



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

Doctorado en ciencias Biomédicas

Facultad de Medicina UNAM

Participación del factor de crecimiento transformante beta en el modelo de
síndrome de banda amniótica en la rata

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA: Mirza Gabriela Romero Valdovinos

TUTORA Dra. Ana Flisser Steinbruch
Facultad de Medicina UNAM

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval

Instituto de Ciencias Biomédicas e Instituto Nacional de Ciencias de la Nutrición "Dr. Salvador
Zubirán"

Dr. Felipe Vadillo Ortega

Unidad de vinculación de la Facultad de Medicina UNAM en el Instituto de Ciencias Genómicas

Ciudad de México., Mayo 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Índice

Abstract.....	3
Resumen	4
Introducción.....	5
Planteamiento del problema.....	14
Pregunta de investigación.....	15
Hipótesis	15
Objetivos	15
Material y Métodos	16
Resultados	19
Discusión	30
Referencias	34

Abstract

Amniocentesis in rats is associated with different malformations such as cleft palate and limb deformation, resembling the human congenital amniotic band syndrome (ABS). In spite of the many human cases reported in the literature little is known about the mechanisms involved in ABS. This study addressed the activation of the transforming growth factor β (TGF β 1) pathway is in part associated to amniotic band formation and growth restriction induced in rats by amniocentesis as in a previously published model.

For this purpose, quantification of TGF β , α -smooth muscle actin (Acta2) and collagen type I (Col1a1) mRNA and protein levels were determined by qPCR and Western blot, respectively, in the fetus, in its amniotic membrane and in the uterus of experimental and control rats. We found that TGF β mRNA levels are increased in the fetus and in the amniotic membrane at 6 hours while Acta2, phosphorylated Smad3 and Col1a1 increased at 48h suggesting that a fibrotic response is induced after the amniotic sac puncture. Furthermore fetuses had hemorrhages, syndactyly and amputation of limbs, similar to human ABS

Resumen

En ratas la amniocentesis se ha asociado con diferentes malformaciones como labio paladar hendido, def ormación de e xtremidades similares a l as que s e encuentran en e l s índrome de banda am niótica humano (SBA). A pes ar de l gran número de reportes médicos en la literatura, poco se sabe del mecanismo involucrado en SBA. Aunque se ha sugerido que el TGF β podría estar asociado. En este estudio se investigó la activación del factor de crecimiento transformante beta (TGF β) en el modelo por amniocentesis en rata publicado previamente.

Para tal propósito se cuantificaron los mRNAs de TGF β , actina de músculo liso (Acta2) y colágena tipo I (Col1a1) y se observó la expresión de estas proteínas por Western-blot en el feto, la membrana amniótica y el útero de ratas grávidas sometidas a am niocentesis. Se enc ontraron niveles d e m RNA de TGF β 1 elevados des de l as 6 h de am niocentesis m ientras q ue A cta2 y Col1a1 s e incrementan a las 48h sugiriendo un proceso de fibrosis inducido por la punción en el s aco am niótico. E n l os fetos enc ontramos hem orragias, s indactilia y amputación de extremidades similares a las observadas en SBA humano.

Introducción

El síndrome de banda amniótica (SBA) consiste en un grupo de anomalías congénitas y esporádicas caracterizadas por anillos de constricción o amputación de dedos y extremidades, pseudosindactilia (fusión de dedos), polidactilia, inversión de pies (pie equino) y múltiples defectos craneo-faciales, viscerales y en el cierre de cavidades corporales. Los defectos craneales asociados con el SBA son: hidrocefalia, microcefalia, meningocele, exencefalia, acrania, a calvaria, y anencefalia. Las anomalías faciales incluyen labio paladar hendido (comúnmente bilateral) fisuras medio faciales, deformidad nasal, fisuras del hueso orbital, hipertelorismo, obstrucción del lagrimal, ausencia de párpados, opacidades corneales y otras anomalías de órganos internos como defectos cardíacos y genitourinarios¹. El SBA observado en familias se debe a anomalías genéticas en el tejido conjuntivo, tales como el síndrome de Ehlers-Danlos tipo IV y osteogénesis imperfecta². Los defectos en las extremidades se presentan con mayor frecuencia en niños que sufrieron daño *in utero*, ya sea por exposición a algún teratógeno como la talidomida y el misoprostol (análogo a prostaglandina E1) o al procedimiento de amniocentesis con muestreo de las vellosidades coriónicas. Cada uno de estos factores produce diferentes deformidades, mientras que la talidomida presenta patrones simétricos de deficiencias como la polidactilia; la amniocentesis y el misoprostol, generan pérdidas asimétricas de dedos, bandas de constricción o sindactilia. Se ha propuesto que estas anomalías están relacionadas con eventos que causan ruptura temprana del amnios y disrupción vascular^{3,4}. La incidencia mundial estimada para este síndrome es de 1: 12,000 nacimientos vivos⁵, aunque un estudio de cohorte de 161, 252 madres, en la que se

incluyeron los productos que no llegaron a término, mostró que la frecuencia del SBA se incrementó hasta a 7 de cada 1000 embarazos⁶. Los factores de riesgo asociados al desarrollo de SBA son: la altitud asociada a mecanismos de hipoxia, la edad temprana de la madre y tabaquismo⁷⁻⁹.

Las hipótesis más aceptadas para explicar el mecanismo de patogenia del SBA son: 1) la ruptura y reparación de la membrana amniótica durante el primer trimestre del embarazo, Si hay fuga de líquido amniótico, éste resulta en la compresión y generación de bandas fibrosas que pueden causar daño mecánico (amputación, deformación y constricción^{3,4}); y 2) la ruptura de vasos sanguíneos^{10,11}. Las anomalías internas se han considerado como el resultado de la proximidad del embrión al sitio afectado de la membrana amniótica y que al formarse el fibroma éste haya impedido la circulación en la región afectada^{12,13}. La hipótesis de bandas fibrosas asume que lesiones discretas causan bandas de adhesión que interfieren con el desarrollo temprano del embrión, resultando en una desorganización básica; alternativamente, una mutación del equivalente humano del gen *d* de desorganización del ratón¹⁴ puede ser la causa del SBA grave. Aunque estas hipótesis son aceptadas, fallan en explicar todos los defectos internos encontrados en los fetos afectados; además de que en muchos casos la presencia de malformaciones no se localiza en el lugar donde se formó la banda, ya que se encuentran malformaciones intracraneales y, en algunos casos, hasta trastornos proliferativos de piel que incluyen apéndices, bridas y pedículos de piel; acompañados o no de polidactilia¹⁵. Múltiples argumentos están en contra de esta última propuesta, incluyendo el tiempo que podría requerirse entre la ruptura de las membranas y la presencia de las

malformaciones. A pesar de que en la literatura existen múltiples informes de casos de banda amniótica, el diagnóstico sonográfico se lleva a cabo de manera tardía, en él se observan bandas de constricción y si bien las extremidades afectadas se pueden liberar por cirugía intrauterina, no se ha logrado evitar el estrangulamiento y amputación de las mismas¹⁶.

Como se mencionó antes, uno de los rasgos más característicos del SBA es la formación de fibromas que estrangulan a las extremidades y a otras partes del cuerpo, lo que podría considerarse una cicatrización fibrótica. Durante el primer trimestre de la vida fetal se reparan los tejidos dañados sin formar una cicatriz; sin embargo, a partir del segundo trimestre, cuando existe un proceso de cicatrización, este se vuelve exacerbado, fibroso y anómalo¹⁷. La diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos que son: fibroblastos especializados más parecidos a músculo liso, está mediada por TGFβ1, el cual promueve el reclutamiento celular y el depósito de colágeno en cicatrices post natales, que se caracterizan por la expresión de alfa actina de músculo liso (*Acta2, alpha-smooth muscle actin*)¹⁸

Los miofibroblastos están presentes durante la cicatrización y en las fibrosis, se consideran el resultado de una falla en la supresión de la respuesta de cicatrización. Los elementos relevantes para desarrollar fibrosis son las citocinas proinflamatorias que producen los macrófagos durante la cicatrización e incluyen al TNF-α y TGFβ. Después de que se produce una lesión se induce TGFβ que atrae neutrófilos, macrófagos y fibroblastos, los que liberan más TGFβ; se ha observado además que los receptores celulares para TGFβ se encuentran incrementados en fibroblastos de cicatrices queloideas e hipertróficas¹⁹. *In vivo* en las cicatrices fetales tratadas con TGFβ se promueve

la cicatrización y el cierre de heridas, ya que induce un exceso en la síntesis de matriz extracelular cuando éste se inyecta subcutáneamente en ratones²⁰. En el mismo modelo, la inyección de anticuerpos o RNA anti-sentido contra TGFβ suprime la producción de matriz extracelular y la cicatrización. En cultivo de células mesenquimales, TGFβ causa el depósito de proteínas de matriz extracelular, promueve la expresión de genes que codifican para estas proteínas y suprime la expresión de genes que codifican para proteínas que degradan la matriz, como las metaloproteasas²¹. Además TGFβ induce la expresión de colágena por medio de activadores transcripcionales (Smads). Smad2 y 3 son fosforilados directamente por el receptor de TGFβ y se unen a un mediador común Smad4, que se traslada dentro del núcleo, donde se une a la secuencia de 5 nucleótidos CAGAC²². Esta ruta de señalización está fuertemente controlada por la ruta de las cinasas activadas por mitógeno (MAPK) ras/MEK/ERK. Existen sitios de fosforilación ERK en la región de unión de Smad3. En células epiteliales la sobreexpresión de miembros de la vía ras/MEK/ERK bloquea la acumulación de Smads en el núcleo e inicia el complejo de activación de expresión de genes²³.

El TGFβ se aisló inicialmente de plaquetas humanas, placenta y riñón bovino. Se considera el prototipo de citocina multifuncional debido a que puede actuar como inhibidor, activador de la replicación celular y controlar la síntesis de múltiples componentes de la matriz extracelular^{24, 25}. Por su naturaleza multifuncional no es sorprendente que TGFβ esté presente en casi todas las estirpes celulares.

Se han descrito 3 isoformas de TGFβ en los vertebrados TGFβ1, 2 y 3 que están codificadas en distintos genes y son muy conservadas pues comparten

del 71 al 79% de identidad; además hay también tres receptores, el 1 y 2 son transmembranales y miembros de la familia serina/treonina cinasas, mientras que el receptor tipo 3 es betaglicano, tiene alta afinidad para unir las isoformas de TGF β y puede ser crítico para mantener TGF β en la superficie celular pero no tiene motivos intracelulares^{26, 27}. TGF β se secreta como un complejo unido a las proteínas de latencia (LAP)²⁸, y de esta forma no se puede unir a su receptor por lo tanto está inactivo, Una vez que se libera por la actividad de proteasas^{21, 29} o interacción con integrinas³⁰ expresadas en miofibroblastos, células epiteliales y dendríticas se activa y puede unirse a su receptor^{31, 32, 33}

La ruta de señalización que involucra a TGF β 1 controla diversos procesos celulares, incluyendo la proliferación celular, el reconocimiento, diferenciación, apoptosis y destino celular durante el desarrollo embrionario, así como en la maduración de tejidos. TGF β se encuentra presente en muchas especies desde moscas y guisanos hasta mamíferos^{21,29} TGF β 1 inicia la cascada de señalización uniéndose a un dímero formado por los receptores tipo I y II. Esto permite al receptor II fosforilar al dominio cinasa del receptor I, el cual entonces propaga la señal por medio de la fosforilación de las proteínas Smad.

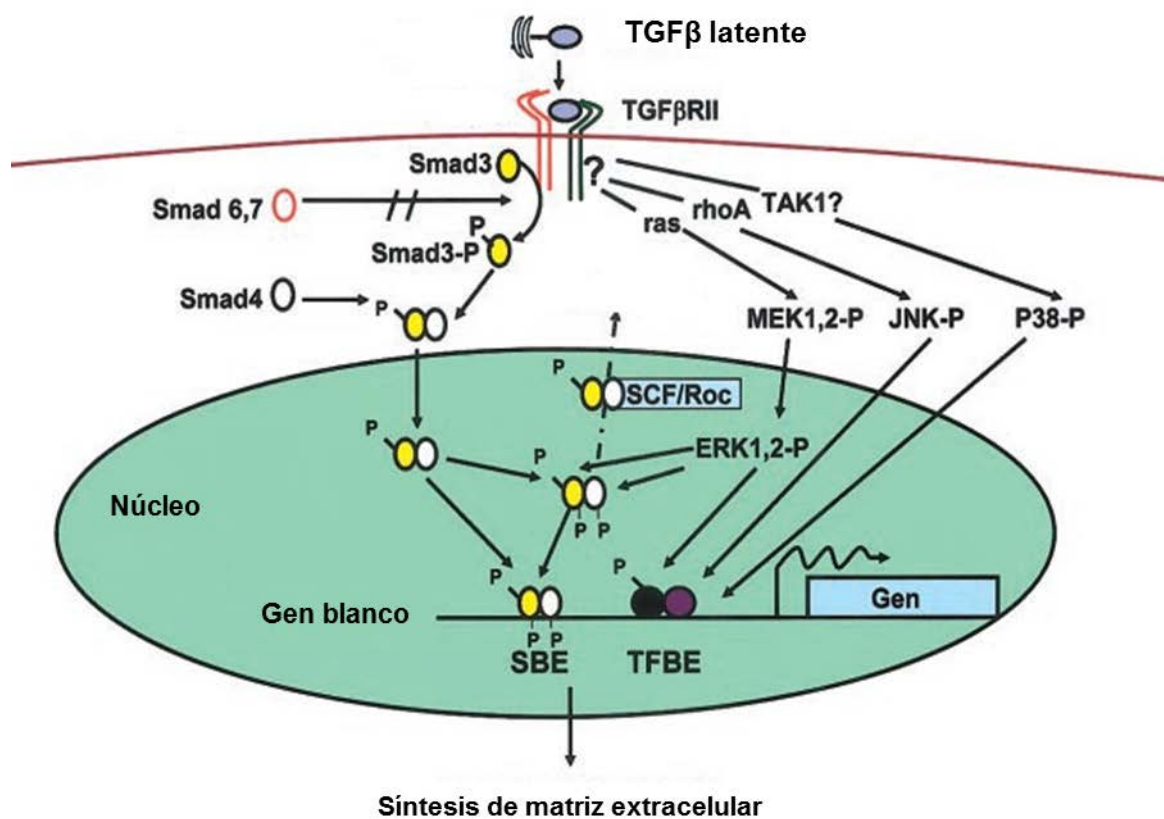
Hay 8 proteínas Smad distintas que constituyen 3 clases funcionales: las reguladas por receptor (R-Smad), el co-mediador (co-Smad) y los inhibidores (I-Smad). R-Smads (Smad1, 2, 3, 5 y 8) son directamente fosforiladas por el receptor tipo uno y forman complejos heteroméricos con la Co-Smad (Smad 4) El complejo activado se traslada al núcleo y en conjunto con otros cofactores nucleares regula la transcripción de los genes blanco. Las I-Smad (Smad 6 y Smad 7) regulan negativamente la señal de TGF β por competencia por el receptor con R-Smad o interaccionando con Co-Smad y marcan el complejo

receptor de TGF β para degradación^{34, 35}. La familia de citocinas del TGF β se caracteriza por seis residuos de cisteína conservados, incluyen a dos subfamilias, TGF β /activina/nodal, la familia de las proteínas morfogénicas de hueso (BMP), que incluyen el factor de diferenciación (GDF) y el factor inhibidor mulleriano, definidas por la similitud entre sus secuencias y las rutas de señalización que activan.

La cicatrización consiste en un programa coordinado de eventos que se inicia con la formación de un coágulo de fibrina, seguido por el reclutamiento de células inflamatorias, formación de tejido de granulación, la angiogénesis, la proliferación de fibroblastos, la migración de los queratinocitos y la contracción de la dermis que ayuda al cierre de la lesión. Finalmente ocurre el remodelamiento de la cicatriz completando el proceso de reparación. En el adulto la cicatrización restablece la integridad de los tejidos después de una lesión, pero la consecuencia es una cicatriz fibrosa. En contraste durante la gestación temprana el feto tiene la capacidad de sanar sus heridas sin cicatrizar¹⁷. Debido a que el feto vive en un ambiente único, los primeros estudios se dirigieron a observar si las condiciones *in utero* contribuían a la reparación sin cicatrización. Sin embargo, utilizando marsupiales (zarigüeya americana), que se desarrollan fuera del útero, se demostró que este ambiente no es necesario³⁶, también los xenotransplantes de piel humana fetal en ratones inmunocomprometidos mostraron reparación del tejido sin cicatriz, lo que sugiere que es una característica de los fibroblastos fetales³⁷.

De los factores de crecimiento relacionados con la cicatrización el más estudiado es el TGF β y sus isoformas. En los tejidos adultos hay un incremento relativo de TGF β 1 y TGF β 2 comparado con TGF β 3. En contraste, los

fibroblastos fetales producen más TGFβ3 y menos de las isoformas 1 y 2. Las cicatrices patológicas (hipertróficas) en adultos muestran altos niveles de TGFβ1 y estudios funcionales, en los que se inhibe TGFβ1, las cicatrices disminuyen. Por el contrario al agregar TGFβ1 en la mitad de la gestación se produce tejido cicatricial. Esto indica que los niveles bajos de TGFβ1 están asociados con disminución de la cicatrización³⁵.



Esquema de la ruta de activación de TGFβ vía Smad3 en la producción de matriz extracelular. TGFβ se desprende de la proteína de latencia, se une a su receptor y transduce la señal vía Smad3, esta se une a Smad4 y entra al núcleo para activar la transcripción de genes de matriz extracelular. Modificado de Leask A et al 2004³⁸.

En condiciones normales, el proceso de reparación que sigue a una lesión se completa por la degradación de la matriz extracelular y la apoptosis de los miofibroblastos. Sin embargo, en algunos casos ocurre la desregulación de los mecanismos de control lo que resulta en una respuesta fibrótica con la acumulación de matriz extracelular, rica en fibras de colágena que coalescen y forman bandas resistentes a la degradación³⁹.

La fibrosis crónica se puede dividir en tres fases, la primera: fase, que es inflamatoria, se debe a la respuesta inicial a la lesión: las células producen citocinas proinflamatorias, quimocinas y moléculas de adhesión que inducen la infiltración de macrófagos,; la segunda fase es la de producción de matriz extracelular: en la que las citocinas producidas por los macrófagos, TGF β y factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), estimulan la transdiferenciación de células epiteliales y fibroblastos residentes a miofibroblastos. La tercera fase es de acumulación de matriz extracelular: en la que los miofibroblastos, bajo la acción de TGF β y CTGF, sintetizan grandes cantidades de proteínas de matriz extracelular como fibronectina y colágena, además evitan su degradación por la síntesis de inhibidores de proteasa como inhibidor del activador de plasminogeno I e inhibidor de metaloproteasa tisular (TIMP)⁴⁰.

TGF β se expresa en muchos tejidos embrionarios del ratón, sin embargo cuando se obtienen ratones nulos (*Knockout*) a TGF β 1 presentan defectos hematopoyéticos, defectos vasculares y muerte neonatal; aunque tienen un fenotipo normal. A las 3 semanas del nacimiento desarrollan un síndrome de desgaste severo relacionado con una respuesta inflamatoria aumentada. Si se elimina el gen TGF β 2 se presentan malformaciones cardíacas, pulmonares,

craneofaciales, de extremidades, de columna vertebral, ojo, oído interno así como defectos genitourinarios. Estos tejidos se derivan de componentes de las crestas neurales⁴¹. En los ratones nulos a $TGF\beta 3$ se observa crecimiento anormal del pulmón y paladar hendido^{42,43}. Con respecto a los receptores de $TGF\beta$ el dominante negativo para el receptor 2 presenta defectos en hematopoyesis, vasculogénesis y el ratón muere alrededor de los 10.5 días de gestación; siendo su fenotipo es muy parecido al mutante nulo para $TGF\beta 1$ ⁴⁴. Durante el desarrollo craneofacial temprano los miembros de la familia de $TGF\beta$ median un amplio rango de actividades biológicas incluyendo la proliferación celular, la diferenciación, la formación de matriz extracelular e inducen la actividad de genes de la familia homeobox, sugiriendo que $TGF\beta$ es importante en la formación de ejes durante la embriogénesis. En la formación de los dientes, el cartílago de Meckel y durante la morfogénesis mandibular⁴⁵ se ha detectado la presencia de los 3 subtipos de $TGF\beta$. Los diferentes miembros de la familia Smad tienen distintas funciones de señalización, Smad1, 2, 3 y 5 son fosforiladas por los receptores tipo 1 después de la estimulación por $TGF\beta$ o activina. Smad2 y 3 son similares en estructura y posiblemente tengan funciones redundantes. Smad1 se fosforila y traslada al núcleo después de la estimulación por BMP2 o BMP4. En las células de mamífero Smad4 forma complejos con Smad2 y 3 después de la activación por $TGF\beta$. Mientras que la activación de BMP en receptores tipo 1 forma complejos con Smad1 y posiblemente con Smad5 y 9. Smad6 y 7 divergen estructuralmente de otros miembros de la familia Smad y su función es inhibitoria de las señales de $TGF\beta$, Activina y BMP. Smad6 inhibe la señal de BMP/Smad1 por competencia con la unión de Smad4. Smad7 se asocia con el

complejo TGF β -receptor, pero no se fosforila aunque si inhibe la fosforilación de Smad2 y 3 vía TGF β . Las Smad inhibitorias producen un mecanismo autoregulatorio en la transducción de señales de la familia TGF β , ya que, una vez en el núcleo, las Smad se unen a activadores o represores para regular la expresión del gen blanco²¹.

Planteamiento del problema

La molécula más estudiada en procesos fibróticos es el TGF β que activa el depósito de proteínas de matriz extracelular vía Smad2/3; ya que después de activarse por la amniocentesis en ratas gestantes podría inducir el síndrome de banda amniótica.

El síndrome de banda amniótica es una entidad que se ha reconocido por siglos. Sus manifestaciones abarcan desde los anillos de constricción en el tórax, las extremidades, la cabeza, la sindactilia, las amputaciones espontáneas, deformidad de miembros (pie equino), surcos dérmicos deformantes, defectos craneofaciales y el aborto. 77% de estos pacientes presentan otras anomalías en el momento del nacimiento, pero no siempre se recuperan las bandas fibróticas en los sitios afectados por que estas se reabsorben al igual que las extremidades amputadas⁴⁶. A pesar de que en la literatura existen múltiples informes de casos de banda amniótica, hasta ahora no se conoce que moléculas están involucradas en el desarrollo de este síndrome, más aún, en casos en los que el diagnóstico sonográfico ha mostrado bandas de constricción y se han liberado las extremidades afectadas durante la vida uterina del embrión por cirugía endoscópica se ha logrado evitar el estrangulamiento y amputación de las extremidades¹⁶ pero no se han

eliminado las escuelas de necrosis y falta de vascularización¹³ Además, durante la práctica clínica, debido a que en ocasiones es necesario realizar estudios de amniocentesis o cirugía intrauterina, para diagnosticar o corregir anomalías en el embrión, el conocimiento de la regulación molecular del SBA permitirá controlar y reducir el riesgo de que se presente durante estos procedimientos invasivos¹².

Pregunta de investigación

Debido a que el rasgo más característico del síndrome de banda amniótica es la presencia de fibromas que envuelven y estrangulan las extremidades, se estudió la expresión de TGF β y la producción de proteínas de matriz extracelular en ratas gestantes sometidas a amniocentesis.

Hipótesis

En ratas gestantes que se someten a amniocentesis se induce una sobreproducción de TGF β y de proteínas de matriz extracelular debido al proceso de cicatrización tipo fibrótico que causa el síndrome de banda amniótica.

Objetivos

1. Estandarizar el modelo de SBA en ratas
2. Estandarizar la cuantificación de RNA mensajeros (mRNA)
3. Obtener los fetos, membranas amnióticas y úteros de ratas experimentales y controles y conservarlos a -20°C hasta su uso
4. Determinar la expresión de mRNA de TGF β
5. Determinar la expresión de Acta2
6. Determinar la expresión de colágena I (Col1a1)
7. Determinar el estado de fosforilación de Smad2/3

Material y Métodos

El presente protocolo fue aprobado por los Comités de Ética e Investigación y el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del Hospital General “Dr. Manuel G. González” (número 12-49-2010). El modelo experimental se estableció en ratas Wistar con un peso de 300 a 450g primíparas, siguiendo la técnica de Kino⁴⁷, quien demostró que a los 15 días de gestación se presentó el mayor número de fetos con SBA. Las cirugías se realizaron a los 15 días de gestación en ratas anestesiadas; se expusieron los cuernos uterinos y se puncionó el útero y las membranas fetales sin tocar al feto; se seleccionó el feto más cercano al ovario derecho, la punción se realizó con una aguja para insulina. Para evitar la variable de volumen de líquido extraído no se extrajo líquido y se presionó un momento la herida, se introdujeron los cuernos uterinos en la cavidad peritoneal, se suturó a la rata y se mantuvo en observación hasta que se recuperó de la anestesia. Se sacrificaron las ratas a diferentes tiempos entre 3 y 120h después de la punción y se obtuvieron fetos, membranas amnióticas y úteros, que se conservaron en congelación a -70°C hasta su análisis. Al grupo de ratas control se les sometió a la cirugía igual que a las experimentales pero no se realizó la punción.

Expresión de mensajeros

La determinación de la expresión de los mensajeros para TGF β 1, Acta2 y Col1a1 se realizó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, utilizando el mensajero alfa tubulina (Tuba1a) como control de expresión. Para esto se extrajo el RNA total de los tejidos obtenidos de las ratas sometidas a amniocentesis, las control y otro grupo que se utilizó como calibrador, que fueron ratas preñadas no sometidas a cirugía.

Se homogenizó cada tejido directamente en el reactivo comercial Q uizol (Quiagen), se incubó 10 min a temperatura ambiente, se agregó cloroformo al 10%, se centrifugó a 12,000xg durante 15 min a 4°C; se separó la fase acuosa y se le agregó isopropanol frío volumen a volumen; se precipitó durante una hora a -20°C, se lavó dos veces con etanol al 70% y se evaporó el etanol. El RNA se incubó con DNAsa1 (Sigma) para eliminar DNA remanente, para lo que se resuspendió el RNA en amortiguador para DNAsa (acetato de sodio 1M, pH 5.0, sulfato de magnesio 100mM, NaCl 150mM) se agregaron 500 U de DNAsa1 y se incubó durante una hora a temperatura ambiente, se inactivó la DNAsa1 agregando EDTA 25 mM pH 8 e incubó a 65° C durante 10min. Finalmente se cuantificó el RNA, se sintetizó cDNA de un µg de RNA total, utilizando el sistema de transcripción reversa (Promega). Se mezcló el amortiguador de la enzima, inhibidor de RNAsas de placenta y mezcla de dNTPs y se calentó a 94°C para desnaturalizar el RNA, durante 10min se enfrió sobre hielo y se le agregó el oligo dT y se incubó a 37° C durante 5min, posteriormente se incubó durante una hora a 42° C; asimismo la enzima se incubó a 85°C 10 min para inactivarla. Para determinar la expresión relativa de RNA se utilizó el equipo Light Cycler 480 (Roche) con el estuche de SYBER Green (Roche); se mezclaron los iniciadores (Tabla 1) para cada gen, la mezcla maestra del estuche que contiene el amortiguador de reacción, dNTPs, taq polimerasa y MgCl₂ a una concentración final de 2.5mM. El programa de amplificación fue: desnaturalización inicial de 95°C durante 10min, amplificación 95° C, 20s, aumento de 50 a 55°C durante 20s y 72° C durante 20s; 45 ciclos, la curva de fusión se determinó a 95°C durante 5s, 65° 1min y 95° durante .11s y un ciclo de enfriamiento a 40° durante 2min.

Tabla 1. Iniciadores utilizados en este estudio

Iniciadores	Sentido	Antisentido
Tgfb1	5' CCGTGGCTTCTAGTGCTGAC 3'	5' GGCGTTGTTGCGTTAGATAC 3'
Acta2	5' ACTTCTGGACGTACAACACTGG 3'	5' CAGGCAGTTCGTAGCTCTTC 3'
Col1a1	5' TGAGCCAGCAGATTGAGAAC 3'	5' ACTCGAACTGGAAGCCATCG 3'
Tuba1a	5' CAGATGCCAAGTGACAAGAC 3'	5'ACTCCAGCTTGGACTTCTTG 3'

Expresión de proteínas

Se obtuvieron extractos crudos de proteínas de los tejidos de los grupos experimentales y controles; se disgregó cada tejido con un homogeneizador celular (Fisher, USA) con amortiguador de lisis (Tris HCl pH 7.5. NaCl 140mM), triton X100 1% y desoxicolato de Na 1%) en frío. Se centrifugó para eliminar los restos de tejido y se determinó la concentración de proteínas totales con el reactivo Bradford (Bio-Rad). Los extractos se sometieron a electroforesis en gel de acrilamida al 12% con SDS y se transfirieron a membranas de PVDF. Se bloquearon con leche descremada al 5% en amortiguador TBST (TRIS HCl 20mM pH 7.5, NaCl 500mM y Tween 20 0.3%) durante 30min, posteriormente se agregó un anticuerpo comercial anti TGFβ1, Acta2, Col1a1, o Tub a1a (Santa Cruz) en el mismo amortiguador y se incubó toda la noche a 4° C; se lavaron las membranas 3 veces con TBST 10 min cada lavado y se incubaron durante una hora con el anticuerpo secundario utilizado conjugado con peroxidasa de rábano. Las proteínas se visualizaron usando el sistema de quimioluminiscencia (Invitrogen). Las placas radiográficas se fotografiaron y analizaron con el software imageJ. Para el análisis del estado de fosforilación de Smad3 se usaron anticuerpos que detectan Smad2 y 3, totales y pSmad3 (Santa Cruz).

Análisis estadístico

Se utilizaron 3 ratas por cada tiempo estudiado y se analizaron 3 fetos, 3 membranas amnióticas y 3 úteros de cada una; se realizó un análisis de varianza y una prueba post Hoc de Tukey para evaluar las diferencias, los valores de $P < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Resultados

Las ratas experimentales se sacrificaron después de las punciones, desde las 3 y hasta las 120h. En el 98% los fetos se observaron hemorragias no solo en las extremidades, como había sido documentado⁴⁸, sino en la cabeza, en el torso y formación de fibromas con hemorragia en las extremidades posteriores. Estos daños se observaron en los fetos experimentales pero no en los controles. Llama la atención que fueron afectados todos los fetos de la camada. No solo el que se puncionó.

Se realizó la cinética de expresión de los mensajeros de TGF β Acta2 y Col1a1 utilizando *SYBR green* y como gen de mantenimiento α -tubulina (Tuba1), en ratas con 15 días de gestación a las que se les realizó amniocentesis y hasta 120h después de la punción. En la figura 5 se muestra la curva patrón de la amplificación del mensajero de TGF β 1.

Se realizó la determinación de la expresión relativa del mensajero para TGF β 1 en el feto, la membrana amniótica y el útero. Se observó aumento de la expresión del mensajero en los tres tejidos a partir de las 6h post-tratamiento. En el feto y el útero el aumento fue menor comparado con la membrana amniótica en donde fue 6 veces mayor y se mantuvo elevado a lo largo del experimento con diferencias estadísticamente significativas en comparación

con las ratas control (figura 6). Se realizaron ensayos de Inmunoelectrotransferencia (*Western blot*) para determinar la expresión de la proteína TGF β . Los resultados en todos los casos se muestran como las bandas detectadas y las densitometrías de las mismas, Se observó la proteína en los tejidos a partir de las 6 horas y permaneció con mayor concentración que en el control hasta el final del ensayo (figura 7).

Se determinó la expresión del mensajero (figura 8) y de la proteína Acta2 (figura 9) en los tejidos estudiados para identificar diferenciación a miofibroblastos, Se observó incremento de la expresión del mensajero en el feto y en la membrana desde las 9 horas post-tratamiento, se pudieron detectar cambios en la expresión de la proteína Acta2 en el feto a partir de las 24h después de la punción y en la membrana a partir de las 48h en el útero solo en los dos últimos tiempos se observaron diferencias el resto del tiempo se mantuvo sin cambios.

Se determinó la expresión del mensajero (figura 10) y de la proteína de matriz extracelular Col1a1 (figura 11) en los tejidos estudiados como indicador de fibrosis, Se observó que se incrementa el mensajero desde las 48h en el feto y la membrana amniótica pero no en el útero

Finalmente se determinó la fosforilación de Smad3 en los tejidos estudiados lo que indica que TGF β se ha activado y unido a su receptor y, por lo tanto, es capaz de fosforilar a Smad2/3. Se encontró Smad3 fosforilada en el feto y en la membrana amniótica desde las 24h mientras que en el útero permaneció en el nivel basal.

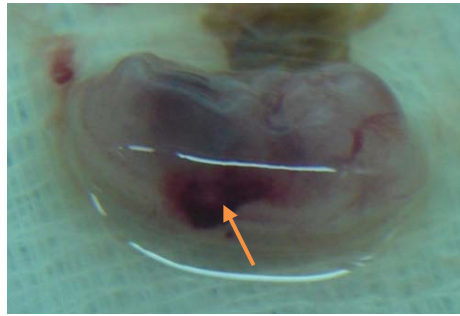


Figura 1. Feto con hemorragia en el torso (flecha), 48h post punción.

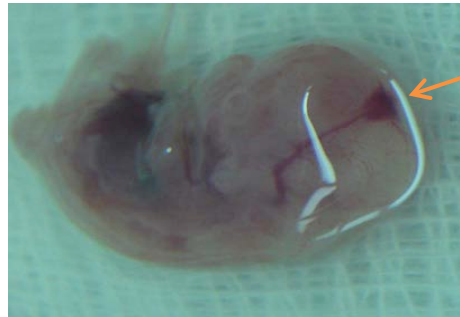


Figura 2. Feto con hemorragia en la cabeza (flecha), 48h post punción.

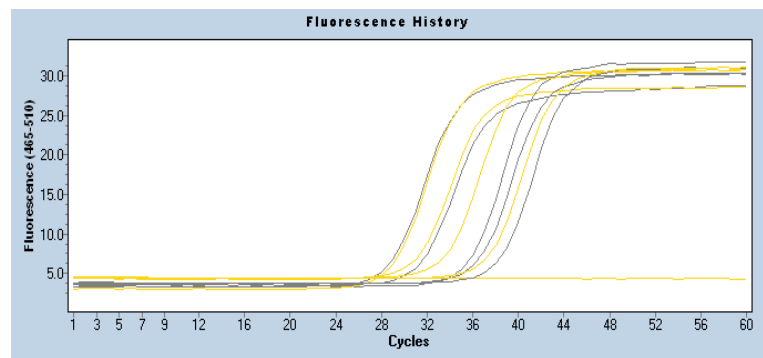


Figura 3. Feto experimental con fibroma adherido a la pata posterior izquierda y múltiples puntos de hemorragia (flechas), 72h post punción.

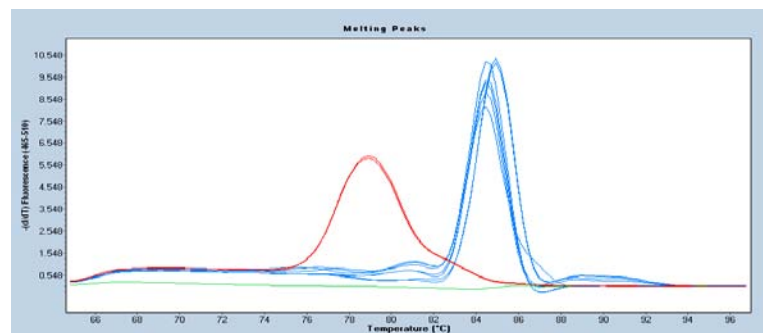


Figura 4. Restricción de crecimiento: A la izquierda se ve el feto control sin punción, el de la derecha es el experimental. En ambos casos se trata del feto más cercano al ovario derecho a 120h después de la cirugía o de la punción.

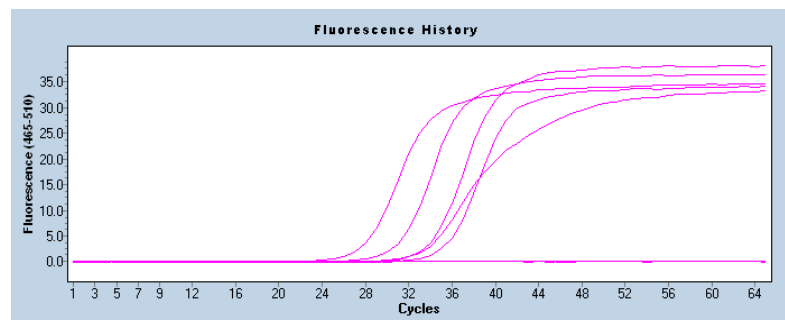
A)



B)



C)



D)

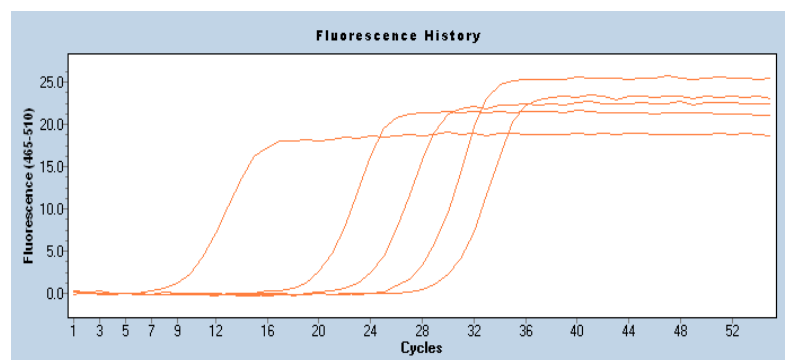


Figura 5. Curvas patrón del amplicón del mensajero de TGFβ1: se muestran las diluciones base 10 (A), la temperatura de disociación de TGFβ1 (B); la curva obtenida para Acta2 (C) y la de Col1a1 (D).

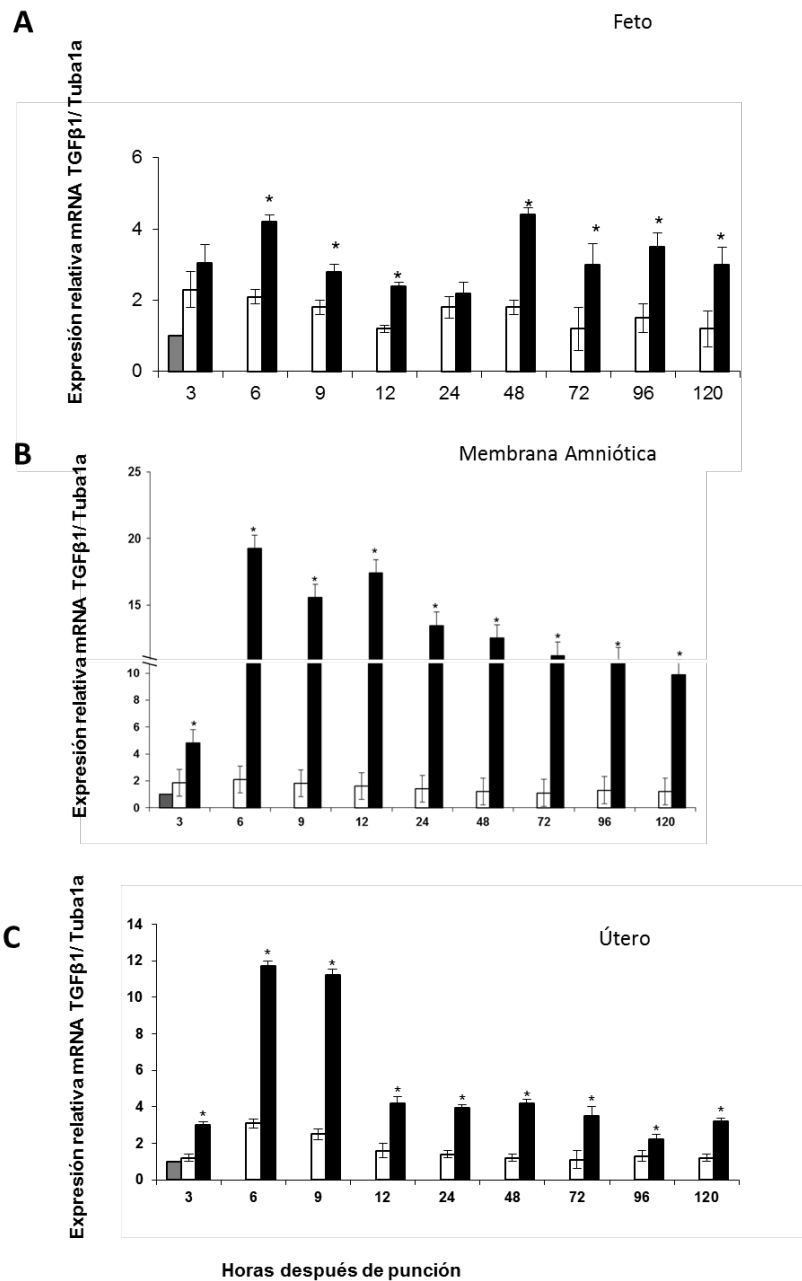


Figura 6. Después de realizar los cálculos de expresión relativa de TGFβ, se obtuvieron los siguientes resultados para el feto (A), la membrana amniótica (B), y el útero (C), utilizando como calibrador un grupo de ratas a las que no se les realizó cirugía (barra gris), se comparó con las que se sometieron a cirugía sin punción (barras blancas) y el grupo experimental en el que se realizó la punción (barras negras). En el eje X se muestra el tiempo en horas y en el eje Y la expresión relativa en unidades arbitrarias de fluorescencia, * p > 0.05 diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control y experimental.

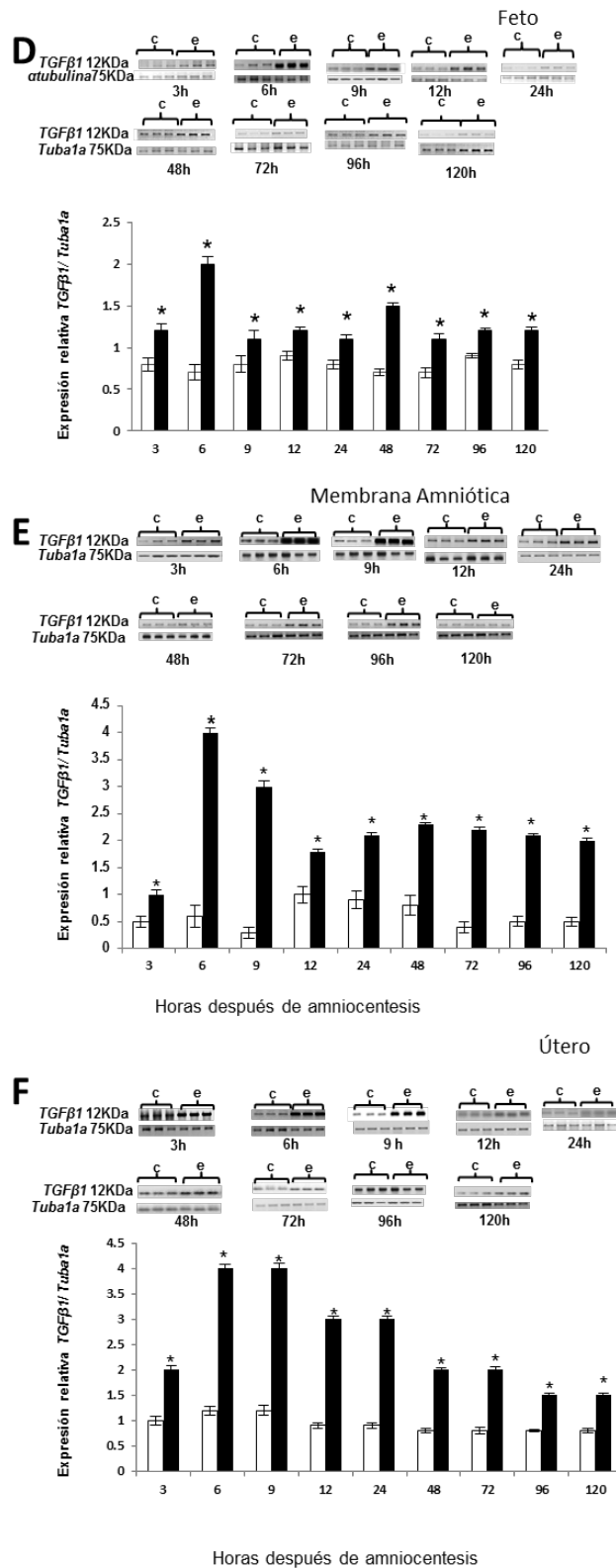


Figura 7. Resultados del *Western-blot* para TGFβ1 con respecto a Tuba1a en fetos (A), membranas amnióticas (B) y en úteros (C) de fetos control (c, barras blancas) y experimentales (e, barras negras). * $p < 0.05$ diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control y experimental

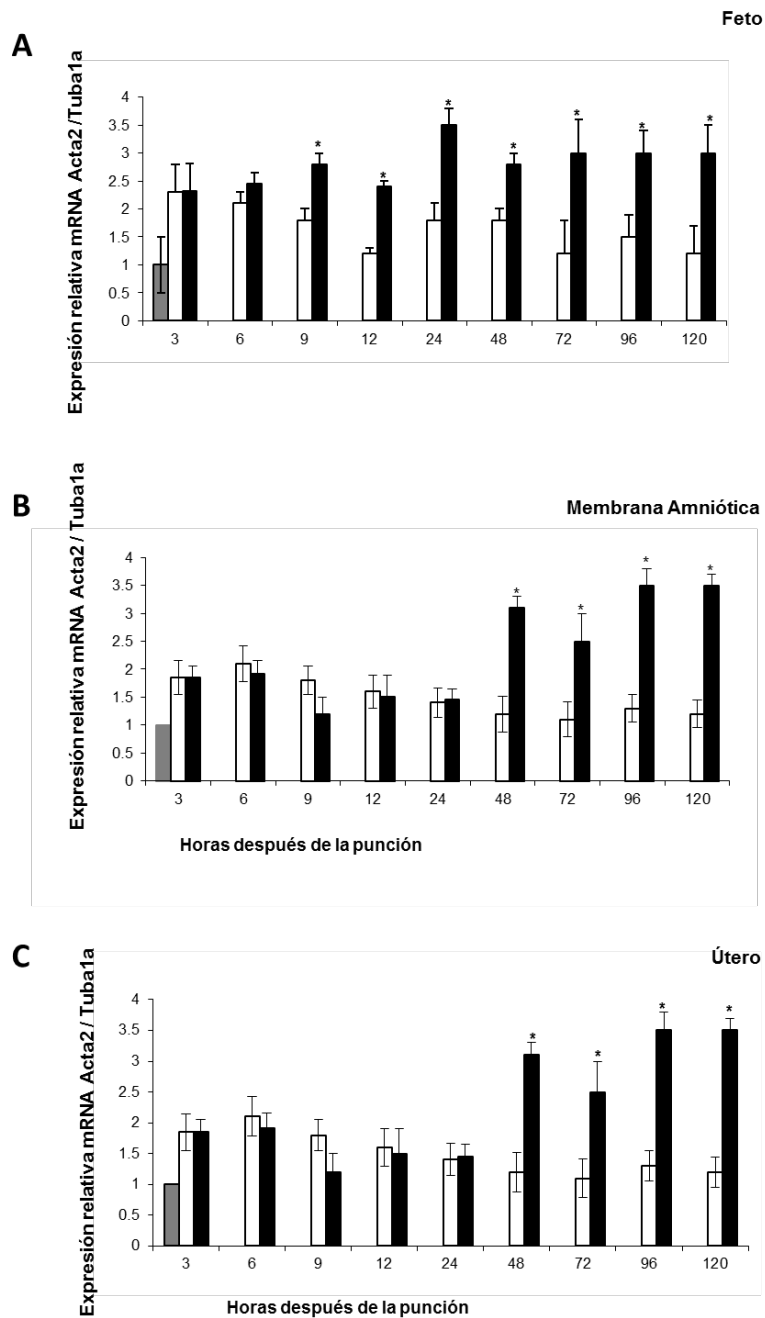


Figura 8. Se muestra la expresión del mensajero para Acta2 para el feto (A), la membrana amniótica (B), y el útero (C), utilizando como calibrador un grupo de ratas a las que no se les realizó cirugía (barra gris), se comparó con las que se sometieron a cirugía sham (barras blancas) y el grupo experimental en el que se realizó la amniocentesis (barras negras); en el eje X se muestra el tiempo en horas y en el eje Y la expresión relativa en unidades arbitrarias de fluorescencia, * $p < 0.05$ diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el experimental

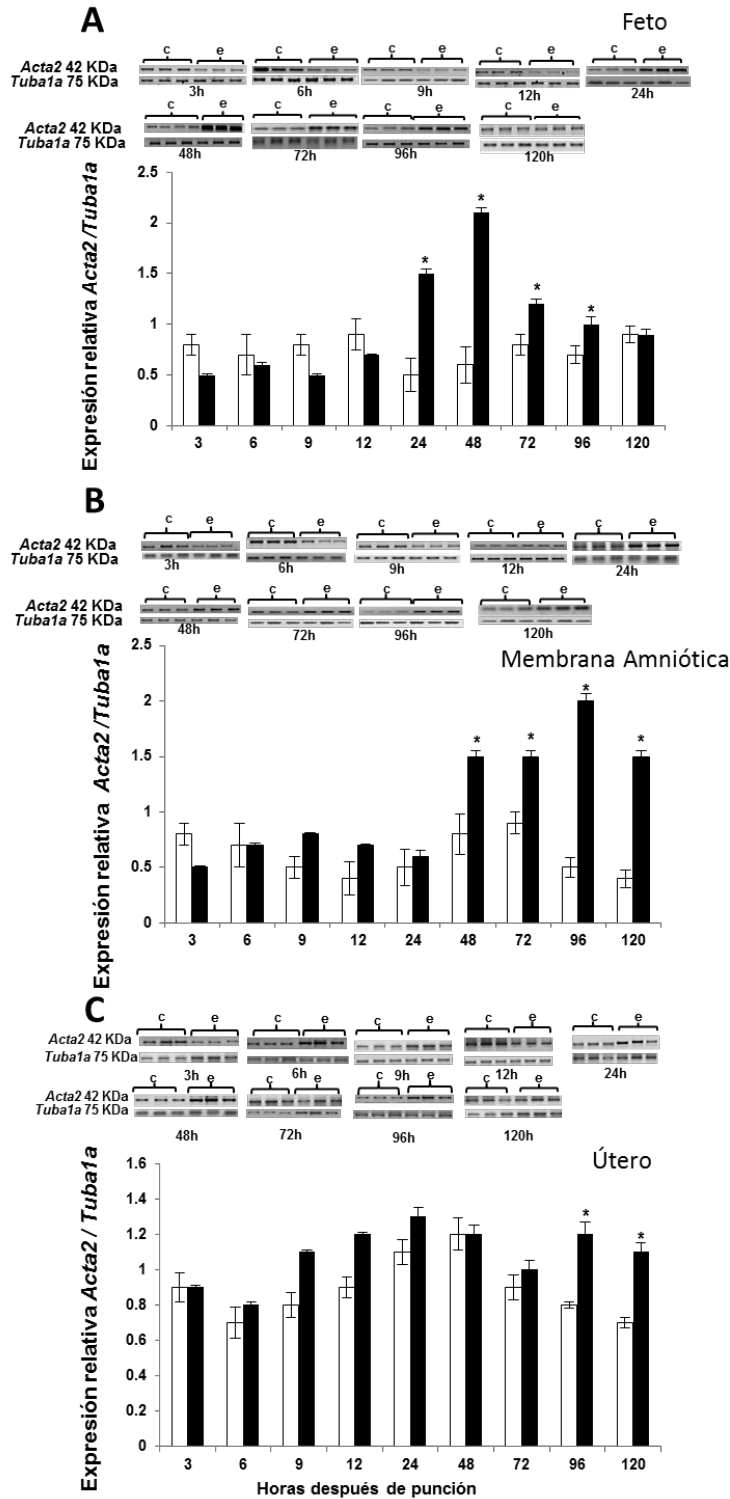


Figura 9. Resultados del *Western-blot* para Acta2 con respecto a Tuba1a en el feto (A), membrana amniótica (B) y útero (C) en tejidos control (c, barras blancas) y experimentales (e, barras negras). * $p > 0.05$ diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el experimental

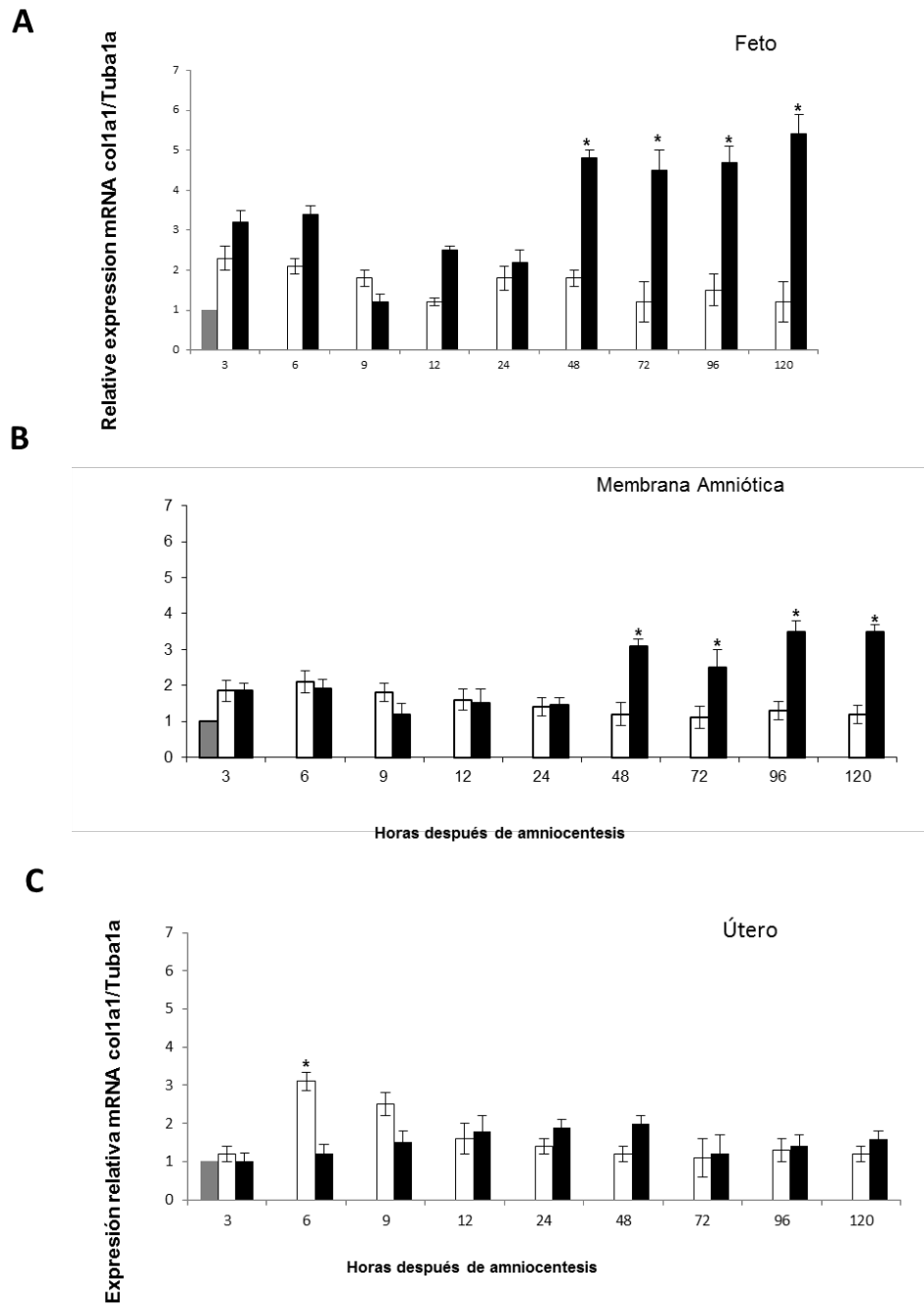


Figura 10. Se muestra la expresión del mensajero para Col1a1 para el feto (A), la membrana amniótica (B), y el útero (C), utilizando como calibrador un grupo de ratas a las que no se les realizó cirugía (barra gris), se comparó con las que se sometieron a cirugías in amniocentesis (barras blancas) y el grupo experimental en el que se realizó la amniocentesis (barras negras); en el eje X se muestra el tiempo en horas y en el eje Y la expresión relativa en unidades arbitrarias de fluorescencia, * $p > 0.05$ diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el experimental

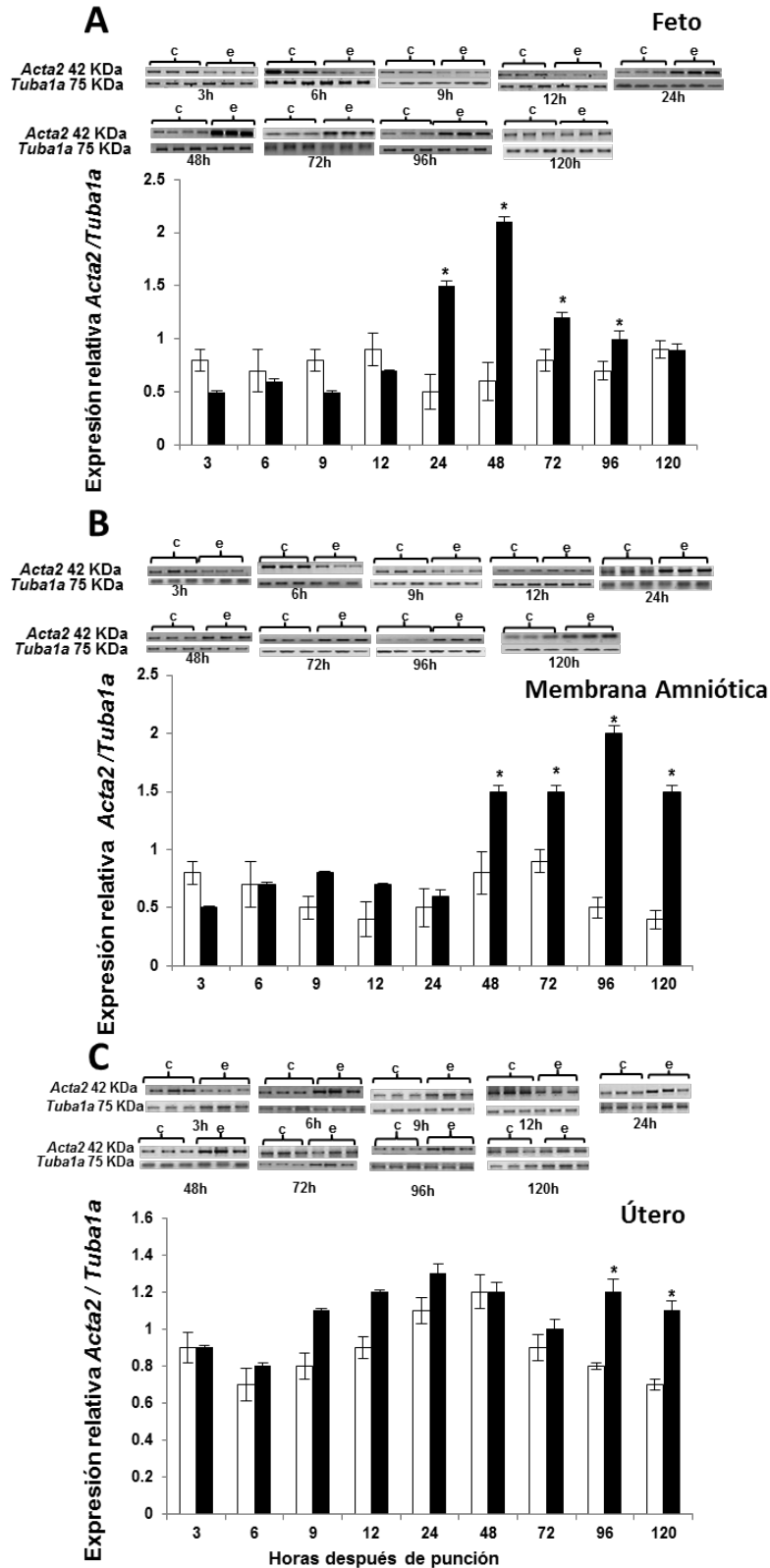


Figura 11. Resultados del *Western-blot* para *Col1a1* con respecto a *Tuba1a*; En el feto (A), en la membrana amniótica (B) y en útero (C) en fetos control (c, barras blancas) y experimentales (e, barras negras). * $p > 0.05$ diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el experimental

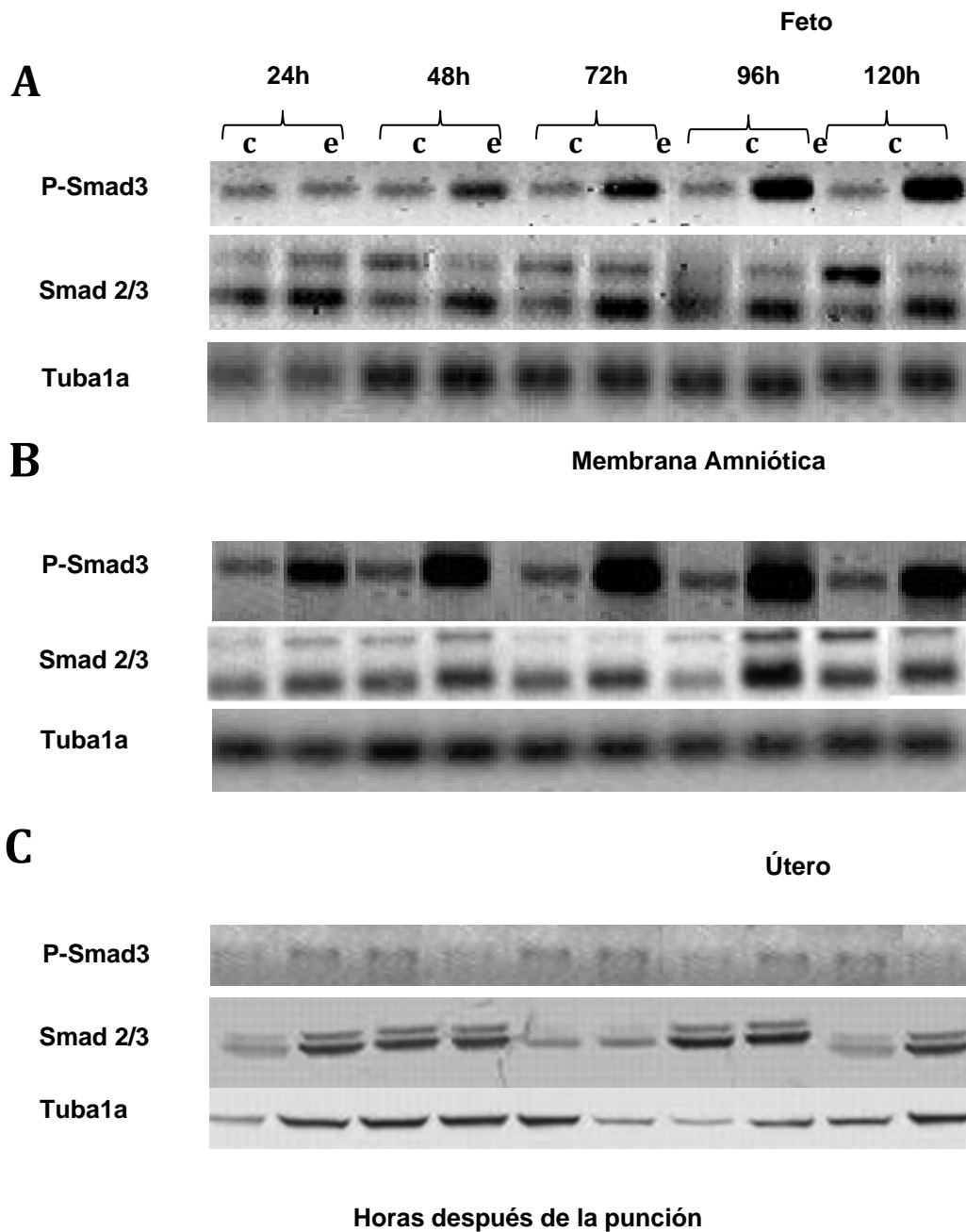


Figura 12 Resultados de la fosforilación de Smad3 (panel superior detectado con anticuerpos anti Smad3 fosforilado) pero no así de Smad 2 (panel central teñido con anticuerpos anti Smad2/3 no fosforilado); como controles se utilizó Tuba1a (panel inferior) en A feto, en B membrana amniótica y C útero

Discusión

La etiología del SBA aún se desconoce, entre las hipótesis más aceptadas está que la ruptura de la membrana amniótica y la salida de líquido generan compresión fetal y desarrollan bandas amnióticas^{3,4}; sin embargo, esto no explicaría las malformaciones internas que se generan en el feto. En este trabajo se demostró que hay un incremento en la expresión de TGF β 1 ocasionada por la punción de la membrana amniótica, lo que inicia un proceso de fibrosis asociado a la formación de bandas y al daño morfológico del feto. La rata es un modelo propuesto para SBA por amniocentesis y en este caso permitió determinar la expresión de mensajeros y proteínas relacionadas con el proceso agudo de fibrosis desde las horas más tempranas de la lesión hasta poco antes del inicio del trabajo de parto⁴⁸. En trabajos anteriores^{47,49} se realizó la punción en diferentes días y se esperó hasta un día antes del alumbramiento para recuperar los fetos afectados, en nuestro caso los sacrificios se realizaron desde las 3h y hasta las 120h encontrándose las malformaciones y hemorragias desde las 48h después de la punción.

Las enfermedades fibróticas son responsables del 45% de las muertes en el mundo, en ellas participan diferentes rutas de señalización como: TGF β , MAPK, activación de PDGF, y procesos como: transición epitelio mesenquimal, activación de metaloproteinasas, presión mecánica, estrés oxidativo e inflamación; Aún no se sabe cómo cada una de las vías mencionadas contribuye a desencadenar este tipo de respuesta. TGF β es la principal molécula involucrada en la respuesta de cicatrización y producción de proteínas de matriz extracelular; como se ha demostrado en ratones adultos en los que al sobreexpresar TGF β se desarrolla fibrosis⁵⁰. Tanto en el feto como

en membrana amniótica de las ratas utilizadas en esta tesis, se observó la sobreexpresión de TGF β 1, que permaneció elevada durante el experimento, lo que sugiere un proceso de reparación fibrótico. En contraste, en el útero no se observó este comportamiento, ya que se elevó TGF β 1 pero tiende a bajar confirmando que esta respuesta se encuentra en los tejidos fetales pero no en los de la rata adulta^{50, 51}.

En condiciones normales TGF β no atraviesa la barrera placentaria, sin embargo, cuando existe una reacción inflamatoria, en este caso provocada por la punción, la integridad de las membranas se altera permitiendo el paso de citocinas como IL1 β , IL6, IL8 y TGF β lo que puede explicar por qué aunque solo se puncionó un feto se observaron malformaciones en los otros miembros de la camada⁵²

Shah⁵³ y colaboradores demostraron con anticuerpos que inhiben específicamente a TGF β 1 o 2, que es los dos subtipos participan en la formación de la cicatriz⁵⁴; además durante los primeros días de la vida embrionaria las heridas curan sin dejar cicatriz pero a partir del día 16 está ya se produce⁵⁵. En este trabajo se estudió la isoforma 1 que se ha demostrado que participa en la respuesta de fibrosis crónica en diferentes órganos como pulmón, intestino, corazón y riñón en adultos^{56, 57} y se encontró elevada en los tejidos fetales.

Los fibroblastos que se encuentran en las heridas son células especializadas que se conocen como miofibroblastos, que expresan niveles elevados de Acta2, y tienen una habilidad incrementada de producir proteínas de matriz extracelular. En el presente trabajo se observaron niveles incrementados de

Acta2 y Col1a1 en el feto y en la membrana amniótica, proteínas características de la respuesta fibrótica³⁷.

Debido a que la ruta de activación de TGF β es la fosforilación de Smad3 se buscó el estado de fosforilación de esta proteína y se observó que está presente en la membrana y en el feto pero no en el útero, reforzando el hallazgo de que TGF β está activo y actúa como modulador en la cicatrización⁵³.

Las proteínas Smad 2 y 3 transducen la señal de TGF β 1, pero es Smad3 la que se ha relacionado con procesos de fibrosis, ya que los ratones nulos para Smad3 son resistentes a desarrollar fibrosis pulmonar producida por bleomicina o fibrosis cutánea por radiación⁵⁸⁻⁶¹

En el caso del ser humano cuando se diagnostica SBA, se desconoce si hubo ruptura temprana de las membranas, esta ocurre por ejemplo, cuando hay una infección intrauterina durante el embarazo, y en este caso puede presentarse pérdida del líquido amniótico transvaginal⁶². La respuesta inmune adaptativa que se ha propuesto recientemente puede ser la responsable de que se induzca este proceso⁶³. Cuando esto ocurre al final de la gestación, comúnmente se acompaña del inicio de la labor de parto, pero cuando ocurre en fases más tempranas de la gestación, la reparación de las membranas es necesaria y para ello se requiere sintetizar tejido conectivo. En la rata gestante, TGF β 1 aumenta en el primer y tercer tercio de la gestación mientras que disminuye en el segundo, durante el tercer trimestre de embarazo se ha observado un incremento de TGF β y se propone que es para reparar al miometrio a cicatrizar después del parto⁶⁴. En este estudio se observó incremento de TGF β en el segundo trimestre debido a la punción y no a la estimulación hormonal.

Durante el proceso de cicatrización los fibroblastos se activan, proliferan y migran a la herida para sintetizar altos niveles de proteínas de matriz, incluyendo colágeno y fibronectina, así como para la diferenciación a miofibroblastos que son necesarios para cerrar las heridas y principales productores de estas proteínas^{15,56}. La lesión ocurrió en esta tesis durante el proceso de remodelación de feto de la rata y esto pudo generar las malformaciones encontradas, ya que como se mencionó anteriormente $TGF\beta^{21}$ participa en diferentes momentos del desarrollo embrionario como son el establecimiento de la polaridad, es decir, el establecimiento de los ejes antero-posterior, dorso-ventral e izquierdo derecho, el destino celular y la remodelación de tejidos en el feto. En el presente estudio se sobrepusieron dos procesos, por un lado la cicatrización de la lesión que se provocó al puncionar el útero y las membranas y por otro lado la remodelación de tejidos en la rata. Una vez que se han activado los miofibroblastos estos producen más $TGF\beta$ manteniendo su propia activación y estableciendo la base para un proceso auto-perpetuador característico de los procesos proliferativos como la fibrosis⁶⁵. Durante el desarrollo embrionario del ratón los receptores 1 y 2 de $TGF\beta$ se encuentran expresados principalmente en el tubo neural, en el corazón, sistema nervioso periférico, pulmón y riñón, por lo que la sobreexpresión de $TGF\beta 1$ durante estas etapas podría explicar las malformaciones de estos órganos, que comúnmente acompañan al SBA⁶⁶.

Perspectivas

Los mecanismos pato-fisiológicos durante la cicatrización incluyen la inflamación, la proliferación y re-modelamiento de tejido, cuando ocurre una

lesión durante el desarrollo fetal las mismas rutas metabólicas están activas, por lo que la interacción entre ellas puede resultar en una falla en su regulación y favorecer la aparición de malformaciones, es necesario estudiar la respuesta inflamatoria que ocurre después de la lesión y las vías Wnt y de otros para tener un panorama completo de este fenómeno, además de estudiar como participan otras proteínas como: el TGF β 3, el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), las integrinas y el desarrollo y remodelación de órganos específicos como los tejidos interdigitales, el corazón y el cerebro.

Referencias

1. Chen C P. Syndromes, disorders and maternal risk factors associated with neural tube defects (III). Taiwan J Obstet Gynecol 2008;47:131-40.
2. Lauwers G , Nevelsteen A , Daenen G , La croix H, Suy R, Frijns J -P. Ehlers-Danlos syndrome type IV: a heterogeneous disease. Ann Vasc Surg 1997;11:178-82.
3. Torpin R . Amnio chorionic mesoblastic fibrous strings and amniotic bands. Am J Obstet Gynecol 1965;91:65-75.
4. Higginbottom M C, Jones KL , Hall BD, Smith D W. The amniotic band disruption complex: Timing of amniotic rupture and variable spectra of consequent defects. J Pediatr 1979;95:544-549.
5. Orioli IM, Ribeiro MG, Castilla EE. Clinical and epidemiological studies of amniotic deformity, adhesion, and mutilation (ADAM) sequence in a South American (ECLAMC) population. Am J Med Genet 2003;118A:135-145.
6. McGuirk C K, Westgate M , Holmes LB . Limb deficiencies in Newborn Infants. Pediatrics 2001;108:64-71

- 7 Castilla EE, Lopez-Camelo JS. The surveillance of birth defects in South America: The search for time clusters: Epidemics. *Adv Mutagen Res* 1990;2:191-210.
- 8 Materna-Kiryluk A, Wiśniewska K, Badura-Stronka M, Mejnartowicz J, Wieckowska B, Balcar-Boroś A et al. Parental age as a risk factor for isolated congenital malformations in a Polish population. *Paediatric and Perinatal Epidemiology* 2009;23, 29-40.
- 9 Haddow J E, Palomaki G E, Holman M S. Young maternal age and smoking during pregnancy as risk factors for gastroschisis. *Teratology* 1993;47:225-228.
- 10 Van Allen M I, Curry C, Gallagher L. Limb body wall complex: I. Pathogenesis. *Am J Med Genet* 1987a;28:529–548.
- 11 Van Allen MI, Curry C, Gallagher L. Limb body wall complex: II. Limb and spine defects. *Am J Med Genet* 1987b;28:549–565
- 12 Streeter G L. Focal deficiencies in fetal tissues and their relation to intrauterine amputations. *Contrib Embryol Carnegie Inst* 1930;22:1–46.
- 13 Bamforth JS. Amniotic Band Sequence: Streeter's hypothesis reexamined. *Am J Med Genet* 1992;44:280–287.
- 14 Hummel KP. Developmental anomalies in mice resulting from a mutation of the gene Disorganization, a semi-dominant lethal. *Pediatrics* 1959;23:212-21.
- 15 Donnai D, Winter RM. Disorganization: a model for 'early amnion rupture'. *J Med Genet* 1989;26:421–425.
- 16 Keswani SG, Johnson MP, Adzick NS, Hori S, Howell LJ, Wilson RD, Hedrick H. In utero limb salvage: fetoscopic release of amniotic bands for threatened limb amputation. *J Pediatr Surg*. 2003;38:848-51

- 17 Adzick NS, Harrison MR, Glick PL, et al. Comparison of fetal, newborn, and adult wound healing by histologic, enzyme-histochemical, and hydroxyproline determinations. *J Pediatr Surg* 1985; 20:315–319.
- 18 Lorenz PH, Scott AN. Scarless skin wound repair in the fetus. *West J. Med* 1993;159(3): 150-155
- 19 Desmoulière A. Factors influencing myofibroblast differentiation during wound healing and fibrosis. *Cell Biol Intern* 1995;19 (5):471-476
- 20 Lee N J, Wang S J, Durairaj KK, Srivatsan E S, Wang MB. Increased expression of transforming growth factor-B1, acidic fibroblast cell lines. *Laryngoscope* 2000;110:616-619
- 21 Massagué, J. The transforming growth factor-beta family. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1990;6:597-641.
- 22 Itoh S, Itoh F, Goumans MJ, Dijke P. Signaling of transforming growth factor- β family members through Smad proteins. *Eur J biochem* 2000, 267: 6954-6967
- 23 Miyazawa K, Shinozaki M, Hara T, Furuya T and Miyazono K. Two major Smad pathways in TGF β superfamily signaling. 2002;7:1191-1204
- 24 Sporn, M. B. and A. B. Roberts. TGF β : Problems and prospects. *Cell Regul* 1990;1:1-8
- 25 Moses, H. L., Yang E. Y., and Pietenpol J. A. TGF-beta stimulation and inhibition of cell proliferation: new mechanistic insights. *Cell.* 1990;63: 245 -247
- 26 Massagué J. Receptors of the TGF beta family. *Cell* 1992;69:1067-1070
- 27 Lopez-Casillas F, Wrana JL, Massagué J. Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor. *Cell* 1993;73:1435-1444

- 28 Annes J P, Munger J S, Rifkin D B. Making sense of latent TGF beta activation. *J Cell Sci* 2003;116:217–24
- 29 Padgett RW, Patterson GI. New developments for TGF beta. *Dev Cell*. 2001;1:343-9.
- 30 Venkatraman L, Chia SM, Narmada BC, White JK, Bhowmick SS, Forbes Dewey Jr C, et al. Plasmin triggers a switch-like decrease in thrombospondin-dependent activation of TGF-beta1. *Biophys J* 2012;103:1060–8
- 31 Asano Y, Ihn H, Yamane K, Jinnin M, Mimura Y, Tamaki K. Increased expression of integrin alpha(v)beta3 contributes to the establishment of autocrine TGF-beta signaling in scleroderma fibroblasts. *J Immunol* 2005;175:7708–18.
- 32 Asano Y, Ihn H, Yamane K, Jinnin M, Mimura Y, Tamaki K. Involvement of alphavbeta5 integrin-mediated activation of latent transforming growth factor beta1 in autocrine transforming growth factor beta signaling in systemic sclerosis fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2005;52:2897–905.
- 33 Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJ, Dalton SL, Wu J, et al. The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* 1999;96:319–28
- 34 Lebrun, J.J., Takabe, K., Chen, Y. & Vale, W. Roles of pathway-specific and inhibitory Smads in activin receptor signaling. *Mol. Endocrinol.* 1999;13:15-23.
- 35 Massagué, J. and Wotton, D. Transcriptional control by the TGFβ /Smad signaling system. *EMBO J.* 2000;19, 1745:1754

- 36 Armstrong JR, Ferguson MW. Ontogeny of the skin and the transition from scar-free to scarring phenotype during wound healing in the pouch young of a marsupial, *Monodelphis domestica*. *Dev Biol* 1995; 169:242–260.
- 37 Lorenz HP, Longaker MT, Perkocha LA, et al. Scarless wound repair: a human fetal skin model. *Development* 1992; 114:253–259.
- 38 Leask A, Denton CP, and Abraham DJ. Insights into the molecular mechanism of sustained fibrosis: The role of connective tissue growth factor in scleroderma. *J Invest Dermatol* 2004;122, 1–6
- 39 Thannickal VJ, Toews GB, White ES et al. Mechanisms of pulmonary fibrosis. *Annu Rev Med* 2004; 55: 395–417
- 40 Ferguson MWJ, Whitby DJ, Shah M, Armstrong J, Siebert JW, Longaker MT: Scar formation: the spectral nature of fetal and adult wound repair. *Plastic Reconstructive Surg* 1996;97:854–860
- 41 Sanford LP, Ormsby I, Gittenberger-de Groot AC, Sariola H, Friedman R, Boivin GP, Cardell EL, Doetschman T. . TGF β 2 knockout mice have multiple developmental defects that are non overlapping with other TGF β knockout phenotypes. *Development* 1997;124:2659-2670
- 42 Kaartinen V, Voncken JW, Shuler C, Warburton D, Bud, Heisterkamp N, Groffen J. Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nat Genet* 1995;11:415-421
- 43 Proetzel G, Pawlowski SA, Wiles MV, Yin M, Boivin GP, Howles PN, Ding J, Ferguson MW, Doetschman T Transforming growth factor-beta 3 is required for secondary palate fusion. *Nat Genet* 1995;11:409-414

- 44 Bottinger EP, Jakubczak JL, Roberts IS, Mumy M, Hemmati P, Bagnall K, Merlino G, Wakefield LM Expression of a dominant-negative mutant TGF-beta type II receptor in transgenic mice reveals essential roles for TGF-beta in regulation of growth and differentiation in the exocrine pancreas. *EMBO J*;1997;16:2621-2633
- 45 Minoux M, Rijli FM Molecular mechanisms of cranial neural crest cell migration and patterning in craniofacial development. *Development*. 2010;137(16):2605-21
- 46 Kiehn M, Leshem D, Zuker R Constriction rings: the missing link Eplasty. 2007;28;8:e4.
- 47 Kino Y: Clinical and experimental studies of the congenital constriction bands syndrome with an emphasis on its etiology *J Bone Joint Surg Am* 1975;57:636-43
- 48 Singh S, Singh G. Hemorrhages in the limbs of fetal rats after amniocentesis and their role in limb malformations. *Teratology* 1973;8:11-18
- 49 Galvan A, Alvarez E, Parraguirre S, Suarez ML, Perez A: Development of a Fetal Rabbit Model to Study Amniotic Band Syndrome Fetal and pediatric pathology 2012;31:300-308
- 50 Shynlova O, Tsui P, Dorogin A, Lowell Ngille B, Lye SJ. The expression of transforming growth factor β in pregnant rat myometrium is hormone and stretch dependent. *Reproduction* 2007;134:503–511
- 51 Eckes B, Zigrino P, Kessler D, Holtkotter O, Shephard P, Mauch C, and Krieg T: Fibroblast-matrix interactions in wound healing and fibrosis. *Matrix Biol* 2000;19:325–332

- 52 Tossetta G, Paolinelli F, Avellini C, Salvolini E, Ciarmela P, Lorenzi T, Emanuelli M, Toti P, Giuliante R, Gesuita R, Crescimanno C, Voltolini C, Di Primio R, Petraglia F, Castellucci M, Marzioni D. IL-1 β and TGF- β weaken the placental barrier through destruction of tight junctions: an in vivo and in vitro study. *Placenta*. 2014 Jul;35(7):509-16
- 53 Shah M, For eman DM, Ferguson MW. J: Neutralization of TGF β 1 and TGF β 2 or exogenous addition of TGF β 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *J Cell Sci* 1995;108:985–1002
- 54 Poswillo D, Roy LJ: The pathogenesis of cleft palate. An animal study. *Br J Surg* 1965;52:902-12
- 55 Devlieger R, Ardon H, Verbist L, Gratacós E, Pijnenborg R, and Deprest JA: Increased polymorphonuclear infiltration and iatrogenic amniotic band after closure of fetoscopic access sites with a bioactive membrane in the rabbit at midgestation, *Am J obstetgynecol* 2003;188:844-8
- 56 klers D, Brenmoehl J, Löffler I, Müller CK, Leipner C, Schultze-Mosgau S, Stallmach A, Kinne RW, Wolf G: TGF-beta and fibrosis in different organs - molecular pathway imprints *Biochim Biophys Acta* 2009;1792:746-56
- 57 Ask K, Bonniaud P, Maass K, Eickelberg O, Margetts PJ, Warburton D, Groffen J, Gauldie J, Kolb M: Progressive pulmonary fibrosis is mediated by TGF-beta isoform 1 but not TGF-beta3. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40:484-95
- 58 Sime, P. J., Z. Xing, F. L. Graham, K. G. Csaky, and J. Gauldie. 1997. Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor- β 1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung. *J. Clin. Invest.* 100: 768–776.
- 59 Bonniaud, P., M. Kolb, T. Galt, J. Robertson, C. Robbins, M. Stampfli, C. Lavery, P. J. Margetts, A. B. Roberts, and J. Gauldie. 2004. *Smad3* null mice

develop airspace enlargement and are resistant to TGF- β mediated pulmonary fibrosis. *J. Immunol.* 173: 2099–2108.

60 . Zhao, J., W. Shi, Y. L. Wang, H. Chen, P. Bringas, Jr., M. B. Datto, J. P. Frederick, X. F. Wang, and D. Warburton. 2002. *Smad3* deficiency attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am. J. Physiol.* 282:L585–L593.

61 Flanders, K. C., C. D. Sullivan, M. Fujii, A. Sowers, M. A. Anzano, A. Arabshahi, C. Major, C. Deng, A. Russo, J. B. Mitchell, and A. B. Roberts. 2002. Mice lacking *Smad3* are protected against cutaneous injury induced by ionizing radiation. *Am. J. Pathol.* 160: 1057–1068.

62 Goldenberg, R L, Hauth J C, and Andrews WW: Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med* 2000;342:1500–1507

63 Gómez-López N , Vega-Sánchez R, Ca stillo-Castrejón M , Romero R , Cubeiro-Arreola K, Vadillo-Ortega F: Evidence for a role for the adaptive immune response in human term parturition. *Am J Reprod Immunol* 2013;69:212-230

64 Shooner C, Caron PL, Fréchette-Frigon G, Leblanc V, Déry MC, Asselin E. TGF-beta expression during rat pregnancy and activity on decidual cell survival. *Reprod Biol Endocrinol.* 2005 31;3:20

65 Yeh YC, Wei WC, Wang YK, Lin SC, Sung JM, Tang MJ. Transforming growth factor- β 1 induces *Smad3*-dependent β 1 integrin gene expression in epithelial-to-mesenchymal transition during chronic tubule interstitial fibrosis. *Am J Pathol* 2010;177:1743-54

66 Mariano J M, Montuenga LM , Pentice M A, Cottitta F, Jakowlew S B. Concurrent and distinct transcription and translation of transforming growth

factor- β type I and Ty pe11 receptors in rodent embryogenesis. *Int J Dev Biol*
1998;42: 1125-1136