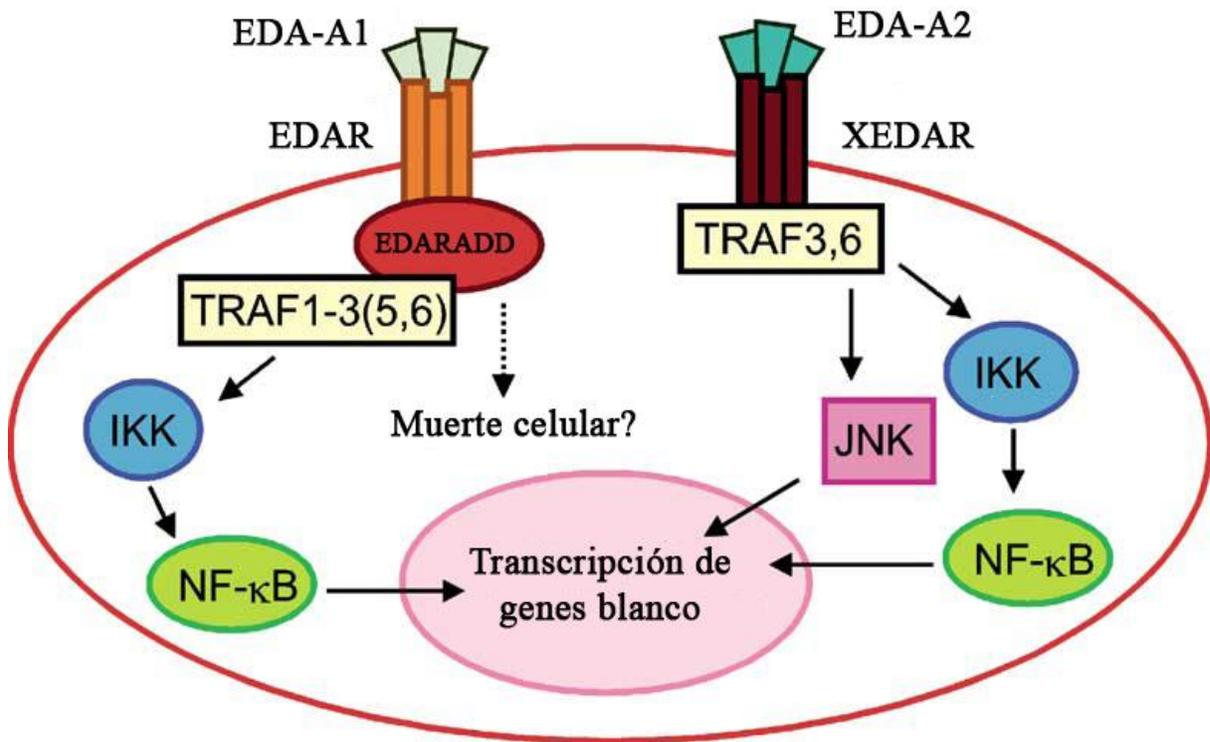


Fig 9. Patrón de transducción de señales de EDAA1 Y EDA A2. EDA A1 se une con EDAR formando un complejo que contiene a EDARADD y a miembros de la familia de los TRAF permitiendo la activación de NF-κB [Modificada de Mikkola et al, 2003].

Botchkarev y Fessing (2005) han mostrado la importancia de la correcta concentración y el tiempo de la señalización de EDAR durante la morfogénesis de la piel y sugieren que los defectos genéticos en la señalización de EDAR pueden ser corregidos efectivamente por la administración del ligando en el tiempo apropiado durante la embriogénesis.

La señalización de EDAR juega un papel crítico en la red de señales moleculares que regulan el desarrollo de apéndices cutáneos (Mikkola y Thesleff 2003) ya que EDA es la única molécula de la familia de TNF que junto con su receptor EDAR es necesaria para el desarrollo normal de órganos ectodérmicos tanto en humanos como en ratones (Mustonen et al, 2004).

La señalización de EDAR también está involucrada en el control de la decisión del destino celular en la epidermis embrionaria, así como en la regulación de los programas de diferenciación celular en el folículo piloso. Los efectos de la señalización de EDAR en el desarrollo del folículo piloso muestran una estricta dependencia espacio-temporal, y también sorprendentemente dependiente de la cantidad de ligando biológicamente activo en la cercanía con las células blanco. Headon y Overbeek (1999) estudiaron los patrones de expresión de dl en embriones de ratones a través de hibridación *in situ* y sugirieron que la señalización de EDAR es requerida en los estados más tempranos de la inducción del folículo piloso y puede ser responsable para recibir la señal inductiva del folículo piloso inicial.

Mustonen y cols (2003) estudiaron ratones transgénicos para EDA A1 y sugirieron que la señalización EDAR incrementada dentro del ectodermo es suficiente para la iniciación de no solo los dientes sino también de otros apéndices ectodérmicos. La señal de EDAR regula negativamente la inhibición lateral del destino placodal en las células vecinas. Mustonen y cols. sugieren que la señalización de EDAR regula el delicado balance entre activadores e inhibidores de la formación de placodas.

1.4.5 Patrones de expresión EDA-EDAR

La expresión de EDA y EDAR ha sido analizada a detalle durante el desarrollo del pelo murino. En general EDA y EDAR están restringidos a las células del ectodermo, y EDARADD fue detectado en las mismas células que EDAR (Headon et al, 2001). Mikkola y cols 2003 observaron en ratones que durante el desarrollo temprano, EDA y EDAR son expresadas en bajos niveles en el ectodermo embrionario antes de cualquier evidencia microscópica del desarrollo de apéndices cutáneos (Mikkola et al, 2003). Sin embargo, tan pronto como el primordio de algún apéndice emerge, en el desarrollo del pelo murino, en el día 14, EDAR se ve restringido en las placodas, mientras que EDA muestra una expresión complementaria en el epitelio adyacente (Laurikkala et al, 2001, Kumar et al, 2001). Estudios realizados mediante hibridación *in situ* revelan que solo EDA-A1 es expresada en la epidermis temprana y EDA-A2 no es detectada hasta el día 17 (Yan et al, 2000), sugiriendo que la señalización de EDAR es requerida para la formación de placodas. Laurikkala y cols (2002) mediante la misma técnica encontraron transcritos de EDA y EDAR en el ectodermo de embriones murinos entre los días 11-13, no obstante la expresión de EDAR a partir del día 15 muestra ser intensa sólo en las células epiteliales basales que forman la placoda.

Durante los estados tardíos de desarrollo del pelo, EDA A1 y EDAR están colocalizadas en la región del bulbo, particularmente en la base de la matriz que es altamente proliferativa (Mikkola et al, 1999; Yan et al, 2000; Laurikkala et al, 2002), la cual contiene células precursoras que proliferan para todos los tipos de células de la propia vaina del pelo (Millar et al, 2002). Además, EDA-A1 es detectada en la epidermis folicular (Yan et al, 2000) lo cual concuerda con su papel en la iniciación de los folículos del pelo en ratón tipo "zigzag" y "auchene". EDAR es expresada en las placodas y en el bulbo de los folículos en todos los tipos de pelo del ratón.

Aunque no existen estudios desarrollados en otros apéndices cutáneos, con excepción de folículo piloso y diente, EDAR ha sido detectado en glándulas salivales, mamarias y lagrimales la cuales son defectuosas en los ratones "Tabby" / "downless". EDAR también se ha localizado en varios órganos que no se ven afectados en estos ratones. Es de notar que EDA es expresado en grandes concentraciones en la hipófisis anterior (Mikkola et al, 1999) pero no EDAR.

Con relación a estudios EDA-EDAR en el desarrollo fetal humano, éstos son pocos y dispersos. Kere y cols (1996) y Bayes y cols. (1998) mediante análisis por Northern blott revelaron la expresión de EDA en piel, corazón, cerebro, pulmón, hígado, intestino delgado y riñón y Monreal (1999) de EDAR en el pulmón e hígado. La expresión *in situ* de EDA en el desarrollo de la piel con sus apéndices asociados concuerda con lo que se encontró en ratones (Montonen et al, 1998). También se ha detectado la expresión de EDA en neuronas, neuroglia, osteoblastos de costillas y huesos de la bóveda craneana, así como en el desarrollo del timo, esófago y túbulos contorneados renales. (Montonen et al, 1998). Desafortunadamente, no existen reportes de la expresión de EDAR en los mismos tejidos.

La información sobre la expresión de EDA en adultos es escasa. Sin embargo, análisis realizados por Northern blott han revelado la expresión de EDA en corazón, riñón y páncreas, así como una expresión débil en cerebro, placenta, pulmón, hígado y músculo esquelético (Kere et al, 1996). Esto concuerda con los análisis realizados en ratón (Srivastava et al, 1997). Por otro lado, con métodos más sensibles como el PCR-RT se ha observado una expresión de EDA prácticamente en todos los tejidos mencionados (Bayes et al, 1998). Mediante análisis *in situ* se demostró que en adultos la expresión es principalmente epitelial. La expresión de EDA ha sido estudiada en pocos casos patológicos. Su expresión es menos abundante tanto en tumores de piel malignos como benignos, así como en cáncer de próstata y mama (Montonen et al, 1998). La expresión de EDAR no ha sido analizada ni en ratones ni humanos adultos (Mikkola et al, 2003).

1.4.6 Regulación de EDAR

No se conoce hasta el momento las señales reguladoras de la expresión de EDAR en el ectodermo temprano antes de la formación de las placodas pero en experimentos de cultivo de explantes de tejidos murino indican que la señal de activina βA estimula la expresión de EDAR en las placodas del pelo y del diente (Houghton et al, 2005; Mou et al, 2006). La activina no induce la expresión de EDAR en ectodermo aislado, pero en presencia de mesénquima, provoca una regulación positiva de EDAR en la formación de placodas (Laurikkala et al, 2001, Laurikkala et al, 2002).

La activina es expresada en el mesénquima subyacente a las placodas del pelo y la supresión de su función en ratones produce una detención en el desarrollo del pelo (Matzuk et al, , 1995). EDAR no parece ser regulado por su propia señalización porque se presenta en los folículos pilosos de los ratones "Tabby" (Laurikkala 2001, 20002). También, la expresión de EDA es normal en el diente de ratones "downless" indicando que EDA no está regulada por la señalización de EDAR (Tucker et al, 2000).

La activina βA puede inducir la expresión de EDAR en placodas que recién estén emergiendo *in vitro* mientras que BMP4 las regula negativamente en el epitelio adyacente de tal modo que restringe su expresión a las placodas que se forman (Laurikkala et al, 2002, Mou et al, 2006). La activina βA y BMP4 son expresadas en el lugar y tiempo correctos para participar críticamente en el desarrollo del diente y del pelo, no obstante es claro que pueden estar involucradas otras señales. EDAR puede también regular positivamente su propia expresión mediante la unión con su ligando, EDA, y en ausencia de este ligando EDAR no es sobre expresado (Figura 10) (Mou et al, 2006).

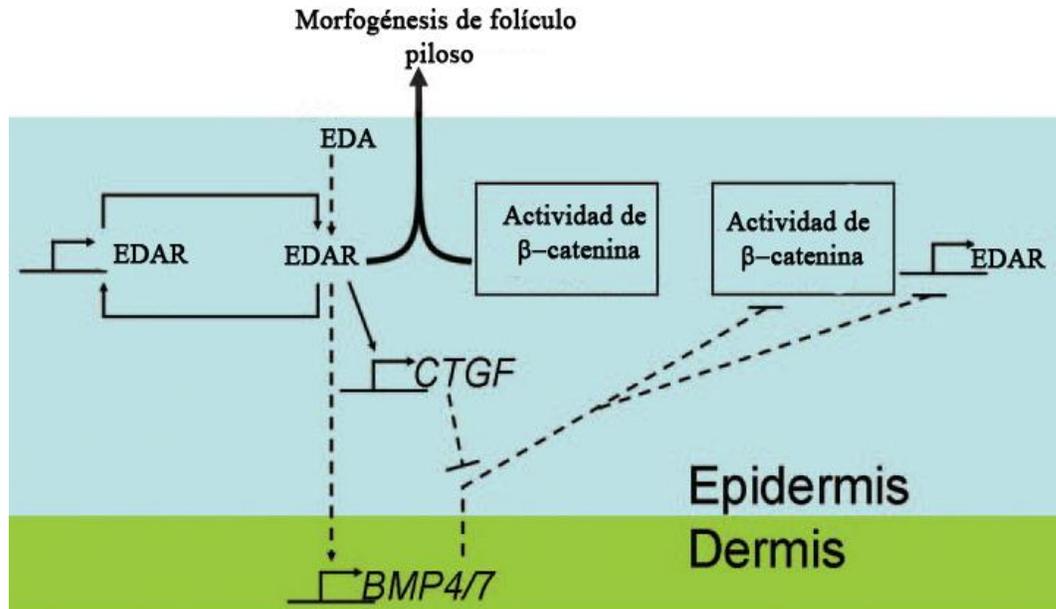


Fig 10. Esquema que propone las interacciones moleculares que generan los folículos pilosos primarios (Modificada de Mou et al, 2006).

1.4.7 EDAR en el ciclo del pelo

Se ha especulado mucho sobre el papel que tiene la señalización de EDAR en el desarrollo de los folículos pilosos, se ha observado que un aumento en su señalización permitiría el rescate parcial en el fenotipo "Tabby" y alteraría el destino celular en la epidermis embrionaria, además se implica en la regulación de diferenciación celular durante la morfogénesis del folículo (Mikkola et al, 2003).

Sin embargo, poco se conoce acerca de la participación de la señalización de EDAR en el control del ciclo del folículo post-natal. Mustonen (2003) realizó estudios con ratones transgénicos que sobre expresaban EDA-A1 bajo los promotores de queratina 14, y observó que la primera fase anágena era prolongada, por lo que propuso que la señalización de EDAR podría jugar un papel en el control del ciclo del pelo post-natal, aparte de su papel ya conocido en la morfogénesis del folículo piloso (Fessing et al, 2006), han sugerido de manera sólida que la duración y la magnitud de la señalización de EDAR son importantes para el propio control de la diferenciación celular en el folículo piloso y para la formación de la vaina del pelo. Ellos mencionaron que la expresión del RNAm de EDAR es dependiente a la fase del ciclo del pelo, esto es, en la fase anágena se expresa en la matriz y en las vainas interna y externa de la raíz, mientras que en la fase catágena sólo se expresa en la vaina interna y externa. En ratones "downless", con defecto en este receptor, la apoptosis en la fase catágena se incrementa y la proteína inhibidora de apoptosis ligada a X (XIAP) disminuye su expresión, lo que sugiere que EDAR también es requerida para el propio control del ciclo del pelo postnatal por la regulación de apoptosis en los queratinocitos durante la fase catágena y que su señalización juega un papel importante en la regeneración cíclica de los folículos post natales, ya que cuando EDAR se encuentra inhibido, la fase catágena se acelera y la apoptosis aumenta en el folículo piloso.

1.4.8 EDAR en la evolución

Información en mamíferos, peces y aves, indican que la secuencia de EDAR así como su función esta conservada en toda la clase de vertebrados (Kondo et al, 2001, Houghton et al, 2005, Cui et al, 2006), de manera que tanto EDA como EDAR están expresados y activos en todos estos linajes. Schmidt-Ullrich y cols (2006) demostraron que en vertebrados, la señalización EDA A1/EDAR/ NF-κB es necesaria para el desarrollo y formación de apéndices cutáneos y por ende es un vía evolutivamente conservada por lo que el desarrollo de pelo y dientes en mamíferos, las plumas en aves, y las escamas en peces involucran la misma vía TNF (Mikkola et al, 2008).

Dado el progreso de la genómica comparada y la genética, los genes EDA, EDAR Y EDARRADD descubiertos inicialmente en pacientes y modelos experimentales de ratón, han sido encontrados altamente conservados en otros vertebrados como, peces, ranas, pollo, perros, ganado y chimpancé. En la figura 10 se puede apreciar la similitud de secuencias en distintas especies.

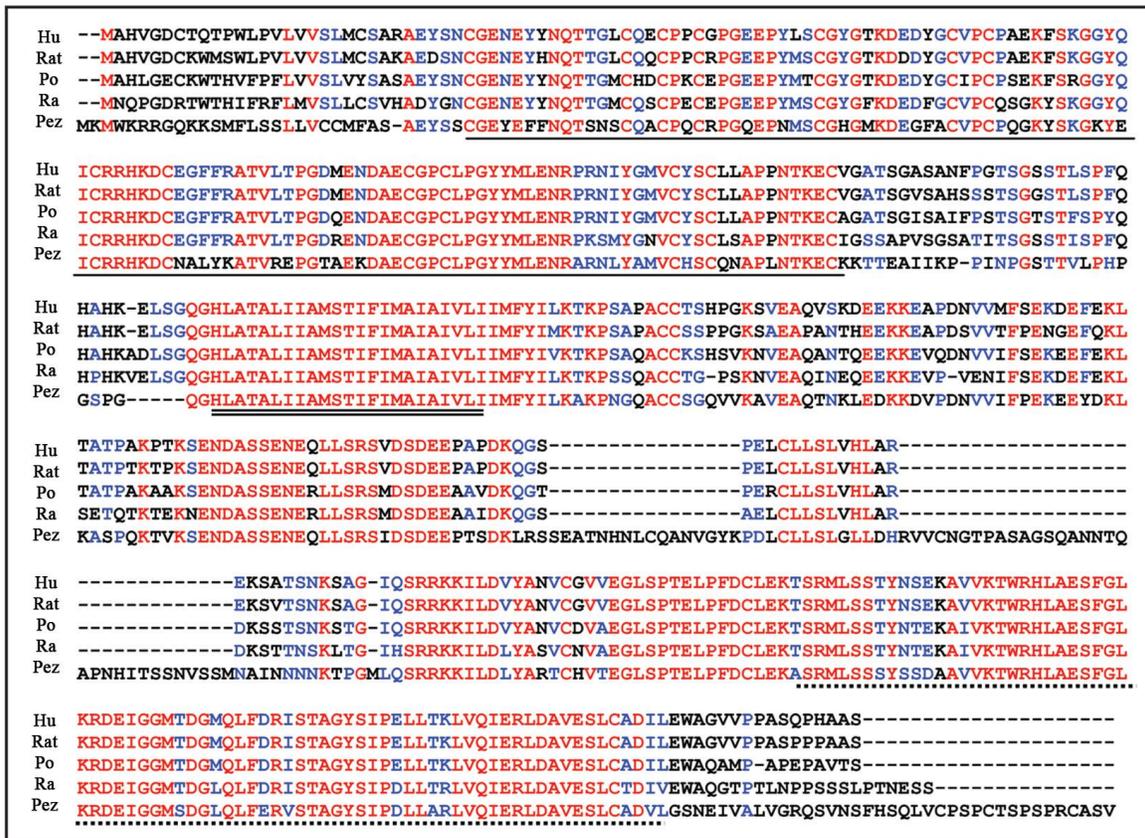


Fig. 11. Conservación de EDAR durante la evolución. Homología de la secuencia de EDAR completa en rojo y parcial en azul entre distintas especies. Región del receptor transmembrana, citoplásmico y dominios de muerte están subrayados con línea sencilla, interrumpida y punteada respectivamente. Humano (Hu); ratón (Ra); pollo (Po); rana (Ra) y pez medaka (Pez) (Modificada de Cui et al, 2006).

Harris y cols (2008) y Schmidt-Ullrich y cols (2006) compararon la secuencia completa de DNAC de EDAR en el pez Medaka con la secuencia ortóloga en humano, encontrando que la del pez Medaka tiene una homología del 56% con la secuencia ortóloga en humano y que la conservación de secuencia es alta en todos los dominios extracelulares, transmembranales e intracelulares, sugiriendo que hay un papel embrionario conservado de EDAR entre las escamas dérmicas de los peces y el pelo de los mamíferos. Por lo anterior los mecanismos moleculares de la función de EDAR son similares entre los peces y los humanos.

Por otro lado, recientemente EDAR ha sido implicada como un regulador importante del desarrollo temprano en las plumas (Houghton 2005 et al, Houghton et al 2007, Drew et al, 2007).

1.5 ACTIVINA

Las activinas son miembros de la superfamilia del Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- β) (Matzuk et al, 1995) y que forman proteínas diméricas constituidas por dos subunidades: beta A y beta B que a su vez se pueden asociar como: beta A/ beta A; beta B/ beta B y beta A/beta B (Matzuk et al, 1995) (Figura 12), para formar la activina A, B y AB respectivamente (Ferguson et al, 1998). Estas proteínas presentan funciones en la reproducción y en el desarrollo (Marther et al, 1997; referido en Matzuk et al, 1995), además de estar altamente conservadas a través de la escala filogenética (Esch et al, 1987; Mitrani et al, 1990; Smith et al, 1990; Thomsen et al, 1990). La relación estructural entre la activina β A y β B radica en el 63% de identidad en aminoácidos del que están constituidas (Brown et al, 2000). Por otro lado, las activinas están íntimamente relacionadas con las inhibinas A y B. (Roberts et al, 1991).

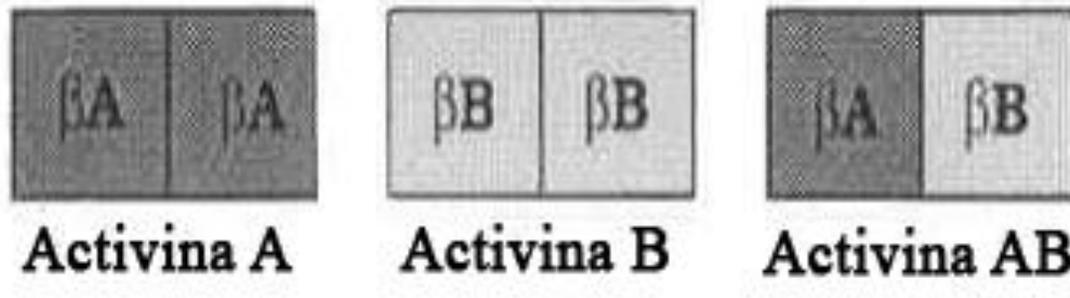


Fig. 12. Formas diméricas de las activinas (Modificada de Matzuk, M.M. et al., 1995).

Las actividades biológicas de las activinas son mediadas por receptores heterodiméricos complejos que constan de dos tipos diferentes, tipo I (ActRIA y ActRIB) y tipo II (ActII y ActIIB) (Mathew, et al, 1993). La actividad de la activina es regulada, pero usualmente también se encuentra inhibida por la folistatina (Ueno et al, 1987, Nakumara et al, 1990). La folistatina también se une a varias Proteínas Morfogénicas de Hueso (BMP), como: BMP-2, BMP-4, BMP-7 y BMP-11 e inhibe su unión con los receptores específicos de BMP, así como sus efectos biológicos. Sin embargo, la afinidad de las BMPs a la folistatina es menor comparada con la de la activina (Wanker et al, 2001). La vía de señalización activina- receptor de activina-folistatina ha mostrado ser esencial en el desarrollo de los órganos, específicamente de dedos (Merino et al,

1999), la formación del intestino (Kim et al, 2000; Miralles et al, 1998) y el desarrollo de los dientes (Matzuk et al, 1995, Matzuk et al., 1995b, Feijen et al, 1994, Ferguson et al, 1998, Ferguson et al, 2001)

1.5.1 Efecto de la activina en el desarrollo de pelo

Matzuk y cols, [1995], encontraron que los ratones deficientes de activina A carecían de bigotes e incisivos. Análisis histológicos del cojinete de los bigotes muestran que el crecimiento y/o la diferenciación de los folículos fue detenido y que los bigotes si presentaban una raíz de la vaina, ésta era inmadura, además las células de la base del bulbo piloso tenían un patrón irregular, y la papila dérmica aparecía siempre cerca de la superficie, cosa que no sucedía con los ratones control, por lo que concluía que la activina A es requerida para el desarrollo normal de bigotes. La activina A es expresada en el mesénquima dérmico y es necesaria para el desarrollo de vibrisas, es posible que la expresión del gen *dl* codificante para EDAR (y así la señalización TNF) es regulada por la activina también durante la organogénesis del pelo. Por su parte, Nakamura y cols [2003], estudiaron los patrones en que se expresaba la folistatina y la activina A, comparando el desarrollo del folículo piloso del pelaje en ratones deficientes de folistatina [Matzuk et al, 1995b] y embriones que sobre expresaban la subunidad βA de la activina [Munz et al, 1999] con los animales silvestres. Nakamura y cols [2003] detectaron transcritos de folistatina en las placodas epiteliales, matriz del pelo y los queratinocitos de la vaina radicular externa; y en la epidermis interfolicular; mientras que la activina A era expresada principalmente en las células de la placoda; además mostraron que ésta última se expresaba en el mesénquima y sus receptores así como su unión a folistatina se llevaba a cabo en el epitelio. Lo anterior fue sugerido debido a que en el desarrollo de folículos de vibrisas, la activina también se expresaba en el mesénquima [Roberts, 1991]. Los cuatro receptores de la activina mostraron también distintos patrones de expresión. El factor que debe tomarse en cuenta es que la expresión de patrones de ambas proteínas durante el desarrollo del diente y del folículo son muy similares, sin embargo en el segundo caso ninguna de las dos son absolutamente esenciales para que la morfogénesis del folículo ocurra, como lo es la unión de EDA y su receptor EDAR para disparar la señalización fundamental para la morfogénesis del pelo, así como la intervención oportuna de moléculas que interactúan entre el mesénquima y el epitelio

Nakamura y cols [2003] sugirieron que la activina A es sintetizada por los fibroblastos que componen la papila dérmica y que se une a sus receptores en el epitelio suprayacente siendo éste el patrón de regulación para la morfogénesis del pelo. La folistatina en cambio se une a la activina previniendo que se una a receptores específicos.

Además, hallaron que la morfogénesis del pelo era retrasada en ratones deficientes de folistatina, sugiriendo que esta proteína es inductora para este proceso, mientras que algo similar se presentó con los ratones transgénicos que sobre expresaban la activina βA , ya que ésta inhibiendo la folistatina. Por otra parte al cultivar explantes de piel embrionaria de ratones silvestres y ver los efectos de la activina y la folistatina en el desarrollo del folículo *in vitro*, cuando se les administró exclusivamente 100ng/ ml de folistatina recombinante humana durante dos días. sin activina y con activina A recombinante humana a una concentración de 30 ng/ml

durante 48 horas, resultando en aquellos cultivos que fueron mantenidos en presencia de folistatina una aceleración en el desarrollo del folículo piloso murino mientras que en los cultivos con activina, éstos efectos se veían inhibidos. Llama la atención que en este trabajo se considera a la folistatina como una señal inductora del desarrollo del folículo, mientras que la activina se le considera como un inhibidor. No obstante existen otros trabajos que apoyan a Nakamura y cols (2003) señalando como inhibidores de la formación de las placodas de folículos pilosos a: BMP-2, BMP4, p75NTR y activina BA pero también existen otras moléculas capaces de inhibir a éstos, como la folistatina y gremlin que también son expresados en el desarrollo de los folículos (Vogt et al, 2008). La activina también retrasó la fase catágena del ciclo del pelo, ya que suprimió la apoptosis prolongando la duración de la fase anágena.

Es de notar el trabajo de Laurikala (2002) quien hizo un análisis de la aplicación local de varias moléculas señalizantes, entre ellas activina A, Wnt6, BMP4, EGF, FGF10, Shh, BSA, en explantes de piel embrionaria mostrando que únicamente la activina A promueve la expresión de EDAR, pero sólo cuando el tejido mesenquimal está presente, ya que cuando dicha proteína se administraba en epitelio, EDAR no era estimulado. La concentración a la que fue administrada la activina A fue de 50 ng/ µl por 24 horas. La activina A se expresó en el mesénquima antes de la formación de los folículos y posteriormente se restringió esta expresión al mesénquima subyacente a las placodas (Figura 13). Es de notar que la estimulación EDAR no se dio en la proximidad de la perla liberadora de proteína, sino específicamente en las placodas por lo tanto la activina no pudo inducir a EDAR en la epidermis en la ausencia de la formación de placodas. La expresión de la activina A inicia tempranamente en el mesénquima dermal y es posible que algunos de sus efectos sean mediados por la estimulación de la expresión de EDAR en el epitelio. Estas vías de señalización se han visto conservadas tanto en pelo como en diente. Por lo anterior, es posible que la presencia de algunas proteínas en el epitelio, sean requeridas para la trasducción de la señal de la activina, por ejemplo que su propio receptor de superficie depende de su inducción, por otras señales mesenquimales. De manera que también es posible que la cooperación de dos señales sea necesaria para la expresión de EDAR, o bien, que la activina induzca en el mesénquima otras señales regulatorias de la expresión de EDAR. En cualquier caso, todo indica que la señalización de TNF en el epitelio es regulada por señales mesenquimales y la activina es un buen candidato a ser una de ellas. Finalmente, Laurikkala (2002) sugirió que mediante la regulación positiva de la expresión de EDAR, la activina puede controlar la sensibilidad de las placodas a la señal del TNF de la epidermis interfolicular.

Dado el papel que puede jugar la activina, sería bueno explorar su efecto en el tratamiento de desórdenes de crecimiento del cabello. En aplicaciones clínicas, en la facilitación de la bioingeniería de folículos a partir de células madre con el manejo apropiado de folistatina-activina *in vitro*, y la administración local de activina y/o folistatina puede llegar a ser el tratamiento para la pérdida del cabello (alopecia) o el crecimiento excesivo (hirsutismo) (Nakamura et al, 2003).

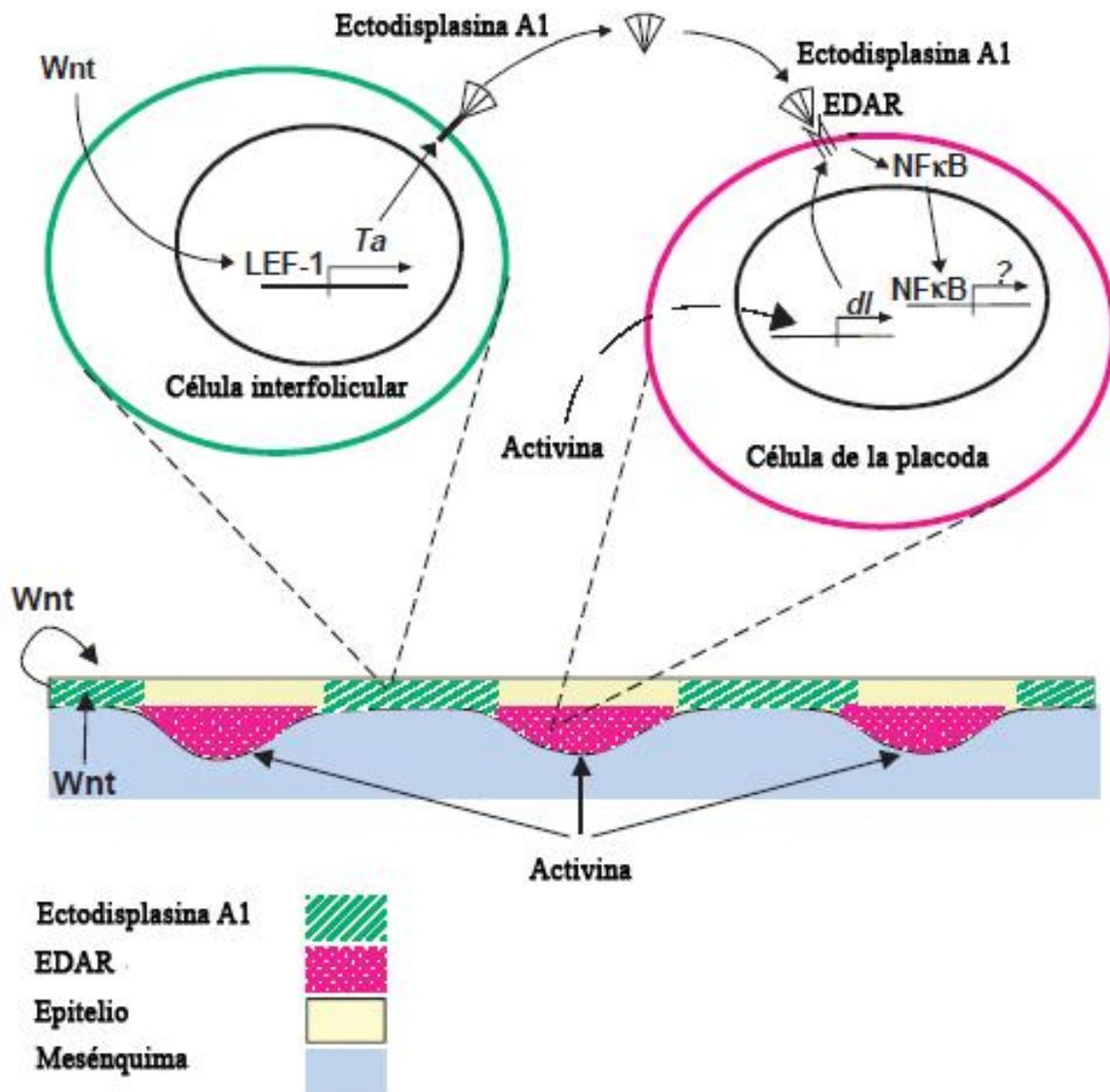


Fig.13. Regulación de la formación del folículo piloso, señalización de EDA-EDAR así como su integración con otras vías. [Modificada de Laurikkala et al, 2002].

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente se han desarrollado múltiples protocolos para la construcción de equivalentes cutáneos, basados en la expansión celular, tanto de células heterólogas como autólogas, y utilizando diversos andamios, con una base de colágena, quitosán, polímeros de ácido láctico o glicolico o fibrina, etc. [Parenteau et al, 2000]. Sin embargo, todos estos modelos carecen de elementos celulares y tisulares que les provean de sensibilidad, pigmentación o la capacidad de inducir respuestas inmunes, así como de la presencia de anexos cutáneos (folículos pilosos y glándulas).

Ya que en la práctica clínica se espera utilizar células autólogas para la generación de dichos equivalentes cutáneos, resulta necesario determinar si en los queratinocitos obtenidos de piel adulta y mantenidos *in vitro* se puede inducir la expresión de los factores de diferenciación esenciales para la generación de los primordios de dichos anexos cutáneos como EDA y EDAR.

3. HIPÓTESIS

Si la activina A regula positivamente la expresión de EDAR, que forma parte de la señalización para la diferenciación de los queratinocitos en la formación de anexos cutáneos entonces si administramos activina A en un cultivo de queratinocitos humanos adultos esperamos observar un aumento en la expresión de EDAR en estas células,

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar la expresión *in vitro* de EDAR en queratinocitos humanos cultivados en presencia de Activina A.

4.2 Objetivos particulares

Demostrar que la administración *in vitro* de activina-A induce la expresión de EDAR en queratinocitos aislados de piel humana adulta, así como en queratinocitos neonatales humanos provenientes de una línea celular.

Determinar si la expresión *in vitro* de EDAR en queratinocitos humanos estimulados con activina A muestra un comportamiento dosis dependiente.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Poblaciones celulares

5.1.1 Queratinocitos humanos adultos

Se obtuvieron biopsias de piel humana normal adulta de aproximadamente 1 cm² de superficie, donadas por la Unidad de quemados del Hospital Pediátrico de Tacubaya, GDF. Las muestras provenían de niños quemados, candidatos a ser injertados. El tamaño de la biopsia algunas veces varió dependiendo de la extensión de la quemadura a injertar y fue tomado mediante un dermatomo, pero en promedio no fue mayor a 3-cm² (Figura 14; A, B y C).

La piel fue trasladada desde el hospital hasta el laboratorio en un tubo con medio QN debidamente sellado. Una vez en el laboratorio, la piel fue sumergida en alcohol al 70% por un minuto e inmediatamente fue lavada con solución salina balanceada de Hanks. Con el propósito de aislar los queratinocitos se siguió la técnica de Rheinwald y Green [1975] (Figura 15).

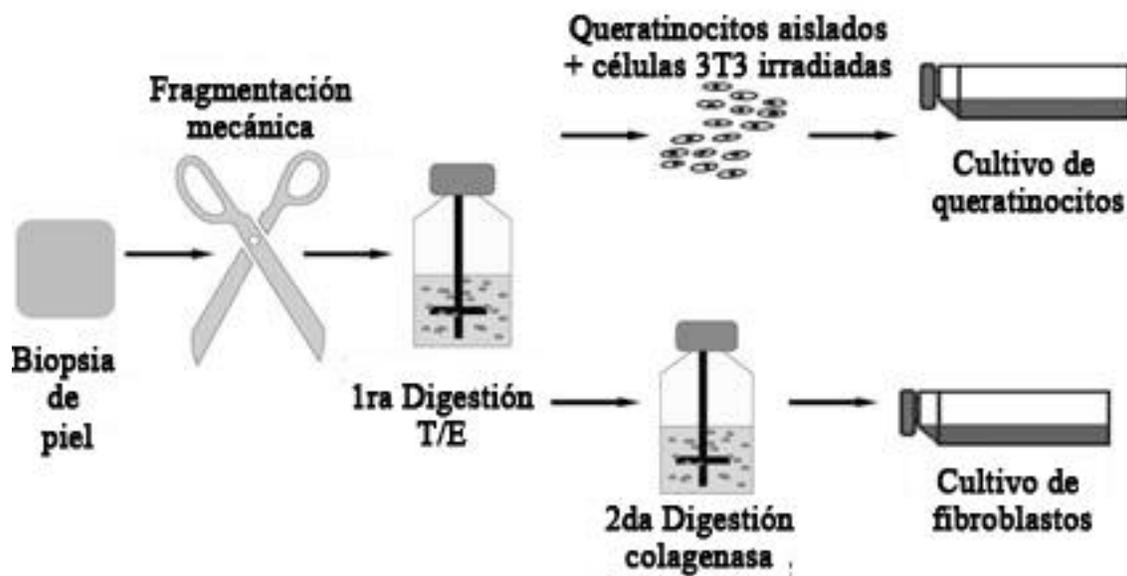


Fig. 15 Técnica de obtención de células para cultivo de acuerdo a Rheinwald y Green [Modificada de Llamas et al, 2006].

Las biopsias fueron lavadas en antisépticos y después de ser removidos los restos de sangre y de tejido adiposo, se fragmentaron en finos pedazos de aproximadamente 2 mm² (Figura 14; D y E).



dermatomo, en (D) la biopsia fragmentada en tiras , en (E) piel fragmentada en finos trozos y en (F) biopsia en medio de cultivo y Tri/EDTA.

5.1.1.1 Digestión enzimática y Aislamiento de queratinocitos

Los fragmentos de piel se colocaron en medio QN con 1ml de Tripsina/ácido etilendiaminotetraacético [Tri/EDTA] (0.05%/ 0.02%), de manera que el tejido tuvo una mayor superficie de contacto para eficientar el efecto de la enzima (Figura 14; F). La solución de Tri /EDTA junto con la piel se mantuvieron a 37° C y en agitación para obtener a los queratinocitos de los estratos basales y suprabasales. Se llevaron a cabo tres digestiones secuenciales de una hora cada una durante 3 horas, y en cada digestión se recuperaban las células suspendidas en medio con la enzima, se centrifugó la suspensión y el sobrenadante se regresó al tubo con la piel en proceso de digestión enzimática suplementándole 1ml más de Tri/EDTA.

En cada una de las tres digestiones, se recuperó el sobrenadante a cada hora, mismo que se centrifugó a 1200 RPM obteniéndose un botón celular que fue resuspendido y contado. Finalmente, se sembraron 50 000 queratinocitos sobre una capa de células alimentadoras irradiadas en placas de cultivo.

5.1.2 Línea celular 3T3 (células alimentadoras)

5.1.2.1 Irradiación de células alimentadoras

Se expandieron células de la línea de fibroblastos embrionarios murinos NIH/3T3, mismas que se emplearon para brindar los factores necesarios a los queratinocitos aislados de las biopsias de piel humana adulta. Las células 3T3 fueron irradiados con una dosis letal de 6,000 rads, en el equipo Therathon Phoenix de la Unidad de Radioterapia del Instituto Nacional de Cancerología (INCAN), GDF, y se sembraron en cajas de cultivo en una densidad de 30 000 fibroblastos. (Figura 19).

La finalidad de irradiar las células alimentadoras a tan alta dosis durante más de 60 minutos fue porque un co-cultivo con fines de implante en humanos debe asegurar que dichas células aporten los factores de crecimiento necesarios para los queratinocitos, pero que al final del proceso de expansión de queratinocitos (10 días) todas las células murinas hayan muerto.



Fig. 19. Cultivo de 3T3 preparándose para la irradiación. En la imagen se encuentra al personal del INCAN, colocando las células 3T3 a la distancia adecuada de la fuente de poder que emana la radiación correspondiente.

5.1.3 Línea celular de Queratinocitos Neonatales Humanos (Millipore SCCE020)

Se estandarizó el cultivo de estas células para su posterior expansión. Fueron sembrados 70 000 queratinocitos sin células alimentadoras en placas de cultivo y se mantuvieron así hasta su confluencia,

5.2 Cultivo primario de queratinocitos humanos

Los queratinocitos se mantuvieron en cultivo hasta llegar a confluencia. Durante los tres primeros días después de la siembra, se mantuvieron los cultivos con Medio QN y después del

tercer día se les administró Medio QC fresco cada tercer día. El sembrado de estas células se hizo de tal manera que se tuviera los siguientes grupos experimentales.

Grupo control negativo experimental. Queratinocitos mantenidos en cultivo únicamente sobre la capa de células alimentadoras 3T3, sin estímulo y sin tinción para citometría de flujo

Grupo control de compensación. Queratinocitos cocultivados con células 3T3 sin ninguna dosis de activina A.

Grupo Experimentales. Queratinocitos mantenidos en cultivo sobre la capa de células alimentadoras 3T3, y estimuladas con diferentes dosis de activina.

5.3 Cultivo secundario de queratinocitos neonatales

Para el caso de los queratinocitos de la línea celular no se requirió sembrar con células alimentadoras, ya que el medio que utilizaban era suficiente para su crecimiento,

Los grupos que se sometieron a citometría de flujo fueron los mismos que se emplearon para los queratinocitos aislados de biopsia

5.4 .Estimulación de queratinocitos con activina A.

Una vez que los cultivos de queratinocitos fueron confluentes, se les administró la activina a los grupos experimentales en las siguientes dosis:

- 5ng/ml
- 50ng/ml
- 100ng/ml
- 250ng/ ml
-

5.5 Evaluación de la expresión de EDAR

5.5.1 Inmunohistoquímica

Con la finalidad de determinar la dilución de los anticuerpos a usar para detectar EDAR y comprobar la eficiencia de dichos anticuerpos, se realizó una inmunohistoquímica a los primeros cultivos primarios de queratinocitos sembrados con 3T3 a una dosis de 30 ng/ml de activina A durante 48 horas, como lo había referido Nakamura y cols [2003]. Para este caso se trabajó con un control negativo para el experimento y un experimental con la dosis de activina A ya mencionada. Estos cultivos se realizaron sobre cubreobjetos de vidrio para posteriormente hacerles la inmunohistoquímica y finalmente ser montados en un porta objetos para su observación bajo el microscopio.

5.5..2 Citometría de flujo

Tanto los cultivos primarios de queratinocitos con células 3T3 así como los cultivos secundarios de queratinocitos neonatales evaluaron la proporción de células positivas a EDAR y la intensidad con que se expresa el receptor.

Los cultivos se realizaron bajo los mismos grupos de trabajo, sin embargo se realizó un ensayo piloto para determinar si mediante esta metodología era posible demostrar y cuantificar la expresión de EDAR, se realizó un ensayo piloto utilizando únicamente Solución Salina Balanceada de Hanks (HBSS)/ EDTA 0.02% para despegar el cultivo de la placa de cultivo. Lo anterior con la finalidad de evitar la pérdida de EDAR por efecto de la incubación con tripsina durante el proceso de cosecha. En este caso se usó una dosis un poco más alta de activina A, 45 ng/ml y se mantuvo en cultivo por 48 horas. Posteriormente al constatar que EDAR se mantenía intacto utilizando HBSS/EDTA, se optó por probar las 4 dosis de activina A ya mencionadas para hacer una curva de concentración y ver si existía una relación dosis dependiente.

Tras despegar las células de la placa, la suspensión celular fue trasladada a tubos Eppendorf para ser tratadas individualmente, fueron lavadas con amortiguador de tinción para posteriormente teñirlas con el anticuerpo primario contra EDAR a una dilución (1:300) y con un anticuerpo secundario biotinilado. Se hicieron los lavados correspondientes en cada uno de los anticuerpos. Finalmente, se le administró Estreptoavidina/APC a una dilución 1:200, se volvió a lavar, se resuspendieron en amortiguador de fijación y se colocaron en tubos FACS para poder ser leídas en citómetro de flujo.

Las lecturas en el citómetro BD FACS Callibur fueron realizadas de los grupos experimentales con tratamiento de activina A y los dos controles ya mencionados. En las citometrías para los cultivos primarios de queratinocitos con las células 3T3 no hubo homogeneidad de las lecturas ni se usaron los mismos "settings" en el citómetro por lo cual no fue posible aplicarles alguna prueba estadística. En contraste, los cultivos secundarios de queratinocitos neonatales sí fueron homogéneos.

El análisis de las lecturas se llevó a cabo mediante el programa Flow Jo

5.6 Análisis estadístico

Se utilizó el programa STATISTICA para analizar los datos promedios de los porcentajes de células EDAR positivas y los promedios de las Medias de Intensidad de Fluorescencia de los cultivos secundarios de queratinocitos. Se calculó las desviaciones estándar de cada uno de los tres grupos.

La población presentó una distribución normal, se realizó un ANOVA de una vía en el cual obtuvimos un valor menor a 0.05 lo que indicó que si se presentaban diferencias entre los grupos. Para saber entre qué grupos estaban estas diferencias, aplicamos una prueba post hoc como la de Tukey para conocer entre qué grupos estaban dichas diferencias

5.5 Reactivos

Medio QN: Para el cultivo primario de queratinocitos humanos dentro de los primeros tres días de cultivo, se preparó 0.5 litros de este medio de la siguiente manera: D-MEM 300 ml, HANS-F12 150ml, Suero Bovino Fetal (SBF) 50 ml, Adedina (2.4g/l) 5 ml, Penicilina/ Estreptomina 5ml, Glutamina 5 ml, Insulina 0.069 ml, Toxina del cólera 0.5 ml, Triiodotirosina 0.5 ml e Hidrocortisona 1 ml.

Medio QC: Para el cultivo primario de queratinocitos humanos después de los primeros tres días de cultivo, se preparó 0.5 litros de este medio de la siguiente manera: D-MEM 300 ml,

HANS-F12 150ml, Suero Bovino Fetal (SBF) 50 ml, Adedina (2.4g/l) 5 ml, Penicilina/ Estreptomina 5ml, Glutamina 5 ml, Insulina 0.069 ml, Toxina del cólera 0.5 ml, Triodotirosina 0.5 ml, Hidrocortisona 1 ml y Factor de Crecimiento Epidérmico (EFG) 0.5 ml.

Medio Completo EpiGRO™: Para el cultivo de los queratinocitos de la línea celular. (MilliporeSCMK001) que está constituido por L-Glutamina 6mM, EpiFactor 0.4%, Epinefrina 1 μ M, Factor de Crecimiento Transformante- alfa recombinante humano (TGF- α rh) 0.5 ng/ml, Hidrocortisona hemisuccinato 100ng/ml, Insulina recombinante humano 5 μ G/ml y apotransferrina 5 μ g/ml. Los anteriores elementos constituidos en 485 ml de medio base.

Solución Salina Balanceada de Hanks (HBSS): Cloruro de sodio (NaCl) 6.83g; Cloruro de Potasio (KCl) 0.2 g; Fosfato de Sodio Monobásico (Na₂HPO₄) 1.15g; Fosfato de Potasio Dibásico (KH₂PO₄) y 1000 ml de agua destilada.

Tripsina/ EDTA: 0.05g de tripsina, 0.02g de EDTA en 100 ml de HSBB.

Amortiguador Salino de Fosfatos (PBS): Fosfato de Sodio Monobásico (Na₂HPO₄) 1.48g; Fosfato de Potasio Dibásico (KH₂PO₄) 0.43g; Cloruro de sodio (NaCl) 7g y 1000 ml de agua destilada.

Amortiguador de Tinción: Preparar en PBS, con SBF 5% y antibiótico 1%.

Amortiguador de Fijación: Preparar en PBS con 0.5% de paraformaldehído.

Activina A: Proteína recombinante humana/ratón/rata. (RyD Systems 338-AC/CF)

Anticuerpo primario: Anticuerpo anti- EDAR humano y ratón. Hecho en cabra (RyD Systems AF157).

Anticuerpo secundario: Anticuerpo biotinilado hecho en ratón , anti cabra (MP Biomedical)

Estreptoavidina APC: BD-Pharmygen

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

6.1. Aislamiento de queratinocitos humanos adultos

Después de la primera hora de digestión enzimática, fue posible observar como la epidermis se separa de la dermis ya que los hemidesmosomas que mantiene unidas ambas capas son rotos.. A nivel histológico, el efecto de la enzima y el EDTA tienen como blanco las uniones dependientes de Ca^{+} por las que está integrado el tejido, de manera que a medida que la Tri/EDTA actúa, estas uniones se rompen en cada uno de los estratos conformantes de la epidermis, lo cual explica cómo es que después de tres horas, el botón celular obtenido es más diverso y bajo el microscopio se hacen presentes queratinocitos de los estratos más externos que conforman la epidermis, mientras que en las dos primeras digestiones pueden observarse mayoritariamente células basales y suprabasales (Figura 16).

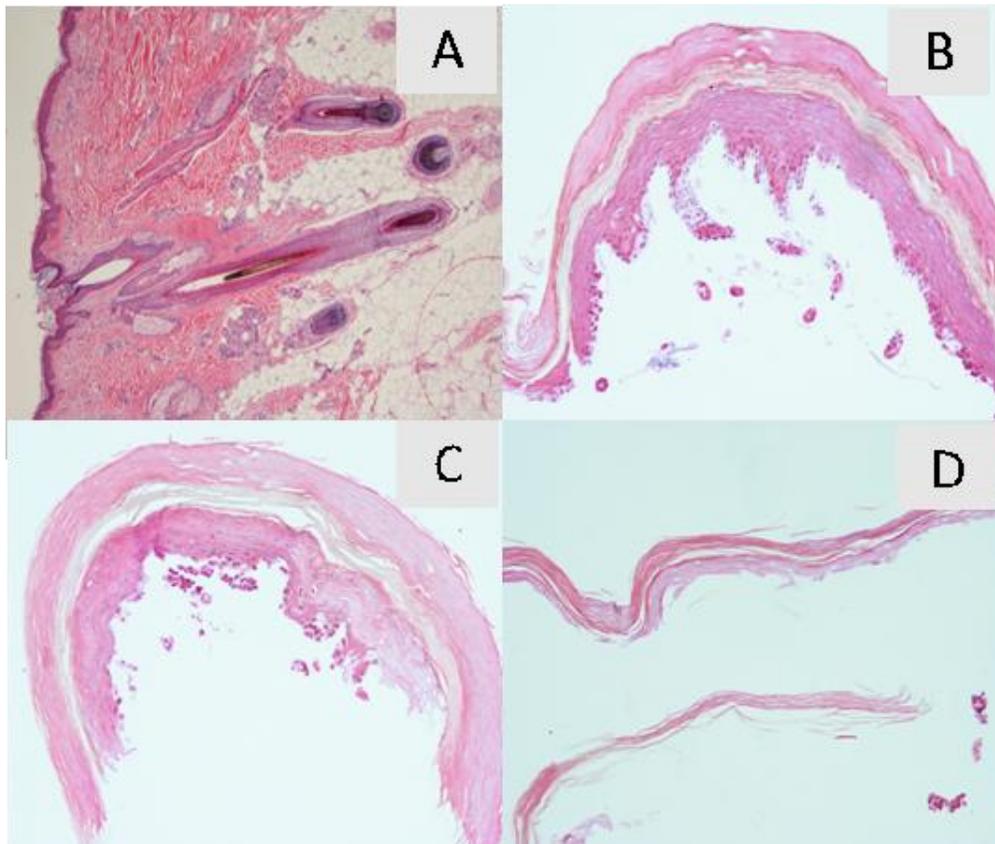
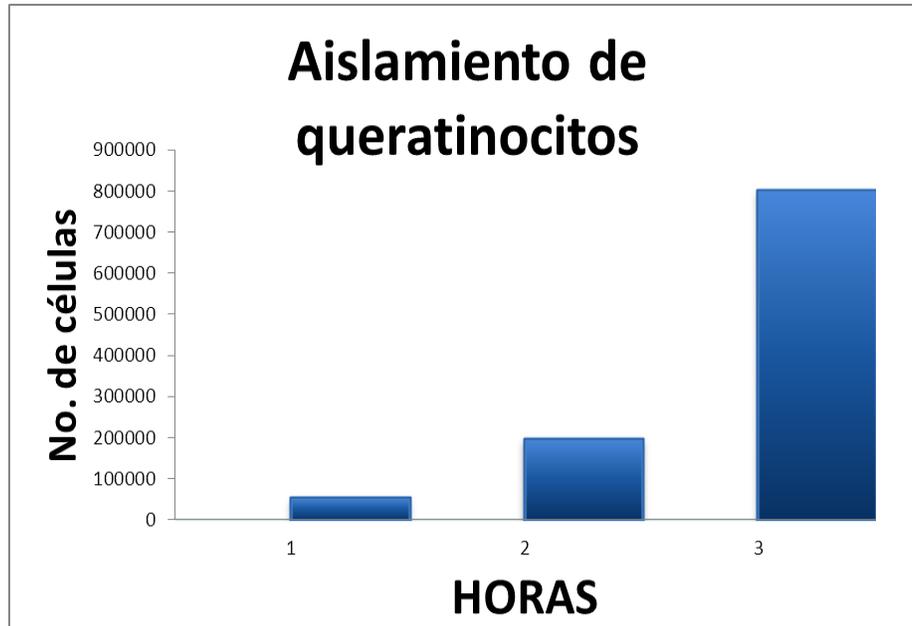


Figura 15. Cortes histológicos de piel humana durante la digestión con Tri/EDTA. Hematoxilina-Eosina. (A) 100x, (B,C,D) 400x En (A) se observa un corte de piel completa con la presencia de folículos y glándulas. En (B), la piel después de la primera hora de digestión, nótese como la dermis se ha deshecho. En (C), piel después de la segunda hora digestión, el estrato basal empieza a ver dañada su integridad. En (D), tras tres horas de digestión, la piel prácticamente está representada por los estratos más externos.

Con este procedimiento de aislamiento de queratinocitos, encontramos que la cantidad celular obtenida durante la primera hora de incubación con Tri/EDTA se encontraba por debajo de las 1×10^5 células, mientras que en la segunda recuperación el número se incrementaba hasta 2×10^5 células, pero al final de las tres horas de incubación el número celular recuperado se

incrementaba hasta las 8×10^5 células (Gráfica 1). Por otra parte observamos que cuando los fragmentos de piel son incubados por tiempos superiores a tres horas en Trij/EDTA, no solo se incrementa la proporción de queratinocitos superficiales sino que además se disminuye notablemente la viabilidad hasta un 30 o 40 %, afectando las condiciones iniciales del cultivo de queratinocitos.



Grafica1. Rendimiento celular contra horas de digestión. Obtención de queratinocitos de una biopsia de piel humana a lo largo de 3 horas de digestión con Trij/EDTA.

De manera que no es adecuado prolongar las digestiones por más de tres horas. Bajo el microscopio, las queratinocitos basales son reconocibles por su morfología redonda y pequeña (Figura 17).

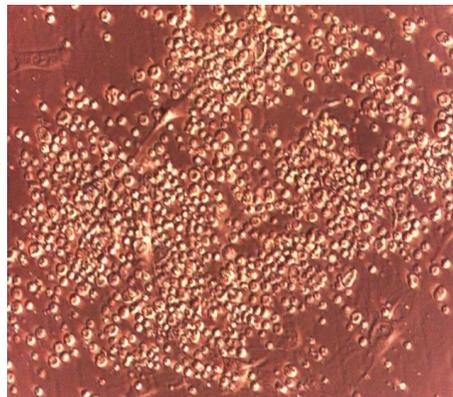


Fig. 17. Queratinocitos basales tras su aislamiento. Nótese la forma esférica y el tamaño pequeño que presentan. Contraste de fases DIC, método Relief por Olympus. 100x

Cabe mencionar que el número de células obtenidas también dependerá del tamaño de la biopsia así como de la profundidad con la que se haya tomado mediante el dermatomo, en este caso el tamaño de la biopsia varía de acuerdo a cada cirugía dependiendo de la cantidad de piel que se requiera para el injerto.

6.2. Cultivo de queratinocitos

6.2.1. Cultivo primario de queratinocitos aislados

Los cultivos de queratinocitos tuvieron una mejor adhesión cuando se sembraban simultáneamente con las células 3T3 con respecto al sembrado previo de las células alimentadoras. También se observó que si se sembraban los queratinocitos solos, éstos no se adherían al frasco de cultivo pues necesitaban de un sustrato al cual adherirse. El aislamiento de las células a partir de las biopsias se dificultó, en parte, por la contaminación por bacterias que presentaban ya las muestras desde el hospital de origen, y por la escasa donación de biopsias de piel.

Por otra parte, las células 3T3 a pocos días de la irradiación mostraron una morfología notablemente afectada y empiezan a tener prolongaciones lo que nos sugiere que están en un proceso apoptótico, un hecho que respalda esto, es que cuando se cultivaron estas células por sí solas antes de sembrar sobre ellas los queratinocitos, era evidente observar, además del cambio de morfología, como paulatinamente se iban encontrando en el medio suspendidas, pues dejaban de adherirse y la placa de cultivo presentaba menos densidad celular. (Figura 20). La irradiación condiciona la vida de las células a sólo 10 días tras su exposición.

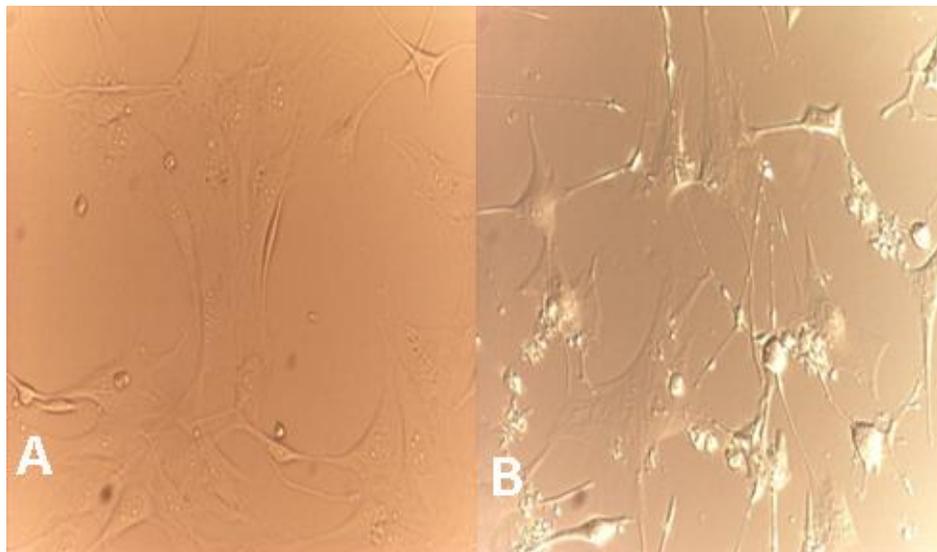


Fig.20. Células alimentadoras 3T3. En (A) se observa el cultivo antes de ser irradiadas, su morfología es la típica de fibroblastos. En (B) se muestra el aspecto de las células después de unos días después de recibir la radiación empiezan a presentar prolongaciones finas y muy largas, así como la presencia de numerosas vacuolas en el núcleo, lo que evidencia que éstas se encuentran en un proceso apoptótico. DIC, método Relief por Olympus. 400x

En cuanto a los cocultivos de queratinocitos con las células alimentadoras, éstos respondían favorablemente al reemplazo de Medio QN por el Medio QC, ya que era notorio una mayor proliferación y adherencia con el último medio de cultivo mencionado, lo que se puede atribuir a la presencia de Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) el cual ayuda a que los queratinocitos proliferen. Por lo anterior, fue después del día tres, que corresponde al día de cambio de tipo de medio, cuando se inició a ver la formación de “nidios” o agrupaciones de queratinocitos delimitados por las células 3T3. Después de una semana, esos “nidios” crecieron hasta poblar todo la superficie de la placa de cultivo y de esta manera, formar una monocapa en donde se podían ver a las células 3T3 entre los límites de dichos nidios expandidos (Figura 22).

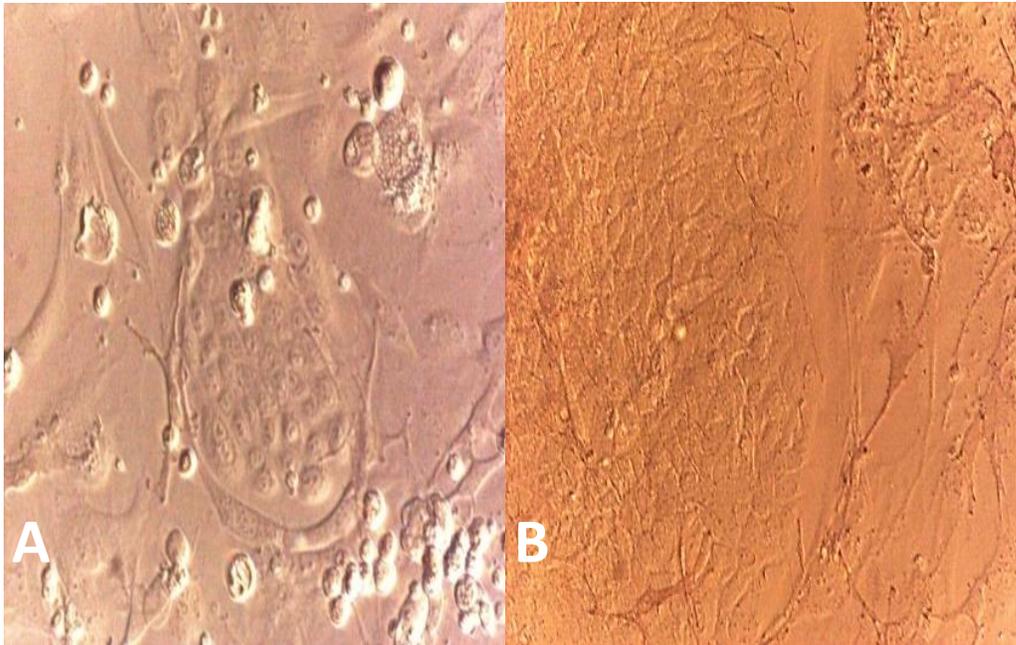


Fig. 22. Cultivos primarios de queratinocitos humanos adultos. En (A) se observa un cultivo a los pocos días de su siembra, nótese la presencia de nidios delimitándose por las células 3T3. En (B) se observa un cultivo ya confluyente, en donde es evidente una monocapa bien establecida.). Contraste de fases DIC, método Relief por Olympus. 100x

6.2.2. Cultivo secundario de queratinocitos neonatales

La línea celular SCCE020 de queratinocitos epidérmicos neonatales humanos no necesitó de células alimentadoras, solo requirió del medio EpiGro™ distribuido por Millipore. Es importante aclarar que no son células modificadas, ni mucho menos inmortalizadas ya que soportan sólo 15 pases. El cultivo de estas células se ilustra en la siguiente imagen (Figura 21).

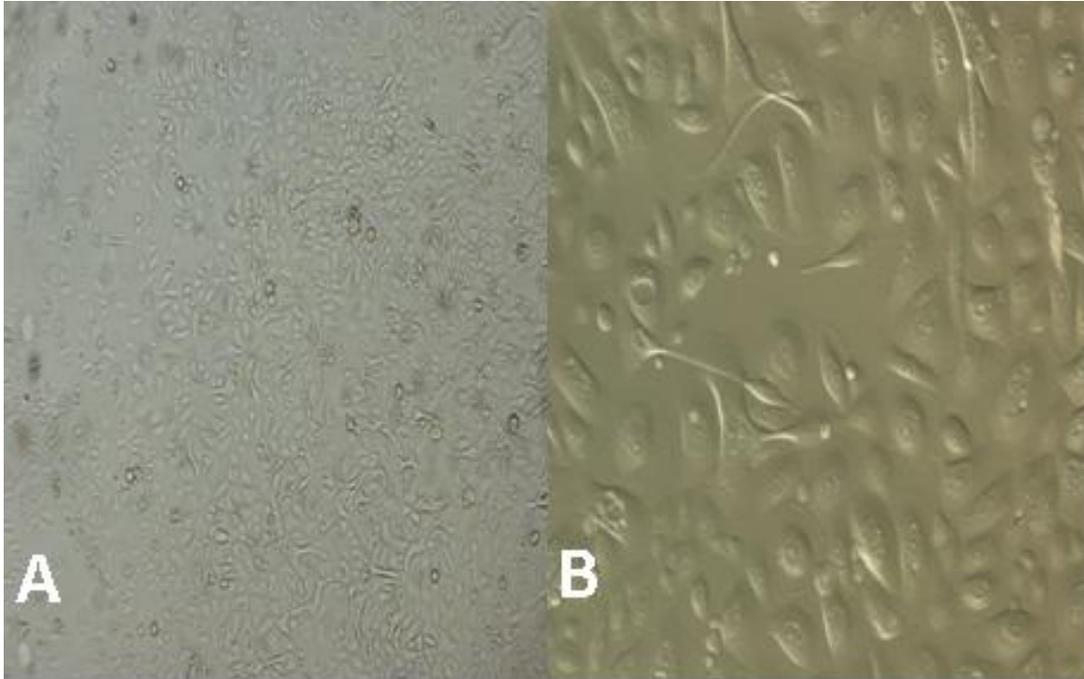


Fig. 21. Cultivo de queratonocitos neonatales humanos. En (A) observamos un cultivo confluyente de queratinocitos 50x, mientras que en (B) es un acercamiento de (A). DIC, método Relief por Olympus. 400x

La estandarización para este cultivo nos llevó un poco de tiempo, ya que las células eran variables, en ocasiones a los pocos días proliferaban y en otras veces su crecimiento era lento. Además de que al inicio, tuvieron que expandirse y después de eso ya trabajar con los cultivos experimentales.

6.3. Expresión del receptor de ectodisplasia A1 (EDAR)

6.3.1 Inmunohistoquímica

El primer ensayo para observar la expresión de EDAR se realizó al estandarizar las diluciones de los anticuerpos a utilizar más adelante. Se observó que a una dosis de 30 ng/ml de activina A durante 48 horas era poca pequeña la proporción de los queratinocitos EDAR+ y era difícil poder apreciar bien la intensidad de su expresión (Figura 23) .Debido a que sólo era un ensayo preliminar y al observar poca expresión en los cultivos se propuso usar una dosis más alta de activina.

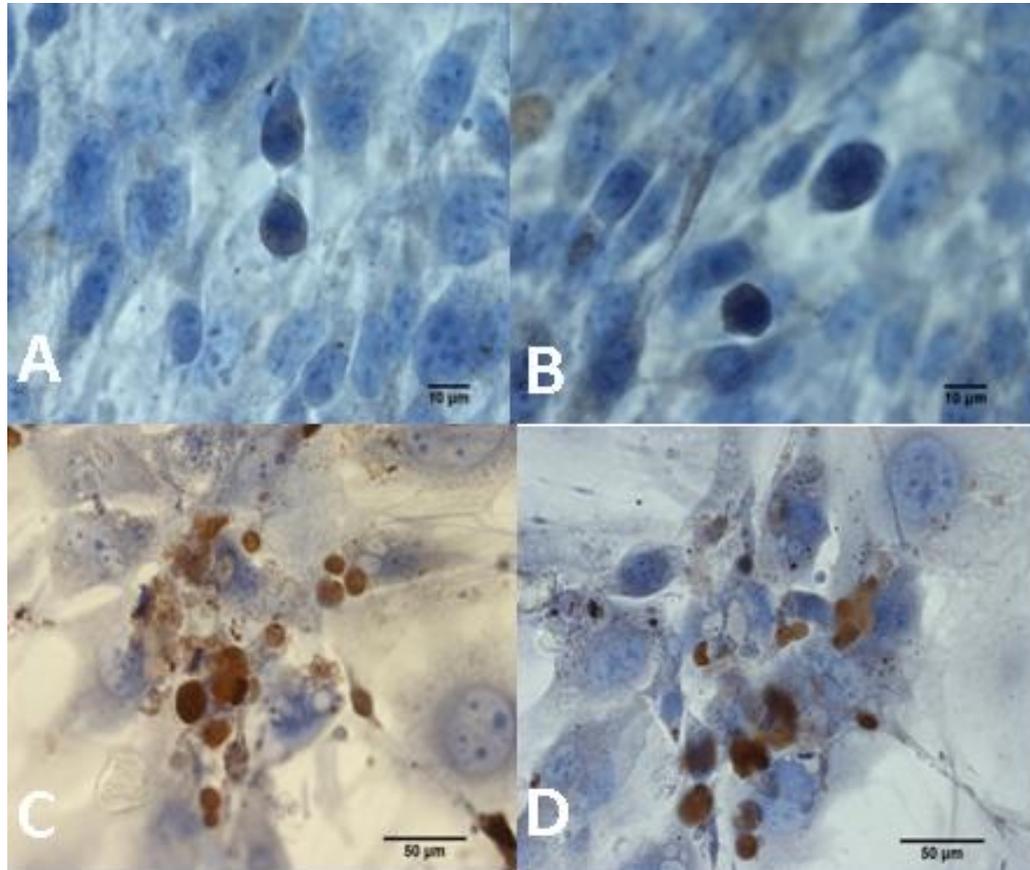
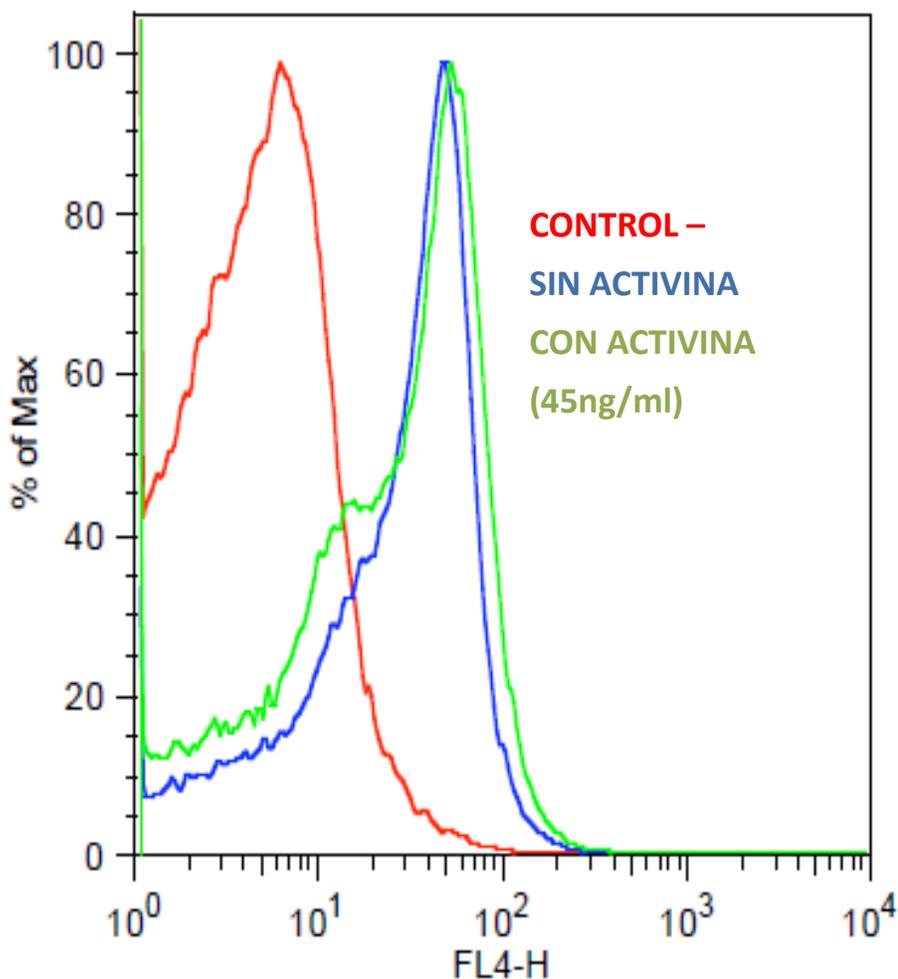


Fig.23. Cultivo celular de queratinocitos humanos sobre una capa de células alimentadoras 3T3, procesados mediante Inmunohistoquímica dirigida contra la molécula EDAR . En (A y B; 1000X) se observa los controles del experimento mientras que para (C y D, 400x) se muestran los cultivos experimentales con una dosis de 30ng/ml de activina A. Nótese como en éstos, se encontraron células positivas para EDAR.

6.3.2 Citometría de flujo

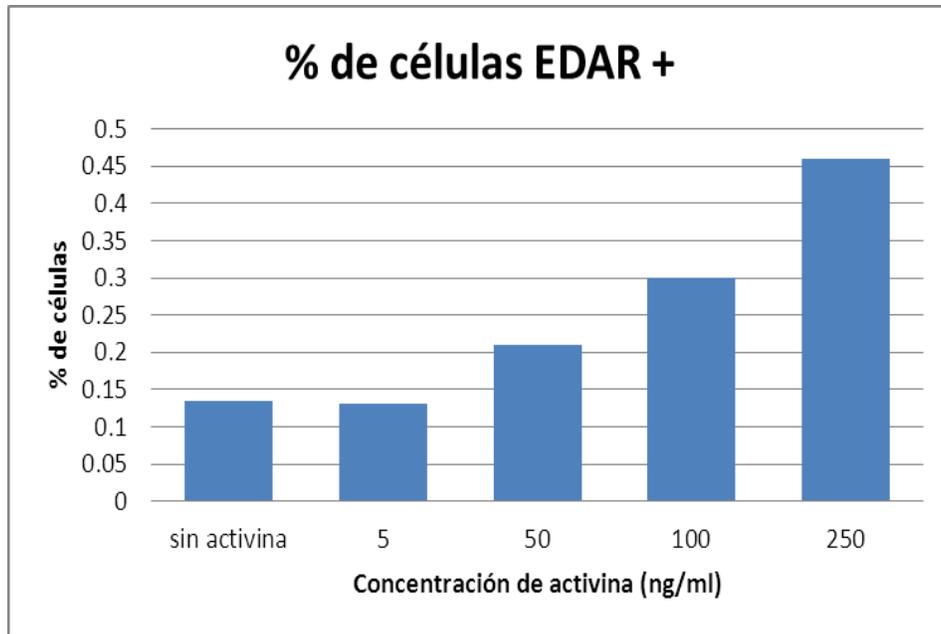
El primer ensayo que se llevó a cabo para evaluar la expresión de EDAR, fue realizado en un cocultivo de queratinocitos y células 3T3, a una dosis de 45 ng/ml con los mismos tres grupos mencionados en la metodología. Para este caso, el siguiente histograma muestra la expresión de EDAR en los queratinocitos (Gráfica 2)



Gráfica. 2 Citometría de flujo en cultivo de queratinocitos y células 3T3. Histograma que muestra en rojo la gráfica que representa la región negativa para EDAR, en azul la expresión basal de EDAR y en verde, la expresión del receptor al ser estimulado con 45 ng/ml de activina A.

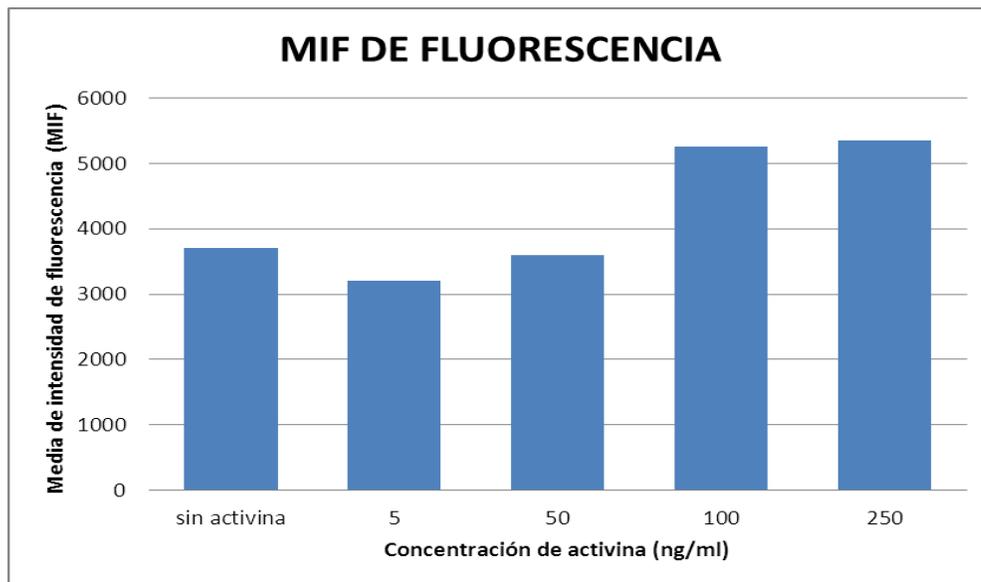
Comprobamos que los receptores EDAR persistían después de separar las células de la placa de cultivo utilizando HBSS/EDTA. Se decidió hacer el experimento con dosis por arriba y debajo de las que se habían probado, esto con la intención de conocer si la expresión de EDAR tenía una relación directa con la dosis.

De manera que se hizo una curva de concentración por triplicado con los cultivos de queratinocitos sobre fibroblastos 3T3, en donde se administraron cuatro diferentes dosis de activina A. En los tres ensayos observamos el mismo patrón de expresión, donde un porcentaje de los queratinocitos expresan EDAR de manera basal en el grupo control de compensación que no fue estimulado con activina A, y que dicho porcentaje se mantiene en el mismo rango en las concentraciones de 5 y 50 ng/ml de activina, sin embargo, cuando incrementamos la concentración a 100 y 250 ng/ml la proporción de células EDAR positivas se incrementa considerablemente con respecto al resto de los grupos experimentales y el control (Gráfica 3).



Gráfica 3. Porcentaje de queratinocitos EDAR +. Gráfica representativa que muestra una tendencia a presentar una mayor expresión del receptor en las dosis altas, en este caso la dosis de 250ng/ml de activina A propicio dicho comportamiento.

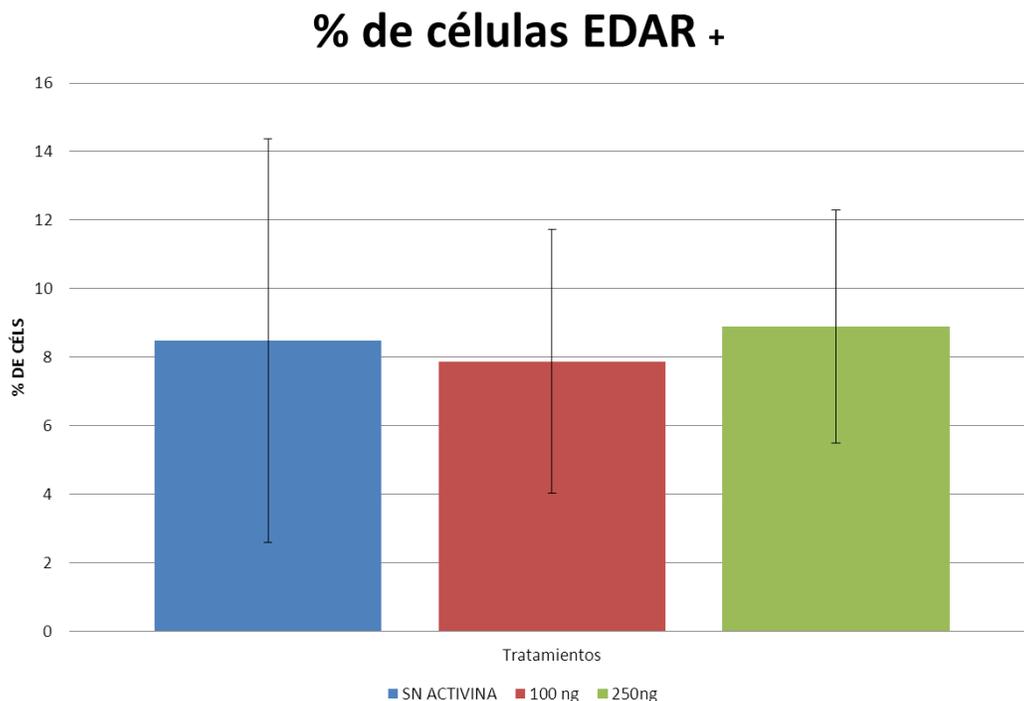
Cuando evaluamos en esta serie de experimentos la expresión de EDAR mediante la Media de Intensidad de Fluorescencia (MIF) observamos nuevamente la misma tendencia en que en las dosis de 100 y 250 ng/ml de Activina A, los queratinocitos obtenidos de biopsias de piel incrementan la intensidad de su expresión. Por lo que en las siguientes repeticiones se decidió utilizar únicamente estas dos dosis.



Grafica 4. Media de Intensidad de Fluorescencia (MIF) de los queratinocitos EDAR +. Nótese como las expresiones más altas de EDAR se vuelven a presentar en las dosis más altas.

Con la finalidad de demostrar si la estimulación con estas dosis de activina es capaz de inducir un incremento no solo en el porcentaje de células EDAR positivas, sino también en la intensidad de su expresión decidimos repetir dichos experimentos, esta vez se usaron queratinocitos neonatales de la línea celular SCCE020 de Millipore,

Para el porcentaje de células, y tomando en cuenta a toda la población de ensayos, podemos ver como las desviaciones estándar son muy grandes y cómo entre tratamientos se sobrelapan, lo cual nos indica en una primera impresión que no hay diferencia entre las dosis. Con el fin de respaldar dicha premisa, se le realizó una prueba de ANOVA de una vía, con un valor de $F= 1.33$ y un valor de $p= 0.31$ bajo una significancia de 0.05, con lo cual no se pudo asumir diferencias entre los tres grupos. (Gráfica 5).



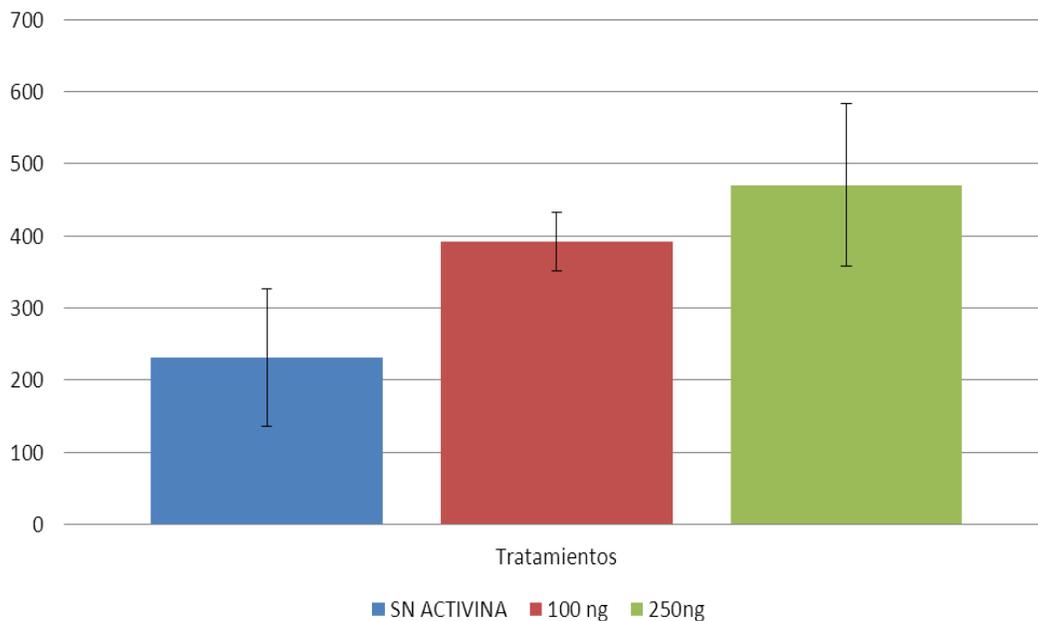
Gráfica 5. Porcentaje de queratinocitos neonatales EDAR +. Para este caso, y de acuerdo a un ANOVA de una vía, el porcentaje de queratinocitos que presentan EDAR no es diferente significativamente entre las diferentes dosis.

Es de notar que el resultado no significativo en el porcentaje de células EDAR+ también pudo haber sido debido a que los queratinocitos neonatales de la línea SCCE020 al no estar en presencia de células alimentadoras carecen de las señales dérmicas, no cumpliendo con la condición señalada por Laurikkala (2002) en donde enuncia que la activina no puede inducir la expresión del receptor de ectodisplasia A1 cuando esté como epitelio aislado, sin mesénquima.

En contraste, cuando se analizó la intensidad con que se expresó EDAR en esta serie de cultivos de queratinocitos, observamos que a diferencia de los queratinocitos aislados de la epidermis, esta población celular muestra un menor incremento en la expresión de EDAR, sin embargo, mediante una prueba de ANOVA con un valor de $F= 7.6$, valor de $p= 0.0116$ y una significancia de 0.05 se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. Mediante una

comparación múltiple de Tuckey encontramos que solo la dosis de 250 ng/ml exhibe diferencias significativas con respecto a la expresión observada en el grupo sin estimulación con activina A. En la gráfica 6, se ilustran las desviaciones estándar y se observa como la desviación de los queratinocitos sin activina y la de la dosis de 250 ng/ml no se traslapan, ya que son las que presentan realmente una diferencia significativa en cuanto a la intensidad con que se expresa EDAR.

MIF DE FLUORESCENCIA



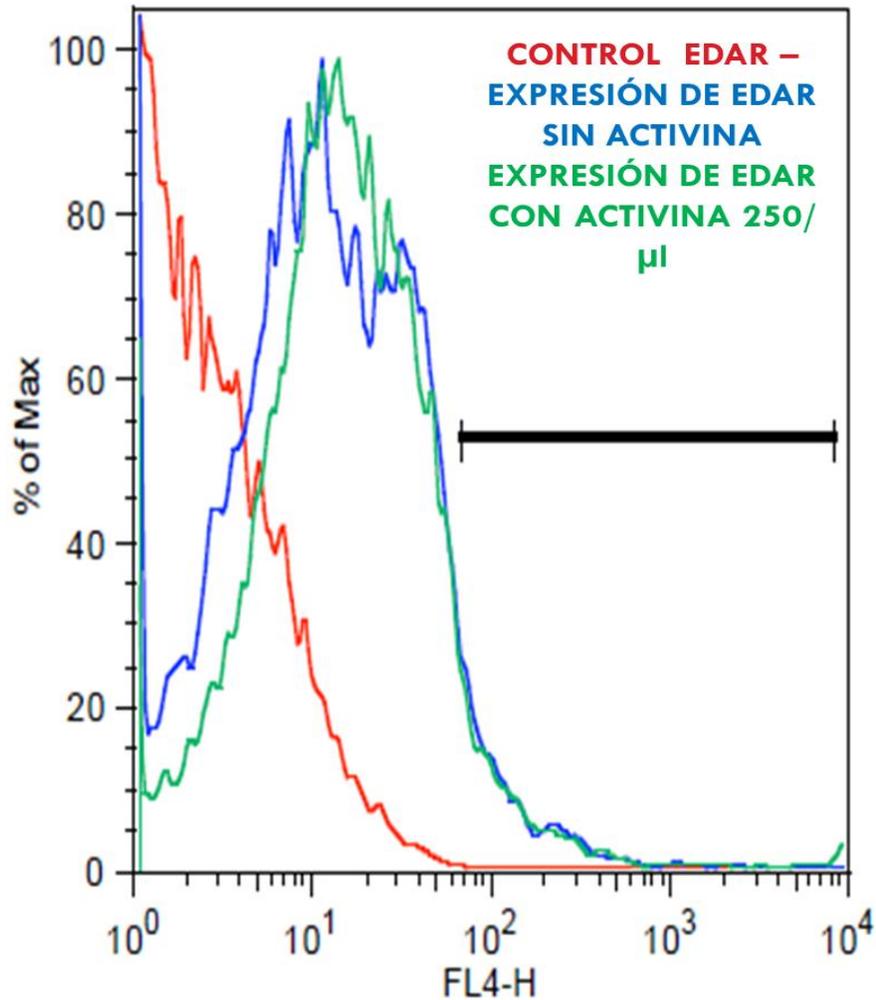
Gráfica 6. Media de intensidad de fluorescencia (MIF) para los queratinocitos neonatales que expresaron EDAR. Nótese como aparentemente existen diferencias entre tratamientos. De acuerdo a un ANOVA resultó si haber diferencias significativas entre tratamientos ($F= 7.6$, $p=0.0116$, $\alpha= 0.05$). Mediante la prueba de Tukey se encontró únicamente diferencias significativas en la MIF en el tratamiento con la dosis de 250ng/ml con respecto al tratamiento sin activina.

Con lo anterior, demostramos que la dosis que estimula un mayor incremento en la intensidad de la expresión es la de 250 ng/ml.

De esto modo podemos afirmar que tanto los queratinocitos aislados de la epidermis como los queratinocitos de la línea celular son susceptibles al efecto de la activina A. No obstante observamos una mejor respuesta en cuanto al porcentaje de células en el cultivo primario, lo cual podemos atribuirlo a que cuando se aislaron los queratinocitos de las biopsias de piel, se recupera una suspensión celular heterogénea constituida no solamente por queratinocitos basales (células amplificadoras) sino también algunas poblaciones de células madre epidérmicas, ya que de acuerdo al grosor y a la localización anatómica de donde se obtuvo la biopsia de piel pudimos haber disgregado piel con folículos pilosos y glándulas mostrando una

curva muy clara. Mientras que para los cultivos de los queratinocitos de la línea celular, se trata de queratinocitos adultos, donde mayoritariamente son células amplificadoras que conforman una población homogénea.

A continuación se muestran el histograma donde aparecen los tratamientos de los cultivos de queratinocitos neonatales que resultaron presentar diferencias significativas en cuanto a la Media de intensidad de Fluorescencia, el tratamiento sin estimulación de activina A y el tratamiento estimulado con una dosis de 250ng/ml (Gráfica 7).



Gráfica 7. Histograma comparativo entre los queratinocitos con una Media de Intensidad de Fluorescencia estadísticamente diferente. En rojo, la gráfica de la región negativa para EDAR, en azul, la gráfica de la expresión basal de EDAR y en verde la expresión con una dosis de 250ng/ml. Nótese como la gráfica verde se desplaza a la derecha con respecto a la azul, y en la parte inferior derecha muestra una pequeña población que expresa intensamente a EDAR.

Los resultados concuerdan con los encontrados por Laurikkala y cols. (2002) que demostraron que de varias moléculas, sólo la activina A promovía la expresión de EDAR siempre y cuando el epitelio estuviera acompañado de tejido mesénquimal, ya que en el epitelio aislado el efecto de la activina A se veía suprimido. En este caso, nuestros resultados son paralelos a este trabajo en el sentido de que si se presentó un aumento en la expresión de EDAR por la estimulación con activina A, sin embargo es importante notar que Laurikkala y cols. trabajaron con explantes de piel completa (epitelio y mesénquima presentes) durante el desarrollo embrionario en modelos experimentales de ratón, mientras que en este caso, trabajamos con cultivos celulares de queratinocitos humanos adultos, en donde para los cultivos primarios de queratinocitos, la células alimentadoras subyacente pudieron representar al tejido conjuntivo (o mesénquimal durante el desarrollo embrionario), sin embargo para los cultivos secundarios que no necesitaron de la monocapa de células 3T3, la condición de Laurikkala no fue satisfecha. Lo anterior pudiera explicar porque la tendencia de EDAR a aumentar su expresión es más clara en los cultivos primarios tanto en la proporción de queratinocitos positivos a EDAR como en la intensidad con que este receptor se expresaba mientras que en los cultivos secundarios de queratinocitos, esta tendencia solo se mostró ser evidente en cuanto a la intensidad de expresión del receptor. Por otro lado, a pesar de que Laurikkala y cols. utilizaron una dosis más elevada por un menor tiempo de exposición, nuestros resultados sugieren que a menores dosis y durante un mayor tiempo de tratamiento la estimulación de la expresión de EDAR también se presenta.

Con respecto al trabajo de Nakamura y cols (2003), ellos también cultivaron explantes de piel murina embrionaria sin embargo no pretendían demostrar que la activina fuera un promotor de la expresión de EDAR, más bien querían evidenciar el papel fundamental que tiene la activina y la folistatina durante el desarrollo del pelo en ratones. Nosotros manejamos el mismo tiempo de exposición que ellos, y utilizamos dosis mayores a las que ellos paltearon (30ng/ml). Para Nakamura y cols. la activina A es un inhibidor del desarrollo de los folículos en el pelo, considerándolo como antagonista de la folistatina que acelera la morfogénesis del pelo murino.

El trabajo de Matzuk y cols. (1995) también respalda la función elemental de la activina A en el desarrollo de bigotes y vibras en ratón. En este caso, ellos trabajaron con ratones en desarrollo deficientes de activina A observando todas las deficiencias que la ausencia de la activina A provocaba.

Aunque estos dos últimos trabajos no se hayan enfocado a estudiar si la activina A induce la expresión de EDAR, han contribuido a demostrar la función importante que tiene ésta en el desarrollo del folículo, incluso en el del diente.

Lamentablemente no hay más estudios que se hayan encargado de investigar más acerca de la promoción de la expresión de EDAR por parte de la activina A. Escasos estudios como los realizados por Kere et al, 1996, Srivastava et al, 1997 y Bayes et al, 1998 han visto la expresión de EDA en la etapa adulta tanto en humanos como en ratones, desafortunadamente la expresión de EDAR no ha sido contemplada ni en humanos ni en ratones en la etapa adulta de acuerdo a lo citado por Mikkola 2003.

Existen otros trabajos más en donde han desarrollado modelos experimentales deficientes de EDA, evaluando si la administración exógena del ligando, puede mejorar o revertir las consecuencias de esa deficiencia, puesto que el receptor de EDA no se ve afectado. Otros manejan modelos en donde se sobre expresa EDA-A1 y obtienen apéndices cutáneos extras. Incluso han llevado al cabo la administración de EDA *in vivo* en ratones preñados, inyectando el ligando en el tiempo y forma para poder lograr a término el desarrollo del apéndice en cuestión.

Por el contexto escaso de literatura, la importancia del presente trabajo radica en que es un estudio de cultivo de células en etapa adulta y provenientes de humano, ningún trabajo se encuentra registrado que se enfoque en la promoción de la expresión de EDAR postnatalmente.

Lo que se intentó con los cultivos fue aumentar esa expresión y posiblemente inducir la expresión en aquellos otros que estén en posibilidad de expresarlo y no estén comprometidos hacia otros destinos, ya que de acuerdo a Mou y cols (2006) existen tres estados de expresión para EDAR, 1) aquellas células cuya expresión es indetectable y que probablemente serán excluidas del destino folicular, 2) aquellas con moderada expresión que pueden permanecer competentes para asumir cualquier destino y 3) aquellas con alto nivel de expresión que están comprometidas con un destino folicular. De esta forma, con la presencia de EDAR en los queratinocitos puede darse la unión con su ligando y posiblemente formarse placodas si se tiene las condiciones y moléculas necesarias que podrían diferenciarse a alguno tipo de apéndice. La presencia de EDAR es fundamental para tal hecho, ya que aun administrando exógenamente grandes cantidades de EDA A1 es necesario la presencia de su receptor, mismo que se puede administrar como tal, pero si estimular, de manera que el objetivo último es poder desarrollar un constructo que presente apéndices cutáneos.

Finalmente, la propuesta de trabajo sería tomar la variable tiempo de exposición de los tratamientos con la dosis de activina A para conocer si ésta también tiene una relación directa con la expresión del receptor de EDA-A1.

7. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados podemos concluir que tanto en los queratinocitos obtenidos de un cultivo primario, como aquellos de un cultivo secundario de queratinocitos humanos adultos presentaron un aumento en la expresión de EDAR al ser estimulado con activina A.

La expresión de EDAR fue dosis dependiente para el caso de los queratinocitos cultivados con 3T3 posiblemente debido a la heterogeneidad del cultivo; mientras que para los últimos experimentos con queratinocitos de la línea celular definieron como la mejor dosis para promover la mayor intensidad de la expresión de EDAR la dosis de 250 ng/ml de activina A

La expresión de EDAR se logró evaluar mediante citometría de flujo considerando el porcentaje de queratinocitos positivos para EDAR y la intensidad con éstos lo expresaban.

Este trabajo pretende sentar las bases para poder lograr el objetivo último que es desarrollar un constructo cutáneo con apéndices, los hallazgos que encontramos son valiosos al ser originales dado que no hay estudios precedentes que se enfoquen a la expresión del receptor de ectodisplasia A1 en etapa adulta y mucho menos en humanos. Consideramos que al demostrar que en efecto, la activina A si induce la expresión de EDAR en queratinocitos adultos posibilita una forma alterna de cubrir la necesidad de los pacientes con quemaduras o algún problema en que los apéndices cutáneos se vean afectados.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Barman, J. M., Astore, I., & Pecoraro, V. (1965). The normal trichogram of the adult. *The Journal of investigative dermatology*, 44(4), 233-236.
2. Barsh, G. (1999). Of ancient tales and hairless tails *The ABCs of cholesterol efflux*. *America*, 22(august).
3. Bayés, M., Hartung, A. J., Ezer, S., Pispá, J., Thesleff, I., Srivastava, A. K., & Kere, J. (1998). The anhidrotic ectodermal dysplasia gene (EDA) undergoes alternative splicing and encodes ectodysplasin-A with deletion mutations in collagenous repeats. *Human Molecular Genetics*, 7(11), 1661-1669.
4. Beer, H. D., Gassmann, M. G., Munz, B., Steiling, H., Engelhardt, F., Bleuel, K., & Werner, S. (2000). Expression and function of keratinocyte growth factor and activin in skin morphogenesis and cutaneous wound repair. *The journal of investigative dermatology Symposium proceedings the Society for Investigative Dermatology Inc and European Society for Dermatological Research*, 5(1), 34-39.
5. Bodemer, C., Smahi, A., Courtois, G., Rabia, S. H., & Do, R. (2002). The NF- κ B signalling pathway in human diseases : from incontinentia pigmenti to ectodermal dysplasias and immune-deficiency syndromes. *Human Genetics*, 11(20), 2371-2375.
6. Botchkarev, V. A., & Fessing, M. Y. (2005). Eder signaling in the control of hair follicle development. *J Investig Dermatol Symp Proc*, 10(3), 247-251.
7. Brown, C. W., Houston-Hawkins, D. E., Woodruff, T. K., & Matzuk, M. M. (2000). Insertion of *Inhbb* into the *Inhba* locus rescues the *Inhba*-null phenotype and reveals new activin functions. *Nature Genetics*, 25(4), 453-457.
8. Casal, M. L., Lewis, J. R., Mauldin, E. a, Tardivel, A., Ingold, K., Favre, M., et al. (2007). Significant correction of disease after postnatal administration of recombinant ectodysplasin A in canine X-linked ectodermal dysplasia. *American journal of human genetics*, 81(5), 1050-6.
9. Chen, Y., Molloy, S. S., Thomas, L., Gambee, J., Bächinger, H. P., Ferguson, B., et al. (2001). Mutations within a furin consensus sequence block proteolytic release of ectodysplasin-A and cause X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(13), 7218-23.
10. Chu D V, Haake R A, Holbrook K. Estructura y desarrollo de la piel. En: Freedberg I M, Eisen A R, Wolff K, Austen K F, Goldsmith L A, Katz S I, Editores. *Fitzpatrick Dermatología en Medicina General* . Vol. 1. 7ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2005. p. 64-88
11. Clarke, A., Phillips, D. I. M., & Harper, P. S.(1987). Original articles Clinical aspects of X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Production*, 989-996.
12. Cui CY, Schlessinger D (2006) EDA signaling and skin appendage development. *Cell Cycle*, 5,2477-2483.

13. Cui, C.-Yi, Durmowicz, M., Ottolenghi, C., Hashimoto, T., Griggs, B., Srivastava, A. K., et al. (2003). Inducible mEDA-A1 transgene mediates sebaceous gland hyperplasia and differential formation of two types of mouse hair follicles, *12*(22), 2931-2940.
14. Cui, C.-Y., Kunisada, M., Esibizione, D., Douglass, E. G., & Schlessinger, D. (2009). Analysis of the temporal requirement for *eda* in hair and sweat gland development. *The Journal of investigative dermatology*, *129*(4), 984-93.
15. Drew, C. F., Lin, C. M., Jiang, T. X., Blunt, G., Mou, C., Chuong, C. M., & Headon, D. J. (2007). The *Edar* subfamily in feather placode formation. *Developmental Biology*, *305*(1), 232-245.
16. Ebling, F. J. (1980). Physiology of hair growth, *Cosmetic Science*, *2*:181-232.
17. Eby, M. T., Jasmin, a, Kumar, a, Sharma, K., & Chaudhary, P. M. (2000). TAJ, a novel member of the tumor necrosis factor receptor family, activates the c-Jun N-terminal kinase pathway and mediates caspase-independent cell death. *The Journal of biological chemistry*, *275*(20), 15336-42.
18. Elomaa, O., Pulkkinen, K., Hannelius, U., Mikkola, M., Saarialho-Kere, U., & Kere, J. (2001). Ectodysplasin is released by proteolytic shedding and binds to the EDAR protein. *Human Molecular Genetics*, *10*(9), 953-62.
19. Esch FS, Shimasaki S, Cooksey K, Mercado M, Mason AJ, Ying S-H, Ueno and Ling (1987) Complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) cloning and DNA sequence analysis of rat ovarian inhibin *Molecular Endocrinology* *1*(5), 388-396
20. Ezer, S., Bayés, M., Elomaa, O., Schlessinger, D., & Kere, J. (1999). Ectodysplasin is a collagenous trimeric type II membrane protein with a tumor necrosis factor-like domain and co-localizes with cytoskeletal structures at lateral and apical surfaces of cells. *Human molecular genetics*, *8*(11), 2079-86
21. Falconer DS. (1952). A totally sex-linked gene in the house mouse. *Nature*;169,664-5.
22. Fessing, M. Y., Sharova, T. Y., Sharov, A. A., Atoyan, R., & Botchkarev, V. A. (2006). Involvement of the *Edar* signaling in the control of hair follicle involution (catagen). *The American journal of pathology*, *169*(6), 2075-2084.
23. Feijen, A, Goumans, M. J., & Eijnden-van Raaij, a J. van den. (1994). Expression of activin subunits, activin receptors and follistatin in postimplantation mouse embryos suggests specific developmental functions for different activins. *Development (Cambridge, England)*, *120*(12), 3621-37.
24. Ferguson, C. A., Tucker, A. S., Christensen, L., Lau, A. L., Matzuk, M. M., & Sharpe, P. T. (1998). Activin is an essential early mesenchymal signal in tooth development that is required for patterning of the murine dentition. *Genes & Development*, *12*(16), 2636-2649.

25. Ferguson, C. A., Tucker, A. S., Heikinheimo, K., Nomura, M., Oh, P., Li, E., & Sharpe, P. T. (2001). The role of effectors of the activin signalling pathway, activin receptors IIA and IIB, and Smad2, in patterning of tooth development. *Development Cambridge England*, 128(22), 4605-4613.
26. Gaide, O., & Schneider, P. (2003). Permanent correction of an inherited ectodermal dysplasia with recombinant EDA. *Nature Medicine*, 9(5), 614-618.
27. Gartner L, Hiatt J. *Texto atlas de Histología*. 2ª edición. México: Mc Graw Hill Interamericana; 2002.p. 311-319
28. Gat, U., DasGupta, R., Degenstein, L., & Fuchs, E. (1998). De Novo hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated beta-catenin in skin. *Cell*, 95(5), 605-14.
29. Gilbert, S. F. *Biología del desarrollo*. 7ª edición. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2005. p.28.
30. Gruneberg H. (1971). The glandular aspects of the tabby syndrome in the mouse. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 25,1-19.
31. Hammerschmidt, B., & Schlake, T. (2007). Localization of Shh expression by Wnt and Eda affects axial polarity and shape of hairs. *Developmental Biology*, 305(1), 246-261.
32. Hardy, M. H. (1992). The secret life of the hair follicle. *Trends in Genetics*, 8(2), 55-61.
33. Harris, M. P., Rohner, N., Schwarz, H., Perathoner, S., Konstantinidis, P., & Nüsslein-Volhard, C. (2008). Zebrafish eda and edar Mutants Reveal Conserved and Ancestral Roles of Ectodysplasin Signaling in Vertebrates. *PLoS Genetics*, 4(10), 15.
34. Headon, D. J., & Overbeek, P. A. (1999). Involvement of a novel Tnf receptor homologue in hair follicle induction. *Nature Genetics*, 22(4), 370-374.
35. Headon DJ; Emmal SA; Ferguson BM; Tucker AS; Justice MJ; Sharpe PT; Zonana J; Overbeek PA (2001). Gene defect in ectodermal dysplasia implicates a death domain adapter in development. *Nature*; 414(6866),913-6.
36. Heikinheimo, M., Lawshe, A., Shackelford, G. M., Wilson, D. B., & MacArthur, C. A. (1994). Fgf-8 expression in the post-gastrulation mouse suggests roles in the development of the face, limbs and central nervous system. *Mech Dev*, 48(2), 129-138.
37. Holbrook KA, Minami SI (1991) Hair follicle embryogenesis in the human. Characterization of events in vivo and in vitro. *Annals of the New York Academy of Sciences Ann* 642:167-196
38. Houghton, L., Lindon, C., & Morgan, B. A. (2005). The ectodysplasin pathway in feather tract development. *Development Cambridge England*, 132(5), 863-872.

39. Houghton, L., Lindon, C. M., Freeman, A., & Morgan, B. a. (2007). Abortive placode formation in the feather tract of the scaleless chicken embryo. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 236(11), 3020-30.
40. Hymowitz, S. G., Compaan, D. M., Yan, M., Wallweber, H. J. a, Dixit, V. M., Starovasnik, M., et al. (2003). The Crystal Structures of EDA-A1 and EDA-A2. *Structure*, 11(12), 1513-1520.
41. Inoue, J.-I., Ishida, T., Tsukamoto, N., Kobayashi, N., Naito, A., Azuma, S., & Yamamoto, T. (2000). Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor (TRAF) Family: Adapter Proteins That Mediate Cytokine Signaling. *Experimental Cell Research*, 254(1), 14-24.
42. Jaskoll, T., Zhou, Y.-M., Trump, G., & Melnick, M. (2003). Ectodysplasin receptor-mediated signaling is essential for embryonic submandibular salivary gland development. *The anatomical record Part A Discoveries in molecular cellular and evolutionary biology*, 271(2), 322-331.
43. Kere J, Srivastava AK, Montonen O. (1996). X-linked anhidrotic (hypohidrotic) ectodermal dysplasia is caused by mutation in a novel transmembrane protein. *Nature Genetics*, 13:409–16.
44. Kim, S. K., Hebrok, M., Li, E., Oh, S. P., Schrewe, H., Harmon, E. B., Lee, J. S., et al. (2000). Activin receptor patterning of foregut organogenesis. *Genes & Development*, 14(15), 1866-1871.
45. Kligman, AM(1959) The human hair cycles. *Journal Investigative Dermatology*, 33(6), 307-317.
46. Kligman, AM. (1961) Pathologic Dynamics of Human Hair Loss: I. Telogen Effluvium. *Archives of Dermatology*. 83, 175-198.
47. Kondo, S., Kuwahara, Y., Kondo, M., Naruse, K., Mitani, H., Wakamatsu, Y., Ozato, K., et al. (2001). The medaka rs-3 locus required for scale development encodes ectodysplasin-A receptor. *Current Biology*, 11(15), 1202-1206.
48. Koppinen, P., Pispä, J., Laurikkala, J., Thesleff, I., & Mikkola, M. L. (2001). Signaling and subcellular localization of the TNF receptor Edar. *Experimental Cell Research*, 269(2), 180-192.
49. Kojima T, Morikawa Y, Copeland NG, et al.(2000). TROY, a newly identified member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, exhibits a homology with Edar and is expressed in embryonic skin and hair follicles. *Journal of Biological Chemistry*. 275(27), 20742–7.
50. Kumar, A., Eby, M. T., Sinha, S., Jasmin, A., & Chaudhary, P. M. (2001). The ectodermal dysplasia receptor activates the nuclear factor-kappaB, JNK, and cell death pathways and binds to ectodysplasin A. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(4), 2668-2677.
51. Laurikkala, J., Mikkola, M., Mustonen, T., Aberg, T., Koppinen, P., Pispä, J., Nieminen, P., et al. (2001). TNF signaling via the ligand-receptor pair ectodysplasin and edar controls the

function of epithelial signaling centers and is regulated by Wnt and activin during tooth organogenesis. *Developmental Biology*, 229(2), 443-455.

52. Laurikkala, J., Pispá, J., Jung, H.-S., Nieminen, P., Mikkola, M., Wang, X., Saarialho-Kere, U., et al. (2002). Regulation of hair follicle development by the TNF signal ectodysplasin and its receptor Edar. *Development Cambridge England*, 129(10), 2541-2553
53. Lavker M R, Bertolino PA, Sun T-T. *Biología de los folículos pilosos*. En: Freedberg I M, Eisen A R, Wolff K, Austen K F, Goldsmith L A, Katz S I, Editores. *Fitzpatrick Dermatología en Medicina General*. Vol. 1. 7ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2005. p. 166-176.
54. Llamas, S., García, E., García, V., Del Río, M., Larcher, F., Jorcano, J. L., López, E., et al. (2006). Clinical results of an autologous engineered skin. *Cell and Tissue Banking*, 7(1), 47-53.
55. Locksley, R. M., Killeen, N., & Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, 104(4), 487-501
56. Loomis CA, Koss T, Chu D. *Desarrollo de la piel fetal*. En: Lawrence F. Eichenfield, Esterly N B, Editores. *Dermatología neonatal*. 2a ed. Barcelona: Elsevier; 2009.p.1-12
57. Mathews, L. S., and Vale, W. W. (1993) Molecular and functional characterization of activin receptors. *Receptor* 3(3) 173.181
58. Mather, J.P., Moore, A. & Li, R.H. (1997). Activins, inhibins, and follistatins: further thoughts on a growing family of regulators. *Proceedings of the Society Experimental Biology and Medicine*. **215**(3),209-222
59. Matzuk, M. M., Kumar, T. R., Vassalli, A., Bickenbach, J. R., Roop, D. R., Jaenisch, R., & Bradley, A. (1995). Functional analysis of activins during mammalian development. *Nature*, 374(6520), 354-356.
60. Matzuk, M. M., Lu, N., Vogel, H., Sellheyer, K., Roop, D. R., and Bradley, A. (1995). Multiple defects and perinatal death in mice deficient in follistatin. *Nature (London)* 374(6520), 360-363
61. Merino, R., Macías, D., Gañan, Y., Rodríguez-Leon, J., Economides, A. N., Rodríguez-Esteban, C., Izpisua-Belmonte, J. C., et al. (1999). Control of digit formation by activin signalling. *Development Cambridge England*, 126(10), 2161-2170.
- 62.
63. Michel, M., Török, N., Godbout, M. J., Lussier, M., Gaudreau, P., Royal, A., & Germain, L. (1996). Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells in vivo and in vitro: keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage. *Journal of Cell Science*, 109 [Pt 5], 1017-1028
64. Mikkola, M. L., Pispá, J., Pekkanen, M., Paulin, L., Nieminen, P., Kere, J., & Thesleff, I. (1999). Ectodysplasin, a protein required for epithelial morphogenesis, is a novel TNF

- homologue and promotes cell-matrix adhesion. *Mechanisms of Development*, 88(2), 133-146.
65. Mikkola, M. L., & Thesleff, I. (2003). Ectodysplasin signaling in development. *Cytokine growth factor reviews*, 14(3-4), 211-224.
66. Mikkola, M. L., & Millar, S. E. (2006). The mammary bud as a skin appendage: unique and shared aspects of development. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 11(3-4), 187-203.
67. Mikkola, M. L. (2007). Genetic basis of skin appendage development. *Seminars in cell developmental biology*, 18(2), 225-236
68. Mikkola, M. L. (2008). TNF superfamily in skin appendage development. *Cytokine growth factor reviews*, 19(3-4), 219-230
69. Millar, S. E. (2002). Molecular mechanisms regulating hair follicle development. *The Journal of investigative dermatology*, 118(2), 216-225.
70. Miralles, F., Czernichow, P., & Scharfmann, R. (1998). Follistatin regulates the relative proportions of endocrine versus exocrine tissue during pancreatic development. *Development Cambridge England*, 125(6), 1017-1024.
71. Mitrani, E., Ziv, T., Shimoni, Y., Melton, D.A. & Bril, A. (1990). Activin Can Induce the Formation of Axial Structures and Is Expressed in the Hypoblast of the Chick Cell ,63, 495-501.
72. Monreal AW, Ferguson BM, Headon DJ, Street SL, Overbeek PA, Zonana J(1999). Mutations in the human homologue of mouse dl cause autosomal recessive and dominant hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Natural Genetics*, 22(4),366-9
73. Montonen, O., Ezer, S., Saarialho-Kere, U. K., Herva, R., Karjalainen-Lindsberg, M. L., Kaitila, I., Schlessinger, D., et al. (1998). The gene defective in anhidrotic ectodermal dysplasia is expressed in the developing epithelium, neuroectoderm, thymus, and bone. *The journal of histochemistry and cytochemistry official journal of the Histochemistry Society*, 46(3), 281-289.
74. Mou, C., Jackson, B., Schneider, P., Overbeek, P. A., & Headon, D. J. (2006). Generation of the primary hair follicle pattern. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(24), 9075-9080.
75. Munz, B., Smola, H., Engelhardt, F., Bleuel, K., Brauchle, M., Lein, I., Evans, L. W., et al. (1999). Overexpression of activin A in the skin of transgenic mice reveals new activities of activin in epidermal morphogenesis, dermal fibrosis and wound repair. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 18(19), 5205-5215.
76. Mustonen, T., Pispä, J., Mikkola, M. L., Pummila, M., Kangas, A. T., Pakkasjärvi, L., Jaatinen, R., et al. (2003). Stimulation of ectodermal organ development by Ectodysplasin-A1. *Developmental Biology*, 259(1), 123-136

77. Mustonen, T., Ilmonen, M., Pummila, M., Kangas, A. T., Laurikkala, J., Jaatinen, R., et al. (2004). Ectodysplasin A1 promotes placodal cell fate during early morphogenesis of ectodermal appendages. *Development (Cambridge, England)*, 131(20), 4907-19.
78. Naito, A., Yoshida, H., Nishioka, E., Satoh, M., Azuma, S., Yamamoto, T., Nishikawa, S.-I., et al. (2002). TRAF6-deficient mice display hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(13), 8766-8771.
79. Nakamura, T., Takio, K., Eto, Y., Shibai, H., Titani, K., and Sugino, H. (1990) Activin binding protein from rat ovary is follistatin. *Nature (London)* 247(4944), 836-838
80. Nakamura, M., Matzuk, M. M., Gerstmayr, B., Bosio, A., Lauster, R., Miyachi, Y., Werner, S., et al. (2003). Control of pelage hair follicle development and cycling by complex interactions between follistatin and activin. *The FASEB journal official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(3), 497-499.
81. Newton, K., French, D. M., Yan, M., Frantz, G. D., & Dixit, V. M. (2004). Myodegeneration in EDA-A2 Transgenic Mice Is Prevented by XEDAR Deficiency. *Society*, 24(4), 1608-1613.
82. Nordgarden H, Mustonen T, Berner HS, Pispá J, Ilmonen M, Jensen JL, et al. (2004) Ectodysplasin A1 promotes epithelial branching and duct formation in developing submandibular glands. *Oral Biosciences Medical*; 1:195–206.
83. Orlinick, J. R., & Chao, M. V. (1998). TNF-related ligands and their receptors. *Cellular signalling*, 10(8), 543-51.
84. Parenteau L N, Hardin-Young J, Ross N R. Skin. En: Lanza, R; Langer, R. y Vacanti J, Editores. Principles of Tissue Engineering. 2ª ed. USA: Academic Press; 2000.p. 879-886
85. Paus, R., Müller-Röver, S., Veen, C. V. D., Maurer, M., Eichmu, S., & Ling, G. (1999). A comprehensive guide for the recognition and classification of distinct stages of hair follicle morphogenesis. *The Journal of investigative dermatology*, 113(4), 523-32.
86. Pinheiro M, Freire Maia N.(1994). Ectodermal dysplasias: a clinical classification and a causal review. *American Journal of Medical Genetics*, 53(2):153-62.
87. Pispá, J., & Thesleff, I. (2003). Mechanisms of ectodermal organogenesis. *Developmental Biology*, 262(2), 195-205
88. Puig S L. Anatomía y fisiología de la piel humana. En: Ferrándiz C, Editores. Dermatología clínica. 2ª ed. Madrid: Elsevier; 2001.p.1-10
89. Rawlins, E. L., & Hogan, B. L. M. (2005). Intercellular growth factor signaling and the development of mouse tracheal submucosal glands. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 233(4), 1378-85.

90. Reed WB, Lopez DA, Landing B. (1970). Clinical spectrum of anhidrotic ectodermal dysplasia. *Archives of Dermatology*, 102(2), 134-43.
91. Rheinwald J. G y Green H. (1975). Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation the keratinizing colonies from single cells. *Cell*, 6, 331-344
92. Roberts, V.J., P.E. Sawchenko, and W.W. Vale. (1991). Expression of inhibin/activin subunit messenger ribonucleic acids during rat embryogenesis. *Endocrinology* ,128 (6), 3122-3129.
93. Rögemüller, C. D., & Istl, O. D. (2003). X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia (ED1) in men , mice , and cattle. *Review Literature And Arts Of The Americas*, 35, 137-145.
94. Ross M H., Wojciech P. *Histología: Texto y Atlas de color con Biología Celular y Molecular*. 5ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2007.p. 480-492
95. Rook, A. (1965). Endocrine influences on hair growth. *British medical journal*, 1(5435), 609-614
96. Schlake, T. (2007). Determination of hair structure and shape. *Seminars in cell & developmental biology*, 18(2), 267-73.
97. Schmidt-Ullrich R, Aebischer T, Hulsken J, Birchmeier W, Klemm U, Scheidereit C.(2001). Requirement of NF- κ B/Rel for the development of hair follicles and other epidermal appendages. *Development*, 128:3843-53.
98. Schmidt-Ullrich, R., & Paus, R. (2005). Molecular principles of hair follicle induction and morphogenesis. *BioEssays news and reviews in molecular cellular and developmental biology*, 27(3), 247-261.
99. Schmidt-Ullrich, R., Tobin, D. J., Lenhard, D., Schneider, P., Paus, R., & Scheidereit, C. (2006). NF-kappaB transmits Eda A1/EdaR signalling to activate Shh and cyclin D1 expression, and controls post-initiation hair placode down growth. *Development (Cambridge, England)*, 133(6), 1045-57.
100. Seiberg M, Marthinuss J, Stenn KS (1995) Changes in expression of apoptosis-associated genes in skin mark early catagen. *Journal Investigative Dermatology*. 104:78-82
101. Smith, J. C., & Price, B. J. (1990). Identification of a potent *Xenopus* mesoderm-inducing factor as a homologue of activin A. *Nature*, 345(6277), 729
102. Sofaer, J.A.(1969). Aspects of the tabby-crinkled-downless syndrome. I. The development of tabby teeth. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 22(2), 181-205.
103. Srivastava, A. K., Pispas, J., Hartung, A. J., Du, Y., Ezer, S., Jenks, T., Shimada, T., et al. (1997). The Tabby phenotype is caused by mutation in a mouse homologue of the EDA gene that reveals novel mouse and human exons and encodes a protein [ectodysplasin-A] with collagenous domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(24), 13069-13074.

104. Stenn, K. S., & Paus, R. (2001). Controls of hair follicle cycling. *Physiological Reviews*, 81(1), 449-494.
105. Strumia, R. (2009). Skin signs in anorexia nervosa. *Dermatoendocrinology*, 1(5), 268-270.
106. Thesleff, I., Mikkola, M.L., (2002). The role of growth factors in tooth development. *International Review Cytology*.217, 93– 135.
107. Thomsen, G., Woolf, T., Whitman, M., Sokol, S., Vaughan, J., Vale, W., and Melton, D.A. (1990). Activins are expressed in early *Xenopus* embryogenesis and can induce axial mesoderm and anterior structures. *Cell* 63(3): 485-493.
108. Tucker, a S., Headon, D. J., Schneider, P., Ferguson, B. M., Overbeek, P., Tschopp, J., et al. (2000). Edar/Eda interactions regulate enamel knot formation in tooth morphogenesis. *Development (Cambridge, England)*, 127(21), 4691-700
109. Ueno, N., Ling, N., Ying, S. Y., Esch, F., Shimasaki, S., & Guillemin, R. (1987). Isolation and partial characterization of follistatin: a single-chain Mr 35,000 monomeric protein that inhibits the release of follicle-stimulating hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(23), 8282-8286
110. Van Keymeulen, A., Mascré, G., Youseff, K. K., Harel, I., Michaux, C., De Geest, N., Szpalski, C., et al. (2009). Epidermal progenitors give rise to Merkel cells during embryonic development and adult homeostasis. *The Journal of Cell Biology*, 187(1), 91-100.
111. Veltmaat, J. M., Mailloux, A. A., Thiery, J. P., & Bellusci, S. (2003). Mouse embryonic mammosgenesis as a model for the molecular regulation of pattern formation. *Differentiation research in biological diversity*, 71(1), 1-17.
112. Voght A, McElwee K, Bl—ume-Peytav U. Biology of the hair follicle. En: Blume-Peytav U, Tosti A, Whiting D A, Trüeb R, Editores. *Hair Growth and disorders*. 1a ed. Alemania: Springer; 2008.p.1-14.
113. Wajant H.(2003). Death receptors. *Essays Biochemical*, 39:53-71
114. Wankell, M., Munz, B., Hübner, G., Hans, W., Wolf, E., Goppelt, A., & Werner, S. (2001). Impaired wound healing in transgenic mice overexpressing the activin antagonist follistatin in the epidermis. *the The European Molecular Biology Organization Journal*, 20(19), 5361-5372.
115. Watt, F. M. (1998). Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences*, 353(1370), 831-837.
116. Welsch, U., Sobotta J., *Histología*. 2^a ed. Madrid: Médica Panamericana; 2008.p. 549-562
117. Wiśniewski, S. A., Kobiela, A., Trzeciak, W. H., & Kobiela, K. (2002). Recent advances in understanding of the molecular basis of anhidrotic ectodermal dysplasia:

discovery of a ligand, ectodysplasin A and its two receptors. *Journal of Applied Genetics*, 43(1), 97-107.

118. Yan MH, Wang LC, Hymowitz SG, et al.[2000]. Two-amino acid molecular switch in an epithelial morphogen that regulates binding to two distinct receptors. *Science*, 290,523-7.
119. Yan M, Brady JR, Schilbach S, Fairbrother WJ, Dixit VM. [2002]. Identification of a novel death domain-containing adaptor molecule for ectodysplasin-A receptor that is mutated in crinkled mice. *Current Biology*, 12(5),409-413.
120. Zhang M, Brancaccio A, Weiner L, Missero C, Brissette JL.[2003]. Ectodysplasin regulates pattern formation in the mammalian hair coat. *Genesis*;37(1),30-7.