

UNIVERSIDAD NACIONAL

AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Psicología

División de Estudios Profesionales



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Identificación de marcadores de células troncales durante la regeneración de dígitos de ratón: importancia para la recuperación neurofisiológica de la extremidad

TESIS

Que para obtener el grado de:

Licenciado en Psicología

P r e s e n t a

Claudio Iván Galván Hernández

Director: Dr. Jesús Chimal Monroy. IIBm UNAM.

Revisor: Dr. Octavio César García González. Fac. Psicología UNAM.

Sinodales:

Dr. Antonio Paulino Zainos Rosales. Fac. Psicología UNAM / IFC UNAM.

Dra. Angélica Zepeda Rivera. IIBm UNAM.

Dra. Beatriz Gómez González. Fac. Psicología UNAM / UAM Iztapalapa.



México, D.F. Abril 2014



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.

La Perfección es el Sentido subjetivo del camino del Inconsciente.

Moria

Nothing without understanding would ever be more beautiful than with understanding.

Plato

If there were no regeneration there would be no life. If everything regenerated there would be no death. All organisms exist between these two extremes.

Richard Goss

Developmental biology is a powerful way to learn how genes and proteins operate in their natural habitats. In a growing animal, genes come to life.

Matthew P. Scott

El sexto planeta... estaba habitado por un anciano que escribía libros enormes.

...[El principito] echó una mirada a su alrededor, sobre el planeta del geógrafo.

[y dijo] Es muy bello vuestro planeta.

-No puedo saberlo -dijo el geógrafo.

- ¡Ah! (el principito estaba decepcionado).

[...] ¡Pero eres geógrafo!

-Es cierto -dijo el geógrafo-, pero no soy explorador. ...

El geógrafo es demasiado importante para explorar. No abandona su escritorio. Pero recibe ahí a los exploradores. Les interroga y toma nota de sus observaciones. [Escribe geografías,] los libros más precisos de todos los libros.

Antoine de Saint-Exupéry

My dreams were at once more fantastic and agreeable than my writings. ...What I wrote was intended at least for one other eye...; but my dreams were all my own...

Mary Shelley

El proceso de realizar un estudio en un Área Frontera,
es el proceso de Idealizar al héroe o tema de la historia;
embellecer, ocultar y pecar de una sabiduría no poseída,
hacer propio aquello que nunca lo ha sido.

A Bety.

A יוֹסֵף, Diana y S.

A Héctor.

He de advertir que pecho de dos males en la escritura de este texto. Primero, tengo un sesgo de para quién escribo. Y segundo, de alguna manera este texto es autobiográfico.

Traté de corregir ambos casos...

El primero, creo, fue eficazmente resuelto con las críticas, pero principalmente con las dudas que me generaron mis sinodales tras su revisión.

El segundo data de abril de 2007 (mientras cursaba el segundo semestre de la carrera) y tiene su origen en el texto de Anne Casselman, **How to Grow a New Limb?**^Φ Parafraseando a Dinsmore, *A History of Regeneration Research*, el exponerme a descubrimientos científicos históricamente significantes estimuló a mi niño interior: retando mi imaginación y creatividad. Espero que mi mal se convierta en un bien y despierte en el lector un poco de curiosidad científica.

A la הַיָּמָה.

^Φ De ese texto, cuatro puntos influyeron en mi desarrollo conceptual: 1) los mamíferos han perdido la capacidad de regenerar partes de su cuerpo; 2) las rutas de señalización que controlan los procesos de regeneración pueden estar conservados en los organismos; 3) estas señales hacen que las células cercanas a la herida regresen a un estado similar al de Células Troncales; y, 4) la capacidad de regenerar “extremidades” está latente en niños planteando la duda sobre qué rutas están implicadas.

D e d i c a t o r i a

Fiat mihi secundum verbum tuum..

A mis Hermanos, D.E.G.H. (Diana) y J.G.H. (ΨΥ), esta tesis fue pensada en Uds; sirva de tributo. Cada experiencia se ha construido con Amor. Siempre estaré en deuda: Gracias por cuidarme. A C.S.G.T.

A mis padres que no solo han patrocinado mis locuras, también con su ejemplo y con sus historias me han llenado de experiencias, esperanzas e ideales.

A M.E.B.H.N. (Bety) quien siempre ha sido punto de referencia del cómo hacer las cosas, de la pasión, coraje y compromiso que se necesita; por siempre estar varios pasos adelante de la adversidad y por nunca dejar que ni brazo ni pierna flaqueen, ni se doblen a la hora de Sembrar. Sirva esta tesis de hermosa Rosa.

A C.H.G.G.A. (Héctor) quien en 98-99 con un pequeño libro de Marx y Engels despertó mi interés por el Desarrollo de la Extremidad y su función en la evolución del hombre; por su amistad, paciencia y cariño a lo largo de la última década. Sea esta tesis reflejo del esfuerzo y Trabajo que hemos compartido.

A Larissa, Eduardo, Gabriel, Mauricio y Nidia, y a toda la *Militia*, con quienes he perdido y ganado Batallas a lo largo de tantas Albas; por su amistad, su consejo, su crítica, su paciencia y su cariño. Levante esta tesis Delicioso Perfume para agradecerles.

A Julienne Gallardo, Claudia Sabag y Guadalupe Valenzuela de la FLAG, quienes siempre han creído en mis proyectos, sirva esta tesis de simbólica recompensa.

A Jessica por sus palabras, consejos y cariño; porque has endulzado la construcción de lo real, lo imaginario y lo simbólico. Por todo tu apoyo.

A Valeria, Alexa, Claudia y Alejandro quienes han sido parte importante de Mi Familia. Cada día recibimos nuevos Regalos.

A la Memoria de Quika; para inmortalizar, la Letra... se que te hubiera gustado.

A mis abuel@s B.M.N.S. y J.A.G.V, tí@s, prim@s, sobrin@s y amig@s que han estado -sin estar- en la génesis de esta tesis. En particular a *Cyrus*, pues honor a quien honor merece.

A Yammel por todas las charlas, interminables; por las preguntas que hemos hecho y las que faltan por hacer.

A Martha y a Marcia, con cariño.

Y en general a los Cuadernos y a las hojas sueltas.

...

A g r a d e c i m i e n t o s P r o f e s i o n a l e s

Al Dr. Jesús Chimal Monroy, del Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM; por todos estos años en los que me ha brindado su apoyo.

Al Dr. Octavio César García González, de la Facultad de Psicología, por sus comentarios, críticas y revisión a lo largo de la escritura de esta tesis.

A la Fundación Lorena Alejandra Gallardo I. de A. P. y a la Sra. Julienne Gallardo Thurlow por la beca otorgada para la realización de mis estudios de licenciatura y para la asistencia de la *IIth Conference on Limb Development and Regeneration*.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, en particular a la RedFarmed, por la beca otorgada para la realización de esta tesis.

Este trabajo no habría sido posible sin el financiamiento otorgado al laboratorio del Dr. Jesús Chimal Monroy por la DGAPA-PAPIIT proyecto IN2I45II-3 y por el CONACyT proyecto I68642.

A la M. en C. Marcia Bustamante Zepeda por el apoyo técnico y asesoramiento durante la realización de los experimentos de biología molecular requeridos para este proyecto; por su amistad durante este tiempo.

A la M.V.Z. Georgina Díaz Herrera y al M.V.Z. Jorge García Rebollar del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas por la capacitación brindada para el uso y manejo de animales de laboratorio y por su apoyo durante la realización de esta tesis.

Al M. en C. Alejandro Marmolejo Valencia por su apoyo técnico y por las facilidades brindadas en el laboratorio.

Al Sr. Pedro Medina Granados por su apoyo técnico para el procesamiento del material histológico.

A g r a d e c i m i e n t o s P r o f e s i o n a l e s

Al Dr. Miguel Tapia Rodríguez de la Unidad de Microscopia del Instituto de Investigaciones Biomédicas por el asesoramiento en la adquisición de imágenes y por su apoyo, su comentarios, sugerencias y, sobre todo, su amistad durante estos años.

A Lic. Lucia Brito Ocampo y a Laura Velázquez Contreras de la Biblioteca del Instituto de Investigaciones Biomédicas por siempre brindarme el apoyo necesario para conseguir el material bibliográfico utilizado en esta tesis. A María Petra Muñoz García y a Julieta Cáliz Cecilia por su apoyo en el aprovechamiento de los recursos disponibles.

Asimismo, esta tesis no habría sido posible sin la ayuda de varios laboratorios, gracias por los reactivos, equipo y ayuda que encontré en el momento justo. En especial quiero agradecer al Dr. David García-Diego (por el asesoramiento en el procesamiento de las extremidades de ratón), al Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina (por el préstamo de algunos anticuerpos) y a la M. en C. Valeria Hansberg (por la donación de los Oligos dT).

Al Dr. Eduardo Martínez Martínez; espero reflejar al menos un poco de lo que me enseñaste sobre el qué y el cómo del hacer Ciencia; siempre lo atesoraré.

A los miembros de los laboratorios con los que compartí de una u otra manera mesa de trabajo e hice amistad a lo largo de los años: José, Eduardo, Miguel, Raquel, Leonora, Ingrid, Ana, Itzel, Paulina, Belem, Isaac, Francisco, Rodrigo, Alberto, Bladimir, Silvina, Donovan, Sabina, Dante, Marcia, Martha, Karen, Alejandro, Valentina, Eduardo Vladimir, Bruno, Faviel, Jessica y Cristóbal.

A todos los que en algún momento revisaron borradores del anteproyecto y de la tesis y que con sus sugerencias enriquecieron la versión final, en especial a: M.M.C.M. Diana Galván, Dra. Martha Díaz, Dr. Cristóbal Prina, M. en C. Jessica Marin, Dr. Octavio García, Dr. Antonio Zainos, Dra. Angélica Zepeda, Dra. Beatriz Gómez y a mi Director de tesis Dr. Jesús Chimal.

Índice

DEDICATORIAS

v

AGRADECIMIENTOS PROFESIONALES

vii

RESUMEN

1

INTRODUCCIÓN

3

- I. ¿Por qué es importante estudiar la regeneración de las extremidades?
 - a. La idea de regenerar: entre lo inmortal y lo real 3
 - b. Antes de la regeneración: pérdida de una extremidad 4
 - c. Daño y regeneración del sistema nervioso periférico 7

2. ¿Qué es la regeneración?
 - a. La regeneración: entre la vida y la muerte* 10
 - b. Factores que influyen en el proceso de regeneración 11
 - c. Características del proceso regenerativo
 - i. La regeneración plantea los mismos problemas que el desarrollo, pero genera soluciones diferentes: morfogénesis de la extremidad 15
 - ii. Etapas características de la regeneración de la extremidad 21
 - d. Participación de las células troncales en la regeneración de la extremidad 25
 - e. Participación del sistema nervioso periférico durante la regeneración de la extremidad 27

3. Regeneración en mamíferos
 - a. Regeneración total de apéndices en mamíferos 29
 - b. Regeneración digital en mamíferos: particularidades 30

* Véase p. iii.

JUSTIFICACIÓN	33
----------------------	----

HIPÓTESIS	35
------------------	----

OBJETIVOS	36
------------------	----

MATERIALES Y MÉTODOS	37
-----------------------------	----

RESULTADOS	47
-------------------	----

DISCUSIÓN	71
------------------	----

CONCLUSIONES	85
---------------------	----

REFERENCIAS	87
--------------------	----

R e s u m e n

La pérdida de extremidades altera la funcionalidad de los organismos e incluso puede comprometer su sobrevivencia. El proceso de regeneración a través de la activación de células troncales adultas, de la inducción del potencial pluripotente en células diferenciadas o de la activación de programas moleculares similares a los del desarrollo embrionario permite la recuperación incluso de tejidos u órganos completos.

Durante la regeneración de la extremidad, los procesos de cerrado de herida y de formación de un reservorio celular (blastema) en el muñón son determinantes para el éxito de la regeneración y, en organismos que regeneran extremidades completas, están regulados por la función trófica y mitogénica de los nervios. Sin embargo, en mamíferos donde la capacidad regenerativa se limita a la punta de los dedos, los nervios están ausentes durante el proceso regenerativo. Aunque los nervios, en apariencia, no influyen en el proceso regenerativo, generan síntomas sensoriales y nociocéptivos patológicos tras la formación de neuromas.

En esta tesis después de estudiar el proceso regenerativo en ratones a través de técnicas histológicas clásicas, inmunohistoquímicas y de la evaluación de la expresión de genes se encontró que la capacidad regenerativa del ratón se limita a los dedos y depende de la edad y el nivel de amputación. Asimismo, se encontró que durante el proceso de regeneración se llevan a cabo en la falange terminal un proceso de inflamación transitorio y un proceso de osificación directa; ello podría explicar las deficiencias en la formación de un blastema. Incluso sin un blastema, se ha reportado una acumulación de células con carácter progenitor bajo el epitelio

de herida y por arriba de los remanentes óseos. Al evaluar la expresión de genes característicos de células troncales pluripotentes y mesenquimales troncales en esta región se encontró una dinámica donde resalta la expresión de *Sox2*, *c-Myc*, *Thy-1* y *Endoglina*. Se sabe que estos genes participan en procesos de regeneración axonal, condrogénesis, reepitelialización, desarrollo y remodelamiento vascular y en el mantenimiento de la multipotencia. La expresión de genes relacionados con el proceso de regeneración axonal y el patrón de reinervación digital durante la regeneración llevan a sugerir la posibilidad de que las células nerviosas periféricas desarrollen procesos de regeneración axonal aberrante que junto con los procesos de reepitelialización y cicatrización explican las deficiencias en la formación del blastema y en la regeneración digital. Todavía falta evaluar: 1) la relación de estos genes y el patrón de innervación con el remodelamiento de la membrana basal; y, 2) la necesidad de, al menos, un centro señalizador que detone y/o regule el proceso regenerativo.

Los resultados de esta tesis permiten sugerir que al inducir en mamíferos la formación de un reservorio celular (blastema) donde se expresen marcadores de células troncales se generarían células blanco para los axones, ello permitiría promover una correcta regeneración axonal y así establecer un asa de retroalimentación que mantendría la población celular del blastema en condiciones óptimas para llevar a cabo la regeneración de la extremidad evitando la formación de neuromas y, a su vez, evitando la aparición de síntomas sensoriales y nociocéptivos.

I n t r o d u c c i ó n

¿Por qué es importante estudiar la regeneración de las extremidades?

La idea de regenerar: entre lo inmortal y lo real

El interés por el fenómeno de la regeneración ha estado presente en el imaginario humano desde que se tiene registro^{I-2}. La capacidad de regenerar era considerada una propiedad o habilidad de héroes o seres inmortales -Titus, Prometeo, Hércules, Mercurio, Xolotl^{I,3-6}; los humanos solo* al exaltar alguna virtud o sacrificio podían recibir la gracia divina^{I-3,6}. Aunque las civilizaciones donde surgieron estos mitos tenían algún conocimiento de los procesos regenerativos, fueron incapaces de explicar sus causas reales^{I,6-7}.

Durante la Edad Media, los humanos tenían la esperanza de regenerar extremidades perdidas gracias a la sensación de extremidades fantasma; mientras la extremidad conservara el alma (teoría vitalista), su regeneración sería posible^{2,8-9}. Esta creencia fue fortalecida por reportes de regeneración milagrosa de extremidades en humanos². La teoría vitalista de Aristóteles^{7-8,10} (c. 350 a.c.) permeó al estudio de la regeneración hasta 1901 cuando Morgan estableció el *corpus* biológico del proceso regenerativo^{9,11-13}.

* Para la acentuación de la palabra solo y las palabras este, ese y aquel, con sus femeninos y plurales se siguieron las reglas de acentuación establecidas por la Real Academia Española en 2010. Véase p. 102.

Antes de la regeneración: pérdida de una extremidad

Aunque parezca obvio, para que se inicie el proceso regenerativo es necesario que haya un daño^{I4} interno (como una enfermedad^{I5-I6}) o externo (como un accidente o una guerra^{I7-I9}) que impida la viabilidad y funcionalidad de la extremidad^{I7,20}. La pérdida de la extremidad también puede ser una estrategia de sobrevivencia como la autotomía (autoamputación) en roedores y humanos^{I7,21-30}.

Aunque la regeneración desempeña funciones distintas en diferentes animales, algunos mecanismos celulares y moleculares se han conservado a lo largo de la filogenia³¹⁻³². Considerar al proceso regenerativo como evolutivamente conservado^{28,33-34}, permite aprender de invertebrados como la esponja³⁵, la planaria³⁶⁻³⁹ y la hidra⁴⁰⁻⁴¹ los mecanismos que se han conservado y aquellos que han cambiado⁴². Por ejemplo, en anfibios⁴³⁻⁴⁵ y en mamíferos⁴⁶⁻⁴⁷ algunos procesos del programa de regeneración de extremidades están conservados incluso en condiciones no regenerantes (organismos adultos y en amputaciones extensas); sin embargo, dicho programa no se lleva a cabo. Aun cuando se han desarrollado tratamientos específicos capaces de inducir el programa regenerativo, la regeneración solo es parcial^{46,48-55}.

El proceso más conservado entre los organismos es el mantenimiento de la homeostasis de sus tejidos⁵⁶⁻⁵⁸. Para esto, los organismos utilizan tres mecanismos: 1) activan células troncales adultas, 2) inducen el potencial pluripotente o multipotente en células diferenciadas a través de un proceso denominado reprogramación natural^{56-57,59} o 3) activan programas moleculares

similares a los del desarrollo embrionario⁶⁰⁻⁶³. Gurley y Sánchez Alvarado⁵⁹ advierten que aún falta mucho por entender (y por estudiar) sobre la función de las células troncales adultas o reprogramadas en los procesos de regeneración.

Si la regeneración de la extremidad fuera un proceso conservado evolutivamente que se ha ido perdiendo por diferentes presiones ambientales, sería necesario descifrar qué fases o eventos (morfológicos, celulares y moleculares) han sido anulados, suprimidos o inhibidos³⁴. En este contexto, Bely³⁴ propone evaluar cuatro eventos: 1) el cerrado de herida o reepitelialización; 2) la formación de un reservorio celular o blastema en el frente de regeneración; 3) que las células de este blastema hayan estado expuestas a señales moleculares similares a las que están presentes durante el desarrollo embrionario⁶⁴ y que dicha exposición refleje los patrones morfogenéticos adecuados⁶⁵; y, 4) que la extremidad regenerada sea un reemplazo fiel y funcional de la extremidad amputada^{28,66}.

Los humanos pueden perder alguna extremidad durante el nacimiento⁶⁷ o en el transcurso de su vida (enfermedad, accidente, guerra o trastornos en la imagen corporal)^{I6-I7,24-25,68-70}. El nivel de amputación correlacionará con el compromiso de la funcionalidad de la extremidad (Ver **Figura I**). Asumiendo que la persona sobrevive a la causa de la amputación, el proceso de curación será largo y doloroso; se deberá remodelar el hueso (desarrollándose a veces procesos de osificación heterotópica⁷¹), se generarán cicatrices, se retraerán los músculos y

se formarán neuromas en el muñón debido al proceso de regeneración axonal aberrante⁷²⁻⁷³ (Ver Figura 2).

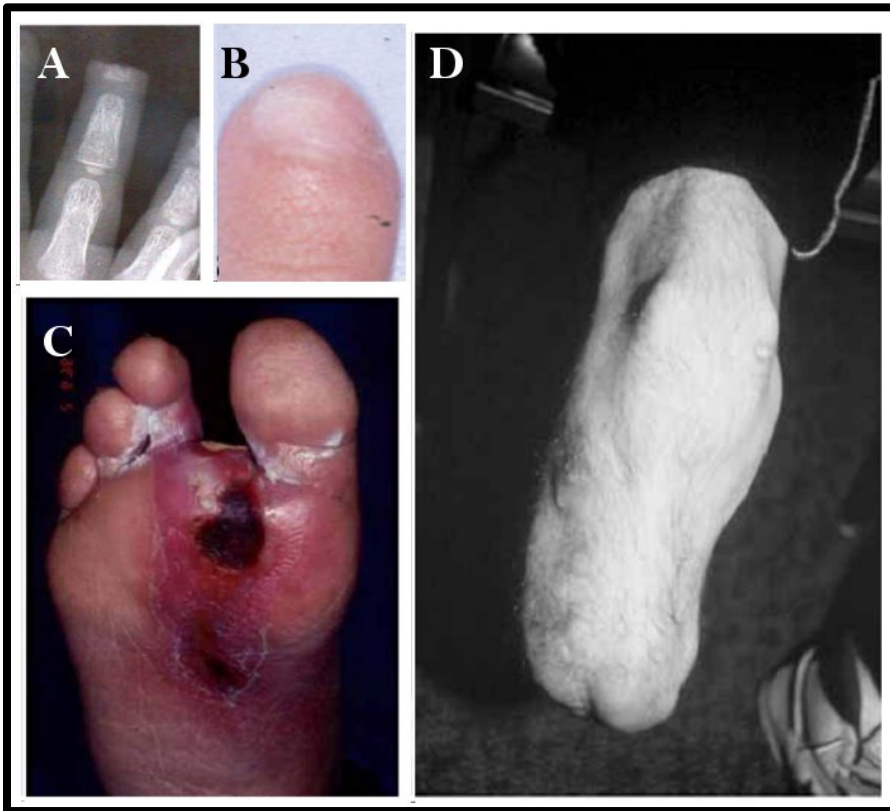


Figura 1. El compromiso de la funcionalidad de la extremidad dependerá del nivel de amputación. A y B) Amputación de la falange distal de un dedo de la mano; rayos X y fotografía donde se muestra la regeneración del hueso y de la uña. C) Fotografía de un pie de un paciente diabético al que se le ha amputado todo el dedo. D) Amputación de todo el pie y parte de la pierna. **Note** en A y B que solo los niños de forma natural son capaces de regenerar la punta de sus dedos^{51,74-76}. A y B) Modificados de referencia 51. C) Modificado de referencia 77. D) Modificado de referencia 15.

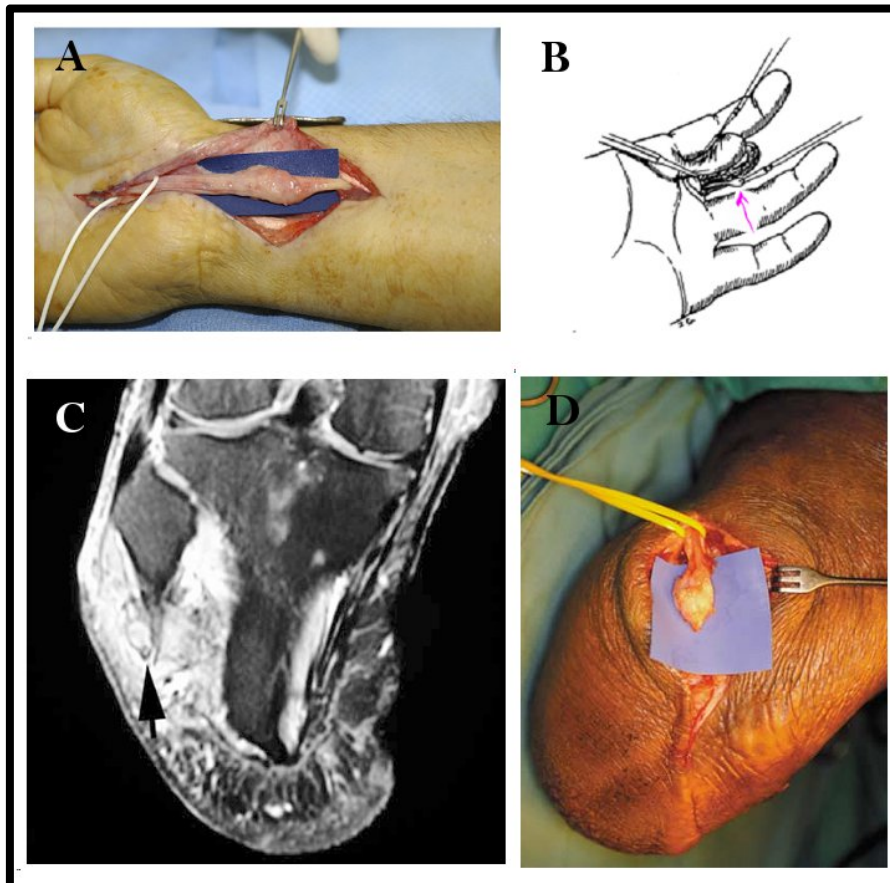


Figura 2. Regeneración aberrante de los nervios o formación de neuromas. A) La regeneración axonal en las extremidades puede originarse con el daño a los nervios sin la necesidad de axotomía. Los neuromas se ven como nudos. B) Neuroma formado tras la amputación del dedo medio a nivel de la falange intermedia de la mano izquierda (flecha). C y D) Tras meses de recuperación de una amputación de la pierna por debajo de la rodilla se muestra la formación de un neuroma; el paciente reportaba dolor de miembro fantasma. A) Modificado de referencia 78. B) Modificado de referencia 79. C y D) Modificado de referencia 72.

En la actualidad solo existen tres tratamientos posibles, dependiendo del grado y el nivel de daño, para que los humanos recobren la función de sus extremidades: I) el reimplante o trasplante de la extremidad (dígitos o extremidades completas) con o sin reinervación^{I7,80-8I}; 2) la elongación ósea o quirúrgica⁸²; y, 3) el uso de prótesis^{I7}.

Daño y regeneración del sistema nervioso periférico

La magnitud de daño que sufre el sistema nervioso periférico (SNP) tras una lesión, determinará las características del proceso regenerativo axonal; ello influirá en su grado de recuperación funcional. Dicha recuperación puede ocurrir a través de tres mecanismos diferentes: restitución, sustitución y compensación⁸³. Se han definido al menos cinco grados de daño neural⁸³ (Ver **Figura 3**); de estos, es importante resaltar que la regeneración decrece con la magnitud de daño, la edad del organismo⁸³⁻⁸⁶ y el lugar en donde el axón fue dañado -inhibiéndose totalmente cuando es cercano al soma. El daño en los nervios periféricos genera cambios retrogradados en el SNP que promueven la sobrevivencia y regeneración axonal. Las señales provenientes de los nervios dañados participan de manera general en dos procesos. Mientras que algunas señales como los derivados de la degeneración Walleriana o cambios en los canales iónicos y sus respectivos cambios electrofisiológicos, generarán síntomas sensoriales y nociceptivos patológicos⁸⁷⁻⁸⁹, otras señales influirán en la dinámica celular al activar: factores neurotróficos, factores de transcripción, moléculas de transporte axonal, moléculas específicas del crecimiento del cono axónico y en el

remodelamiento del citoesqueleto, en particular, de la tubulina (componente esencial en la formación de microtúbulos)⁹⁰. Por ejemplo, las diferentes modificaciones posttraduccionales de la tubulina podrían representar mecanismos regulatorios de su disponibilidad durante el crecimiento axonal y el transporte intracelular⁹¹⁻⁹². La arquitectura del SNP (los axones se extienden desde la médula espinal hasta la punta de los dedos) implica un gran reto para la dinámica del sistema de transporte retrogrado y anterogrado intracelular de mRNA, proteínas, moléculas, organelos, neuropéptidos, neurotransmisores y factores de crecimiento⁹³⁻⁹⁴. Recientemente, en el SNP se ha asociado la dinámica de acetilación de los microtúbulos a su estabilidad durante el transporte axonal⁹³ y, por lo tanto, se ha asociado a su funcionalidad.

El proceso de regeneración axonal involucra varios pasos: sobrevivir al trauma inicial, iniciar el crecimiento axonal, abrirse paso por la región de daño, navegar de nuevo hacia los objetivos originales, restablecer los contactos sinápticos con dichos objetivos y restablecer el patrón normal de mielinización de los axones regenerados^{83,95} (Ver **Figura 3**). La respuesta inicial del sistema nervioso es inflamatoria; las neuronas y las células gliales inician un proceso de apoptosis cuyos derivados son desechados a través del proceso de degeneración Walleriana⁸³. La regeneración axonal, propiamente dicha, inicia con la proliferación de las células de Schwann que son una rica fuente de soporte trófico que potencia la sobrevivencia neural y producen un ambiente (andamio) que promueve el crecimiento celular al guiar físicamente el crecimiento de la fibras

y promover una matriz extracelular (ECM) especializada⁸³. Las células blanco recién denervadas también son capaces de producir factores tróficos que inducirían la regeneración⁹⁶⁻⁹⁸. Si los daños a los nervios son poco severos las células de Schwann proliferantes permitirán la extensión de las fibras nerviosas regenerantes hasta sus objetivos originales⁸³. Si las lesiones son severas, las células de Schwann forman una densa masa en la región de daño que los axones regenerantes son incapaces de atravesar lo que forma un denso neuroma (Ver Figuras 2 y 3). En el caso de la regeneración de la extremidad, se ha propuesto que en ausencia de nervios, las células de Schwann liberan moléculas que afectan la proliferación celular inhibiendo así la correcta formación del reservorio celular (blastema) necesario para originar la extremidad faltante⁹⁹⁻¹⁰⁰.

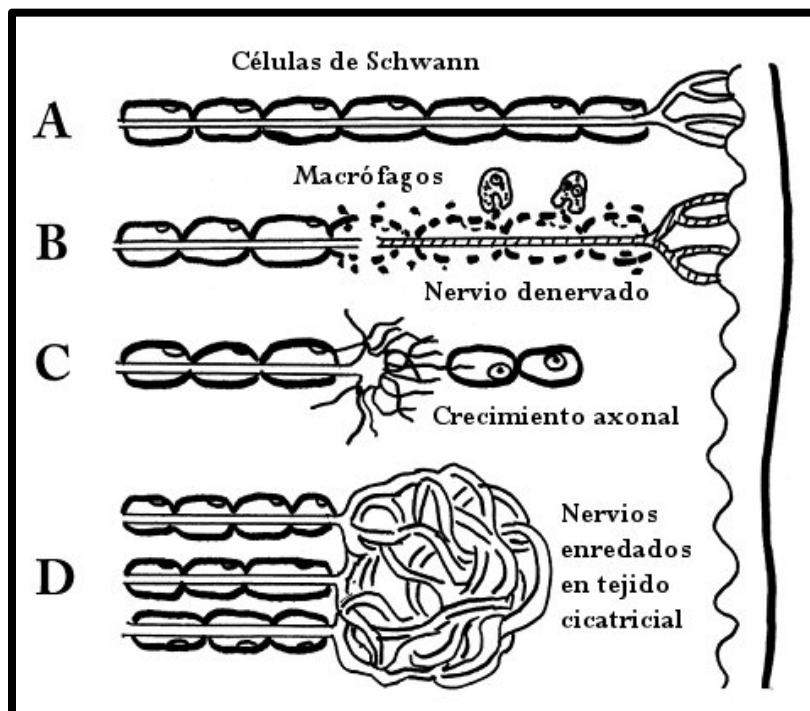


Figura 3. Proceso de regeneración axonal. La regeneración de los nervios periféricos depende de la severidad del daño. Lesiones que dañan al axón, ya sea por una compresión moderada o una temperatura extrema, sin interrumpir la matriz extracelular son de primer grado y son reparadas sin dificultad. Las lesiones que separan o rompen al nervio (segundo grado) inician un proceso de degeneración Walleriana en la parte distal al plano de lesión. Mientras que las capas del tejido conectivo se encuentren intactas estas lesiones pueden repararse. Las lesiones del tercero al quinto grado implican un incremento en interrupción del tejido conectivo

de los nervios y raramente son reparados sin algún tipo de intervención quirúrgica que reconecte los muñones de los nerviosos distales y proximales (con trasplantes neurales o andamios biológicos¹⁰¹⁻¹⁰²). A) Nervio periférico intacto haciendo contacto con su tejido blanco; B) Proceso de degeneración axonal Walleriana; C) Proceso de regeneración axonal dependiente de las características del daño. D) Formación de neuromas. Modificado de referencias 83 y 95.

¿Qué es la regeneración?

La regeneración: entre la vida y la muerte

En 1894, Driesch definió la regeneración como la reactivación de los factores que estuvieron presentes durante el desarrollo embrionario y que le permitiría a los organismos inducir los procesos celulares elementales para recuperar la forma original tras un daño^{I3}. En algunos casos la regeneración permite recuperar órganos, apéndices y hasta organismos completos (en invertebrados)^{I03}. En vertebrados, la capacidad regenerativa varía entre especies y cambia con la etapa de desarrollo ontogenético.

En términos generales el proceso de regeneración puede ser de dos tipos: epimórfico o morfaláxico^{I3-I4, I04}. Por una parte, el proceso epimórfico se caracteriza por la formación de un blastema o reservorio celular localizado en la región distal de la herida. Este blastema es el resultado de una elevada tasa de proliferación de las células que han quedado en el muñón y que, presumiblemente, se desdiferencian. Por otra parte, el proceso morfaláxico se caracteriza por el remodelamiento y reorganización de los tejidos existentes (es decir, el tejido que queda se “transforma directamente”^{*} en la parte faltante^{I4}).

Tanto la regeneración epimórfica como la morfaláctica pueden responder al daño tisular a través de la activación, reclutamiento y uso de células troncales. El tipo de proceso regenerativo y la gama de procesos celulares implicados están regulados por la activación de centros señalizadores que especifican el

* De acuerdo a la definición original de Morgan. Véase referencia I3.

comportamiento celular. Asimismo, las células a partir de las cuales ocurrirá la regeneración deberán ser capaces de identificar su posición y de restablecer el patrón espacial tisular; cada célula deberá adquirir la forma y linaje adecuados para recuperar la funcionalidad de la estructura regenerada³³.

Ya desde principios del siglo XX, Morgan se preguntaba sobre las causas por las que algunos animales, incluido los humanos, carecían de la capacidad de regenerar partes perdidas^{I05}. Entender las causas sería vital para lograr inducir la regeneración de extremidades; por ejemplo, en la actualidad los grupos de Muenoka^{I06} y de Badylak⁵³⁻⁵⁴ (entre otros) tienen como meta inducir la formación de un blastema en las extremidades de mamíferos, proceso que se ha postulado es una *condicio sine qua non* del proceso regenerativo^{I07-I09}. Asimismo, Morgan consideraba que las células de los tejidos que quedaban en la zona de daño eran las responsables de la regeneración^{I3,I05,II0} y propuso que el medio ambiente sería el que limitaría las respuestas celulares al generar las presiones necesarias de diferenciación^{I05}; lo que estaría dado por la activación de centros señalizadores dentro del blastema.

Factores que influyen en el proceso de regeneración

En humanos y en roedores, igual que en otros animales (como las ranas), se sabe que la capacidad regenerativa de extremidades disminuye con su desarrollo y crecimiento^{74,76}. Aunque se ha logrado inducir el programa regenerativo digital en ranas y roedores adultos^{46,I06,II0-III}; la regeneración es parcial, ya que el

desarrollo de los elementos esqueléticos aún es incompleto^{46,48,50,I07,I09,II2-II3}.

Aparte de la edad del organismo, otra limitante de la capacidad regenerativa es la magnitud del daño tisular (el nivel de amputación)^{I05,II4}. Mientras que las planarias e hidras pueden regenerar organismos completos a partir de fragmentos muy pequeños (por ejemplo, la planaria solo necesita una I/279 parte o el 0.36% de su cuerpo para poder regenerar), en gusanos de tierra, roedores y humanos, el nivel de amputación determinará la capacidad regenerativa^{II2} al regular el proceso de cicatrización^{95,II5-II6} promoviendo o inhibiéndola^{I03,I05} (se sabe que la cicatrización inhibe la regeneración).

Otra explicación de la incapacidad de regenerar extremidades completas en mamíferos, es que no se activan las señales instructoras que coordinen la regeneración de los tejidos que integran a la extremidad^{64,I05,II7-II8} incluso cuando se ha demostrado que los tejidos individuales son capaces de regenerar por separado^{I05,II9}. Ante la incapacidad de los tejidos de la extremidad de mamíferos para regenerar de manera coordinada, se ha propuesto que el trasplante de células embrionarias pluripotentes y células pluripotentes inducidas en la zona de daño podría inducir la regeneración de la extremidad al ser capaces de evaluar el medio ambiente celular e incorporarse al programa regenerativo^{33,50,II8,I20-I24}.

Para que la regeneración pueda llevarse a cabo es necesario que el estímulo aversivo detone cambios en el tejido, en las células y en el ambiente celular circundante a través de señales mecánicas, químicas o eléctricas. En general, la respuesta regenerativa comienza con el reconocimiento del daño tisular o herida

local. Sin embargo, las posibilidades para sensar (detectar) la pérdida de la extremidad son diversas e involucran cambios en el flujo eléctrico, en la hemostasis, en la participación del sistema inmune y en el cerrado de la herida. Por ejemplo, alteraciones en los campos eléctricos pueden cambiar la polaridad celular, estimular la liberación de factores de crecimiento, promover o inhibir el cerrado de herida, dirigir la migración celular, el crecimiento celular, promover su diferenciación o incluso estimular y detonar la regeneración tisular^{I25-I29}. Asimismo, la activación de la proteasa trombina, que participa en la formación de costras, es capaz de regresar al ciclo celular a las células cercanas al sitio de daño; otros factores liberados por las plaquetas son capaces de promover la proliferación celular^{I29}. Del mismo modo, diferencias en los mecanismos innatos y adquiridos del sistema inmune y su neuromodulación regulan las fases tempranas del proceso regenerativo^{I30} a través de la liberación de moléculas que inhiben la respuesta inflamatoria. Se ha reportado que la inflamación crónica en pez cebra y en ranas inhibe la regeneración al retrasar la reepitelialización e incrementar la respuesta angiogénica^{I30}. Dependiendo del organismo, el cerrado de la herida se lleva a cabo por la anteposición de ejes a través de la regresión del tejido o por la migración del epitelio^{37,I29,I31}. El epitelio delimitará la zona de daño y establecerá el frente de regeneración. Este epitelio en organismos que regeneran será inervado y se engrosará; en conjunto ello permitirá que se forme un blastema con el reclutamiento y la acumulación de células desdiferenciadas e indiferenciadas lo que iniciará el proceso

regenerativo^{99, I32-I35}. En este caso, las células del blastema sienten exactamente dónde están y qué partes de la extremidad faltan; es decir cuentan con la información posicional adecuada^{I36-I37}.

Se ha propuesto que las células desdiferenciadas del blastema se parecen a las células troncales mesenquimales en mamíferos, resaltando su habilidad de regular la respuesta inmune local y la inflamación provocada por el daño^{I30}. Si las células mesenquimales del blastema temprano tuvieran una función paracrina inmunomoduladora que evitara la formación de cicatrices y que promovieran la regeneración axonal^{I38-I46}, esto ayudaría a inducir la regeneración de la extremidad en mamíferos (roedores y humanos)^{II5, I30}. Algunos de los factores que participan en la regeneración de extremidades están resumidos en la Tabla I.

Tabla I. Resumen de factores que participan en el proceso de regeneración de extremidades

Factores que participan en el proceso de regeneración	Efecto
Pérdida de la hemostasis / Formación de costra	Inhibidor
Activación del sistema inmune o inflamación y reclutamiento celular	
Cerrado de herida o anteposición de ejes / Formación de cicatriz	Promotor / Inhibidor
Reinervación / Degeneración axonal	
Pérdida de la continuidad eléctrica	Promotor
Activación de factores promotores de la proliferación celular	
Alteración de los valores posicionales celulares	

Características del proceso regenerativo

La regeneración plantea los mismos problemas que el desarrollo, pero genera soluciones diferentes*: Morfogénesis de la extremidad

El proceso de desarrollo de la extremidad en vertebrados tienen ciertas similitudes con el de regeneración, principalmente, en la adquisición de patrones a través de expresión de genes específicos^{I47} (punto 3 propuesto por Bely³⁴ -véase pág. 5), en la capacidad celular de autoorganizarse para formar estructuras complejas o morfogénesis^{I48} y en el engrosamiento del ectodermo apical^{I49-I51}. Sin embargo, difieren en la interacción del epitelio-mesénquima a través del remodelamiento de la membrana basal^{I52-I54}, en la presencia de nervios y vasos sanguíneos^{I55-I56} y en la formación de un blastema^{53, I20, I57}.

Aunque hay claras diferencias anatómicas entre las extremidades de los vertebrados que surgen de adaptaciones para su locomoción, alimentación y ejecución de funciones esenciales para su sobrevivencia (Ver **Renglón I** de la **Figura 4**), estudios genéticos han mostrado gran similitud en las moléculas señalizadoras y en los genes reguladores que organizan el desarrollo, el crecimiento y la adquisición de patrones en las extremidades^{I58} (Ver **Panel C** de la **Figura 5**). Las extremidades de los tetrápodos presentan tres grandes divisiones anatómicas: el estilópodo o parte más proximal; el zeugópodo o parte media; y, la parte más distal o autópedo^{I59} (Ver **Figura 6**). Se sabe que el eje antero-posterior

* Título basado en el trabajo de Tickle "Limb Regeneration: Regenerating a limb poses the same problems of pattern formation as developing a limb, but the solutions are different". Véase referencia I52.

(del dedo pulgar al meñique) es el que primero se establece, posteriormente el eje dorso-ventral (del dorso a la palma) y finalmente el próximo-distal (del hombro a los dígitos) (ver **Figura 6**). El desarrollo de la extremidad está dado por la interacción entre los tres centros señalizadores: la Cresta Ectodérmica Apical (AER) controla el desarrollo próximo-distal, la Zona de Actividad Polarizante (ZPA) controla el desarrollo anterior-posterior y el ectodermo del primordio dirige el desarrollo del eje dorso-ventral^{I60} (Ver **Paneles B y C de la Figura 5**).

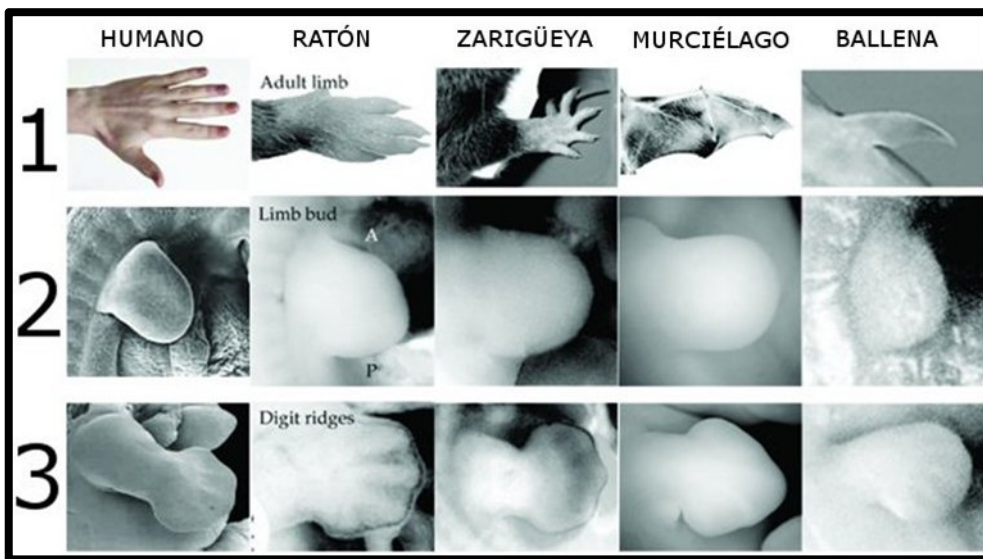
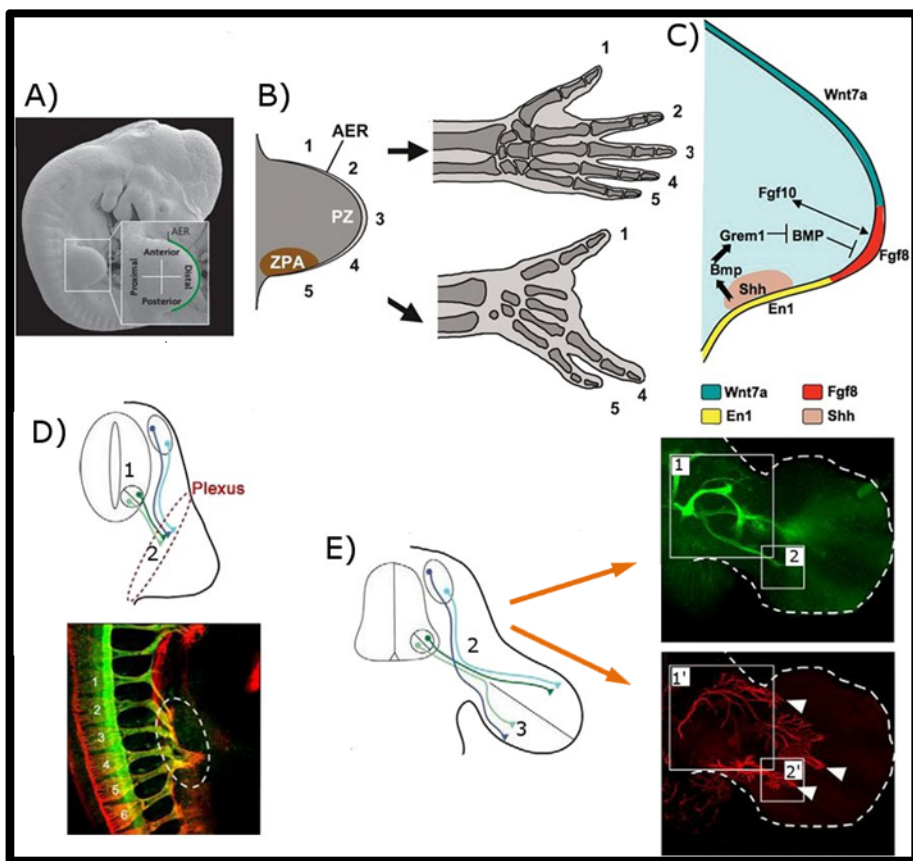


Figura 4. Comparación del desarrollo de la extremidad entre vertebrados. Tres estadios de desarrollo de la extremidad: 1) Forma final de la extremidad 2) Primordio, 3) Formación de las condensaciones. Note las similitudes morfológicas en los renglones 2 y 3. Modificado de referencias I61 y I62.

Por simplicidad, el desarrollo de la extremidad se ha dividido en cuatro etapas: 1) el establecimiento de la identidad de la extremidad y la formación del primordio; 2) el desarrollo de patrones a través de la activación de los tres centros señalizadores; 3) la condensación de los condrocitos, diferenciación y morfogénesis; y, 4) el crecimiento, segmentación, regulación de la identidad digital y la maduración de la extremidad^{I50, I63} (Ver **Figura 7**). Cada primordio consiste en una capa externa ectodermal que cubre un centro de células

mesenquimales^{I64}, de las interacciones celulares y moleculares entre ambos tipos celulares se desarrollará una extremidad completa con un patrón esquelético determinado^{I65}. Debido a que el primordio de la extremidad es capaz de dar origen a todos los linajes celulares mesenquimales -cartílago, hueso, tendón, tejido conectivo, ligamentos y tejido adiposo- (estas células también tienen la capacidad de diferenciarse a linajes ectodérmico y endodérmico *in vitro*^{I21,I66}), se ha propuesto que tiene en la Zona de Progreso (PZ)^{I67-I68} células troncales mesenquimales^{I69}. Deficiencias en las interacciones moleculares pueden generar alteraciones en el desarrollo o malformaciones^{I70} (Ver Panel B de la Figura 5).

Figura 5. Morfogénesis de la extremidad A) Ubicación de la extremidad en el cuerpo del embrión. B y C) La regulación en la expresión de genes asegurará el correcto desarrollo. C) Modelo de la interacción molecular durante el desarrollo de la extremidad. D y E) Modelo del patrón de inervación de las extremidades de ratón. D) Los nervios motores (verde) provienen de la médula espinal -1- y los nervios sensoriales (azul) provienen del ganglio de la raíz dorsal. En la región del plexo -2- se inicia el proceso de fasciculación. Abajo) En el estadio E10.5, los nervios sensoriales y motrices se encuentran en la región del plexo (líneas punteadas); los números 1-6 marcan los nervios espinales. E) Las células mesenquimales químicamente repelen a los nervios -3-. Derecha) Patrón de inervación en E12.5, las cabezas de flecha resaltan las diferencias entre la inervación sensorial y motriz (compare 1-1' y 2-2'). GFP (Proteína verde fluorescente) -verde, nervios motores- y neurofilamentos -rojo, nervios motores y sensoriales-. PZ (Zona de Progreso). A) Modificado de referencia **I71**. B) Modificado de referencia **I70**. C) Modificado de referencia **I72**. D y E) Modificado de referencia **I73**.



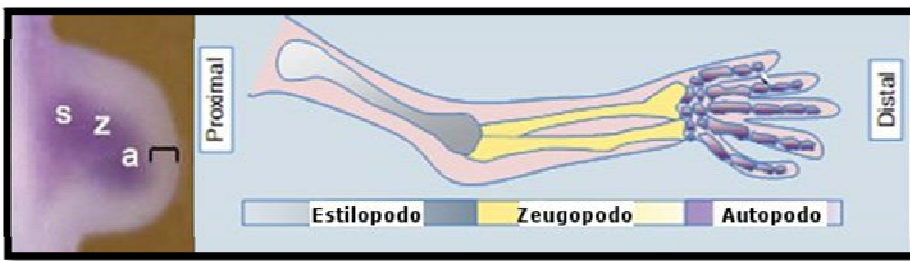


Figura 6. Divisiones anatómicas de la extremidad. La extremidad de los vertebrados tiene tres grandes divisiones anatómicas: el estilópodo (s), el zeugópodo (z) y el autópedo (a). Izquierda)

Detección por hibridación *in situ* en el primordio de ratón de *Sox9*, primer marcador molecular de la formación del molde de cartilago, en el estadio de desarrollo E10.75. La Zona de Progreso está identificada por un corchete. **Compare** con el **Renglón 2** de la **Figura 7**. Modificado de referencias I74 y I50.

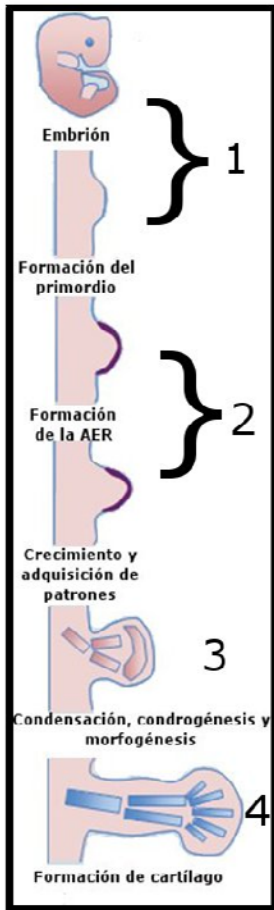


Figura 7. Etapas del desarrollo de la extremidad. 1) Establecimiento de la identidad de la extremidad y formación del primordio; 2) Desarrollo de patrones a través de la activación de los tres centros señalizadores; 3) Condensación de los condrocitos, diferenciación y morfogénesis; y, 4) Crecimiento, segmentación, regulación de la identidad digital y maduración de la extremidad. AER (Cresta Ectodérmica Apical). Modificado de referencia I50.

Durante el proceso de morfogénesis, los elementos esqueléticos pueden formarse a través de dos procesos generales con programas moleculares particulares: mientras que la osificación endocondral implica que el mesénquima mesodermal forma un molde de cartilago que es reemplazado por hueso, la osificación directa o intramembranosa implica que

el mesénquima a través de la generación de nódulos de osteoblastos forma directamente los huesos^{I75-I76} (la mitad proximal la falange terminal de roedores⁴⁸ se osifica endocondralmente y la distal intramembranalmente).

Una de las conductas estereotípicas de los vertebrados es su locomoción^{I77-}
^{I80}, su correcta ejecución dependerá de la integración de los circuitos neurales

que desarrollan asas de retroalimentación motriz-sensorial en los distintos niveles del Sistema Nervioso Central (SNC) y Periférico (SNP). La parte somática del SNP incluye los nervios sensoriales y motores que inervan a las extremidades. Los nervios sensoriales provienen del ganglio de la raíz dorsal, mientras que los nervios motores de la parte ventrolateral de la medula espinal^{I75} (Ver **Panel D** de la **Figura 5**). Los nervios sensoriales pueden hacer blanco en la piel (receptores mecánicos, térmicos o nociceptivos) o en los músculos (husos musculares y órganos tendinosos de Golgi). La pérdida de un único ganglio raramente se traduce en la pérdida total de sensibilidad y genera solamente debilidad parcial (Ver **Panel D** de la **Figura 5**).

Es importante resaltar que, mientras en la extremidad en desarrollo en los estadios donde se expresan los genes que regulan las asas de retroalimentación de los tres centros señalizadores, la inervación del primordio de la extremidad todavía no se ha iniciado (Ver **Paneles C y D** de la **Figura 5**). En el estadio EI0.5 (Ver **Renglón 2 Columna Ratón** en la **Figura 4**), los nervios sensoriales y motrices se encuentran en la región del plexo donde a través de las interacciones axón-axón y con moléculas del medio ambiente se inicia en proceso de fasciculación^{I73} (Ver **Panel E** de la **Figura 5**). Las células mesenquimales quimio atraen o repelen a los nervios^{I81}. El patrón de inervación de la extremidad queda establecido en el estadio EI2.5 de desarrollo^{I73} (Ver **Renglón 3 Columna Ratón** en la **Figura 4** y **Panel E** de la **Figura 5**) y para el estadio EI5.5 las proyecciones nerviosas son laterales y se dirigen hacia la punta de los dedos^{I82}. Aunque se creía que las

neuronas motoras y sensoriales inervaban de manera independiente a la extremidad en desarrollo^{I83-I84}, Huettl et al.^{I73} demostraron que tanto los axones motrices como los sensoriales tienen interacciones y dependen uno del otro para la generación de sus trayectorias. Se sabe que las células mesenquimales de la extremidad expresan los ligandos necesarios para atraer a los axones motrices que expresen los receptores adecuados^{I8I} y que los axones motrices funcionan de andamio para los axones sensoriales; también se sabe que el patrón de vascularización influye en el patrón de innervación al proporcionar nutrientes y oxígeno^{I85-I87}. A la fecha no se tiene información de que el patrón anormal de innervación del primordio de la extremidad repercute en la morfogénesis de la extremidad, pues se sabe que la expresión de genes o exposición de moléculas en el mesénquima de las extremidades no está mediada por los nervios*^{I73,I8I,I88-I92}.

Parecido a la innervación, los músculos y la vasculatura forman un patrón estereotípico en la extremidad a través de la migración de sus precursores que

* Es importante mencionar que recientemente dos trabajos del grupo de Hurlle han estudiado la participación de la señalización de la glicoproteína Reelin en la muerte interdigital y en la regulación de la diferenciación condrogénica en los dígitos (Referencias I88-I89). Reelin es secretada en la matriz extracelular (ECM) y tiene una función paracrina (Referencias I90-I9I). Su función se ha estudiado durante el desarrollo embrionario principalmente en células de la corteza cerebral y cerebelar y en el hipocampo y en procesos cancerígenos en células pancreáticas, criptas intestinales y fibroblastos entre otras. La señalización canónica de Reelin se ha estudiado en el mantenimiento, sobrevivencia, migración y morfogénesis del sistema nervioso central (Referencia I90); sin embargo, vías no canónicas (a través de la activación de receptores EphB -Referencia I92-) pudieran estar interviniendo en fases tardías del desarrollo del sistema nervioso periférico (Referencia I8I). La duda que queda es si el mesénquima de la extremidad al establecer los frentes de innervación a través de la activación de la señalización Eph:ephrin en los estadios de fasciculación motriz y sensorial -Referencias I73 y I8I- (EI0.5-EII) es dependiente o independiente de la señalización de Reelin no canónico o si la señalización de Reelin es activada por los axones y establece asas de retroalimentación con las células mesenquimales de la extremidad.

proviene de las somitas y que responden a la señalización del mesénquima; su diferenciación culmina cuando llegan a la zona de destino dentro del primordio^{I93}.

Etapas características de la regeneración de la extremidad

El proceso de regeneración engloba una variedad de eventos morfológicos, celulares y moleculares altamente coordinados. Para los objetivos de esta tesis se ha dividido en cinco eventos coordinados, estos son: I) el cerrado de la herida con la generación de la capa epidérmica apical (AEC); 2) la formación del blastema con el reclutamiento celular; 3) la adquisición de patrones en el blastema; 4) la morfogénesis de la extremidad; y, 5) la maduración de la extremidad (Ver **Figura 8**).

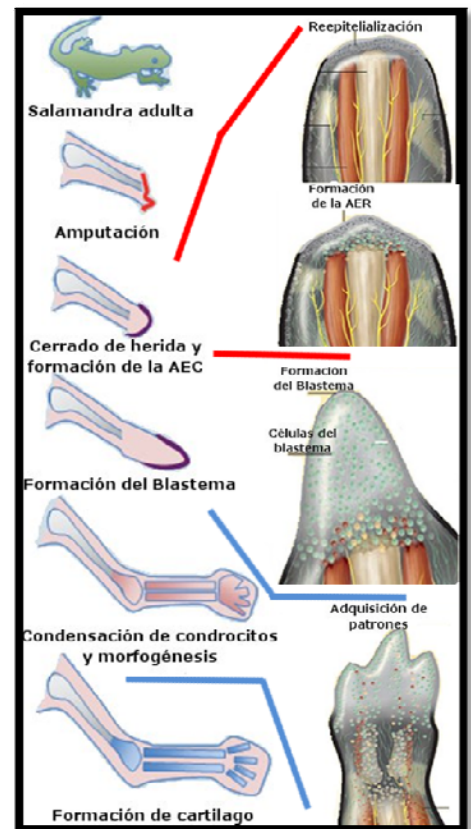


Figura 8. Etapas de la regeneración de la extremidad de salamandra. Se han utilizado organismos que regeneran extremidades completas para describir el proceso regenerativo; sin embargo, este difiere en mamíferos. AEC (Capa Epidérmica Apical). Modificado de referencia I06 y I50.

Algunos autores consideran como el detonante del proceso regenerativo al estímulo mecánico que provoca la amputación, otros consideran a la desregulación eléctrica consecuencia de la alteración de la integridad corporal como la responsable, y otros, incluso, atribuyen el inicio del proceso regenerativo a la reinervación de la epidermis^{I94} y a la consecuente liberación de factores

mitogénicos^{I29,I95} (Ver Tabla I -p. I4).

Cerrado de herida

Tras la amputación de la extremidad, la superficie de la herida se cubre con células epiteliales que forman un epitelio de herida; este epitelio influye en las células subyacentes para que se desdiferencien y vuelvan a entrar y mantenerse en el ciclo celular^{99,I96}. A diferencia de una simple reparación o cerrado de herida donde la continuidad tisular es interrumpida por una cicatriz, la regeneración restaura la continuidad tisular generando una nueva extremidad en el lugar anatómico original^{I97} (Ver Figura 8). El epitelio de herida es distinto al epitelio normal y se forma por la migración de células epidermales en el borde del lugar de amputación en un proceso de reepitelialización a través de la expresión de genes como *K5*, *K6*, *KI4*, *KI6*, *KI7*, *c-Myc* entre otros^{I98-201}. Este epitelio de la herida se engruesa (formando la capa epidérmica apical o AEC) y se cree que es el responsable de la expresión de factores esenciales para que la regeneración sea posible, por ejemplo algunas FGFs^{I96,202-207} (Ver Figura 8).

Durante el cerrado de la herida, hay una gran remodelación de la matriz extracelular mediada principalmente por la expresión de *MMP-2*, *MMP9*, *TIMM-2* y *TIMM-3* entre otros^{202,208-218}. En mamíferos mientras se lleva a cabo el cerrado de la herida, inician dos procesos que se ha postulado inhiben el proceso de regeneración al impedir el libre flujo de factores y células entre el mesénquima y la epidermis; por un lado, inicia la respuesta inflamatoria que conlleva a la formación de una cicatriz^{33,II5}; y, por otro, inicia el proceso de reconstitución

de la membrana basal que culminará en las 72 horas post herida²¹⁹⁻²²⁰ (Ver Figuras 9 y 10).

Formación del reservorio celular o blastema

Se ha sugerido que la formación de una cicatriz durante el cerrado de la herida es el resultado de un epitelio de herida no funcional, ya que este no mantiene a las células desdiferenciadas e indiferenciadas dentro del ciclo celular el tiempo suficiente para permitir la formación de un blastema, quizá por la incapacidad de recibir y mandar las señales adecuadas^{46,III,I95,2I2,22I} (Ver Figuras 9 y 10). En vez de eso, la diferenciación celular ocurre antes produciendo una cicatriz que impide la consolidación del blastema^{46,II5,I97,22I-223}. Es necesario que en las células del epitelio de herida se comiencen a sintetizar proteínas esenciales para el remodelamiento de la membrana basal y para el reclutamiento celular, por ejemplo, las metaloproteinasas promueven los procesos de desdiferenciación y de remodelamiento del tejido que ha quedado^{I52,I96,2I6}.

Posterior al cerrado de la herida se forman dos estructuras que promueven la regeneración de la extremidad: uno, el blastema que se forma entre el epitelio que cierra la herida y el tejido que queda y, dos, la AEC que se forma del epitelio que cubre la herida^{33,224-225} (Ver Figuras 8, 9 y 10). El blastema se ha considerado como un grupo heterogéneo de células que conservan información sobre su posición en la extremidad²²⁶; los orígenes celulares del blastema son tejidos o nichos cercanos a la herida (Ver Figura II). El blastema puede considerarse como una zona de crecimiento, similar al primordio de la extremidad en

desarrollo^{222,227-230} (Ver Figuras 5 y 8). En algunos casos las células del blastema son producto de un proceso de desdiferenciación de células adyacentes y adquieren un estado pluripotencial^{33,45,II7,231-234} (Ver Figura II).

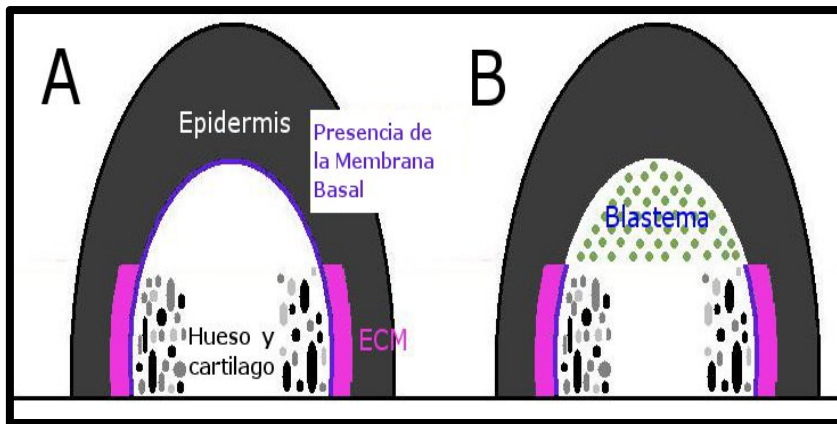


Figura 9. Modelo propuesto de la regeneración digital y la participación de la membrana basal. A) Modelo de la punta de un dedo que simplemente ha cerrado su herida tras una amputación; B) La punta del dedo ha iniciado el proceso de remodelación de la membrana basal lo que facilita la formación de un blastema. Modificado de referencia 212.

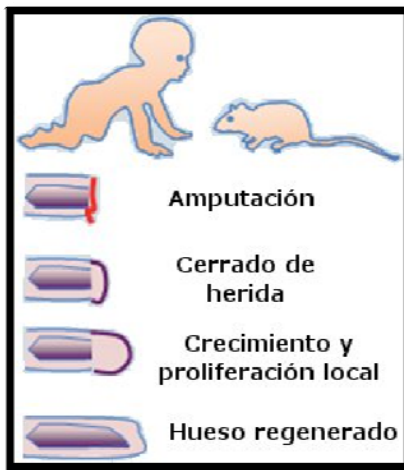


Figura 10. Regeneración de los dedos de mamíferos. Fases del proceso incompleto de regeneración digital en roedores y humanos. Modificado de referencia 150.

Se ha demostrado que en organismos con una alta capacidad regenerativa, el blastema recibe moléculas con capacidad mitogénica, principalmente de los nervios, de estos resaltan: Substancia P (SP)^{* 235-237} y ²³⁸⁻²³⁹, el factor de crecimiento de Glia (GGF)²⁴⁰ y factores de crecimiento de Fibroblastos (FGF)^{202,241-243}; también se ha propuesto que la AEC puede liberar moléculas mitogénicas²⁴⁴⁻²⁴⁵.

Sin embargo, al estudiar el estado pluripotencial de las células del

* El blastema recibe moléculas con capacidad mitogénica principalmente de neuropéptidos provenientes de los nervios; una dinámica similar se ha visto en el crecimiento de tumores (Referencia 238). Asimismo, se ha visto que en la médula espinal se expresan ciertos neuropéptidos en varias subpoblaciones neuronales; estas poblaciones inervaran a las extremidades (Referencia 239).

blastema todavía no se han logrado identificar satisfactoriamente cambios en la presencia de células troncales durante el proceso de regeneración; mientras Maki et al.²²⁴ han reportado que las extremidades en regeneración de salamandras expresan diferencialmente ciertos marcadores de células troncales pluripotentes principalmente durante el remodelamiento del muñón y la formación del blastema, en roedores, Rinkevich et al.¹²⁰, basados en los experimentos pioneros de Masaki e Ide⁵⁰, solo han logrado “inducir” la regeneración digital a través del trasplante de células mesenquimales troncales (estas células no estaban presentes ni se originaron durante el proceso regenerativo). Esto contrasta con los hallazgos de Li²²⁵ donde las células troncales pluripotentes son responsables de la regeneración de las astas de venados.

Participación de las células troncales en la regeneración de la extremidad

Aunque esté conservado en los organismos el uso de células troncales para reemplazar tejidos faltantes^{57,59}, aún no se sabe su función en el proceso natural de regeneración en vertebrados. Una pregunta común es si las células troncales se generan, a través de mecanismos de reprogramación natural, durante la respuesta al daño o si ya estaban presentes en estado quiescente en la zona de daño y solo son activadas. La misma pregunta puede realizarse sobre el estado desdiferenciado de las células. Aunque se ha propuesto que la regeneración ocurre por la presencia y activación de células troncales y la desdiferenciación de células

residentes, la existencia de células troncales quiescentes y de algún proceso de dediferenciación todavía no se ha comprobado satisfactoriamente (Ver **Figura II**). La pluripotencia de las células troncales puede evaluarse a través de diversas metodologías; una de ellas busca evaluar la expresión de ciertos factores de transcripción como *Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, *Klf4* y *c-Myc*.

Dentro de las características de las células troncales resaltan dos: la capacidad de autorenovarse y de diferenciarse. La tasa de renovación y el o los linajes posibles de diferenciación determinará la potencialidad de dichas células. Por ejemplo, una población de células troncales pluripotentes puede dar origen a células de las tres capas germinales, mientras que las células troncales mesenquimales (evaluadas a través de la expresión de las moléculas de superficie *CD-13*, *CD-73*, *CD-90* y *CD-105*), se ha descrito que solo serán capaces de originar

células de hueso, cartílago, músculo, tendones, tejido adiposo, tejido conectivo y hasta células nerviosas^{I24, I40-I41, I44-I46, 246-254}.

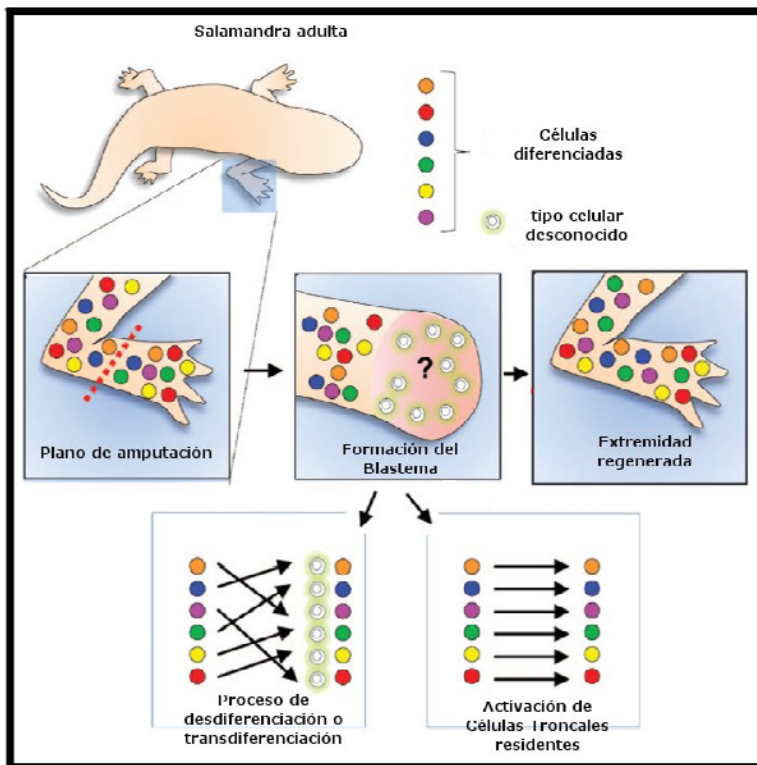


Figura II. Origen hipotético de las células del blastema. El blastema puede formarse por células dediferenciadas o transdiferenciadas (panel inferior izquierdo) o por la activación y reclutamiento de células troncales de nichos locales (panel inferior derecho). Modificado de referencia 255.

Participación del sistema nervioso periférico durante la regeneración de la extremidad

El patrón de innervación y vascularización de las extremidades, principalmente en el autópodo, hace difícil la recuperación de la extremidad ante un daño severo (amputación); el grosor de los nervios y vasos sanguíneos lo complica incluso más. Cuando un nervio es cortado, mientras que la parte distal es incapaz de volver a crecer y muere, la parte proximal regenera⁹⁰. Sin un ambiente adecuado, el nervio no crecerá de manera adecuada y su función (sensorial o motriz) estará comprometida²⁵⁶.

El muñón del nervio regenerante utilizará las claves que deja el nervio en degeneración²⁵⁶ lo que asegurara el crecimiento próximo-distal en la dirección y posición correcta. El proceso reparativo de los nervios toma, en mamíferos, unas semanas y cuando se ha iniciado los nervios, en el sistema nervioso periférico, crecerán a una tasa de 1 mm por día. Sin embargo, la recuperación de la sensación y movimiento de la extremidad tardará meses (en caso de que se recupere)^{17,80-81}. Los nervios digitales corren junto con las arterias a los lados de los dedos. Al menos en humanos, los nervios digitales son solamente sensoriales²⁵⁶, el efecto del daño a los nervios digitales es solo de adormecimiento ya que la función motriz está controlada por los tendones cuyos músculos son inervados proximalmente. En las puntas de los dedos los nervios se dividen y generan

ramificaciones; debido a su tamaño (las ramificaciones son delgadas) las ramas terminales no se reparan tras un daño²⁵⁶.

Se ha postulado que el patrón de inervación de la extremidad previo la amputación y durante la regeneración establecerá el éxito de la regeneración de la extremidad; sin embargo, la regeneración funcional de la extremidad regenerada solo ha sido estudiado de manera indirecta^{28,194}. Asimismo, la participación del sistema nervioso periférico en el proceso de regeneración de la extremidad en mamíferos^{156,221} ha sido insuficientemente estudiada. Mientras que en anfibios los nervios son necesarios para iniciar y mantener el proceso de regeneración²⁵⁷, en mamíferos el proceso parece ser independiente de nervios¹⁵⁶. Por ello, en mamíferos no se sabe si los nervios promoverían la regeneración de la extremidad al brindar señales que faciliten o potencien mecanismos celulares específicos (proliferación de las células en el blastema) o si la regeneración de la extremidad ayudaría a promover la regeneración axonal²²¹. A través de experimentos en organismos incapaces de regenerar extremidades (donde el proceso regenerativo no se activa tras una amputación) como las ranas adultas, ratas, lagartijas, pollos, monos y zarigüeyas²⁵⁸⁻²⁶⁷, se ha intentado inducir la regeneración al incrementar la densidad de fibras nerviosas o al transplantar tejido neural en la zona de amputación²⁶⁸. Dos son las conclusiones de estos trabajos: el proceso de regeneración se encuentra en estado latente y la poca densidad de inervación es capaz de explicar la incapacidad para regenerar las extremidades²⁶⁹⁻²⁷⁰. Asimismo, a la fecha nadie ha relacionado la regeneración axonal aberrante durante procesos

regenerativos de la extremidad en mamíferos y la deficiencia de estos para regenerar. Por estudios en conejos y observaciones en humanos, se ha establecido que los neuromas generan sensaciones de dolor e impiden el correcto proceso de regeneración axonal de la extremidad²⁷¹.

Regeneración en mamíferos

Regeneración total de apéndices en mamíferos

Dentro de los mamíferos con astas, solo los venados tienen la capacidad de regenerar cíclicamente dichos apéndices. De manera general, las astas se forman por cartílago y hueso (componente interno) y por piel, nervios y vasos sanguíneos (componente externo)²²⁵. El crecimiento, osificación y la consecuente pérdida de piel, nervios y vasos sanguíneos de las astas está relacionado con el ciclo reproductivo²⁷². El proceso cíclico de recambio de astas es parecido al proceso de regeneración de la extremidad, pues implica un proceso de cerrado de herida con reepitelialización y la formación de un blastema, quizá de células troncales provenientes del periosteo²⁷³ y de nichos cercanos, y depende de la regulación de factores y vías de señalización locales (por ejemplo, la señalización mediada por Ácido Retinoico y Wnt²⁷⁴⁻²⁷⁶) y del remodelamiento de la matriz extracelular que en conjunto evitan la formación de cicatrices²⁷⁶. De manera general, resaltan tres puntos del proceso de regeneración de astas: I) las células que participan durante la regeneración de las astas expresan marcadores clave de células

troncales pluripotentes (*Oct4*, *Nanog* y *Sox2*)²²⁵; 2) la regeneración de las astas precede a su inervación y depende de las rutas establecidas por los vasos sanguíneos²⁷⁷⁻²⁷⁸; y, 3) tras la axotomía de las astas, los venados muestran la formación de neuromas y conductas estereotípicas de dolor que han sido interpretadas como sensación de un miembro fantasma²⁷⁸.

Regeneración digital en mamíferos: particularidades

Algunos estudios han demostrado que en las extremidades de mamíferos solo las puntas de los dedos en la parte distal de la falange terminal y en edades perinatales pueden regenerar^{34,53-55,I20,I50,I57,279-283} (Ver **Figura I2**). Otros estudios que buscan evaluar el proceso de regeneración en condiciones en las que normalmente no regeneran han utilizado ratones adultos y amputado a distintos niveles^{46,50,53-55} (Ver **Figura I2**).

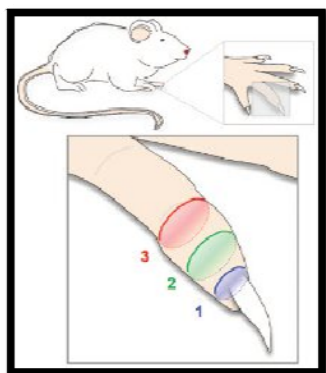


Figura I2. Nivel de amputación de los dígitos de ratón De manera esquemática se representan tres niveles de amputación digital: 1) nivel distal (la regeneración es completa), 2) nivel intermedio (la regeneración es parcial), y 3) nivel proximal (no se lleva a cabo algún proceso regenerativo). Modificado de referencias **I50** y **255**.

Aunque a finales del siglo XVII ya se tenía registro de la regeneración de dedos en humanos, fue hasta 1768 con los estudios en vertebrados de Spallanzani cuando la regeneración se convirtió en un paradigma para los científicos, ya que implicaba la posibilidad de que los nuevos conocimientos pudieran aplicarse a los humanos^{32,59,I03,284-286}.

Observaciones clínicas sugieren que la regeneración de extremidades en humanos está restringida a la parte distal de la falange terminal^{51,76,106}. Esto se debe a que se conserva parte de la matriz ungueal responsable de la expresión de genes que mantienen las células en estado indiferenciado^{44,221,280,287-289}. Por su parecido con la de los humanos, la capacidad regenerante de los dedos de ratones ha sido utilizada como modelo experimental para encontrar los mecanismos celulares y moleculares que se activan durante la regeneración digital²⁹⁰⁻²⁹¹. Estudios recientes han tratado de identificar marcadores de células troncales durante el proceso de regeneración, encontrando en algunos casos marcadores de células troncales mesenquimales^{120,157,279}. Otros estudios han utilizado ratones adultos y han evaluado distintos niveles de amputación (condiciones no regenerantes), examinando distintas técnicas para inducir la regeneración, por ejemplo, poniendo ectópicamente proteínas (BMP2, BMP4, BMP7 y bFGF-FGF2)^{48,113,283,292-293} o suministrando modificadores del estado de la cromatina (TSA o 5-aza-2'-deoxicitidina)^{46,50,294}.

Todavía falta por estudiar a profundidad los eventos morfológicos, celulares y moleculares esenciales para el inicio y consolidación de la regeneración de la extremidad, en particular los procesos del cerrado de la herida con la generación de la AEC y la formación del blastema con el reclutamiento de células. Aunque en fechas recientes se ha descrito la presencia de células troncales en la regeneración del dígito^{120,157,279}, aún queda la duda si estas células participan reemplazando el tejido faltante durante el proceso de

regeneración en la extremidad de mamíferos.

El proceso de regeneración de dígitos en ratones es diferente al proceso de regeneración de la extremidad en anfibios en tres aspectos: uno) en el tiempo del cerrado de herida y su relación con la formación de blastema; dos) en el origen celular del blastema; y, tres) en la cantidad de tejido que se puede regenerar; solo los dígitos de ratones que mantienen parte de la matriz ungueal son capaces de regenerar²⁷⁹.

De manera interesante, durante la escritura de esta tesis se publicaron varios trabajos, uno de ellos aporta información valiosa al tema^{47,221}. Takeo et al.²²¹ han recuperado la propuesta de Zhao y Neufeld^{292,295} y los estudios de Munoka et al.²⁸⁰ donde la la matriz ungueal es la responsable para la regeneración de la falange terminal^{51,287,296-297}. Takeo et al.²²¹ demostraron que la activación de Wnt en la matriz ungueal es necesaria para la regeneración del epitelio de la uña, su diferenciación y para la atracción de los nervios que promoverán el crecimiento del blastema (se ha demostrado que la señalización Wnt es capaz de promover y regular la regeneración de la extremidad en anfibios²⁹⁸⁻²⁹⁹). Del trabajo de Takeo et al.²²¹, es importante resaltar que el 90% de las células del blastema tienen un compromiso celular hacia osteoblastos; estas células mesenquimales comprometidas a la regeneración ósea (particularmente de la falange terminal) reciben, a través de los nervios que reinervan al epitelio de la uña -matriz ungueal-, factores mitogénicos (FGF2). De su estudio puede concluirse que la función de los nervios difiere de otros modelos de regeneración de extremidad^{117,132,134-135,300-301}.

J u s t i f i c a c i ó n

De acuerdo con el Consejo Nacional para las Personas con Discapacidad (Conadis), cada mes en México se realizan 780 mil amputaciones que van desde el dedo meñique hasta la extremidad completa. El 50% de los casos está relacionado con problemas de salud, 30% con accidentes automovilísticos y 20% con malformaciones congénitas o de nacimiento.

Del elevado número de personas amputadas, solo algunas son candidatas a la reimplantación, al uso de prótesis o al uso de aparatos que les permitiría recobrar la función que la extremidad desempeñaba. Las limitaciones de estos tratamientos han llevado a buscar terapias alternativas, entre ellas sobresalen la terapia celular y la ingeniería de tejidos. Sin embargo, el reto sigue siendo grande. En la actualidad estas aproximaciones se han concentrado en estudios en roedores particularmente en el estudio del potencial de las células troncales para promover e inducir el proceso de regeneración de la extremidad. Todavía queda la interrogante si esta extremidad regenerada sería funcional. Asimismo, hasta ahora solo se han logrado entender algunos de los mecanismos celulares y moleculares que subyacen a la regeneración de dígitos en roedores.

Debido a que las señales moleculares que se activan durante el proceso regenerativo parecieran estar conservadas en los organismos y que dichas señales hacen que las células cercanas a la herida regresen a un estado similar al de células troncales, el propósito de la presente tesis es buscar durante el proceso

de regeneración digital en ratones evidencia experimental que indique la posible presencia de células troncales en el frente de regeneración.

En este contexto, pueden plantearse algunas preguntas sobre el proceso de regeneración de extremidades de mamíferos principalmente sobre la dinámica de expresión de genes que regulan las actividades celulares y sobre los eventos que se han modificado inhibiendo el proceso de regeneración. El interés ha recaído en determinar si células troncales pluripotentes o mesenquimales troncales participan en este proceso. La presente tesis pretende aportar evidencia que muestre la presencia de marcadores de células troncales pluripotentes y mesenquimales troncales durante la regeneración del dígito de ratón.

Al mismo tiempo, debido a las diferencias en la participación del sistema nervioso periférico durante la regeneración de la extremidad entre organismos capaces e incapaces de regenerar extremidades completas y debido a la activación de procesos de regeneración axonal aberrante en mamíferos, la presente tesis busca correlacionar la presencia de marcadores de células troncales con los patrones de reinervación durante la regeneración de dígitos de ratón.

H i p ó t e s i s

Las diferencias en la capacidad regenerativa de los dígitos de ratón entre la condición regenerante y la no regenerante pueden explicarse por la expresión diferencial de marcadores de células troncales pluripotentes y troncales mesenquimales durante las fases de cerrado de herida y formación del blastema. La correcta formación del blastema donde se expresen estos marcadores de células troncales podría favorecer la adecuada regeneración axonal del dígito y de esta manera promover su regeneración funcional.

O b j e t i v o s

Identificar cambios en los genes marcadores de células troncales pluripotentes y mesenquimales troncales durante la regeneración de dígitos de ratón, en particular durante el proceso de cerrado de herida y formación del blastema. Relacionar los cambios en la expresión de genes con cambios en la morfología y en los patrones de innervación y proliferación, durante el proceso de regeneración digital entre las condiciones regenerante y no regenerante.

Objetivos particulares

1. Determinar a través de una secuencia temporal los días postnatales a los que un ratón puede regenerar tras la amputación de la última falange del dígito.
2. Describir por histología mediante una tinción tricrómica de Masson, los cambios morfológicos que acontecen durante el cerrado de herida y la formación del blastema en el proceso de regeneración de dígitos en ratones cuando han sido amputados en diferentes condiciones: a) donde se sabe si regeneran, y; b) donde la regeneración no se lleva a cabo.
3. Describir por RT-PCR, la presencia y posibles cambios en la expresión de genes marcadores de células troncales pluripotentes (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc* y *Nanog*) y mesenquimales troncales (*CD13-Aminopeptidasa*, *CD73-Nucleotidasa*, *CD90-Thy-I*, y *CD105-Endoglina*) durante el cerrado de herida y la formación del blastema en el proceso de regeneración de dígitos en ratones.
4. Describir por inmunohistoquímicas el patrón de proliferación e inervación tras la amputación digital a través de la inmunodetección de los anticuerpos: Ki67* ³⁰², PGP 9.5** ³⁰³⁻³⁰⁵, tubulina acetilada y Substancia P.

* Existen diversas formas para detectar células en proliferación. Entre estas están la incorporación de Brdu y la inmunodetección de células positivas a los anticuerpos PCNA y Ki67. En estudios sobre la dinámica de proliferación de la epidermis se ha descrito que el uso del anticuerpo Ki67 es más sensible. (Referencia 302)

** La inmunodetección de células positivas a PGP 9.5 se ha utilizado para detectar los patrones de inervación motriz y sensorial en diversos órganos internos y en apéndices de la piel. La ventaja sobre otros anticuerpos es que permite localizar las terminales axonales y que se ha utilizado durante el proceso de regeneración axonal. (Referencia 303-305)

M a t e r i a l e s y M é t o d o s

Animales

Para llevar a cabo los objetivos descritos, en el proyecto se utilizaron ratones de la cepa CDI, provenientes de la colonia del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM). Los animales se mantuvieron en cuartos con temperatura e iluminación controladas (I2 hrs luz/I2 hrs obscuridad) y tuvieron acceso a agua y comida *ad libitum*. El número de crías por caja se mantuvo en 8. Los procedimientos experimentales fueron aprobados por la Comisión para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto. Todos los experimentos se diseñaron para usar el menor número de animales y aminorar su posible sufrimiento.

Obtención y preparación de las muestras

Para hacer los diferentes experimentos de esta tesis se determinó, después de realizar algunos experimentos piloto, utilizar ratones de las edades postnatales 3, II y I3 días postnatales (dpn) (Ver **Figura I3** y **I4**). En los experimentos piloto se utilizaron ratones de 3, 5, 7, 9, II, I3, I9, 20 y 50 dpn.

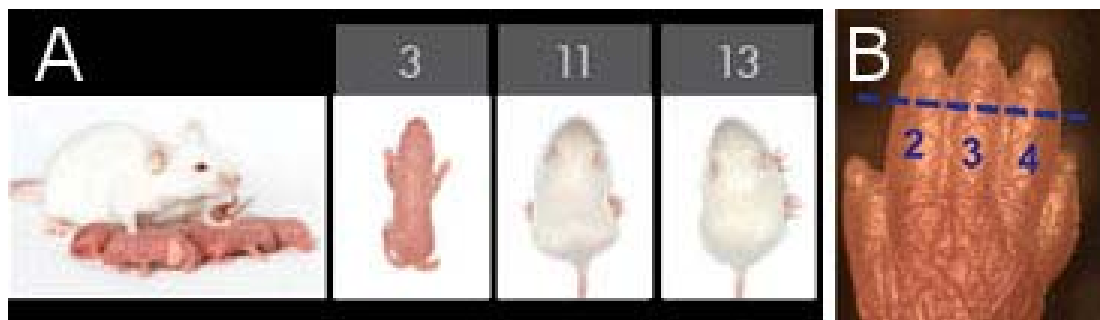


Figura I3. Edad de amputación y dedos amputados. (←) A) Se muestran las edades postnatales en días (3, II y I3 dpn) a las que se realizaron las amputaciones y cuyos experimentos están reportados en esta tesis. B) Se muestran los dedos (2, 3 y 4) de la extremidad posterior que se amputaron para la realización

se realizaron las amputaciones y cuyos experimentos están reportados en esta tesis. B) Se muestran los dedos (2, 3 y 4) de la extremidad posterior que se amputaron para la realización

de esta tesis. A) Modificado de la Tabla de edades de **The Jackson Laboratory** cepa CDI. B) Modificado de referencia 47.

De manera general, para la caracterización del proceso de regeneración se utilizaron ratones de II y I3 días postnatales y para la caracterización de las fases de cerrado de herida y de formación del blastema se utilizaron ratones de 3 días postnatales. Las amputaciones se realizaron de acuerdo a los diferentes puntos de la **Figura I5**.

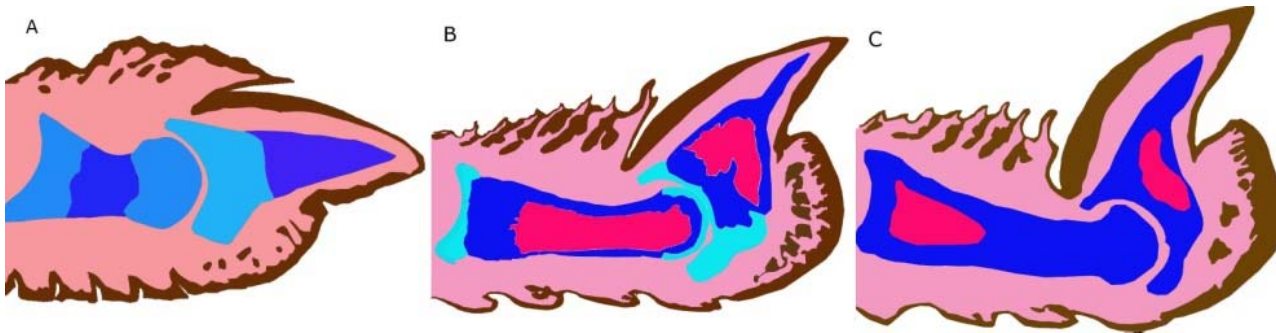


Figura I4. Modelo de la estructura anatómica de los dedos en las edades evaluadas. A) 1era semana postnatal (I-7 dpn), B) 3era semana (2I dpn) y C) 7ma semana (49 dpn). En color café se representa la epidermis y algunos de sus apéndices como folículos pilosos y glándulas, en rosa la dermis, en fiusha la médula ósea y en azul las falanges intermedia y terminal; en el tono de azul más claro se muestra la zona de crecimiento.

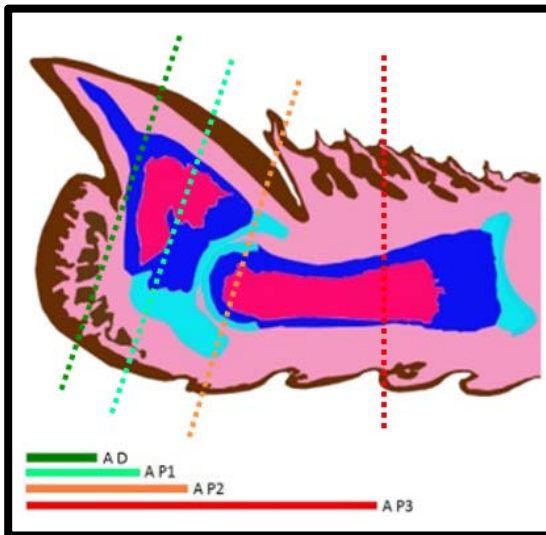


Figura I5. Modelo digital comparativo y tabla que muestran en el dígito los niveles de amputación donde la capacidad regenerativa está conservada y donde se pierde. Se muestra en diferentes colores los tejidos. En la tabla se explican los diferentes niveles de amputación y la nomenclatura. Modificado de referencia 306.

Tipo de amputación	Nivel de amputación	Referencia	
A D	Amputación Distal	Amputación del 30-40% de la falange terminal	Han et al 2008
A P1	Amputación Proximal nivel 1	Amputación del 50% de la falange terminal	Han et al 2008
A P2	Amputación Proximal nivel 2	Amputación donde solo queda el 30% de la falange terminal	Neufeld y Zhao 1995
A P3	Amputación Proximal nivel 3	Amputación del 50% de la falange intermedia	Wang et al 2010

Para la presente tesis se utilizaron solo los dedos 2, 3 y 4 ya que se encontraron dinámicas de desarrollo y de regeneración similares^{47,279-280,307}. De manera general, las amputaciones distales se realizaron dentro del 30-40% de la falange terminal (línea punteada en azul turquesa) y las proximales donde inicia el lecho ungueal (línea punteada en naranja) (Ver **Figura I5**). Específicamente, la amputación distal (A D) se basó en el trabajo de Han et al.²⁸⁰, la amputación proximal del 50% de la falange distal (A PI) en el trabajo de Han et al.²⁸⁰, la amputación proximal donde solo queda aproximadamente el 30% de la falange terminal (A P2) se basó en el trabajo de Neufeld y Zhao²⁸⁹, y la amputación proximal a la mitad de la falange intermedia (A P3) se basó en el trabajo de Wang et al.⁴⁶ (Ver **Figura I5**). Tras realizar la amputación en diferentes días postnatales (3, II y I3 días postnatales) se tomaron y analizaron las fotografías del dígito amputado; dichas fotografías fueron tomadas en distintos días postamputación (0, I, 2, 3, 4, 5, IO, I5, 20, 25, 30 y 35 días postamputación -dpa-). Después de 35 días de la amputación (tiempo aproximado que dura el proceso regenerativo), se fijó y preservó el tejido regenerado para su posterior procesamiento morfológico e inmunohistoquímico. Asimismo, se colectó la zona más distal del dígito amputado -basado en referencias¹⁵⁷ y ²²²- (Ver **Figura I7**) para su procesamiento molecular (RNA, cDNA y RT-PCR) buscando marcadores de células troncales pluripotentes y mesenquimales troncales. Para la recolección del tejido se colectaron el área propuesta de blastema de los dígitos amputados en una secuencia temporal determinada (dpa 0, I, 2, 3, 4, 5, IO) (Ver **Figura I7**).

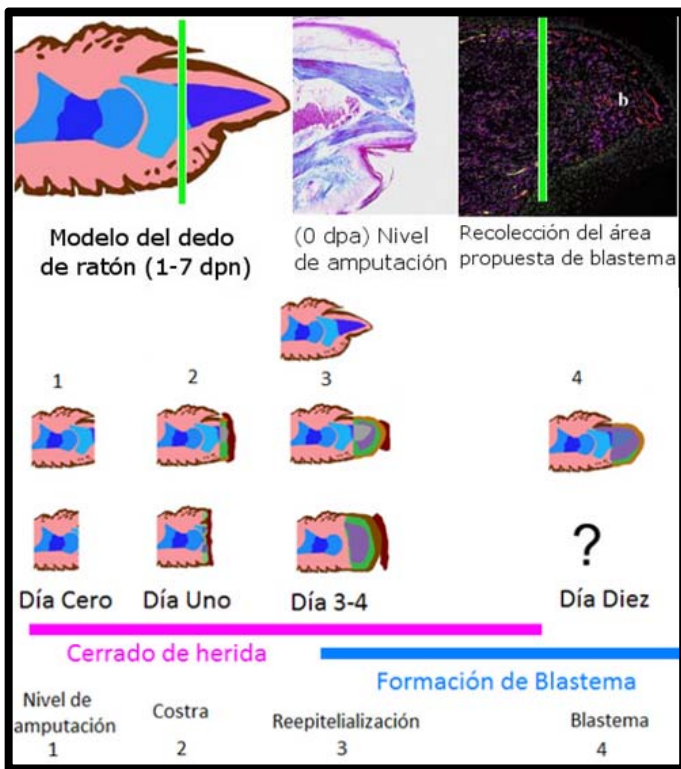


Figura I6. Área propuesta de blastema. Se colectó la zona más distal del dígito amputado, (b) blastema presuntivo, en distintos días después de la amputación. Modificado de referencia I57. Abajo) **Esquema de recolección de tejido de los dígitos durante el proceso de regeneración en las condiciones regenerante (amputación distal) y no regenerante (amputación proximal).** Los números I-4 representan cuatro de las características más sobresalientes durante las fases de regeneración evaluadas.

Los animales de edad postnatal 3, II y I3 fueron anestesiados mediante la técnica de hipotermia³⁰⁸. Esto significa que de manera individual los ratones fueron colocados en un cama de hielo molido de uno a cinco minutos; al retirarse del hielo inmediatamente se amputaron los dígitos con microtijeras bajo un microscopio estereoscópico. Tras la amputación los animales fueron regresados a su caja después de comprobar su recuperación del proceso de anestesia. El comportamiento de la madre fue observado para vigilar la aceptación de las crías. Para la adquisición de las fotografías también se utilizó la técnica de anestesia por hipotermia y los ratones fueron sacrificados después de la última adquisición de las fotos en el día 35 postamputación; en el caso de la recolección de los blastemas el procedimiento no implicaba el sacrificio de los animales, por lo que se donaron a otro bioterio para que formaran una colonia CDI. En el caso de los

ratones de 3 días postnatales, los animales fueron sacrificados para recolectar tejido los días postnatales 3, 4, 5, 6, 7, 8 y I3 correspondientes a los días postamputación 0 (control-ctl-), I, 2, 3, 4, 5 y I0 por asfixia con CO₂. Los animales fueron agrupados en tres grupos: grupo I Control de Amputación (dpa 0); grupo 2 Cerrado de herida (dpa I-5); y, grupo 3 Formación del Blastema (dpa I0) y en tres condiciones: Desarrollo de extremidad, Condición regenerante o amputación distal, y Condición no regenerante o amputación proximal.

Tras su recolección, el tejido se fijó por inmersión (volumen de al menos I:20) con 4% paraformaldehído disuelto en amortiguador salino de fosfatos (PBS; 4% PFA) pH 7.4 en viales a 4°C por I-5 días (dependiendo el tamaño de la extremidad). Los dígitos de las extremidades fueron procesamiento individualmente. Después del proceso de descalcificación con Descalcifier II (Surgipath, Richmond) que puede variar de I-5 días dependiendo el tamaño de la extremidad, se postfijó con el buffer neutro de formalina I0% pH 7 por I-3 días y se procesó la muestra para su deshidratación con un tren ascendente de Metanol (PBT (PBS + Tween 20 0.1%), MeOH 25%/PBT 75%, MeOH 40%/PBT 60%, MeOH 50%/PBT 50%, MeOH 75%/PBT 25%, MeOH 80%/PBT 20%, MeOH 85%/PBT I5%, MeOH 90%/PBT I0%, MeOH 95%/PBT 5% y MeOH Abs (2 veces) por una hora cada uno). Tras su deshidratación, las muestras fueron separadas según su condición experimental y almacenadas en un ultracongelador a -74°C hasta efectuar los experimentos morfológicos.

Después de su almacenaje en el ultracongelador, las muestras fueron fotografiadas para ver el fenotipo final con un microscopio estereoscópico (Nikon

SMZI500) acoplado a una cámara (AxioCam MSc Zeiss) con el programa (AxioVision 4.3, Carl Zeiss Vision). Posteriormente las muestras se procesaron para inclusión en parafina (Parablast embedding media, Sigma). Después de dejar que la parafina se solidificara en los cassettes, 1-2 días a temperatura ambiente, se realizaron cortes seriados en el eje dorso-ventral del dígito de 7 µm de espesor, con un micrótopo a temperatura ambiente. Los cortes se colocaron en portaobjetos previamente tratados con TESPA 4% (3-aminopropyl-triethoxysilane, Sigma) y se dejaron en la plancha de estiramiento (Leica HI I220) toda la noche a 42° C. Tras su estiramiento las laminillas se almacenaron a 4°C.

Antes de su procesamiento el tejido se desparafinó y rehidrató poniendo las laminillas en la plancha de estiramiento por 30-60 mins a 55°C, las laminillas en una caja coplin donde se lavaron por inmersión en Xilol 10 mins 2 veces, y en EtOH Abs, EtOH 96%/H₂O bd, EtOH 90%/H₂O bd, EtOH 85%/H₂O bd, EtOH 70%/H₂O bd, EtOH 50%/H₂O bd, EtOH 25%/H₂O bd y H₂O MilliQ cada uno por 5 minutos.

Tinciones histológicas

Tinción tricrómica de Masson

Para realizar la tinción tricrómica de Masson, se utilizaron las siguientes soluciones: hematoxilina de Weigert, fuscina ácida-escarlata de Biebrich, solución de ácido fosfotungsténico-fosfomolibdico, solución azul de anilina y solución de ácido acético 1%. En el tejido, en negro se detectaron los núcleos celulares, en rojo se identificó el fondo (keratina, músculo y citoplasma) y en azul se detectó las fibras de colágeno.

Inmunohistoquímicas

Tras su rehidratación, las laminillas se lavaron dos veces (5 minutos cada vez) en una caja coplin con PBS. Para permeabilizar el tejido se lavaron las laminillas 15 minutos con PBS con tritón X-100 al 3% (PBS+T). A continuación, las laminillas se incubaron en una solución desenmascaradora de antígenos a 70°C por 45 minutos y a temperatura ambiente por 15 minutos (Immuno/DNAretriever; Bio SB, EE. UU.). Después de lavar tres veces con PBS, el tejido se bloqueó con una solución de suero de caballo o de cabra al 5% (en PBS+T) por 1 hora. Tras el bloqueo, las laminillas se dejaron incubando toda la noche a temperatura ambiente con alguno de los siguientes anticuerpos: Conejo α -PGP 9.5 (I:1,000; Chemicon), Rata α -Ki67 (I:400; Chemicon), Ratón α -Acetylated Tubulin (I:250; Sigma) o Conejo α -Substance P (I:850; Chemicon). Los anticuerpos se diluyeron en la solución de bloqueo. Tras tres lavados con PBS, las laminillas se incubaron por dos horas con alguno de los anticuerpos secundarios biotinilados: Burro α -Conejo, Cabra α -Rata o Burro α -Ratón (I:500; Chemicon). Concluido el tiempo, las laminillas se lavaron tres veces por 5 minutos con PBS. Finalmente, se incubó con el complejo avidina-biotina (ABC kit Vector Laboratories, EE. UU.) por 90 minutos a una dilución de I:400. El revelado de la inmunohistoquímica fue obtenido con una solución de 3,3-diaminobencidina (DAB) y níquel (Vector Laboratories). Después de lavarlas con H₂O bd, los cortes fueron contrateñidos con Verde de Metilo o Eosina Y, deshidratados y montados con resina.

RT-PCR

Para la obtención del RNA se siguió el protocolo del TRizol Reagent (Molecular Research Center). Comprobada la integridad del RNA, se realizó el cDNA de las muestras de interés siguiendo el protocolo del kit First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA). Tras la obtención de los cDNAs se realizaron las reacciones de RT-PCR siguiendo las recomendaciones del fabricante (Roche Diagnostics) utilizando Ipl de la enzima Taq DNA Polimrase (Invitrogen). Las reacciones se realizaron a Tm (temperatura media) determinadas y utilizando los primers sentido y antisentido que fueron diseñados por la M. en C. Marcia Bustamante Zepeda en el laboratorio del Dr. Jesús Chimal como se muestra en la **Tabla 2**. Para realizar la reacción de RT-PCR se utilizó el termociclador PTC-I00 Programmable Thermal Controller (MS Research) y se siguieron las recomendaciones de Roche. Los geles de agarosa 1% se corrieron a 80 V, 400 mA por 50 minutos en una cámara de electroforesis Bio-Rad Power Pac 300.

Tabla 2. Primers utilizados para detectar la expresión de marcadores de células troncales pluripotentes y troncales mesenquimales; (bp) pares de bases y (Tm) temperatura media.

SCs	Gene	Tm	Peso	MSCs	Gene	Tm	Peso
	Oct 4.	63.7°	414 pb		CD-13	60.5°	600 pb
Primer F	tggtcagccagaccaccatc			Primer F	acctggccagtgctaaaatg		
Primer R	ggggcagaggaaaggataca			Primer R	caatgctgatgatggtggag		
	Sox2	63.2°	406 pb		CD-73	60.5°	448 pb
Primer F	aaaaaccaccaatcccatcc			Primer F	caactgtctgtttttggatg		
Primer R	aaaccagcaagaacccttt			Primer R	gcacttctttggaaggtgga		
	Nanog	58°	412 pb		CD-90	61.3°	406 pb
Primer F	tatctggtgaacgcactctgg			Primer F	taaggggcgtatggtggtag		
Primer R	aaggaaggaacctggctttg			Primer R	gcaggctcgtgttttagagg		
	Klf-4	60.1°	410 pb		CD-105	62.4°	437 pb
Primer F	ggggttttggtttgaggttt			Primer F	accctgccttcatctgtgt		
Primer R	gtcgttgaactcctcgtct			Primer R	aacgtcacctcacccttgt		
	c-Myc	60.1°	567 pb				
Primer F	atctgcgacgaggaagagaa						
Primer R	ggacgaggtacaggatttgg						

Adquisición de fotografías y análisis del tejido

Las fotografías de los animales anestesiados y de los dedos completos se adquirieron para analizar el fenotipo final con un microscopio estereoscópico (Nikon SMZI500) acoplado a una cámara (AxioCam MSc Zeiss) con el programa AxioVision 4.3 (Carl Zeiss Vision). Tras las diversas técnicas de histológicas o inmunohistoquímicas, las laminillas se observaron en un microscopio Olympus BX5I WI (Tokio, Japan) con el programa StereoInvestigator 9 (MBFBioscience, EE.UU) para ver en campo claro los tejidos procesados con los objetivos 4X, 10X, 20X y 40X y una platina motorizada en los ejes X-Y-Z. Se realizó la captura de imágenes pertinentes y se armaron las composiciones en el programa Adobe Photoshop CS5. Las fotografías de los geles de agarosa se tomaron con una cámara Kodak EDAS 200 acoplada a un transiluminador Sigma TI20I y se procesaron con el software Kodak ID v.3.5.4 (Scientific Imaging Systems, New Haven USA).

Tabla 3. Resumen de uso de dígitos por condición experimental.

Piloto*	3	5	7	9	11	13	15	19	20	50
AD-AP1 (Condición regenerante)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
AP2 (Condición no regenerante)	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Control de desarrollo	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Caracterización **		
Dpn11	AD	9
	AP1	4
	AP2	4
	AP3	8
Dpn13	AD	4
	AP2	4

Histologías***		Dpa 0	Dpa 7	Dpa 15	Dpa 25	Dpa 35
Dpn11	AD	3	3	3	3	3
	Control	3	3	3	3	3

Caracterización CH y FB****		DPN 3	DPN 4	DPN 5	DPN 6	DPN 7	DPN 8	DPN 13
		DPA 0	DPA 1	DPA 2	DPA 3	DPA 4	DPA 5	DPA 10
Dpn3	AD	3	3	3	3	3	3	3
	AP2	3	3	3	3	3	3	nd
	CTL	3	3	3	3	3	3	3

PCR*****		DPN 3	DPN 4	DPN 5	DPN 6	DPN 7	DPN 8	DPN 13
		DPA 0	DPA 1	DPA 2	DPA 3	DPA 4	DPA 5	DPA 10
AD (Condición regenerante)		9	9	9	9	9	9	9
AP2 (Condición no regenerante)		9	9	9	9	9	9	9
Control de desarrollo		9	9	9	9	9	9	9

Piloto*

Se colectaron los dígitos en proceso regenerativo (cinco dígitos por condición) del día 0 postamputación (CTL) hasta el día quince postamputación.

Caracterización**

Se hizo un seguimiento fotográfico de los animales amputados hasta 35 días después de la amputación.

Histologías***

Se caracterizó todo el proceso regenerativo digital.

Caracterización CH y FB****

Se caracterizó el proceso regenerativo digital, particularmente el cerrado de la herida y el proceso de formación de blastema utilizando técnicas histológicas e inmunohistoquímicas.

PCR*****

Se caracterizó el proceso regenerativo digital, particularmente el cerrado de la herida y el proceso de formación de blastema evaluando la expresión diferencial de genes. Los experimentos se hicieron de un pool de 9 dedos

R e s u l t a d o s

La capacidad regenerativa de los dedos depende de la edad y del nivel de amputación.

Primero se determinó la edad límite para la regeneración digital; posteriormente se determinó el nivel de amputación límite para la regeneración. Se determinó a través de amputaciones en la parte distal de la falange terminal la edad (en días postnatales) en la cual el dígito es capaz de regenerar (Ver **Figura I4**). Se hicieron amputaciones piloto los días postnatales 3, 5, 7, 9, II, I3, I5, I9, 20 y 50 y se determinó que se utilizarían para realizar esta tesis los animales de los días 3, II y I3 (Ver **Figuras I3 y I4**). Se encontró que los animales amputados el día I5 postnatal fueron capaces de regenerar sin ningún problema, mientras que edades posteriores presentaron deficiencias en la regeneración.

Asimismo, se determinaron los niveles de amputación en el eje próximo-distal donde el dígito fuera capaz de regenerar. Se encontró que en amputaciones distales (A D) y en las proximales I (A PI) el dígito era capaz de regenerar (Ver **Figura I5**); se decidió considerar a los dígitos que habían sido amputados a nivel (A D) como regenerantes ya que las amputaciones realizadas a nivel (A PI) mostraban deficiencias en la regeneración de la falange terminal. En cuanto a las amputaciones proximales 2 y 3 (A P2 y A P3) no se encontró ninguna capacidad regenerativa. Se utilizó como condición no regenerante las amputaciones realizadas en el nivel proximal 2 (A P2) (Ver **Figura I5**).

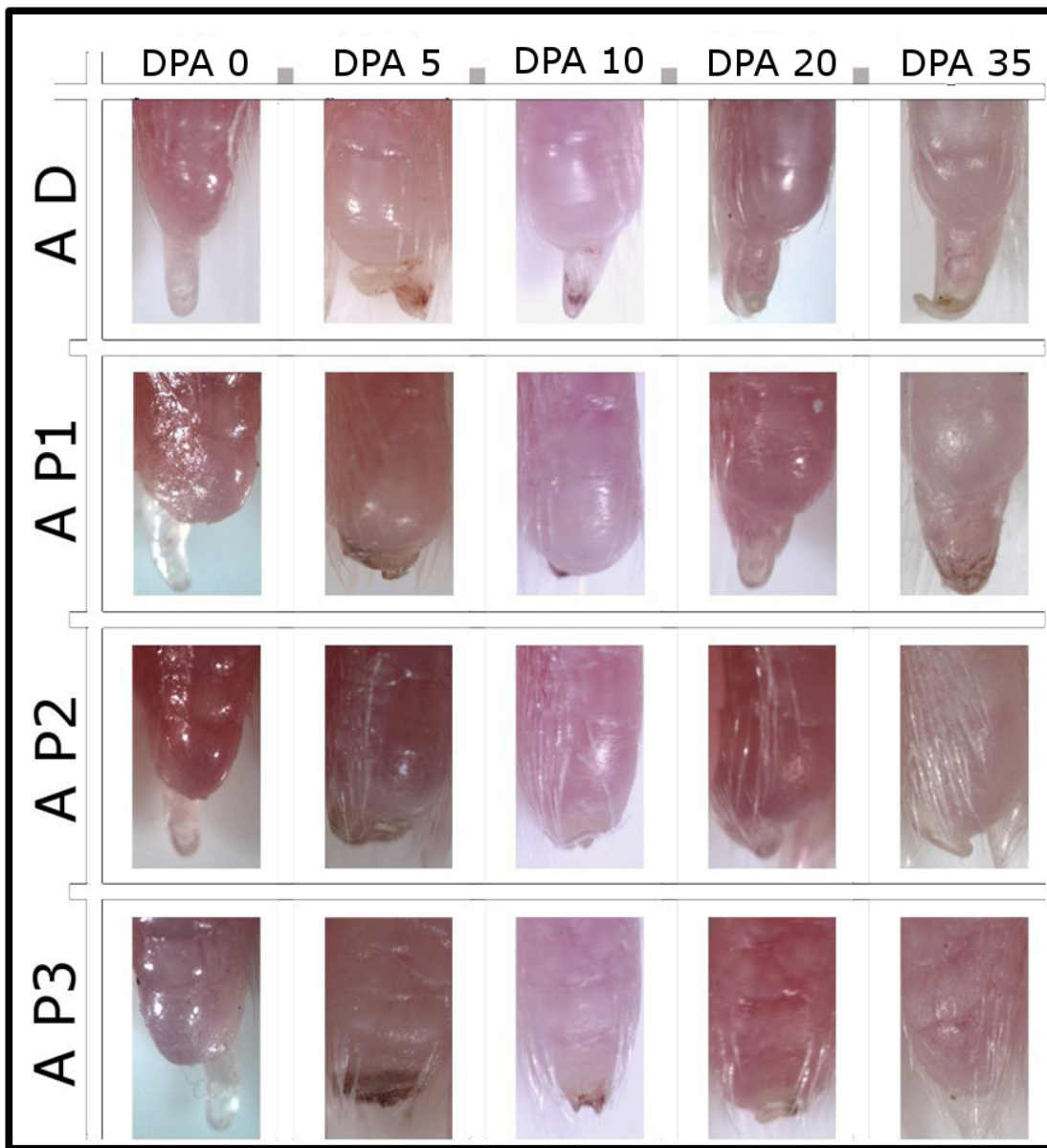


Figura I7. El incremento en el nivel de amputación digital dificulta la regeneración de la falange terminal. Evaluación del proceso de regeneración digital cuando la amputación se realiza en cuatro niveles diferentes (Ver Figura I5). El seguimiento del proceso se realizó durante 35 días después de la amputación. Los renglones representan los cuatro niveles de amputación y las columnas los días postamputación. Las fotografías reflejan casos representativos de (A D) n=9/9, (A P1) n=3/4, (A P2) n=3/4, y (A P3) n=8/8.

Conforme se incrementa el nivel de amputación digital a lo largo del eje próximo-distal, la capacidad de regeneración de la falange terminal disminuye llegando incluso a ser nula (Ver Figura I7 renglones A D, A P1, A P2 y A P3). El hueso es el tejido que más se ve afectado por el nivel de amputación, perdiéndose

totalmente su capacidad regenerativa en amputaciones proximales (A P2 y A P3). Del mismo modo, conforme el nivel de amputación digital es más proximal, la capacidad regenerativa de la uña se pierde, procesos regenerativos intermedios producen grados variables de deformidad (niveles A PI y A P2 en los DPA20 y DPA35); aunque la reepitelialización se acelera en amputaciones digitales proximales, la costra que se genera por arriba del epitelio de herida se mantiene más tiempo (A P3 en los DPA5, DPA10 y DPA20). Por otra parte, los folículos pilosos mantienen su capacidad regenerativa independientemente del nivel de amputación(A P3 en DPA35).

De acuerdo a lo establecido por anteriormente, el proceso de cerrado de herida empieza justo después de la amputación y hasta el día 8 post-amputación. Si se toma en cuenta la formación de una costra como indicador de cerrado de herida, puede verse que entre más proximal sea la amputación (A P3) más tiempo dura la costra (Ver **Figura I7**). Asimismo, se ha propuesto que el proceso de formación del blastema comienza a partir del cuarto día post-amputación y dura hasta el día 20, sin embargo, con excepción de los dígitos de los niveles A D y A PI en el día 20 postamputación y el dígito del nivel A P3 el día 10 postamputación, no pudo observarse el crecimiento de alguna protuberancia en la región distal de daño que semejara a un blastema. Se encontró para todos los niveles de amputación evaluados que para el día 35 postamputación el proceso de regeneración o de simple cerrado de herida había concluido. Los datos obtenidos

en animales amputados el día I3 postnatal son similares a los obtenidos en animales amputados el día II postnatal por lo que no se incluyeron.

Durante el proceso de regeneración, en la falange terminal se lleva a cabo un proceso de osificación directa y un proceso transitorio de inflamación.

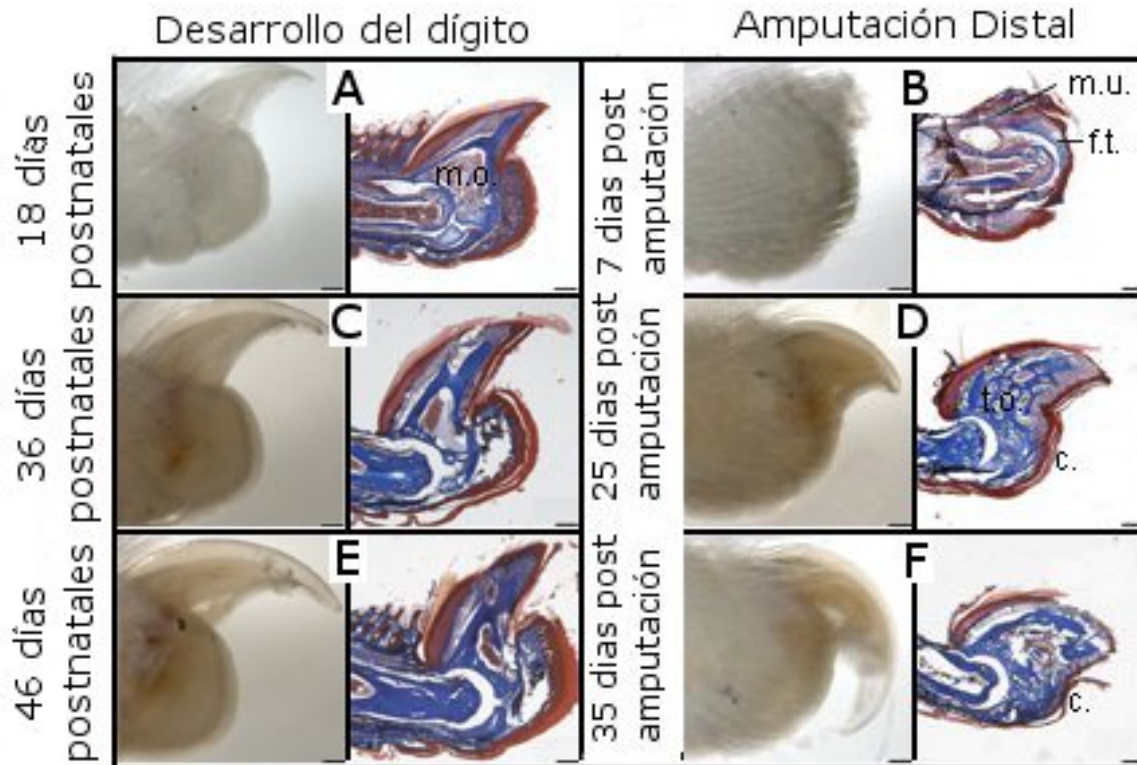


Figura I8. Procesos de osificación directa y de inflamación durante la regeneración de la falange terminal. A, C y E) Desarrollo normal del dígito a los I8, 36 y 46 días postnatales. B, D y F) Proceso regenerativo tras una amputación realizada a nivel proximal I (A PI) en el día II postnatal a los días 7 días postamputación (I8 postnatales), 25 días postamputación (36 postnatales) y 35 postamputación (46 postnatales). A-F) En cada panel, el lado izquierdo muestra fotografías macroscópicas de los dígitos controles o regenerantes y en el lado derecho se muestran mediante la tinción tricrómica de Masson los tejidos del dígito en un corte dorso-ventral. (f.t.) falange terminal, (m.u.) matriz ungueal, (m.o.) médula ósea, (t.o.) tejido óseo (c.) cojinete.

La regeneración de dígitos de ratón se lleva a cabo a través de proceso de osificación directa en la parte distal de la falange terminal; este proceso es evidenciado en la **Figura I8** (paneles D y F). Debido a que se observó que desde

las fases de cerrado de herida durante la regeneración de amputaciones proximales (Ver **Figura I7** renglones A P2 y A P3) se inhibía el proceso regenerativo, se evaluaron los procesos de regeneración digital en amputaciones distales (Ver **Figuras I5 y I7** renglones A D y A PI). Se observó que los dígitos de ratón en la zona de amputación (Ver **Figura I8** panel B) tienen folículos cercanos a la matriz ungueal (m.u.), pericondrio por encima de la falange intermedia (f.m.), cojinetes (c.) por debajo de la falange terminal (f.t.) que contiene glándulas y una uña (u.) que cubre la falange terminal. Se ha demostrado, a excepción del hueso y la uña, que los tejidos del dígito son fuentes probables de células troncales, quedando la duda de si estos tejidos participan en la regeneración digital. A diferencia del dígito control (Ver **Figura I8** panel A), el dígito regenerante (Ver **Figura I8** panel B) se ve ligeramente inflamado. A los siete días postamputación la falange terminal casi ha desaparecido y no hay médula ósea (m.o.), pero al menos la mitad de la matriz ungueal se mantiene. La reepitelialización o cerrado de herida ha concluido y ya no hay costra (Ver **Figura I8** panel B). La regeneración de la falange terminal implica que la parte más distal inicia un proceso de osificación directa (Ver **Figura I8** panel B, D y F). Debido a este proceso de osificación, durante la regeneración del dígito, la médula ósea se transforma en tejido óseo (Ver **Figura I8** paneles C y E). Se ha sugerido que la regeneración se debe a la existencia de células troncales presentes en la región ungueal por su cercanía con la falange terminal (Ver **Figura I8** paneles B, D y F), sin embargo, de acuerdo con los resultados obtenidos previamente (Ver **Figura I7**)

la presencia de la matriz ungueal podría influir en la capacidad regenerativa digital; ello no descarta una combinación de variables donde la presencia de la matriz ungueal desempeñe una función necesaria mas no suficiente para que la regeneración digital se lleve a cabo; si la matriz ungueal sirve de fuente celular para la regeneración aún falta por estudiarse. Cabe recalcar que la cantidad de tejido perdido repercutirá en el proceso de regeneración principalmente en la forma del dígito regenerante y en la regeneración de estructuras como folículos, uña y cojinetes (Ver **Figura I8** paneles E y F).

El reclutamiento celular en el frente de regeneración no es suficiente para que se forme un blastema debido a la continuidad de la membrana basal y al engrosamiento no funcional del epitelio de herida.

Se evaluaron los procesos de reepitelialización y de formación de blastema del dígito de ratón en animales amputados AD-A PI (Ver **Figura I5**) el día II post-natal (Ver **Figuras I9 y 20**).

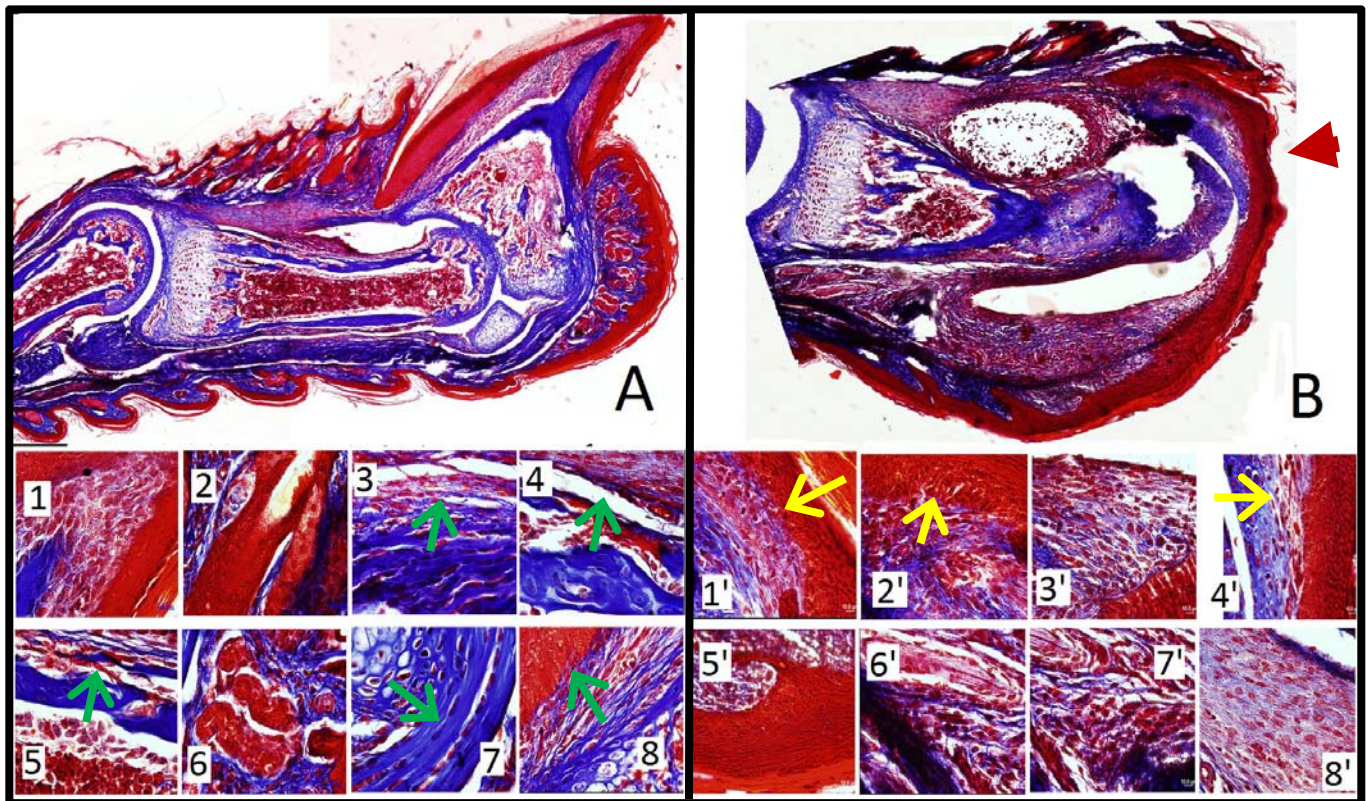


Figura I9. Concluido el cerrado de herida, el proceso inflamatorio no inhibe la regeneración; sin embargo, el reclutamiento celular en el frente de regeneración no es suficiente para formar un blastema. Tinción tricrómica de Masson donde se muestra: A) Desarrollo del dígito de ratón a los 18 días postnatales. Condición con dedos no amputados. B) Regeneración del dígito de ratón amputado distalmente (11 días postnatales + 7 días postamputación).

Se muestran algunos de los tejidos en ambas condiciones. I) punta del dígito donde se muestra el ectodermo en rojo sólido, la punta de la falange distal en azul y en el espacio intermedio células posiblemente fibroblastos, 2) se muestra un folículo piloso en fase de crecimiento con la protuberancia a la derecha y a la izquierda el tejido intrafolicular, posiblemente fibroblastos, 3) se muestra el pericondrio de la falange intermedia, 4) se muestra infiltración de vasos sanguíneos a la falange, 5) se observa la medula ósea y proceso de osificación de la falange, 6) se muestra una glándula característica de los cojinetes, 7) se muestra las fibras musculares por debajo de la falange distal y por arriba del ectodermo de los cojinetes, 8) se muestra arriba la matriz ungueal con un arreglo celular tipo columnar y abajo la falange distal, en el espacio de en medio se muestra fibroblastos. B) En el dígito que está en regeneración se observa solo la falange intermedia y la parte proximal de la falange terminal. I'-8') Se muestra una desorganización celular generalizada, posiblemente de fibroblastos, como consecuencia al daño ocasionado por la amputación. I'-5') Se muestra en rojo un engrosamiento en el ectodermo; sin embargo, no se ve la formación de AEC ni en I', ni en 4'. En I'-4' es posible ver la continuidad de la membrana basal. En 4' por arriba de los remanentes de la falange terminal puede observarse una zona de reclutamiento celular, posiblemente fibroblastos.

De acuerdo a lo establecido con anterioridad y a los resultados obtenidos **Figura I7**, se decidió evaluar el inicio presuntivo de la formación del blastema. Para el séptimo día postamputación se encontró que la zona de herida ya se había reepitelializado completamente y ya no había costra (**Figura I9** panel B cabeza de flecha); en el frente de regeneración por arriba de los remanentes de la falange terminal en regeneración y por debajo del epitelio se encontró una acumulación celular (**Figura I9** paneles I' y 4' flechas), posiblemente fibroblastos, condición necesaria para la formación de un blastema. Aún queda por resolver los tejidos o nichos de donde surgen estas células. Como se ha mencionado, por su cercanía al plano de amputación los folículos pilosos (**Figura I9** panel 2), las glándulas del cojinete (**Figura I9** panel 6), el periosteo (**Figura I9** paneles 3, 4 y 5 flechas), las fibras musculares (**Figura I9** panel 7 flecha) y la matriz de la uña (**Figura I9** panel 8 flecha) son fuentes celulares probables que podrían contribuir a la formación del reservorio celular o blastema que dará origen a la nueva falange terminal. De manera general, una comparación entre los dígitos A y B (**Figura I7**) muestra un proceso inflamatorio alrededor de la falange intermedia. Como se demostró en la **Figura I9** este proceso inflamatorio no impidió la regeneración de la falange terminal mientras se conservara la matriz ungueal (**Figura I9** paneles I' y 2' flechas). Es de resaltar que tanto en la condición control como en la condición regenerante se observa la continuidad de la membrana basal en la punta del dedo o en el frente de regeneración y a lo largo de la matriz ungueal (**Figura**

I9 paneles I, 8, I'-4'). Asimismo, es importante hacer notar que el epitelio del dedo regenerante está engrosado tanto en el frente de regeneración, como en la matriz ungueal como en la zona de cojinetes en comparación al epitelio de los dígitos control (Figura I9 paneles I vs I'-5'). Finalmente, se puede observar un cambio en el arreglo celular de fibroblastos entre los tejidos digitales. Por ejemplo, arriba de la falange terminal (Figura I9 paneles I vs 4'), por debajo de la matriz ungueal (Figura I9 paneles I vs I'-2'), por arriba y debajo de la falange intermedia en el periosteo (Figura I9 paneles 3-5 y 8 vs 6'-8') e incluso en la zona de cojinetes (Figura I9 paneles 7 vs 3' y 5').

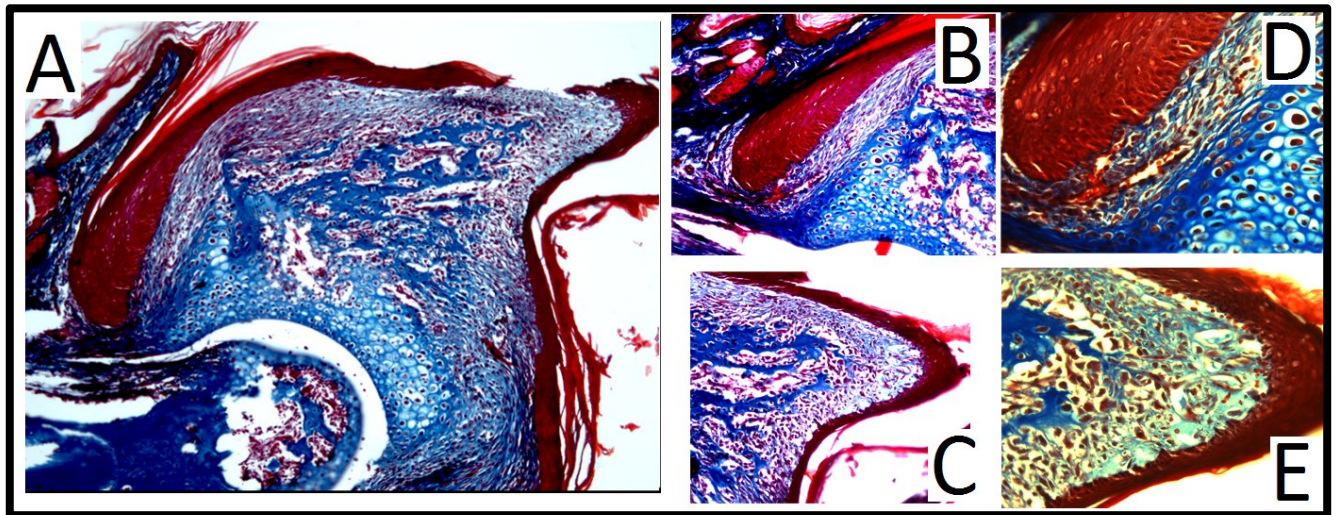


Figura 20. Proceso de osificación directa durante la regeneración digital y la ausencia del blastema en el día 15 postamputación. A) Dígito de ratón después de 15 días de ser amputado. B y D) Se muestra la matriz ungueal y la falange terminal en regeneración. C y E) Se muestra la punta del dedo con islotes de osificación directa y una zona de fibroblastos por debajo del epitelio

Se ha postulado que a los 15 días de ser amputada una extremidad debería haber un blastema maduro, sin embargo, la desorganización celular que se vio tras el cerrado de la herida (Ver Figura I9) se ha concentrado por arriba y por debajo de

la falange terminal que ha iniciado su proceso de osificación directa (Ver **Figura 20**). Una semana después del inicio del reclutamiento celular en el frente de regeneración se muestra un ligero engrosamiento de la matriz ungueal que mantiene su organización columnar característica (paneles B y D). Asimismo, mientras que en el **panel D** se muestra el proceso de osificación endocondral en la parte proximal de la falange terminal, en los **paneles B, C y E** se pueden ver islotes característicos del proceso de osificación directa. Finalmente, en el **panel E** puede verse el flanco distal de regeneración, en esta región es donde debería estar el blastema, pero solo puede verse una zona de fibroblastos; sin embargo, puede observarse la integridad de la membrana basal y la carencia de una AEC.

En el blastema presuntivo (parte distal del dígito en frente de regeneración) se expresaron los genes: *Sox2*, *c-Myc*, y *Thy-I* que se sabe participan en la regeneración axonal, condrogénesis, reepitelialización y en el mantenimiento de la multipotencia.

Patrón de expresión de genes relacionados con células troncales pluripotentes y mesenquimales troncales durante las fases de cerrado de herida y formación de blastema

A través de RT-PCR se detectaron durante el proceso de regeneración cambios en la expresión de genes relacionados con células troncales pluripotentes (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc* y *Nanog*) y mesenquimales troncales (*CD13-Aminopeptidasa*, *CD73-Nucleotidasa*, *CD90-Thy-I*, y *CD105-Endoglina*) -ver **Figuras I6 y 2I**- durante la fase de cerrado de herida, días postamputación 0-5, y durante fase de formación

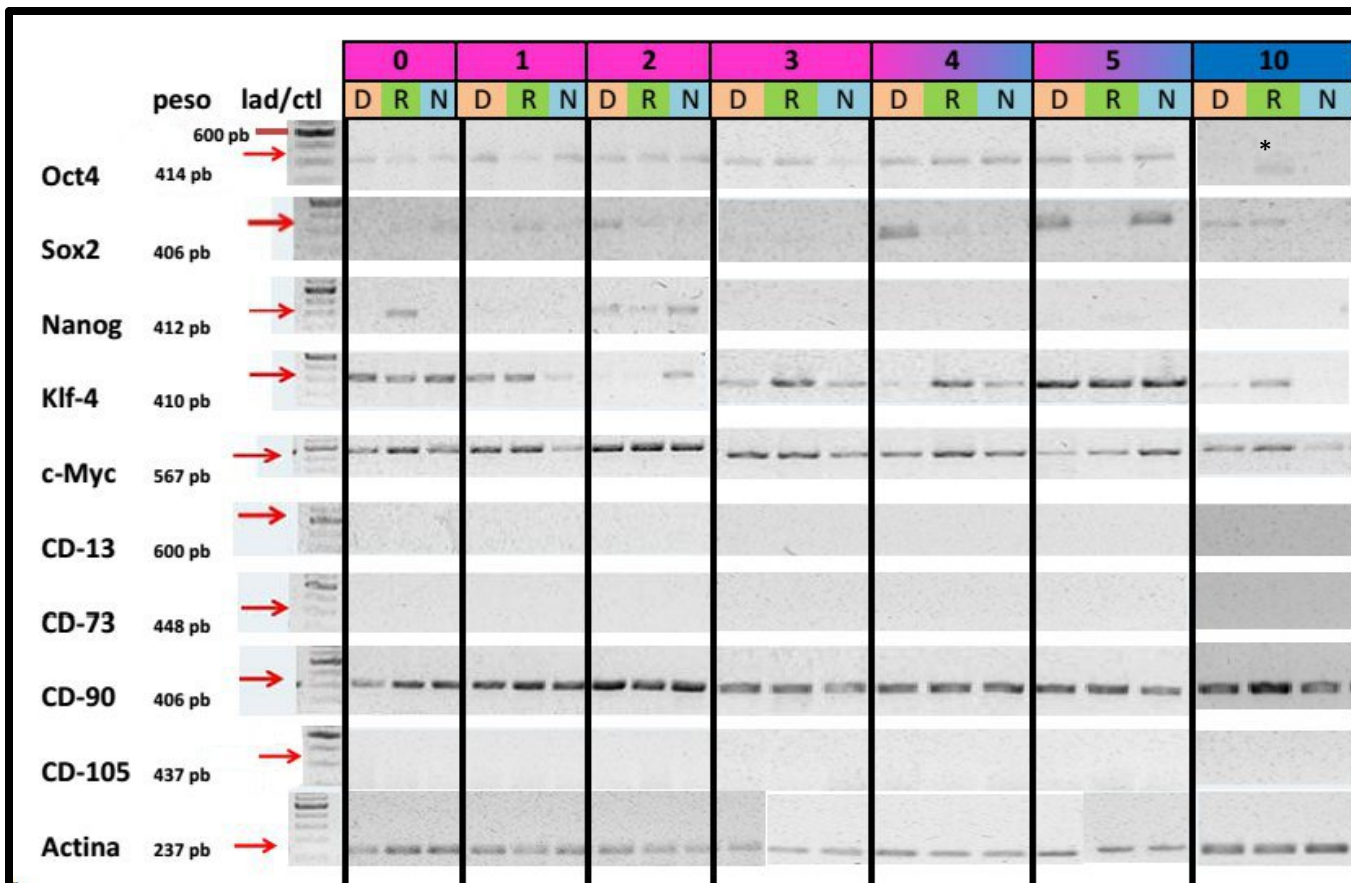
del blastema, días 4, 5 y 10 postamputación, en la condición regenerante (amputación distal) y no regenerante.

		Cerrado de herida				Formación del Blastema			
		0	1	2	3	4	5	10	
Oct4									Des
								‡	Reg
									No-Reg
Sox2			‡			‡	‡	‡	Des
	‡	‡		‡	‡	‡	‡	‡	Reg
	‡	‡	‡		‡	‡			No-Reg
Nanog			‡	‡			‡		Des
							‡		Reg
							‡		No-Reg
Klf-4	‡	‡		‡	‡	‡	‡	‡	Des
	‡	‡		‡	‡	‡	‡	‡	Reg
	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	No-Reg
c-Myc	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	Des
	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	Reg
	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	No-Reg
CD-13									Des
									Reg
									No-Reg
CD-73									Des
									Reg
									No-Reg
CD-90	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	Des
	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	Reg
	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	No-Reg
CD-105									Des
									Reg
									No-Reg
Actina	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	Des
	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	Reg
	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	No-Reg

Resumen de la expresión diferencial de marcadores de células troncales pluripotentes y troncales mesenquimales durante la regeneración de dígitos de ratón.

La tabla se ha dividido para facilitar su lectura en tres. De manera horizontal por días post-amputación y se han identificado las fases del proceso regenerativo correspondientes. De manera vertical, en los renglones se ha dividido, a la izquierda, por gen de interés (10) y, a la derecha, por condición (Desarrollo, Regenerante y No regenerante). El símbolo ‡ representa que el gen SI se expresa.

Figura 2I. Expresión diferencial de marcadores de células troncales pluripotentes y mesenquimales troncales durante las fases de cerrado de herida y formación del blastema en la regeneración de dígitos de ratón. La tabla se divide horizontalmente en días postamputación identificando la condición experimental (desarrollo D-color naranja, regenerante R-color verde, no regenerante N-color azul). Verticalmente, la tabla se divide por gen de interés.



Para evaluar la dinámica de expresión génica durante la regeneración digital se utilizaron animales que fueron amputados al tercer día postnatal; ello debido a que se ha caracterizado ampliamente el proceso^{280,283}. Paralelamente a la dinámica de expresión se evaluaron los procesos de cerrado de herida, infiltración de células del sistema inmune, patrón de proliferación, patrón de regeneración axonal y patrón de reinervación.

Mientras que el en la condición regenerante (amputación distal) la punta de la falange terminal inicia su regeneración a partir del tercer día, el proceso de reepitelialización en la condición no regenerante (amputación proximal) es más rápido.

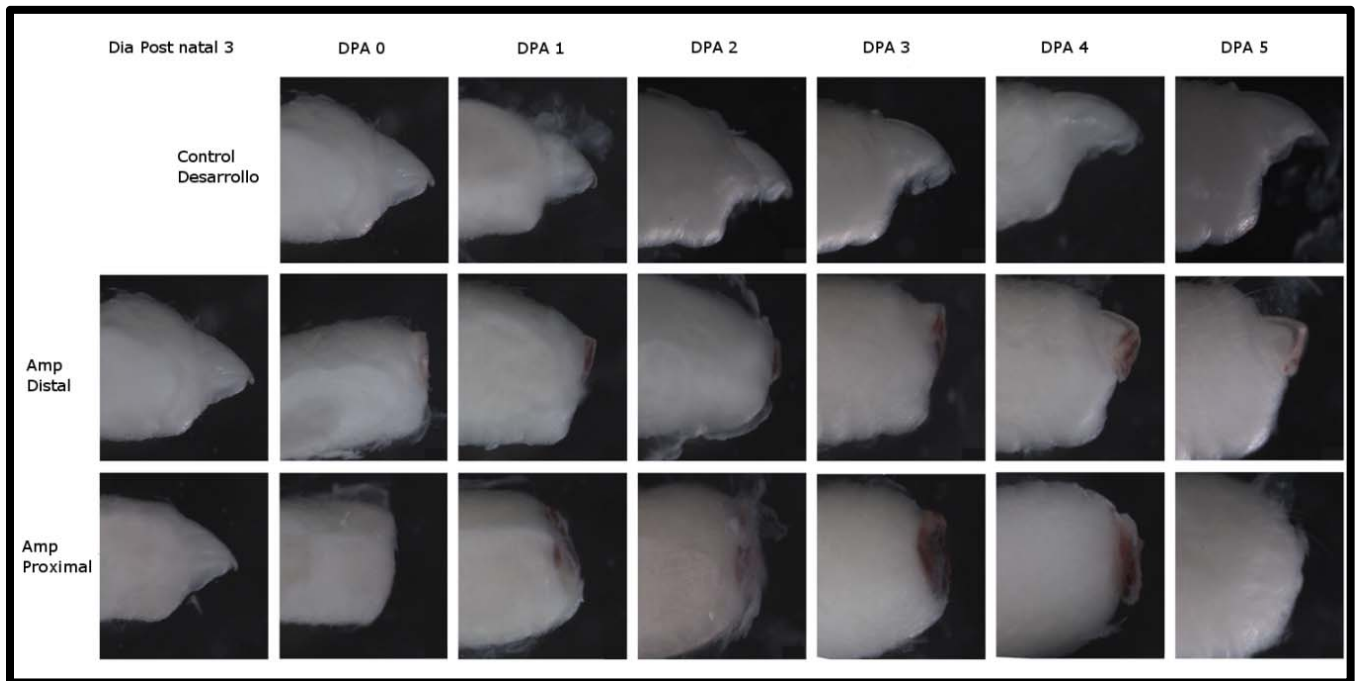


Figura 22. En la condición regenerante la punta de la falange terminal inicia su regeneración a partir del tercer día, el proceso de reepitelialización es más rápido en la amputación proximal (condición no regenerante). Vista macroscópica de los proceso de cerrado de herida y formación de blastema. Se puede ver la costra en la parte distal de la falange terminal.

Las fases de cerrado de herida y de formación de blastema son importantes para la regeneración digital. Durante la reepitelialización en el frente de regeneración, en la condición regenerante, comienzan a acumularse células posiblemente fibroblastos (Ver Figuras I9 y 22). En la condición no regenerante el proceso de cerrado de herida se acelera, sin embargo, es probable que desemboque en la formación de una cicatriz al caerse la costra (Ver Figura 22).

Mientras que la amputación proximal acelera el proceso de cerrado de herida que desemboca en la formación de un doble epitelio, el dígito amputado distalmente todavía no cierra la herida y mantiene su osificación endocondral.

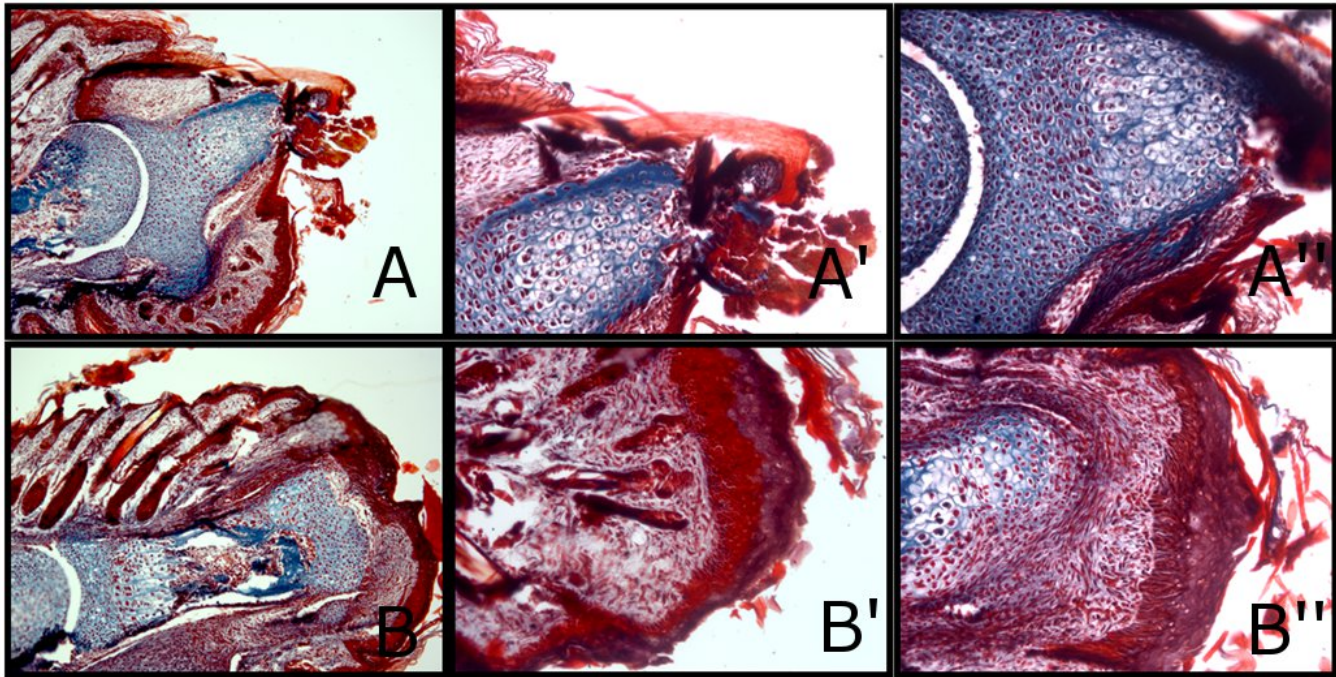


Figura 23. El proceso de regeneración en dígitos amputados proximalmente desemboca en la formación de un doble epitelio; sin embargo, en el proceso de regeneración en la condición regenerante todavía no cierra la herida y continúa su proceso de osificación endocondral. A-A'') Dígito amputado a nivel distal. B-B'') Dígito amputado a nivel proximal. Las figuras son imágenes representativas de los procesos descritos.

En el dígito amputado a nivel distal después de cinco días de iniciado el proceso regenerativo (Ver Figura 23 paneles A-A'') aún se observa una costra, el proceso de reepitelialización continúa y no se observa indicios de blastema o de algún espacio donde pudiera originarse. De manera interesante, puede observarse un proceso de osificación endocondral en los paneles A'-A''. Para el quinto día postamputación, los dígitos que fueron amputados a nivel proximal (Ver Figura 23 paneles B-B'') ya terminaron su proceso de reepitelialización y se observa la generación de dos epitelios, ello podría explicar la incapacidad de formar un

blastema. Asimismo, puede observarse que ya no hay remanentes de la falange terminal y que la parte distal de la falange intermedia se ha remodelado (Ver **Figura 23** paneles B y B''). A diferencia del frente distal de regeneración en amputaciones a nivel distal (Ver **Figura 23** paneles A'-A''), en la región distal bajo el doble epitelio en amputaciones proximales (Ver **Figura 23** paneles B y B'') hay una zona donde se han acumulado células desorganizadas, posiblemente fibroblastos.

No se detectaron células de Langerhans en la epidermis durante la regeneración de dígitos de ratón.

La intención de evaluar la participación del sistema inmune en la regeneración de dígitos es por su posible regulación para el reclutamiento celular y también para descartar que el sistema inmune a través de la activación de la respuesta angiogénica inhibiera el proceso de regeneración digital retrasando el inicio de procesos de reepitelialización. Sin embargo, como lo muestra la **Figura 23** no se encontraron infiltrados de células de Langerhans en los días y condiciones evaluadas.

El proceso de regeneración induce la aparición de fibras SP+ en los remanentes de la falange terminal incluso en la condición no regenerante. Sin embargo, no se detectaron fibras SP+ en el flanco de regeneración.

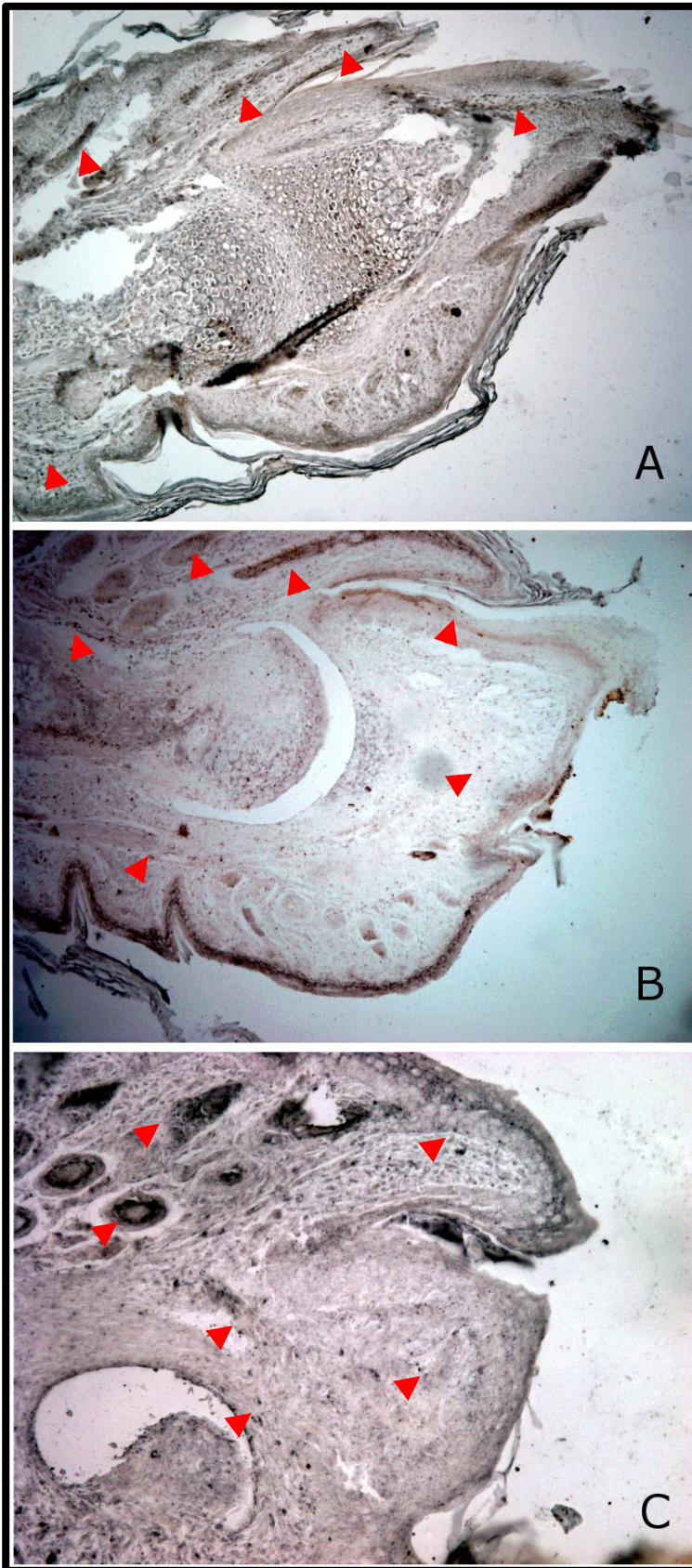


Figura 24. Inmunodetección de fibras SP+ en el frente de regeneración a los tres días postamputación. A) Dígito control de desarrollo, día postnatal 6. B) Dígito en regeneración amputado a nivel distal. C) Dígito amputado proximalmente. Las fibras están indicadas con cabezas de flecha.

Durante el desarrollo de la extremidad y en las condiciones regenerante y no regenerante, se encontraron fibras SP+ alrededor de la matriz ungueal (Figura 24 paneles A-C). Asimismo, en las tres condiciones, los folículos, tanto de la parte dorsal como ventral del dígito, tienen fibras SP+ (Figura 24 paneles A-C). es importante resaltar que la inervación SP+ no se localiza en

el flanco distal de regeneración durante el proceso de reepitelialización (**Figura 24** paneles B-C). Tampoco se encontraron queratinocitos inmunoreactivos a SP. Las fibras SP+ se encontraron en los remanentes de la falange terminal incluso en la condición no regenerante (**Figura 24** panel C). De manera interesante, se encontró que en dígitos que estaban concluyendo su proceso regenerativo a los 25 días postamputación (ratones amputados el día once postnatal), las fibras que llegan al periosteo, a la placa de crecimiento y a los centros de osificación directa eran SP+ (**Figura 25** paneles A, B y C-E, respectivamente). Resultados similares se encontraron en dígitos tras 35 días postamputación. En los animales control de a los 36 y 46 días postnatales (días 25 y 35 postamputación) también se encontraron nervios SP+ cercanos a las falanges intermedias (Ver **Figura 25** paneles A-B).

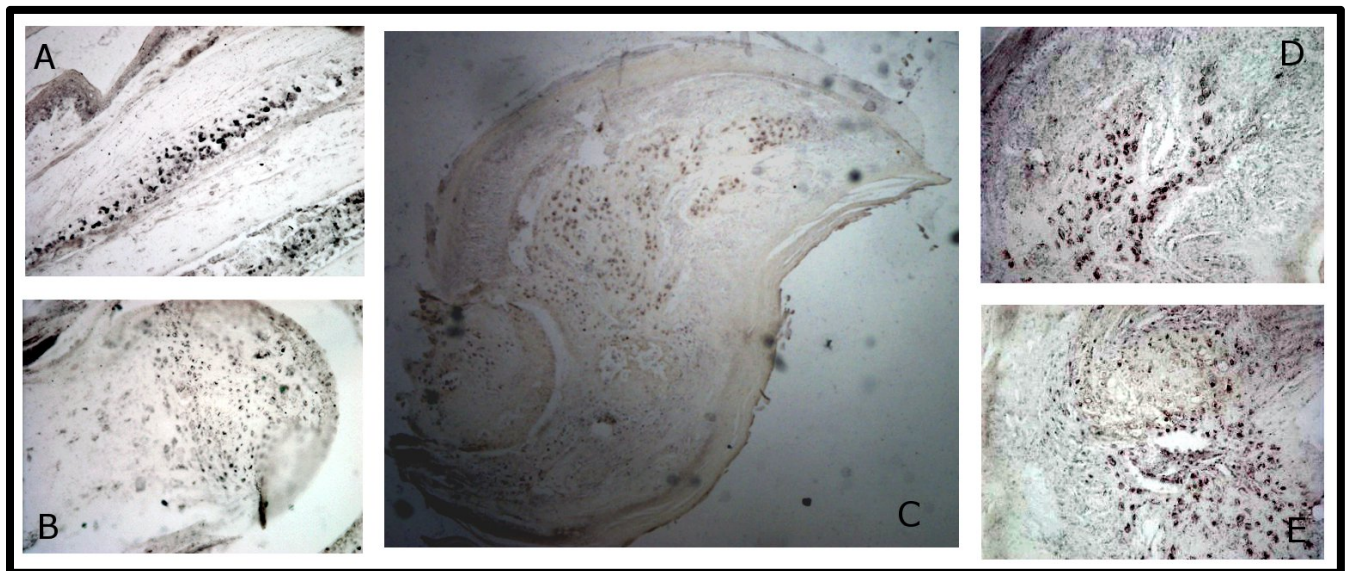


Figura 25. Inmunodetección de fibras SP+ en dígitos en proceso de regeneración tras 25 días postamputación (amputados distalmente el día II postnatal). A) Las fibras SP+ se localizan en el periosteo de la falange intermedia. B) Las fibras SP+ se localizan en la placa de crecimiento de la falange intermedia. C-E) Dígito de un animal 25 días postamputación, de manera interesante se ve inmunoreactividad en la zona del cojinete y en los centros de osificación directa.

La capa basal de la epidermis, los folículos pilosos, los fibroblastos y las zonas de crecimiento de las falanges se encuentran proliferando en el momento de la amputación; durante la regeneración, solo la epidermis cercana al plano de amputación muestra mayor proliferación.

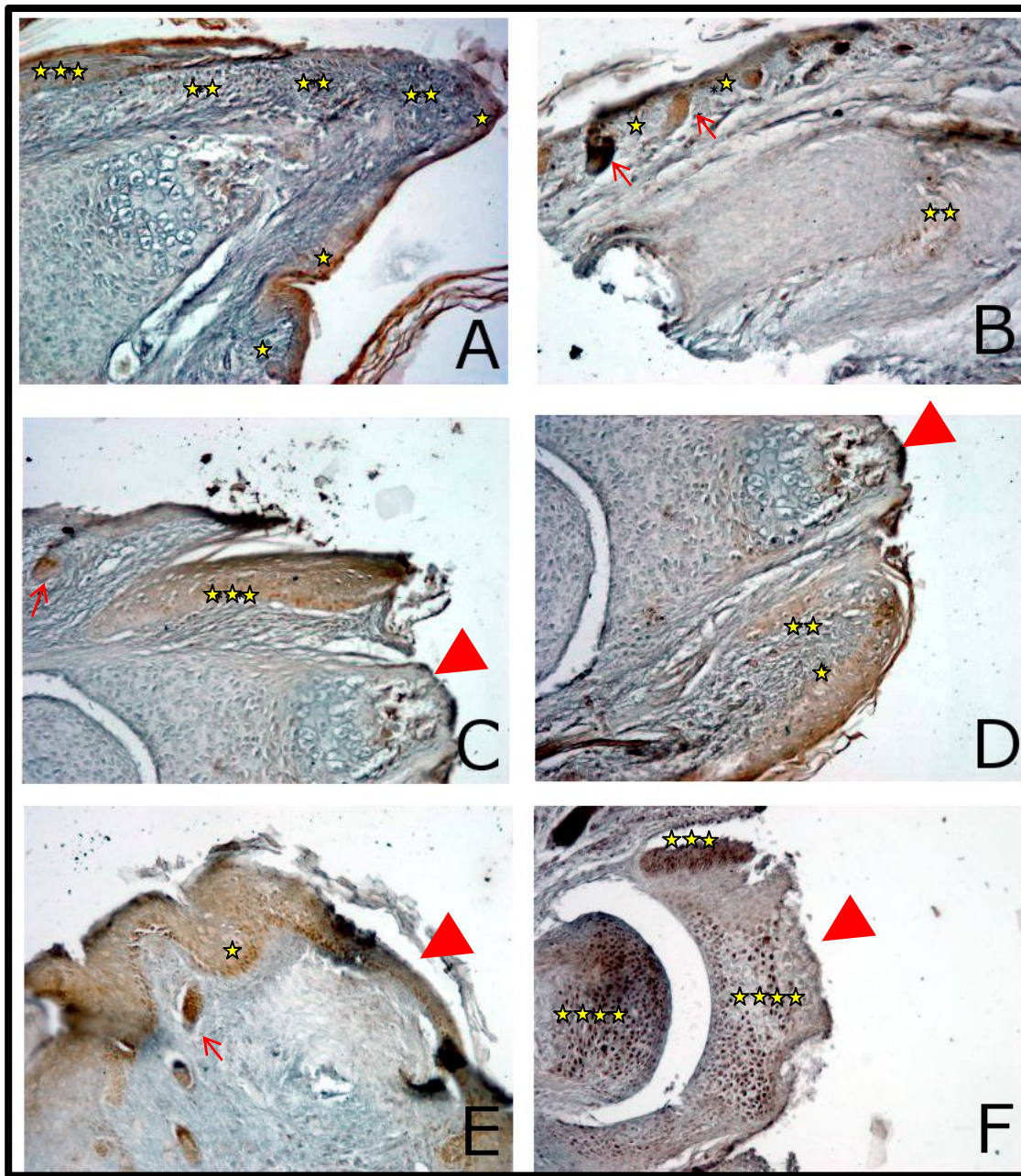


Figura 26. Patrón de proliferación en el dígito el día de amputación (3 día postnatal). A-B) Control de desarrollo. C-D) Amputación distal. E-F) Amputación proximal. Las células en café son Ki67+. capa basal de la epidermis (*) fibroblastos (**) células de la matriz ungueal (***) condrocitos (****) folículos pilosos (→). La parte distal de la falange terminal está identificada con una cabeza de flecha.

Debido a que en el tercer día postnatal, día cuando se realizó la amputación, el dígito de ratón aún no ha llegado a su forma final, la capa basal de la epidermis (**Figura 26** paneles **A, D y E**), los folículos pilosos (**Figura 26** paneles **B, C y E**), los condrocitos (**Figura 26** panel **F**), los fibroblastos (**Figura 26** paneles **A, B y D**), la matriz ungueal (**Figura 26** paneles **A, C y F**) se encuentran proliferando.

Tres días después de amputar el dígito puede verse que la proliferación celular en la epidermis está sobre activada (**Figura 27** paneles **C y F**), no solo se encuentran proliferando las células de la capa basal (**Figura 26** panel **E**), sino también de estratos superiores (**Figura 27** paneles **C y F**). Mientras que en los paneles **D y E** puede apreciarse que los condrocitos también están proliferando, solo en amputaciones distales también los fibroblastos en la parte distal de la falange terminal proliferan (**Figura 27** panel **C**). El patrón de proliferación de la epidermis en los dígitos amputados proximalmente podría explicar la rápida reepitelialización (Ver **Figura 23**).

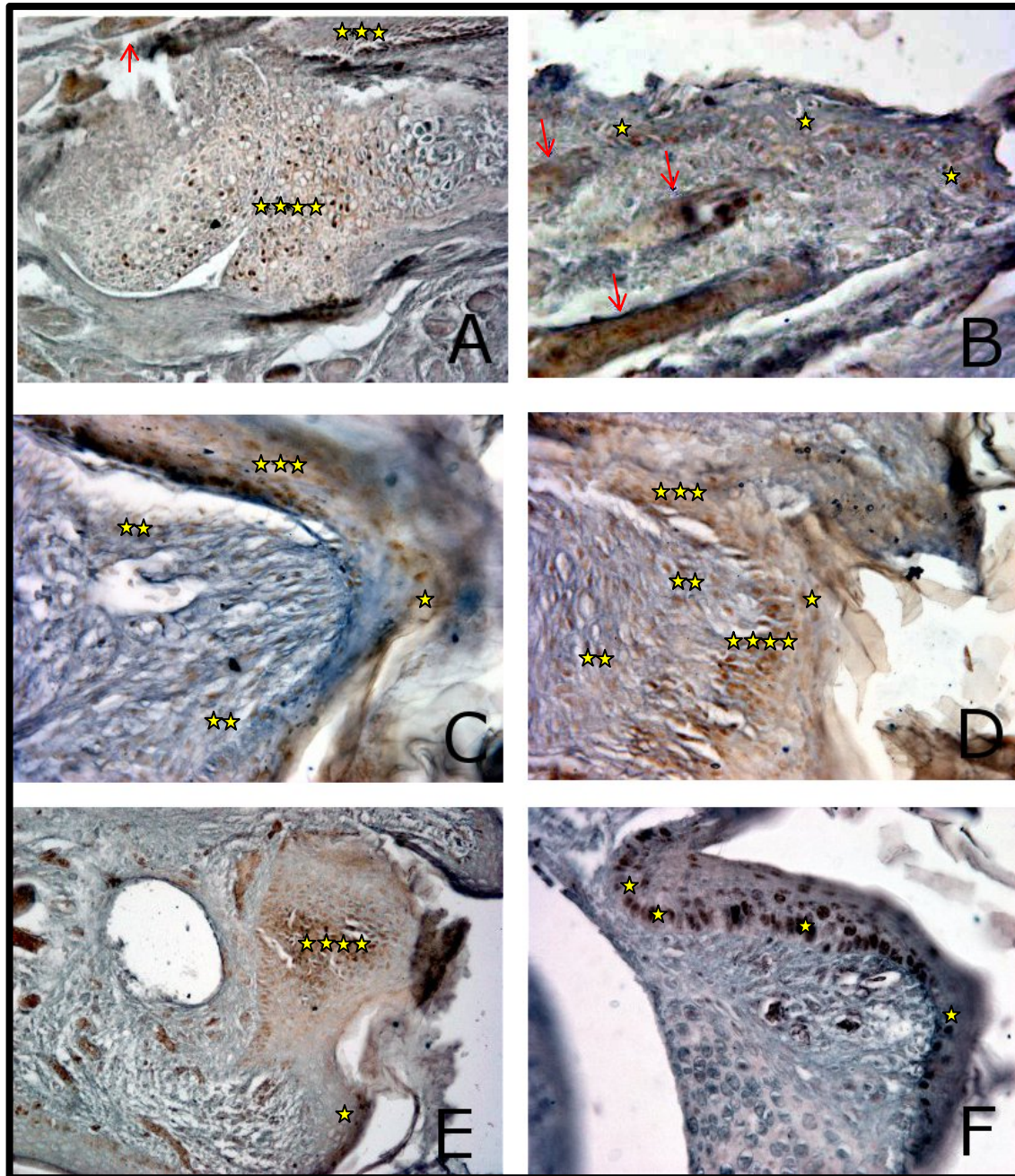


Figura 27. Patrón de proliferación en el dígito después de tres días de ser amputado (6 día postnatal). A-B) Control de desarrollo. C-D) Amputación distal. E-F) Amputación proximal. Las células en café son Ki67+. Capa basal de la epidermis (*) fibroblastos (**) células de la matriz ungueal (***) condrocitos (****) folículos pilosos (→).

Las fibras PGP9.5+ intraepidérmicas que bordean al dígito y que están presentes en la zona de folículos pilosos previo a la amputación desaparecen durante el proceso de regeneración digital; asimismo, las fibras tubulina acetilda+ no reinervan la epidermis distal y tras la regeneración axonal desarrollan un patrón desorganizado.

Antes de la amputación, las fibras PGP9.5+ se localizan intraepidérmicamente bordeando al dígito, en la zona de folículos y cojinetes (**Figura 28** paneles **A-B**). Tanto en los dígitos amputados distal (**Figura 28** paneles **C-D**), como proximalmente (**Figura 28** paneles **E-F**) se puede ver que la continuidad de las fibras intraepidérmicas PGP 9.5+ se interrumpe.

Tres días después de la amputación la densidad de las fibras PGP 9.5+ disminuye en la falange terminal (**Figura 29** paneles **A, B y C**). En amputaciones distales la densidad de las fibras PGP 9.5+ incrementa ligeramente, principalmente, en la zona de la matriz ungueal (**Figura 29** panel **C**); sin embargo, en amputaciones proximales las fibras PGP 9.5+, en lo que queda de la matriz ungueal, son escasas y en los folículos pilosos su número es reducido (**Figura 29** Paneles **C**). Del mismo modo, la continuidad de las fibras intraepidérmicas PGP 9.5+ no se ha restablecido.

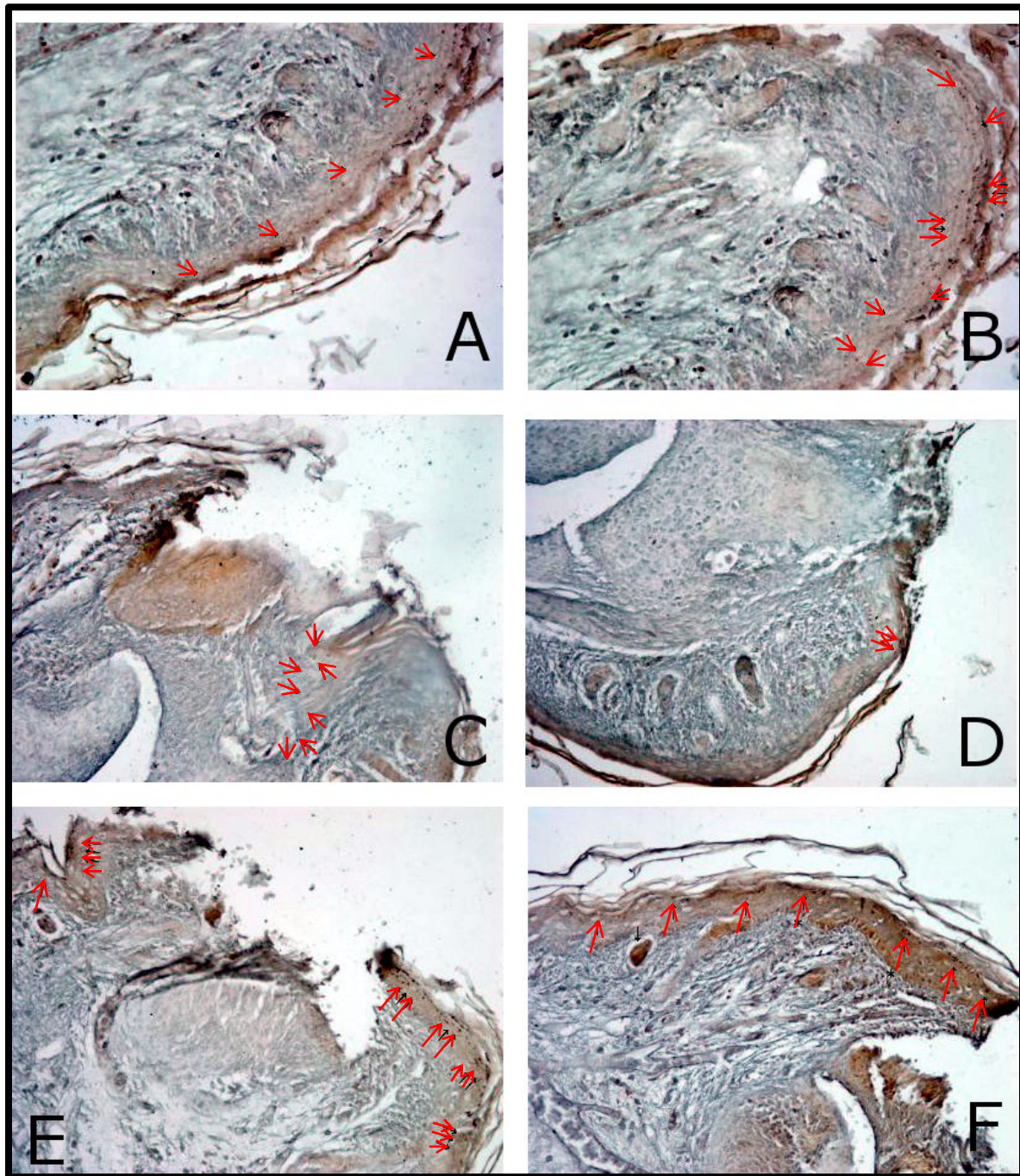


Figura 28. Patrón de innervación digital en el día de amputación (3 día postnatal). A-B) Control de desarrollo. C-D) Amputación distal. E-F) Amputación proximal. Las fibras en negro son PGP 9.5+; las → delinear sus posibles trayectorias. Las células en café (Ki67+) se encuentran proliferando.

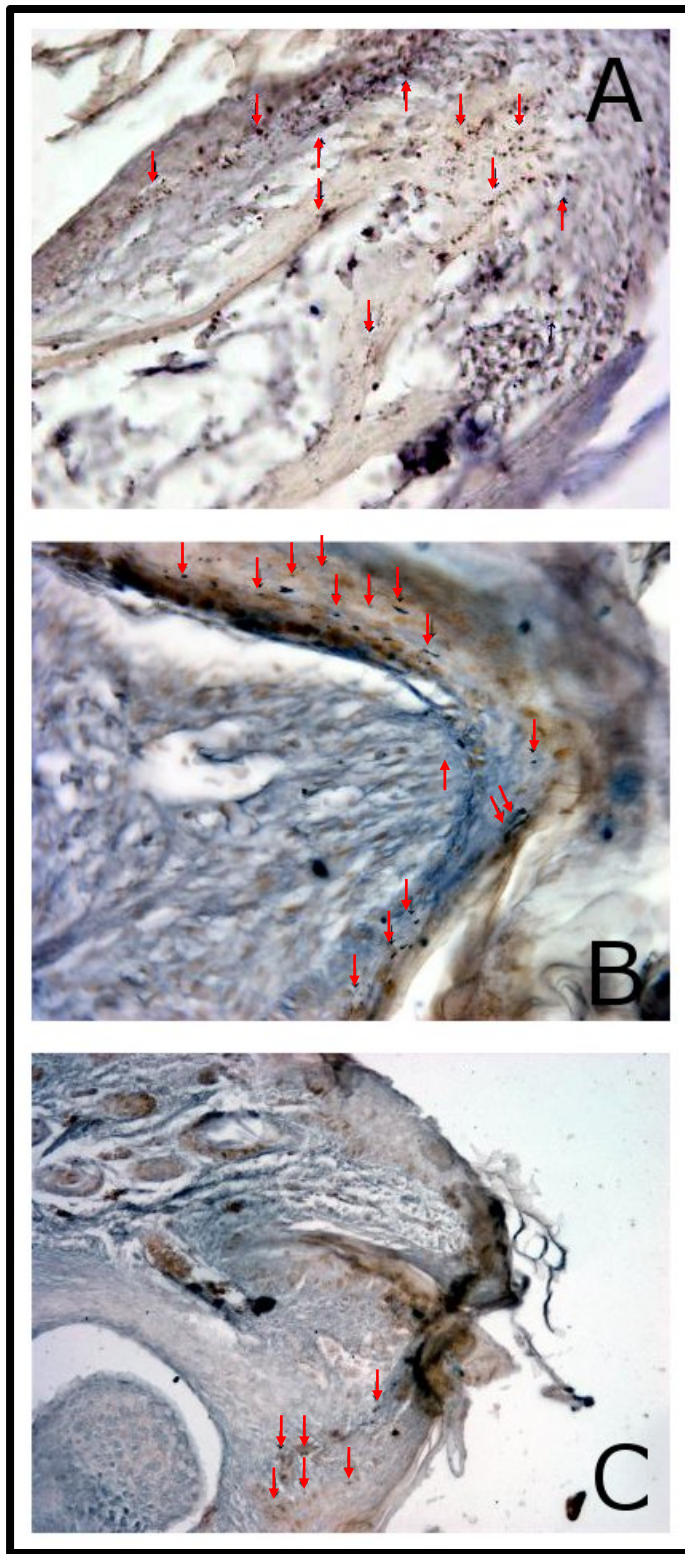


Figura 29. Patrón de innervación en el dígito después de tres días de ser amputado (6 día postnatal). A) Control de desarrollo. B) Amputación distal. C) Amputación proximal. Las fibras en negro son PGP 9.5+; las → delinean sus posibles trayectorias.

Al tercer día postamputación cuando ya se ha cerrado la herida, el patrón de reinervación en los dígitos con amputaciones proximales y su concentración en una densa red en el centro del dedo (figura no mostrada), llevan a sugerir la formación de neuromas. En la condición regenerante (amputaciones distales), para el día 10 postamputación, los nervios se encuentran cercanos al flanco de regeneración (Figura 30 panel C), muestran una densa red que a diferencia de la inervación en los dedos control aún no reinervan la epidermis (Figura 30 panel A). Mientras que en los dedos control los nervios rodean la falange terminal hasta llegar la punta del dedo (Figura 30 panel A y B), en los dedos en regeneración solo se han formado complejas redes en la base de la falange terminal y en el frente de regeneración (Figura 30 paneles C y D).

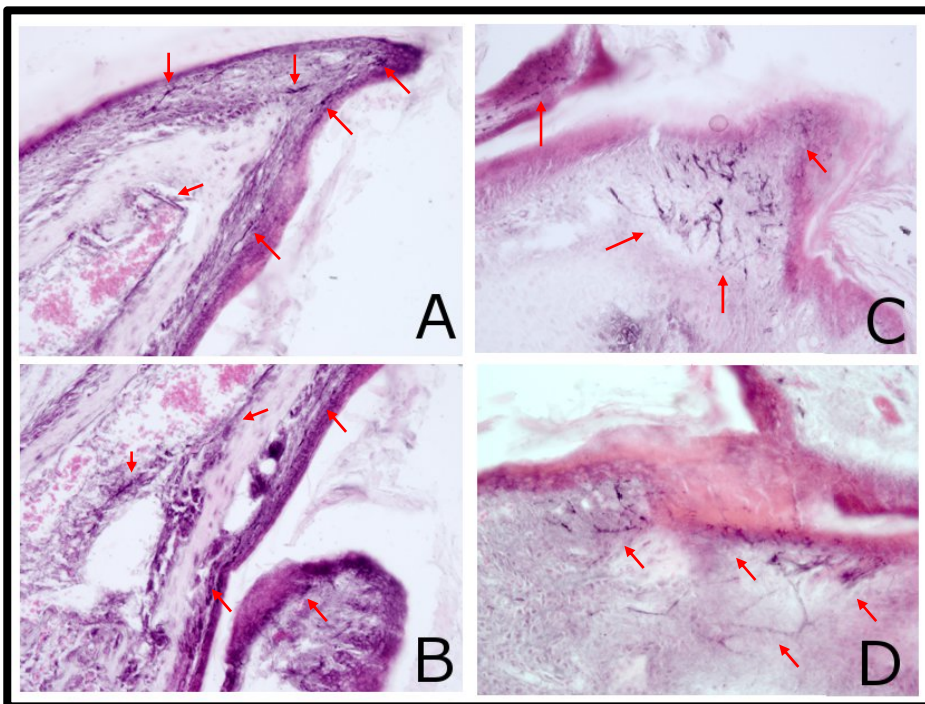


Figura 30. Patrón de reinervación digital después de 10 días postamputación en la condición regenerante. A y B) Dedos control. C y D) Dedo amputado distalmente. A y B) Los nervios corren bordeando la falange terminal y llegan a la punta del dedo. C) En el flanco de regeneración se ve una densa red de nervios, sin embargo, no inervan ni la epidermis, ni la matriz ungueal. D) A lo largo del dedo, puede observarse un patrón desorganizado de reinervación. Las → delinear sus posibles trayectorias.

Dedos control. C y D) Dedo amputado distalmente. A y B) Los nervios corren bordeando la falange terminal y llegan a la punta del dedo. C) En el flanco de regeneración se ve una densa red de nervios, sin embargo, no inervan ni la epidermis, ni la matriz ungueal. D) A lo largo del dedo, puede observarse un patrón desorganizado de reinervación. Las → delinear sus posibles trayectorias.

D i s c u s i ó n

Ante la pérdida de la extremidad^{17,20}, la regeneración permite la recuperación funcional (recuperación de la forma y la función) de tejidos al reactivar los factores inductores de los procesos celulares elementales presentes durante el desarrollo embrionario^{13,61,147} que regulan: 1) el estado metabólico celular⁴⁷; y, 2) el programa de diferenciación²⁷⁹ generando un medio ambiente permisible para la regeneración³⁰⁹. En organismos que regeneran extremidades completas estos procesos celulares elementales hacen que las células vuelvan a adquirir los patrones moleculares¹⁴⁷ adecuados para autoorganizarse y formar estructuras complejas^{33,148}.

Los organismos utilizan dos mecanismos para reemplazar sus tejidos faltantes, por una parte pueden activar células troncales adultas y por otra pueden inducir el potencial pluripotente en células diferenciadas^{47,56,224-225,310}. En el caso de los dígitos su limitada capacidad de regeneración en roedores, parecida a la de los humanos, ha evidenciado las particularidades evolutivas del proceso regenerativo en las extremidades de mamíferos^{63,106,281,311}. Como se ha descrito, la regeneración de la extremidad implica una variedad de eventos morfológicos, celulares y moleculares altamente coordinados¹⁰³ donde los eventos tempranos del proceso, el cerrado de la herida con el engrosamiento del epitelio de herida y la formación de un blastema con el reclutamiento de células con carácter multipotente, son determinantes para el éxito de la regeneración³¹²⁻³¹³.

La recuperación funcional de la extremidad regenerada solo se ha deducido por el patrón de reinervación de la nueva extremidad^{8I,194,3I4-3I6}. Sin embargo, la función de los nervios durante el proceso regenerativo de ratones ha sido poco estudiada describiéndose funciones diferentes^{I56,22I} a las funciones tróficas y mitógenicas reportadas durante la regeneración en anfibios y que regulan los procesos de cerrado de herida y de formación del blastema^{300,3I7}.

Mientras que en los roedores solamente se han descrito procesos de autotomía por la falta de nervios^{2I,26-27,3I8-320}, en humanos se han descrito procesos de regeneración axonal aberrante o formación de neuromas y los síntomas sensoriales y nociceptivos que estos generan^{26,72-73,80,87,3I8,32I-323} (ambos procesos - formación de neuromas y sensación de dolor- también han sido reportados en otros mamíferos²⁷⁸ con amputación fisiológica o axotomía), incluso hay reportes de procesos de autotomía^{I6,25,68-69}.

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta tesis sobre el patrón de inervación (fibras PGP 9.5+, SP+ y Tub Acet+) durante la regeneración digital, la posible independencia y ausencia (debido al probable proceso de degeneración-regeneración axonal) de los nervios en las primeras etapas del proceso regenerativo de los dedos de mamíferos puede explicar la capacidad limitada de regenerar extremidades^{I56,22I,324}. Esto debido a que, como se ha reportado en organismos con la capacidad de regenerar extremidades completas, la correcta inervación de la epidermis de herida es esencial (detona el proceso regenerativo) en la regeneración. La influencia de los nervios en la epidermis probablemente

resulta en el establecimiento de nuevos centros señalizadores (como la AEC)^{I94} y en la generación de un ambiente celular “rejuvenecedor” regenerativo que promueve el reclutamiento celular que culminará en la formación de un blastema. De acuerdo a esta idea, podría plantearse que en mamíferos la correcta regeneración axonal detonaría la formación de un blastema que permitiría la regeneración.

Sin embargo, una propuesta alternativa sería que el proceso de regeneración axonal en mamíferos podría ser detonado o potenciado por señales quimioatrayentes provenientes de células troncales del blastema cuando este se forma^{98, I43, I45, 325-329}, y, a su vez, mejoraría la capacidad regenerativa de la extremidad. Esto significaría que regenerar los nervios ayudaría a regenerar la extremidad y de este modo establecer mecanismos de retroalimentación para su recuperación funcional. Ello implicaría que la regeneración axonal fuera dependiente de la regeneración de la extremidad y esta, a su vez, estuviera regulada por otros procesos como el cerrado de herida.

Los resultados obtenidos en esta tesis permiten discutir sobre tres temas en particular: el proceso de cerrado de herida, la formación del blastema y la participación de los nervios durante el proceso de regeneración; y, sugerir métodos para inducir el proceso regenerativo en extremidades de mamíferos. Como se ha planteado en el párrafo anterior, el proceso de regeneración digital en los roedores no puede verse como un proceso “paso a paso” donde la ejecución de un paso o evento regenerativo estaría condicionada a un paso o evento regenerativo

anterior. Esto implica que los eventos regenerativos inician o son detonados de manera independiente, pero que su mantenimiento y consolidación dependen de la coordinación de la activación de ambos pasos o eventos regenerativos¹⁰⁵. Una interpretación alternativa es que existen pasos o eventos regenerativos necesarios para la activación y regulación de otros eventos regenerativos, pero aún falta por descubrirse y, como en otros casos, es posible que varíen entre especies. De acuerdo a los resultados obtenidos en esta tesis, dos ejemplos claros son: 1) la secuencia de eventos que llevan al cerrado de la herida con el engrosamiento del epitelio y la formación de la AEC; y, 2) la secuencia de eventos que llevan a la formación del blastema con el reclutamiento celular. De manera ilustrativa véanse las Figuras 31 y 32.

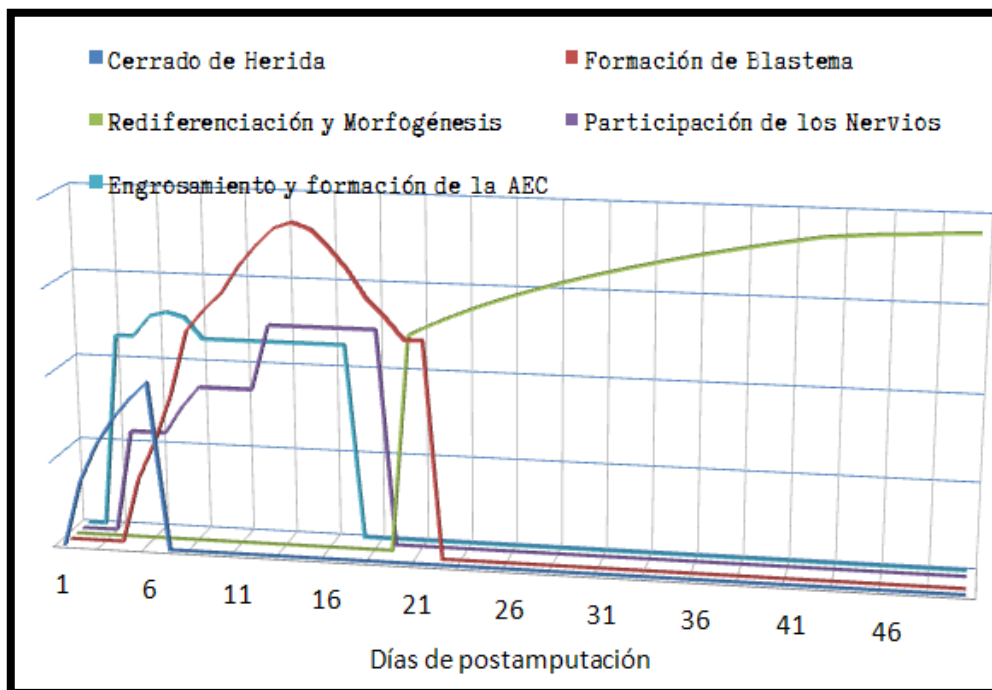


Figura 31 Modelo de los pasos o eventos regenerativos y su relación temporal durante la regeneración de la extremidad en anfibios. En azul pastel se muestra la dinámica de cerrado de herida. En los primeros 6 días se reepitelializa la herida. En azul claro se muestra el engrosamiento del epitelio de herida y se muestra en los días 6-8 la formación de la AEC. La formación del

blastema comienza con el reclutamiento celular a partir del día 4 y hasta el 20. Y posterior al día 20 inicia el proceso de morfogénesis. La participación de los nervios se muestra en morado, se ha planteado que la regeneración de la extremidad en anfibios tiene una fase de dependencia de nervios hasta los 18 dpa a partir de ahí se vuelve independiente. En el eje Y se muestra la Dinámica de los eventos regenerativos. Modificado de referencias 330 y 331.

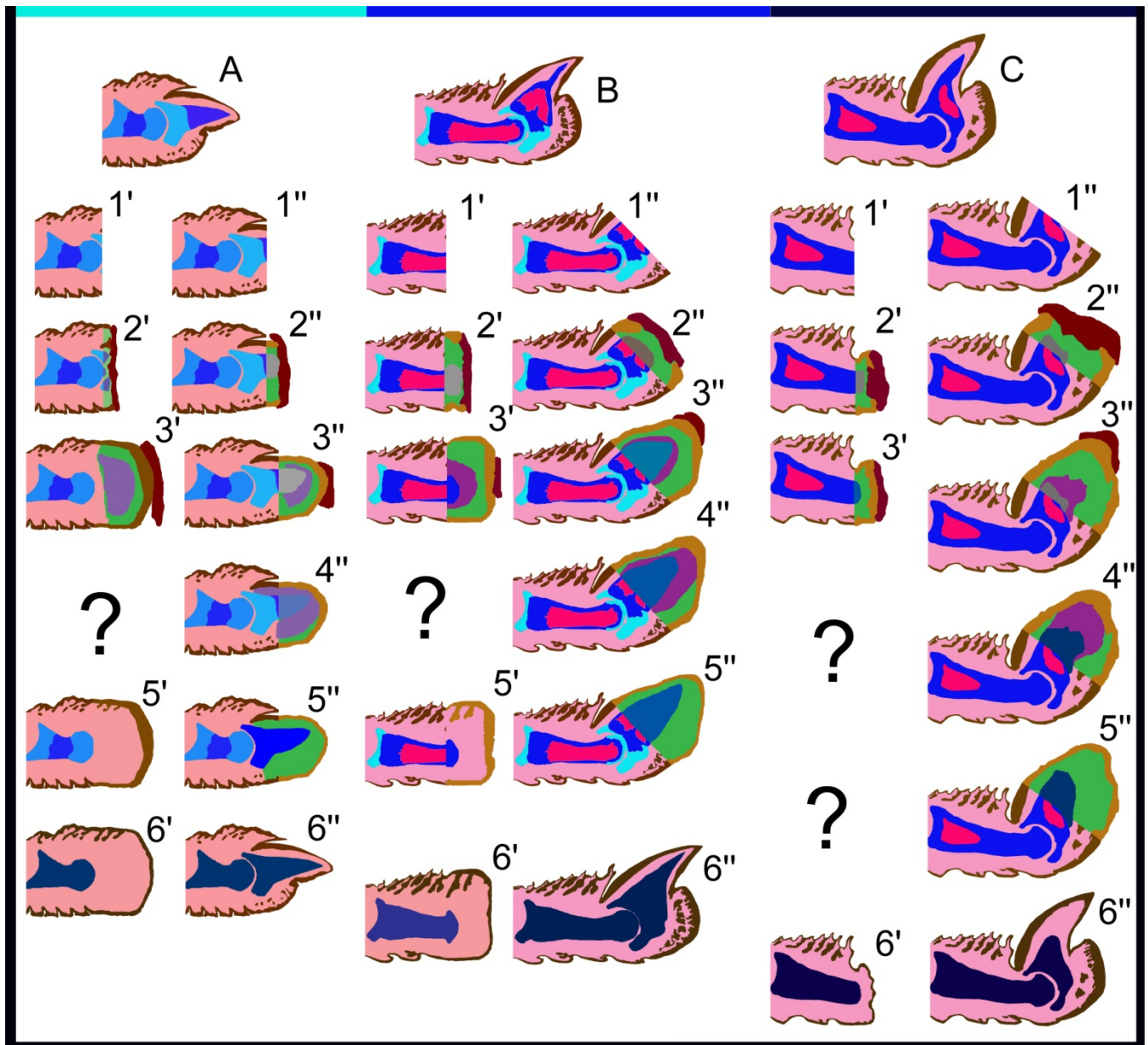


Figura 32. Modelo de los pasos o eventos regenerativos y su relación temporal durante la regeneración de dígitos en roedores. De acuerdo a la **Figura I4**, A) Representa un dígito en la primera semana de vida postnatal, B) Representa un dígito en la tercera semana y C) Representa un dígito en la séptima semana. Los números del I al 6 representan las fases de regeneración: 1) Representa la fase de amputación que muestra el nivel de amputación, proximal y distal 2) Representa la fase de cerrado de herida por formación de costra, 3) Representa la fase de cerrado de herida con reepitelialización, 4) Representa la fase de formación de un blastema, 5) Representa la fase de morfogénesis o adquisición de patrones y 6) Representa la fase de Crecimiento y Maduración. En rojo ladrillo se representa la costra, en morado el blastema presuntivo, en verde la zona regenerante, en café claro el nuevo epitelio, en azul oscuro la falange que ha terminado su desarrollo, en gris la zona de osificación endocondral y en azul opaco la zona de osificación directa. Los números (') representan la condición no regenerante y los (") la regenerante. El signo (?) representa fases aún no descritas. Léase texto.

Las diferencias entre las **Figuras 3I** y **32** radica en que la dinámica representada por la **Figura 3I** es característica de organismos que mantienen una

capacidad total de regenerar sus extremidades a lo largo de toda su vida, mientras que la dinámica representada en la **Figura 32** muestra las particularidades de los roedores.

Finalmente, los resultados obtenidos en esta tesis muestran que la capacidad regenerativa de la extremidad del ratón se limita a los dedos y depende de la edad y el nivel de amputación manteniéndose hasta el día I5 postnatal y solo cuando se conserva la matriz ungueal de la falange terminal. Esto correlaciona con el patrón de osificación de la extremidad donde la mitad proximal de la falange terminal osificada endocondralmente, mientras que la mitad distal a través del proceso de osificación directa^{43,50,53,112,283,289,332-333}. Aunque se encontró que en las amputaciones distales, condición regenerante, la matriz ungueal estaba inervada, en la presente tesis no se pudo evaluar su función; una posible función es la planteada por Takeo et al.²²¹, donde los nervios que inervan la matriz ungueal regulan el comportamiento de una población celular necesaria para la regeneración digital dependiente de la señalización de la matriz ungueal. Asimismo, los resultados de esta tesis muestran que durante el proceso de regeneración digital se llevan a cabo, de manera transitoria, un proceso de inflamación (que no inhibe el proceso regenerativo)^{212,215} y un proceso de osificación directa en la falange terminal lo que podría explicar la incapacidad de que un blastema se forme^{33,48,215,334} en ratones amputados en la segunda semana de vida (días postnatales II, I3 y I5)^{48,157}. Sin embargo, se encontró que la dinámica de reclutamiento celular durante la formación del blastema cambiaba en ratones

amputados la primera semana de vida (3er día postnatal), comparada con ratones amputados posteriormente, pues la población celular que posibilita la regeneración es diferente. De ahí que sean aparentemente contradictorios los trabajos que se han realizado en roedores postnatales y en roedores adultos^{46-47,289}.

Para evaluar la participación del sistema inmune durante la regeneración digital, en esta tesis se evaluó la presencia de células de Langerhans (aun que deben evaluarse otros tipos celulares). Las células de Langerhans son células epidermales derivadas de precursores sanguíneos que se encuentran dentro del estrato espinoso y participan en reacciones inflamatorias. Sin embargo, no se encontraron infiltrados de estas células en la epidermis en los estadios más sensibles a la formación de cicatrices: durante el cerrado de herida y la formación de blastema. De manera genérica, las células de Langerhans pueden detectarse a través de tinciones histológicas, y a través de inmunohistoquímicas ya que expresan, de acuerdo a su grado de diferenciación, proteínas neuronales específicas como PGP 9.5, el receptor a SP y otras³³⁴. Es importante resaltar que en ninguna de las condiciones evaluadas, ni con ninguna de las metodologías utilizadas en esta tesis se encontraron infiltrados de células de Langerhans. Asimismo, la rapidez del proceso de cerrado de herida descrita en esta tesis muestra rastros de paraqueratosis indicativo de una diferenciación inapropiada de los queratinocitos en la epidermis lo que concuerda con procesos de cerrado de heridas cutáneas en modelos con deficiencias en la recuperación de la homeostasis

de la piel^{20I} y plantea la duda sobre una regulación de los nervios durante el proceso de reepitelialización durante el proceso regenerativo de la extremidad^{86,335-336}.

El proceso de osificación directa encontrado en el proceso regenerativo de la falange terminal solo explica la incapacidad para formar el blastema en ratones amputados durante la segunda semana de vida. Sin embargo, como se observó, el reclutamiento celular en el frente de regeneración de animales amputados la primera semana de vida postnatal no es suficiente para que se forme un blastema debido a la continuidad de la membrana basal y al engrosamiento no funcional del epitelio de herida. Por lo que para que se forme un blastema, y de acuerdo a lo descrito en esta tesis, es necesaria una combinación de eventos morfológicos, intracelulares y extracelulares que permitan tener un frente de regeneración con las células adecuadas (con capacidad de formar los tejidos adecuados) para re-desarrollar la extremidad faltante. Por los resultados que se obtuvieron en la presente tesis se observa que el blastema o reservorio celular en el frente distal de regeneración está limitado a formar los tejidos de la falange terminal (en la condición regenerante); sin embargo, recientemente se ha demostrado *in vitro* que las células provenientes de regiones vecinas a la amputación en niveles diferentes tienen características diferentes y capacidades de diferenciación diferentes^{II9}. Estas diferencias resaltan la importancia de estudiar y comparar el proceso regenerativo, sus fases o eventos durante la regeneración de dígitos en organismos amputados en diferentes edades postnatales

y evaluar el proceso de formación de blastema su dinámica de expresión génica^{5I,280,283,296,3II,337}.

Los resultados obtenidos de amputaciones en organismos en la segunda semana de vida concuerdan con la propuesta del grupo de Badylak^{53,II3} que propone que el proceso de regeneración en mamíferos es de tipo epimórfico sin la formación de blastema^{I3,46,53,I05,I20,I57} generando posiblemente una región reparativa. Los resultados obtenidos sugieren que puede haber diferencias celulares en la formación del blastema; diferencias principalmente entre el reclutamiento de células osteoprogenitoras y de células formadoras del molde de cartílago y, también en el reclutamiento de fibroblastos. Asimismo, Heber-Katz ha planteado que la incapacidad para que se forme un blastema en el flanco de regeneración se debe, por una parte, a la no degradación de la membrana basal y a la carencia de metaloproteinasas en concentración suficiente para el remodelamiento del tejido en el plano de amputación dificultando el proceso de desdiferenciación celular^{III,2I2}.

Otra explicación de la no formación del blastema es el proceso de degeneración-regeneración axonal del dígito^{84,II5,338-340}, ya que entre los días 8 y II postamputación en el muñón aún se detectan nervios en fase degenerativa^{33I} y el patrón de reinervación descrito en esta tesis no hace verosímil que los nervios desempeñen función trófica o mitogénica alguna comparable con la regeneración en anfibios^{I33-I35}. Sin embargo, de acuerdo a lo planteado por Takeo et al.^{22I}, y de acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio del patrón de

innervación los nervios podrían desempeñar funciones reguladoras en la migración, proliferación y diferenciación de células mesenquimales en la zona por arriba de los remanentes óseos y por debajo de el epitelio de herida durante el proceso de regeneración digital. Esto implica, como lo detectamos, que los nervios no dirigen o participan en el inicio del proceso regenerativo. Los resultados de esta tesis aunque no concuerdan con la propuesta de un reclutamiento de células mesenquimales generado por los nervios, establecen que el proceso de regeneración en mamíferos difiere en aspectos básicos de la regeneración de extremidades en otros modelos como los anfibios. Por el patrón de inervación durante la regeneración digital se puede sugerir que los nervios tampoco participan en el cerrado de la herida o cerrado de la epidermis³²⁴; como suele sugerirse¹⁹⁴ lo que puede representar un interesante tópico de estudio para futuras investigaciones.

Aunque en el presente trabajo no se encontraron indicios de la formación de un blastema como tal, se ha reportado una acumulación de células con carácter progenitor bajo el epitelio de herida y por arriba de los remanentes óseos^{46,22I-222}. En la presente tesis se observó que los dígitos de ratón en la zona de amputación podrían tener acceso a células con carácter regenerante provenientes de nichos cercanos, por ejemplo, la capa basal de la epidermis, los folículos pilosos cercanos a la matriz ungueal, la matriz ungueal, el pericondrio por encima de la falange intermedia y las glándulas de los cojinetes que están por debajo de la falange terminal. En el presente trabajo se encontró que todos estos tejidos activan su proliferación tras una amputación planteando la posibilidad de

que fueran fuentes probables de células troncales (Figuras I9, 26 y 27). Cabe mencionar que Morgan, en 1906, ya sugería que los tejidos de la extremidad en humanos iniciaban de manera independiente su regeneración lo que le permitía sugerir que solo faltaba algún centro coordinador¹⁰⁵. Sin embargo, la participación de estos tejidos durante la regeneración digital fue recientemente descartada por Lehoczky et al^{120,279}. Al evaluar la expresión de genes relacionados con células troncales pluripotentes y troncales mesenquimales durante la regeneración digital en la acumulación de células bajo el epitelio de herida y por arriba de los remanentes óseos en el presente trabajo, se encontró una dinámica diferente a la reportada en otros modelos de regeneración de extremidad^{III,22I-222,224,34I-342}.

De la dinámica encontrada en el presente trabajo resaltan la expresión de los genes: *Sox2*, *c-Myc*, *Thy-I* y la ausencia de *Endoglina* a lo largo del proceso de regeneración durante las fases de cerrado de herida y formación del blastema. Se sabe que estos genes participan en eventos celulares de regeneración axonal^{53,343-348}, condrogénesis³⁴⁹⁻³⁵⁰, reepitelialización³⁵¹⁻³⁵², angiogenesis³⁵³ y en el mantenimiento de la multipotencia^{346,354-355} en ciertas poblaciones celulares. En este trabajo se observó que a lo largo de los cinco primeros días del proceso regenerativo solo hay dos marcadores que se expresan a lo largo del proceso, *CD90* y *c-Myc*. Debido a que no se expresan en combinación con otros marcadores o que varía su expresión de acuerdo a la condición de amputación, puede decirse que están reflejando funciones alternas como procesos de osificación endocondral

y de cerrado de herida; esta hipótesis concordaría con la literatura^{20I,349-350}. Asimismo, la dinámica de expresión de *Sox2* y de *Nanog*, que se encontró en el presente estudio, podría estar reflejando intervalos transitorios de reprogramación natural³⁵⁶; sin embargo, tendría que evaluarse la expresión de otros marcadores de linajes específicos buscando determinar qué tipo de célula se está reprogramando y su función durante el proceso regenerativo digital. Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo de la dinámica de expresión de genes relacionados a células troncales pluripotentes y mesenquimales troncales durante la regeneración de dígitos de ratón es posible sugerir que durante el proceso regenerativo se lleva a cabo una reprogramación natural transitoria con una conversión directa de linaje con o sin desdiferenciación lo que resalta la importancia del medio ambiente celular y extracelular durante el proceso regenerativo y sobre todo la necesidad de un centro señalizador en el frente de regeneración que coordine otros comportamientos celulares en las extremidades de mamíferos.

Aunque *CD90* se ha reportado como un regulador de la regeneración axonal³⁴⁸, todavía falta determinar las características del proceso de reinervación durante la regeneración digital de mamíferos. Una de las aproximaciones que se utilizó en el presente estudio para evaluar la función de los nervios en la formación del blastema fue la inmunodetección de fibras o células SP+. Ya que dentro de las características de organismos con capacidad de regenerar extremidades completas resalta que los nervios son capaces de liberar neuropéptidos (como SP), que

participan en el cerrado de herida, en la regulación de nichos de células troncales y en la activación de procesos de desdiferenciación y llevar a ciclo celular a células ya “diferenciadas”^{36,357-363}. La expresión de genes relacionados con el proceso de regeneración axonal y el patrón de reinervación digital llevan a plantear la posibilidad de que las células nerviosas periféricas desarrollen procesos de regeneración aberrantes que se pueden observar en una regeneración digital deficiente y en la formación de neuromas con probables consecuencias neurofisiológicas al no tener células blanco que inervar^{96,364-367}.

En conclusión, los resultados obtenidos en esta tesis podrían indicar que al inducir la formación de una zona que sirva de reservorio celular donde se expresen marcadores de células troncales pluripotentes o mesenquimales troncales en el flanco de amputación se generarían células blanco para los axones lo que permitiría promover la regeneración de la extremidad en mamíferos. Ello concordaría con el modelo dual durante la regeneración de astas de venado planteado por Li²²⁵. Asimismo, se ha reportado que la capacidad regenerativa en dígitos se incrementa cuando se trasplantan células mesenquimales “troncales”^{50,II2,I20} y que la reprogramación de células con factores definidos (Oct4, Nanog, Sox2 y Lin28) y su posterior trasplante en la extremidad tiene efectos terapéuticos positivos ante procesos isquémicos^{I24}. Establecido en el presente estudio que el límite de regeneración en el dígito de ratón tiene un componente temporal y otro espacial (hasta el I5 post natal y solo cuando la amputación se dejaba parte de la matriz ungueal), se decidió utilizar una

aproximación de generación de células pluripotentes inducidas (iPSCs) *in vivo* (son células diferenciadas o somáticas que han sido reprogramadas artificialmente). Se buscó potenciar o promover el proceso de regeneración en condiciones donde se sabe no está activo. Estos experimentos piloto con vectores lentivirales (datos no mostrados) no han logrado promover la regeneración digital lo que abre la posibilidad a nuevas aproximaciones conceptuales y experimentales más integrativas, por ejemplo la propuesta de Lin et al ³⁶⁸ donde la combinación de: 1) células capaces de dar origen a los tejidos de una extremidad, 2) células con la capacidad de responde a un centro señalizador, 3) la exposición de estas células a señales de mantenimiento de estado indiferenciado, 4) de señales de diferenciación, y 5) señales de remodelamiento extracelular, entre otros factores son capaces de detonar el proceso de regeneración de la extremidad en condiciones y organismos no regenerantes.

C o n c l u s i o n e s

Los ratones son capaces de regenerar la falange terminal de sus dígitos hasta la tercera semana de vida a través de un proceso dual de osificación endocondral y de osificación directa. Las diferencias radican en las características de las células mesenquimales reclutadas en el frente de regeneración. En otras palabras, depende de que células conformen el blastema o reservorio celular.

El proceso de regeneración digital es la culminación de la integración de señales promotoras e inhibitorias que permitirán se recupere la forma original del dedo. Es importante resaltar principalmente las señales que permitan la reepitelialización de la zona de amputación sin la formación de una cicatriz en el frente de regeneración y las señales que promuevan la formación del blastema quizás a través de la degradación de la membrana basal y el establecimiento de gradientes moleculares que le permitan al dígito en proceso de regeneración saber que parte de sí hace falta.

Aún queda sin resolver la dinámica de expresión de marcadores de células troncales pluripotentes y mesenquimales troncales a lo largo de todo el proceso de regeneración de dígitos; al menos en las condiciones estudiadas en las fases de cerrado de herida y formación del blastema temprano la dinámica encontrada refleja eventos celulares específicos y abre la posibilidad de una reprogramación transitoria mediada por *Sox2*. La presencia de células troncales pluripotentes

durante la regeneración digital al menos en las condiciones evaluadas queda descartada, pero la hipótesis de la presencia de células mesenquimales troncales durante la regeneración digital todavía podría mantenerse pues no se ha establecido un criterio único para la determinación de esta población en roedores particularmente en las extremidades. Aunque no se observó un patrón claro de expresión de factores de transcripción, hay dos dinámicas de expresión. Las consecuencias de estas dinámicas no quedan claras.

El patrón de innervación durante el proceso de regeneración digital en ratones demuestra que el proceso es independiente de nervios al menos con lo que se ha descrito con otros modelos animales. Ello permite resaltar la importancia de la activación del proceso regenerativo digital para la regeneración axonal de la extremidad y la influencia de los nervios en pasos o eventos regenerativos digitales aún no descritos. Otra aproximación sobre la influencia de los nervios durante la regeneración de las extremidades en mamíferos buscaría evaluar la posible mejoría o rescate del proceso regenerativo si un mamífero estuviera hiperinervado. Sin embargo, aún queda la duda de cómo los nervios participarían en procesos regenerativos tras amputaciones más extensas p.e. extremidades completas.

References

- 1 Goss, R. J. **The natural history (and mystery) of regeneration.** In C. E. Dinsmore (Ed.), *A History of Regeneration Research. Milestones in the Evolution of a Science.* (pp. 7-23). Cambridge, UK: Cambridge University Press (1991).
- 2 Price, D. B. **Miraculus Restoration of Lost Body Parts: Relationship to the Phantom Limb Phenomenon and to Limb-Burial Superstitions and Practices.** In W. D. Hand (Ed.), *American Folk Medicine: A Symposium* (pp. 49-71). Berkeley and Los Angeles: University of California Press (1976).
- 3 Ingham, J. M. **Human Sacrifice at Tenochtitlan.** *Comparative Studies in Society and History*, 26(3), 379-400 (1984).
- 4 Tiniakos, D. G., Kandilis, A., & Geller, S. A.. **Tityus: A forgotten myth of liver regeneration.** *Journal of Hepatology*, 53(2), 357-361: (2010).
- 5 Moreno, R. **El Axólotl.** *Estudios de cultura náhuatl*, 8, 157-173; (1969).
- 6 Power, C., & Rasko, J. E. J. **Whither Prometheus' Liver? Greek Myth and the Science of Regeneration.** *Annals of Internal Medicine*, 149(6), 421-426; (2008).
- 7 Aristotle. **The History of Animals.** Book II (350 B.C.E.).
- 8 Aristotle. **Generation of Animals.** Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press (1943).
- 9 Singer, M., & Géraudie, J. **The neurotrophic phenomenon: its history during limb regeneration in the newt.** In C. E. Dinsmore (Ed.), *A History of Regeneration Research. Milestones in the Evolution of a Science.* (pp. 101-112). Cambridge, UK: Cambridge University Press (1991).
- 10 Aristoteles. **Metafísica.** Libro I 5-30 (Editorial Porrúa, México, 1998).
- 11 Benson, K. R. **Observation versus philosophical commitment in eighteenth-century ideas of regeneration and generation** in *A History of Regeneration Research. Milestones in the Evolution of a Science.* (ed Charles E. Dinsmore) Ch. 6, 91-100 (Cambridge University Press, 1991).
- 12 Maienschein, J. T. H. **Morgan's regeneration, epigenesis, and (w)holism** in *A History of Regeneration Research. Milestones in the Evolution of a Science.* (ed Charles E. Dinsmore) Ch. 9, 133-149 (Cambridge University Press, 1991).
- 13 Morgan, T. **Regeneration.** (Macmillan, 1901).
- 14 Carlson, B. M. **Principles of Regenerative Biology.** 379 (Academic Press, 2007).
- 15 Sage, R. A., Pinzur, M., Stuck, R. & Napolitano, C. **Amputation and Rehabilitation of the Diabetic Foot** in *The Diabetic Foot Contemporary Diabetes* eds Aristidis Veves, John M. Giorini, & Frank W. LoGerfo Ch. 18, 363-390 (Humana Press, 2006).
- 16 Edwards, M. J. *et al.* **Limb amputations in fixed dystonia: A form of body integrity identity disorder?** *Movement Disorders* 26, 1410-1414 (2011).
- 17 Kirkup, J. **A History of Limb Amputation.** (Springer-Verlag, 2007).
- 18 McCallum, J. E. **Military medicine: from ancient times to the 21st century.** (ABC-CLIO, Inc., 2008).
- 19 Blackbourne, L. H. *et al.* **Military medical revolution: Prehospital combat casualty care.** *The Journal of Trauma and Acute Care Surgery* 73, S372-S377 (2012).
- 20 Marcovitch, H. **Black's Medical Dictionary.** 41st edn, (A & C Black Publishers Limited, 2005).
- 21 Rabin, A. G. & Anderson, E. G. **Autotomy following limb denervation: Effects of previous exposure to neurectomy.** *Pain* 21, 105-115 (1985).
- 22 Seifert, A. W. *et al.* **Skin shedding and tissue regeneration in African spiny mice (Acomys).** *Nature* 489, 561-565 (2012).
- 23 Shargal, E., Rath-Wolfson, L., Kronfeld, N. & Dayan, T. **Ecological and histological aspects of tail loss in spiny mice (Rodentia: Muridae, Acomys) with a review of its occurrence in rodents.** *Journal of Zoology* 249, 187-193 (1999).
- 24 Giummarra, M., Bradshaw, J., Nicholls, M., Hilti, L. & Brugger, P. **Body Integrity Identity Disorder: Deranged Body Processing, Right Fronto-Parietal Dysfunction, and Phenomenological Experience of Body Incongruity.** *Neuropsychology Review* 21, 320-333 (2011).
- 25 Sedda, A. **Body Integrity Identity Disorder: From A Psychological to A Neurological Syndrome.** *Neuropsychology Review* 21, 334-336 (2011).
- 26 Devor, M. **Sensory basis of autotomy in rats.** *Pain* 45, 109-110 (1991).
- 27 Wall, P. D. *et al.* **Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anesthesia dolorosa.** *Pain* 7, 103-113 (1979).

- 28 Maginnis, T. L. The costs of autotomy and regeneration in animals: a review and framework for future research. *Behavioral Ecology* 17, 857-872 (2006).
- 29 Wilkie, I. C. Autotomy as a prelude to regeneration in echinoderms. *Microscopy Research and Technique* 55, 369-396 (2001).
- 30 Fleming, P. A., Muller, D. & Bateman, P. W. Leave it all behind: a taxonomic perspective of autotomy in invertebrates. *Biological Reviews* 82, 481-510 (2007).
- 31 Agata, K. & Inoue, T. Survey of the differences between regenerative and non-regenerative animals. *Development, Growth & Differentiation* 54, 143-152 (2012).
- 32 Sánchez Alvarado, A. Regeneration in the metazoans: why does it happen? *Bioessays* 22, 578-590 (2000).
- 33 Chimal-Monroy, J., Correa Gallegos, D. & Galván-Hernández, C. I. Regeneración in *Células troncales y medicina regenerativa* eds Rosana Pelayo, Jesús Santa-Olalla, & Iván Velasco) Ch. II, 255-274 (UNAM, 2011).
- 34 Bely, A. E. Evolutionary Loss of Animal Regeneration: Pattern and Process. *Integrative and Comparative Biology* 50, 515-527, doi:10.1093/icb/icq118 (2010).
- 35 Funayama, N. The stem cell system in demosponges: Insights into the origin of somatic stem cells. *Development, Growth & Differentiation* 52, 1-14 (2010).
- 36 Reddien, P. W. & Alvarado, A. S. Fundamentals of planarian regeneration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 725-757 (2004).
- 37 Chandebois, R. The dynamics of wound closure and its role in the programminf of planarian regeneration I-Blastema Emergence. *Development, Growth & Differentiation* 21, 195-204 (1979).
- 38 Kato, K., Orii, H., Watanabe, K. & Agata, K. Dorsal and Ventral Positional Cues Required for the Onset of Planarian Regeneration May Reside in Differentiated Cells. *Developmental Biology* 233, 109-121 (2001).
- 39 Wagner, D. E., Wang, I. E. & Reddien, P. W. Clonogenic Neoblasts Are Pluripotent Adult Stem Cells That Underlie Planarian Regeneration. *Science* 332, 811-816 (2011).
- 40 Galliot, B. & Ghila, L. Cell plasticity in homeostasis and regeneration. *Molecular Reproduction and Development* 77, 837-855 (2010).
- 41 Galliot, B., Miljkovic-Licina, M., de Rosa, R. & Chera, S. Hydra, a niche for cell and developmental plasticity. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 17, 492-502 (2006).
- 42 Tawk, M. & Vríz, S. La régénération des appendices chez les vertébrés : un modèle expérimental ancien pour étudier les cellules souches chez l'adulte. *Médecine sciences* 19, 465-471 (2003).
- 43 Wolfe, A. D., Nye, H. L. D. & Cameron, J. A. Extent of ossification at the amputation plane is correlated with the decline of blastema formation and regeneration in *Xenopus laevis* hindlimbs. *Developmental Dynamics* 218, 681-697 (2000).
- 44 Russell, A. P., Maddin, H. C. & Chrbet, T. Restorative Regeneration of Digital Tips in the African Clawed Frog (*Xenopus laevis* Daudin). *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology* 294, 253-262 (2011).
- 45 Gardiner, D. M., Endo, T. & Bryant, S. V. The molecular basis of amphibian limb regeneration: integrating the old with the new. *Cell and Developmental Biology* 13, 345-352 (2002).
- 46 Wang, G., Badylak, S. F., Heber-Katz, E., Braunhut, S. J. & Gudas, L. J. The effects of DNA methyltransferase inhibitors and histone deacetylase inhibitors on digit regeneration in mice. *Regenerative Medicine* 5, 201-220 (2010).
- 47 Shyh-Chang, N. *et al.* Lin28 Enhances Tissue Repair by Reprogramming Cellular Metabolism. *Cell* 155, 778-792 (2013).
- 48 Yu, L., Han, M., Yan, M., Lee, J. & Muneoka, K. BMP2 induces segment-specific skeletal regeneration from digit and limb amputations by establishing a new endochondral ossification center. *Developmental Biology* 372, 263-273 (2012).
- 49 Freytes, D. O., Badylak, S. F., Webster, T. J., Geddes, L. A. & Rundell, A. E. Biaxial strength of multilaminated extracellular matrix scaffolds. *Biomaterials* 25, 2353-2361 (2004).
- 50 Masaki, H. & Ide, H. Regeneration potency of mouse limbs. *Development Growth & Differentiation* 49, 89-98 (2007).
- 51 Muneoka, K., Allan, C. H., Yang, X., Lee, J. & Han, M. Mammalian regeneration and regenerative medicine. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* 84, 265-280 (2008).

- 52 Han, M., Yang, X., Jangwoo, L., Allan, C. H. & Muneoka, K. Development and Regeneration of the Neonatal Digit Tip in Mice. *Dev Biol.* 315, 125-135 (2008).
- 53 Agrawal, V. *et al.* Partial Characterization of the Sox2+ Cell Population in an Adult Murine Model of Digit Amputation. *Tissue Engineering Part A* 18, 1454-1463. (2012).
- 54 Agrawal, V. *et al.* Recruitment of Progenitor Cells by an Extracellular Matrix Cryptic Peptide in a Mouse Model of Digit Amputation. *Tissue Engineering: Part A* 17, 2435-2443 (2011).
- 55 Agrawal, V. *et al.* Epimorphic regeneration approach to tissue replacement in adult mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 3351-3355 (2010).
- 56 Birnbaum, K. D. & Sánchez Alvarado, A. Slicing across Kingdoms: Regeneration in Plants and Animals. *Cell* 132, 697-710 (2008).
- 57 Chakraborty, C. & Agoramoorthy, G. Stem cells in the light of evolution. *Indian J Med Res* 135, 813-819 (2012).
- 58 Stocum, D. L. Stem Cells in Amphibian Regeneration in *Stem Cells Handbook* (ed Stewart Sell) Ch. 8, 89-100 (Humana Press, 2004).
- 59 Gurley, K. A. & Sánchez Alvarado, A. (ed Stembook) (The Stem Cell Research Community, 2008).
- 60 Filbin, M. T. Recapitulate development to promote axonal regeneration: good or bad approach? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 361, 1565-1574 (2006).
- 61 Martin, P. & Parkhurst, S. M. Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis. *Development* 131, 3021-3034 (2004).
- 62 Caterson, E. J. & Caterson, S. A. Regeneration in medicine: A plastic surgeons “tail” of disease, stem cells, and a possible future. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* 84, 322-334, doi:10.1002/bdrc.20139 (2008).
- 63 Gardiner, D. M. & Holmes, L. B. Hypothesis: Terminal transverse limb defects with “nubbins” represent a regenerative process during limb development in human fetuses. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology* 94, 129-133 (2012).
- 64 Stoick-Cooper, C. L., Moon, R. T. & Weidinger, G. Advances in signaling in vertebrate regeneration as a prelude to regenerative medicine. *Genes & Development* 21, 1292-1315 (2007).
- 65 Bénazet, J.-D. & Zeller, R. Vertebrate Limb Development: Moving from Classical Morphogen Gradients to an Integrated 4-Dimensional Patterning System. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1 (2009).
- 66 Skinner, D. M. & Cooke, J. S. New limbs for old: some highlights in the history of regeneration in Crustacea in *A History of Regeneration Research. Milestones in the Evolution of a Science.* (ed Charles E. Dinsmore) Ch. 3, 25-45 (Cambridge University Press, 1991).
- 67 Epstein, C. J. Human Malformations and their Genetic Basis in *Inborn Errors of Development. The Molecular Basis of Clinical Disorders of Morphogenesis* eds Charles J. Epstein, Robert P. Erickson, & Anthony Wynshaw-Boris) Ch. 1, 3-8 (Oxford University Press, 2008).
- 68 Jotkowitz, A. & Zivotofsky, A. Body Integrity Identity Disorder (BIID) and the Limits of Autonomy. *The American Journal of Bioethics–Neuroscience* 9, 55-56 (2009).
- 69 Sorene, E. D., Heras-Palou, C. & Burke, F. D. Self-amputation of a healthy hand: a case of body integrity identity disorder. *The Journal of Hand Surgery: British & European Volume* 31, 593-595 (2006).
- 70 Melzack, R., Israel, R., Lacroix, R. & Schultz, G. Phantom limbs in people with congenital limb deficiency or amputation in early childhood. *Brain* 120, 1603-1620, doi:10.1093/brain/120.9.1603 (1997).
- 71 Shehab, D., Elgazzar, A. H. & Collier, B. D. Heterotopic Ossification. *Journal of Nuclear Medicine* 43, 346-353 (2002).
- 72 Henrot, P. *et al.* Imaging of the Painful Lower Limb Stump. *Radiographics* 20, S219-S235 (2000).
- 73 Ko, J. *et al.* A quantitative evaluation of gross versus histologic neuroma formation in a rabbit forelimb amputation model: potential implications for the operative treatment and study of neuromas. *Journal of Brachial Plexus and Peripheral Nerve Injury* 6, 8 (2011).
- 74 Douglas, B. S. Conservative management of guillotine amputation of the finger in children. *Aust. paediat. J.* 8, 86-89 (1972).
- 75 Gang, R. K. & Lenghi, M. Conservative management of guillotine amputations of finger tips. *European Journal of Plastic Surgery* 7, 75-81 (1982).
- 76 Illingworth, C. M. Trapped fingers and amputated finger tips in children. *Journal of Pediatric Surgery* 9, 853-858 (1974).

- 77 Attinger, C. E. **Soft Tissue Reconstructive Options for the Ulcerated or Gangrenous Diabetic Foot in The Diabetic Foot** *Contemporary Diabetes* eds Aristidis Veves, John M. Giorini, & Frank W. LoGerfo) Ch. 19, 391-446 (Humana Press, 2006).
- 78 Watson, J., Gonzalez, M., Romero, A. & Kerns, J. **Neuromas of the Hand and Upper Extremity.** *The Journal of hand surgery* 35, 499-510 (2010).
- 79 Freeland, A. E. **Neuromas in Chapman's Orthopaedic Surgery** Vol. 1 (ed Michael W. Chapman) Ch. 53, 1610-1620 (Lippincott Williams and Wilkins, 2001).
- 80 Sebastin, S. J. **A Systematic Review of the Outcomes of Replantation of Distal Digital Amputation.** *Plast. Reconstr. Surg.* 128, 723-737 (2011).
- 81 Agnew, S. P., Ko, J., De La Garza, M., Kuiken, T. & Dumanian, G. **Limb Transplantation and Targeted Reinnervation: A Practical Comparison.** *J reconstr Microsurg* 28, 63-68 (2012).
- 82 Braga-Silva, J. & Padoin, A. V. **Distraction Osteogenesis and Free Nail Graft After Distal Phalanx Amputation.** *The Journal of hand surgery* 37, 2541-2546 (2012).
- 83 Condic, M. L. **Regeneration and Repair in Developmental Neurobiology** eds Mahendra S. Rao & Marcus Jacobson Ch. 12, 329-348 (Kluvier Academic/Plenum Publishers, 2005).
- 84 Verdú, E., Ceballos, D., Vilches, J. J. & Navarro, X. **Influence of aging on peripheral nerve function and regeneration.** *Journal of the Peripheral Nervous System* 5, 191-208 (2000).
- 85 Mattson, M. P. & Limke, T. L. **Developmental Mechanisms in Aging in Developmental Neurobiology** eds Mahendra S. Rao & Marcus Jacobson Ch. 13, 349-364 (Kluvier Academic/Plenum Publishers, 2005).
- 86 Paré, M. *et al.* **Differential hypertrophy and atrophy among all types of cutaneous innervation in the glabrous skin of the monkey hand during aging and naturally occurring type 2 diabetes.** *The Journal of Comparative Neurology* 501, 543-567 (2007).
- 87 Üçeyler, N. & Sommer, C. **Wallerian degeneration and neuropathic pain.** *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms* 3, 351-356 (2006).
- 88 Dib-Hajj, S., Cummins, T., Black, J. & Waxman, S. **Sodium Channels in Normal and Pathological Pain.** *Annu. Rev. Neurosci.* 33, 325-347 (2010).
- 89 Waxman, S. G., Dib-Hajj, S., Cummins, T. R. & Black, J. A. **Sodium channels and pain.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 7635-7639 (1999).
- 90 Richardson, P. M. *et al.* **Responses of the Nerve Cell Body to Axotomy.** *Neurosurgery* 65, A74-A79 (2009).
- 91 Banerjee, A., Roach, M. C., Trcka, P. & Ludueña, R. F. **Increased microtubule assembly in bovine brain tubulin lacking the type III isotype of beta-tubulin.** *Journal of Biological Chemistry* 265, 1794-1799 (1990).
- 92 Stephens, R. E. **Tubulin in sea urchin embryonic cilia: post-translational modifications during regeneration.** *Journal of Cell Science* 101, 837-845 (1992).
- 93 Almeida-Souza, L., Timmerman, V. & Janssens, S. **Microtubule dynamics in the peripheral nervous system: A matter of balance.** *BioArchitecture* 1, 267-270 (2011).
- 94 Brady, S. T., Colman, D. R. & Brophy, P. J. **Subcellular Organization of the Nervous System: Organelles and their Functions in Fundamental Neuroscience** eds Larry Squire *et al.*) Ch. 4, 59-86 (Elsevier/ Academic Press, 2008).
- 95 Stokvis, A. ***Surgical Management of Painful Neuromas.*** 159 (Erasmus Universiteit Rotterdam, 2010).
- 96 May, R. M. **The relation of nerves to degenerating and regenerating taste buds.** *Journal of Experimental Zoology* 42, 371-410 (1925).
- 97 Yasuda, H. *et al.* **Diabetic neuropathy and nerve regeneration.** *Progress in Neurobiology* 69, 229-285 (2003).
- 98 Kumar, A., Nevill, G., Brockes, J. P. & Forge, A. **A comparative study of gland cells implicated in the nerve dependence of salamander limb regeneration.** *Journal of Anatomy* 217, 16-25 (2010).
- 99 Monaghan, J. *et al.* **Microarray and cDNA sequence analysis of transcription during nerve-dependent limb regeneration.** *BMC Biology* 7, 1 (2009).
- 100 Ferretti, P. & Brockes, J. P. **Cell origin and identity in Limb regeneration and development.** *Glia* 4, 214-224 (1991).
- 101 Crapo, P. M. *et al.* **Biologic scaffolds composed of central nervous system extracellular matrix.** *Biomaterials* 33, 3539-3547 (2012).
- 102 Medberry, C. J. *et al.* **Hydrogels derived from central nervous system extracellular matrix.** *Biomaterials* 34, 1033-1040 (2013).

- 103 Stocum, D. L. & Zupanc, G. K. H. **Stretching the Limits: Stem Cells in Regeneration Science.** *Developmental Dynamics* 237, 3648-3671 (2008).
- 104 Agata, K., Saito, Y. & Nakajima, E. **Unifying principles of regeneration I: Epimorphosis versus morphallaxis.** *Development Growth & Differentiation* 49, 73-78 (2007).
- 105 Morgan, T. H. **The extent and limitantions of the power to regenerate in man and other vertebrates.** *The Journal of the American Medical Association* 46, 1327-1330 (1906).
- 106 Muneoka, K., Han, M. & Gardiner, D. M. **Regrowing human limbs.** *Scientific American* 298, 56-63 (2008).
- 107 Goss, R. J. & Holt, R. **Epimorphic vs. tissue regeneration in *Xenopus* forelimbs.** *Journal of Experimental Zoology* 261, 451-457 (1992).
- 108 Maier, C. E. & Miller, R. H. **In vitro and in vivo characterization of blastemal cells from regenerating newt limbs.** *Journal of Experimental Zoology* 262, 180-192 (1992).
- 109 Korneluk, R. G. & Liversage, R. A. **Tissue regeneration in the amputated forelimb of *Xenopus laevis* froglets.** *Canadian Journal of Zoology* 62, 2383-2391 (1984).
- 110 Sessions, S. K. & Bryant, S. V. **Evidence that Regenerative Ability is an Intrinsic Property of Limb Cells in *Xenopus*.** *The Journal of Experimental Zoology* 247, 39-44 (1988).
- 111 Gourevitch, D. L., Clark, L., Bedelbaeva, K., Leferovich, J. & Heber-Katz, E. **Dynamic changes after murine digit amputation: The MRL mouse digit shows waves of tissue remodeling, growth, and apoptosis.** *Wound Repair and Regeneration* 17, 447-455 (2009).
- 112 Ide, H. **Bone pattern formation in mouse limbs after amputation at the forearm level.** *Developmental Dynamics* 241, 435-441 (2012).
- 113 Lee, J. *et al.* **SDF-1 α /CXCR4 signaling mediates digit tip regeneration promoted by BMP-2.** *Developmental Biology* (article in press).
- 114 Seifert, A. & Voss, S. **Revisiting the relationship between regenerative ability and aging.** *BMC Biology* 11, 2 (2013).
- 115 Harty, M., Neff, A. W., King, M. W. & Mescher, A. L. **Regeneration or scarring: An immunologic perspective.** *Developmental Dynamics* 226, 268-279 (2003).
- 116 Ferguson, M. W. J. & O'Kane, S. **Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention.** *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 359, 839-850 (2004).
- 117 Endo, T., Bryant, S. V. & Gardiner, D. M. **A stepwise model system for limb regeneration.** *Developmental Biology* 270, 135-145 (2004).
- 118 Yakushiji, N., Yokoyama, H. & Tamura, K. **Repatterning in amphibian limb regeneration: A model for study of genetic and epigenetic control of organ regeneration.** *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20, 565-574 (2009).
- 119 Wu, Y. *et al.* **Connective Tissue Fibroblast Properties Are Position-Dependent during Mouse Digit Tip Regeneration.** *PLoS ONE* 8, e54764 (2013).
- 120 Rinkevich, Y., Lindau, P., Ueno, H., Longaker, M. T. & Weissman, I. L. **Germ-layer and lineage-restricted stem/progenitors regenerate the mouse digit tip.** *Nature* 476, 409-413 (2011).
- 121 Sui, Y., Clarke, T. & Khillan, J. S. **Limb bud progenitor cells induce differentiation of pluripotent embryonic stem cells into chondrogenic lineage.** *Differentiation* 71, 578-585 (2003).
- 122 Amariglio, N. *et al.* **Donor-Derived Brain Tumor Following Neural Stem Cell Transplantation in an Ataxia Telangiectasia Patient.** *PLoS Med* 6, e1000029 (2009).
- 123 Wakitani, S. *et al.* **Embryonic stem cells injected into the mouse knee joint form teratomas and subsequently destroy the joint.** *Rheumatology* 42, 162-165 (2003).
- 124 Lian, Q. *et al.* **Functional Mesenchymal Stem Cells Derived From Human Induced Pluripotent Stem Cells Attenuate Limb Ischemia in Mice.** *Circulation* 121, 1113-1123 (2010).
- 125 Lu, M.-C. *et al.* **Effects of Electrical Stimulation at Different Frequencies on Regeneration of Transected Peripheral Nerve.** *Neurorehabilitation and Neural Repair* 22, 367-373 (2008).
- 126 Sundelacruz, S., Levin, M. & Kaplan, D. L. **Membrane Potential Controls Adipogenic and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells.** *PLoS ONE* 3, e3737 (2008).
- 127 McCaig, C. D., Rajnicek, A. M., Song, B. & Zhao, M. **Controlling Cell Behavior Electrically: Current Views and Future Potential.** *Physiological Reviews* 85, 943-978 (2005).
- 128 Levin, M. **Bioelectric mechanisms in regeneration: Unique aspects and future perspectives.** *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20, 543-556 (2009).

- 129 Brookes, J. P. & Kumar, A. Comparative Aspects of Animal Regeneration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 24, 525-549 (2008).
- 130 King, M. W., Neff, A. W. & Mescher, A. L. The Developing *Xenopus* Limb as a Model for Studies on the Balance between Inflammation and Regeneration. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology* 295, 1552-1561 (2012).
- 131 Kato, K., Orii, H., Watanabe, K. & Agata, K. The role of dorsoventral interaction in the onset of planarian regeneration. *Development* 126, 1031-1040 (1999).
- 132 Suzuki, M., Satoh, A., Ide, H. & Tamura, K. Nerve-dependent and -independent events in blastema formation during *Xenopus* froglet limb regeneration. *Developmental Biology* 286, 361-375 (2005).
- 133 Satoh, A., Gardiner, D. M., Bryant, S. V. & Endo, T. Nerve-induced ectopic limb blastemas in the axolotl are equivalent to amputation-induced blastemas. *Developmental Biology* 312, 231-244 (2007).
- 134 Satoh, A., Graham, G. M. C., Bryant, S. V. & Gardiner, D. M. Neurotrophic regulation of epidermal dedifferentiation during wound healing and limb regeneration in the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Developmental Biology* 319, 321-335 (2008).
- 135 Satoh, A., Bryant, S. V. & Gardiner, D. M. Nerve signaling regulates basal keratinocyte proliferation in the blastema apical epithelial cap in the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Developmental Biology* 366, 374-381 (2012).
- 136 Satoh, A., Cummings, G. M. C., Bryant, S. V. & Gardiner, D. M. Regulation of proximal-distal intercalation during limb regeneration in the axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Development Growth & Differentiation* 52, 785-798 (2010).
- 137 Maden, M. Positional Information: Knowing Where You Are in a Limb. *Current biology : CB* 12, R773-R775 (2002).
- 138 Young, H. E. *et al.* Mesenchymal stem cells reside within the connective tissues of many organs. *Developmental Dynamics* 202, 137-144 (1995).
- 139 Caplan, A. I., Elyaderani, M., Mochizuki, Y., Wakitani, S. & Goldberg, V. M. Principles of cartilage repair and regeneration. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 254-269 (1997).
- 140 Deans, R. J. & Moseley, A. B. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. *Experimental hematology* 28, 875-884 (2000).
- 141 Dezawa, M., Takahashi, I., Esaki, M., Takano, M. & Sawada, H. Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrow stromal cells. *European Journal of Neuroscience* 14, 1771-1776 (2001).
- 142 Young, H. *et al.* Adult reserve stem cells and their potential for tissue engineering. *Cell Biochemistry and Biophysics* 40, 1-80 (2004).
- 143 Caplan, A. I. & Dennis, J. E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of Cellular Biochemistry* 98, 1076-1084 (2006).
- 144 Keilhoff, G., Stang, F., Goihl, A., Wolf, G. & Fansa, H. Transdifferentiated Mesenchymal Stem Cells as Alternative Therapy in Supporting Nerve Regeneration and Myelination. *Cell Mol Neurobiol* 26, 1233-1250 (2006).
- 145 Keilhoff, G. & Fansa, H. Mesenchymal stem cells for peripheral nerve regeneration—A real hope or just an empty promise? *Experimental Neurology* 232, 110-113 (2011).
- 146 Ladak, A., Olson, J., Tredget, E. E. & Gordon, T. Differentiation of mesenchymal stem cells to support peripheral nerve regeneration in a rat model. *Experimental Neurology* 228, 242-252 (2011).
- 147 Tickle, C. Limb Regeneration: Regenerating a limb poses the same problems of pattern formation as developing a limb, but the solutions are different. *American Scientist* 69, 639-646 (1981).
- 148 Galis, F., Wagner, G. P. & Jockusch, E. L. Why is limb regeneration possible in amphibians but not in reptiles, birds and mammals? *Evolution and Development* 5, 208-220 (2003).
- 149 Alber, M. *et al.* The Morphostatic Limit for a Model of Skeletal Pattern Formation in the Vertebrate Limb. *Bulletin of Mathematical Biology* 70, 460-483 (2008).
- 150 Mariani, F. V. Proximal to distal patterning during limb development and regeneration: a review of converging disciplines. *Regenerative Medicine* 5, 451-462, doi:10.2217/rme.10.27 (2010).
- 151 Ferretti, P. & Tickle, C. The Limbs in *Embryos, Genes and Birth Defects* eds Patrizia Ferretti, Andrew Copp, Cheryll Tickle, & Gudrun Moore Ch. 7, 123-166 (John Wiley & Sons, Ltd, 2006).
- 152 Daley, W. P., Peters, S. B. & Larsen, M. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *Journal of Cell Science* 121, 255-264 (2008).

- 153 Wang, Y. & Sassoon, D. Ectoderm-Mesenchyme and Mesenchyme-Mesenchyme Interactions Regulate *Msx-1* Expression and Cellular Differentiation in the Murine Limb Bud. *Developmental Biology* 168, 374-382 (1995).
- 154 Bani-Hani, A. H., Campbell, M. T., Meldrum, D. R. & Meldrum, K. K. Cytokines in Epithelial-Mesenchymal Transition: A New Insight Into Obstructive Nephropathy. *The Journal of urology* 180, 461-468 (2008).
- 155 Said, S., Parke, W. & Neufeld, D. A. Vascular supplies differ in regenerating and nonregenerating amputated rodent digits. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology* 278A, 443-449 (2004).
- 156 Mohammad, K. S. & Neufeld, D. A. Denervation retards but does not prevent toetip regeneration. *Wound Repair and Regeneration* 8, 277-281 (2000).
- 157 Fernando, W. A. *et al.* Wound healing and blastema formation in regenerating digit tips of adult mice. *Developmental Biology* 350, 301-310 (2011).
- 158 Panganiban, G. *et al.* The origin and evolution of animal appendages. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 5162-5166 (1997).
- 159 Feduccia, A. & McCrady, E. *Torrey's Morphogenesis of the Vertebrates*. 5th edn, 517 (John Wiley & Sons, 1991).
- 160 Soshnikova, N. *et al.* Genetic interaction between Wnt/ β -catenin and BMP receptor signaling during formation of the AER and the dorsal-ventral axis in the limb. *Genes & Development* 17, 1963-1968 (2003).
- 161 Steding, G. *The Anatomy of the Human Embryo. A Scanning Electron-Microscopic Atlas*. 516 (Karger, 2008).
- 162 Sears, K. E. Novel insights into the regulation of limb development from 'natural' mammalian mutants. Studies in 'non-traditional' mammalian models with very different limb morphologies and sizes can contribute to resolving general developmental mechanisms. *Bioessays* 33, 327-331 (2011).
- 163 Mackem, S. Limb Development in *Cell Signaling and Growth Factors in Development. From Molecules to Organogenesis* Vol. 2 eds Klaus Unsicker & Kerstin Kriegelstein Ch. 15, 523-618 (Willey-Vch Verlag, 2006).
- 164 Schoenwolf, G. C., Bleyl, S. B., Brauer, P. R. & Francis-West, P. H. Development of the Limbs in *Larsen's Human Embryology* Ch. 18, 616-644 (Churchill Livingstone, 2009).
- 165 Saunders Jr., J. W. & Gasseling, M. T. Ectodermal-Mesenchymal Interactions in the Origin of Limb Symmetry in *Epithelial-Mesenchymal Interactions* eds R. Fleishnajer & R. E. Billingham Ch. 5, 78-97 (Williams & Wilkins, 1968).
- 166 Takács, R., Matta, C., Somogyi, C., Juhász, T. & Zákány, R. Comparative Analysis of Osteogenic/Chondrogenic Differentiation Potential in Primary Limb Bud-Derived and C3H10T1/2 Cell Line-Based Mouse Micromass Cultures. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 16141-16167 (2013).
- 167 Saunders Jr, J. W. Is the Progress Zone Model a Victim of Progress? *Cell* 110, 541-543 (2002).
- 168 Tabin, C. & Wolpert, L. Rethinking the proximodistal axis of the vertebrate limb in the molecular era. *Genes & Development* 21, 1433-1442 (2007).
- 169 Jiao, F. *et al.* Human mesenchymal stem cells derived from limb bud can differentiate into all three embryonic germ layers lineages. *Cell Reprogram* 14, 324-333 (2012).
- 170 Duijf, P. H. G., van Bokhoven, H. & Brunner, H. G. Pathogenesis of split-hand/split-foot malformation. *Human Molecular Genetics* 12, R51-R60 (2003).
- 171 Zeller, R., Lopez-Rios, J. & Zuniga, A. Vertebrate limb bud development: moving towards integrative analysis of organogenesis. *Nat Rev Genet* 10, 845-858 (2009).
- 172 Fernandez-Teran, M. & Ros, M. A. The Apical Ectodermal Ridge: morphological aspects and signaling pathways. *Int J Dev Biol* 52, 857-871 (2008).
- 173 Huettl, R.-E., Soellner, H., Bianchi, E., Novitsch, B. G. & Huber, A. B. *Npn-1* Contributes to Axon-Axon Interactions That Differentially Control Sensory and Motor Innervation of the Limb. *PLoS Biol* 9, e1001020 (2011).
- 174 Galli, A. *et al.* Distinct Roles of *Hand2* in Initiating Polarity and Posterior *Shh* Expression during the Onset of Mouse Limb Bud Development. *PLoS Genet* 6, e1000901 (2010).
- 175 Gilbert, S. F. *Developmental Biology*. 9th edn, 711 (Sinauer Associates, 2010).
- 176 Schneider, R. A. Neural Crest Can Form Cartilages Normally Derived from Mesoderm during Development of the Avian Head Skeleton. *Developmental Biology* 208, 441-455 (1999).

177 Grillner, S. **Human Locomotor Circuits Conform.** *Science* 334, 912-913, doi:10.1126/science.1214778 (2011).

178 Dominici, N. *et al.* **Locomotor Primitives in Newborn Babies and Their Development.** *Science* 334, 997-999, doi:10.1126/science.1210617 (2011).

179 Wake, M. H. **Tetrapod Limbless Locomotion.** *eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.* (2001).

180 Bennett, M. B. **Tetrapod Walking and Running.** *eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester* (2001).

181 Luria, V., Krawchuk, D., Jessell, T. M., Laufer, E. & Kania, A. **Specification of Motor Axon Trajectory by Ephrin-B:EphB Signaling: Symmetrical Control of Axonal Patterning in the Developing Limb.** *Neuron* 60, 1039-1053 (2008).

182 Haupt, C., Kloos, K., Faus-Kessler, T. & Huber, A. B. **Semaphorin 3A-Neuropilin-1 signaling regulates peripheral axon fasciculation and pathfinding but not developmental cell death patterns.** *European Journal of Neuroscience* 31, 1164-1172 (2010).

183 Ohuchi, H. & Noji, S. **Fibroblast-growth-factor-induced additional limbs in the study of initiation of limb formation, limb identity, myogenesis and innervation.** *Cell Tissue Res* 296, 45-56 (1999).

184 Wang, G. & Scott, S. A. **Independent Development of Sensory and Motor Innervation Patterns in Embryonic Chick Hindlimbs.** *Developmental Biology* 208, 324-336, (1999).

185 Landmesser, L. & Honig, M. G. **Altered sensory projections in the chick hind limb following the early removal of motoneurons.** *Developmental Biology* 118, 511-531 (1986).

186 Mukouyama, Y.-s., Shin, D., Britsch, S., Taniguchi, M. & Anderson, D. J. **Sensory Nerves Determine the Pattern of Arterial Differentiation and Blood Vessel Branching in the Skin.** *Cell* 109, 693-705 (2002).

187 Adams, R. H. & Eichmann, A. **Axon Guidance Molecules in Vascular Patterning in Neuronal Guidance.** *The Biology of Brain Wiring* eds Marc Tessier-Lavigne & Alex L. Kolodin) 369-386 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2011).

188 Diaz-Mendoza, M. J., Lorda-Diez, C. I., Montero, J. A., Garcia-Porrero, J. A. & Hurler, J. M. **Interdigital cell death in the embryonic limb is associated with depletion of Reelin in the extracellular matrix.** *Cell Death Dis* 4, e800 (2013).

189 Diaz-Mendoza, M. J., Lorda-Diez, C. I., Montero, J. A., Garcia-Porrero, J. A. & Hurler, J. M. **Reelin/DAB-1 Signaling in the Embryonic Limb Regulates the Chondrogenic Differentiation of Digit Mesodermal Progenitors.** *Journal of Cellular Physiology*, n/a-n/a (2014).

190 Bar, I. & Goffinet, A. M. **Developmental neurobiology: Decoding the Reelin signal.** *Nature* 399, 645-646 (1999).

191 Lambert de Rouvroit, C. *et al.* **Reelin, the Extracellular Matrix Protein Deficient in Reeler Mutant Mice, Is Processed by a Metalloproteinase.** *Experimental Neurology* 156, 214-217 (1999).

192 Bouche, E. *et al.* **Reelin induces EphB activation.** *Cell Res* 23, 473-490 (2013).

193 Pearse Ii, R. V., Scherz, P. J., Campbell, J. K. & Tabin, C. J. **A cellular lineage analysis of the chick limb bud.** *Developmental Biology* 310, 388-400 (2007).

194 Rieger, S. & Sagasti, A. **Hydrogen Peroxide Promotes Injury-Induced Peripheral Sensory Axon Regeneration in the Zebrafish Skin.** *PLoS Biol* 9, e1000621 (2011).

195 Tassava, R. A. & Olsen, C. L. **Higher Vertebrates Do Not Regenerate Digits and Legs Because the Wound Epidermis Is Not Functional: A Hypothesis.** *Differentiation* 22, 151-155 (1982).

196 Call, M. K. & Tsonis, P. A. **Vertebrate Limb Regeneration in Regenerative Medicine I: Theories, Models and Methods** Vol. 93 *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 67-81 (2005).

197 Yannas, I. V. **The Irreversibility of Injury in Tissue and Organ Regeneration in Adults** (ed Springer-Verlag) Ch. Chapter 1, 1-25 (2001).

198 Wojcik, S. M., Bundman, D. S. & Roop, D. R. **Delayed Wound Healing in Keratin 6a Knockout Mice.** *Mol. Cell. Biol.* 20, 5248-5255 (2000).

199 Wong, P. & Coulombe, P. A. **Loss of keratin 6 (K6) proteins reveals a function for intermediate filaments during wound repair.** *The Journal of Cell Biology* 163, 327-337, doi:10.1083/jcb.200305032 (2003).

200 Alibardi, L. & Toni, M. **Wound keratins in the regenerating epidermis of lizard suggest that the wound reaction is similar in the tail and limb.** *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology* 303A, 845-860 (2005).

201 Stojadinovic, O. *et al.* **Molecular Pathogenesis of Chronic Wounds: The Role of β -Catenin and c-myc in the Inhibition of Epithelialization and Wound Healing.** *The American journal of pathology* 167, 59-69 (2005).

- 202 Satoh, A., makanae, A., Hirata, A. & Satou, Y. Blastema induction in aneurogenic state and Prrx-1
regulation by MMPs and FGFs in *Ambystoma mexicanum* limb regeneration. *Developmental Biology*
355, 263-274 (2011).
- 203 Christensen, R. N., Weinstein, M. & Tassava, R. A. Expression of fibroblast growth factors 4, 8, and 10
in limbs, flanks, and blastemas of *Ambystoma*. *Developmental Dynamics* 223, 193-203 (2002).
- 204 Han, M.-J., An, J.-Y. & Kim, W.-S. Expression patterns of Fgf-8 during development and limb
regeneration of the axolotl. *Developmental Dynamics* 220, 40-48 (2001).
- 205 Yokoyama, H., Ide, H. & Tamura, K. FGF-10 Stimulates Limb Regeneration Ability in *Xenopus laevis*.
Developmental Biology 233, 72-79 (2001).
- 206 Christensen, R. N., Weinstein, M. & Tassava, R. A. Fibroblast growth factors in regenerating limbs of
Ambystoma: Cloning and semi-quantitative RT-PCR expression studies. *Journal of Experimental*
Zoology 290, 529-540 (2001).
- 207 Mullen, L. M., Bryant, S. V., Torok, M. A., Blumberg, B. & Gardiner, D. M. Nerve dependency of
regeneration: the role of Distal-less and FGF signaling in amphibian limb regeneration. *Development*
122, 3487-3497 (1996).
- 208 Yang, E. V., Gardiner, D. M., Carlson, M. R. J., Nugas, C. A. & Bryant, S. V. Expression of Mmp-9 and
related matrix metalloproteinase genes during axolotl limb regeneration. *Developmental Dynamics* 216,
2-9 (1999).
- 209 Zhou, Z. *et al.* Impaired endochondral ossification and angiogenesis in mice deficient in membrane-
type matrix metalloproteinase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 4052-4057 (2000).
- 210 Heissig, B. *et al.* Recruitment of Stem and Progenitor Cells from the Bone Marrow Niche Requires
MMP-9 Mediated Release of Kit-Ligand. *Cell* 109, 625-637 (2002).
- 211 Kato, T. *et al.* Unique expression patterns of matrix metalloproteinases in regenerating newt limbs.
Developmental Dynamics 226, 366-376 (2003).
- 212 Heber-Katz, E., Leferovich, J. M., Bedelbaeva, K. & Gourevitch, D. Vol. 280 *Current Topics in Microbiology*
and Immunology (ed Ellen Heber-Katz) 165-189 (Springer Berlin Heidelberg, 2004).
- 213 Mannello, F., Tonti, G. A. M., Bagnara, G. P. & Papa, S. Role and Function of Matrix
Metalloproteinases in the Differentiation and Biological Characterization of Mesenchymal Stem
Cells. *STEM CELLS* 24, 475-481 (2006).
- 214 Djouad, F. *et al.* Microenvironmental changes during differentiation of mesenchymal stem cells
towards chondrocytes. *Arthritis Research & Therapy* 9, R33 (2007).
- 215 Heber-Katz, E. & Gourevitch, D. The Relationship between Inflammation and Regeneration in the
MRL Mouse. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1172, 110-114 (2009).
- 216 Santosh, N. *et al.* Matrix metalloproteinase expression during blastema formation in regeneration-
competent versus regeneration-deficient amphibian limbs. *Developmental Dynamics* 240, 1127-1141
(2011).
- 217 Egea, V. *et al.* Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) regulates mesenchymal stem cells
through let-7f microRNA and Wnt/ β -catenin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109,
E309-E316 (2012).
- 218 Mitten, E. K., Jing, D. & Suzuki, Y. Matrix metalloproteinases (MMPs) are required for wound
closure and healing during larval leg regeneration in the flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect*
Biochemistry and Molecular Biology 42, 854-864 (2012).
- 219 Johnson, L. D. & Pierce, G. B. Changes in antigenicity of basement membrane during wound healing.
Developmental Biology 23, 534-549 (1970).
- 220 Giampaoli, S. *et al.* Expression of FGF2 in the limb blastema of two Salamandridae correlates with
their regenerative capability. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 270, 2197-
2205 (2003).
- 221 Takeo, M. *et al.* Wnt activation in nail epithelium couples nail growth to digit regeneration. *Nature*
499, 228-232 (2013).
- 222 Neufeld, D. A. Partial blastema formation after amputation in adult mice. *Journal of Experimental Zoology*
212, 31-36 (1980).
- 223 Saxena, S. *et al.* Proteomic Analysis of Zebrafish Caudal Fin Regeneration. *Molecular & Cellular*
Proteomics 11 (2012).

- 224 Maki, N. *et al.* Expression of stem cell pluripotency factors during regeneration in newts. *Developmental Dynamics* 238, 1613-1616 (2009).
- 225 Li, C. Deer Antler Regeneration: A Stem Cell-Based Epimorphic Process. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* 96, 51-62 (2012).
- 226 Maden, M. The regeneration of positional information in the amphibian limb. *Journal of Theoretical Biology* 69, 735-753 (1977).
- 227 Onda, H., Goldhamer, D. J. & Tassava, R. A. An extracellular matrix molecule of newt and axolotl regenerating limb blastemas and embryonic limb buds: immunological relationship of MT1 antigen with tenascin. *Development* 108, 657-668 (1990).
- 228 Desbiens, X. Vertebrate limb bud development and regeneration. *Annales Des Sciences Naturelles-Zoologie Et Biologie Animale* 17, 51-64 (1996).
- 229 Tamura, K., Ohgo, S. & Yokoyama, H. Limb blastema cell: A stem cell for morphological regeneration. *Development Growth & Differentiation* 52, 89-99 (2010).
- 230 Tweedell, K. S. The Urodele Limb Regeneration Blastema: The Cell Potential. *TheScientificWorldJournal* 10, 954-971 (2010).
- 231 Odelberg, S. J. Inducing cellular dedifferentiation: a potential method for enhancing endogenous regeneration in mammals. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 13, 335-343 (2002).
- 232 Odelberg, S. J. Cellular plasticity in vertebrate regeneration. *The Anatomical Record Part B: The New Anatomist* 287B, 25-35 (2005).
- 233 Tanaka, Elly M. & Reddien, Peter W. The Cellular Basis for Animal Regeneration. *Developmental cell* 21, 172-185 (2011).
- 234 King, R. S. & Newmark, P. A. The cell biology of regeneration. *The Journal of Cell Biology* 196, 553-562 (2012).
- 235 Saló, E. & Baguña, J. Stimulation of cellular proliferation and differentiation in the intact and regenerating planarian *Dugesia(G) tigrina* by the neuropeptide substance P. *Journal of Experimental Zoology* 237, 129-135 (1986).
- 236 Globus, M. & Alles, P. A search for immunoreactive substance P and other neural peptides in the limb regenerate of the newt *Notophthalmus viridescens*. *Journal of Experimental Zoology* 254, 165-176 (1990).
- 237 Smith, M. J., Globus, M. & Vethamany-Globus, S. Nerve Extracts and Substance P Activate the Phosphatidylinositol Signaling Pathway and Mitogenesis in Newt Forelimb Regenerates. *Developmental Biology* 167, 239-251 (1995).
- 238 Entschladen, F., Drell, T. L., Lang, K., Joseph, J. & Zaenker, K. S. Tumour-cell migration, invasion, and metastasis: navigation by neurotransmitters. *The Lancet Oncology* 5, 254-258 (2004).
- 239 Lindsay, R., Lockett, C., Sternberg, J. & Winter, J. Neuropeptide expression in cultures of adult sensory neurons: modulation of substance P and calcitonin gene-related peptide levels by nerve growth factor. *Neuroscience* 33, 53-65 (1989).
- 240 Brockes, J. P. & Kintner, C. R. Glial growth factor and nerve-dependent proliferation in the regeneration blastema of urodele amphibians. *Cell* 45, 301-306 (1986).
- 241 Chew, K. E. & Cameron, J. A. Increase in mitotic activity of regenerating axolotl limbs by growth factor-impregnated implants. *Journal of Experimental Zoology* 226, 325-329 (1983).
- 242 Albert, P., Boilly, B., Courty, J. & Barritault, D. Stimulation in cell culture of mesenchymal cells of newt limb blastemas by EDGF I or II (basic or acidic FGF). *Cell Differentiation* 21, 63-68 (1987).
- 243 Zenjari, C., Boilly, B., Hondermarck, H. & Boilly-Marer, Y. Nerve-blastema interactions induce fibroblast growth factor-1 release during limb regeneration in *Pleurodeles waltl*. *Development, Growth & Differentiation* 39, 15-22 (1997).
- 244 Globus, M., Vethamany-Globus, S. & Lee, Y. C. I. Effect of apical epidermal cap on mitotic cycle and cartilage differentiation in regeneration blastemata in the newt, *Notophthalmus viridescens*. *Developmental Biology* 75, 358-372 (1980).
- 245 Reiter, R. S. & Solursh, M. Mitogenic property of the apical ectodermal ridge. *Developmental Biology* 93, 28-35 (1982).
- 246 Atari, M. *et al.* Dental pulp of the third molar: a new source of pluripotent-like stem cells. *Journal of Cell Science* 125, 3343-3356 (2012).

- 247 Lopatina, T. *et al.* Adipose-Derived Stem Cells Stimulate Regeneration of Peripheral Nerves: BDNF
Secreted by These Cells Promotes Nerve Healing and Axon Growth *De Novo*. *PLoS ONE* 6, e17899
(2011).
- 248 Caplan, A. I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine.
Journal of Cellular Physiology 213, 341-347 (2007).
- 249 Nair, A. *et al.* Biomaterial implants mediate autologous stem cell recruitment in mice. *Acta Biomaterialia*
7, 3887-3895 (2011).
- 250 Reyes, M. & Verfaillie, C. M. Characterization of Multipotent Adult Progenitor Cells, a
Subpopulation of Mesenchymal Stem Cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 938, 231-235 (2001).
- 251 Oliveira, J. T. *et al.* Mesenchymal stem cells in a polycaprolactone conduit enhance median-nerve
regeneration, prevent decrease of creatine phosphokinase levels in muscle, and improve functional
recovery in mice. *Neuroscience* 170, 1295-1303 (2010).
- 252 Pfister, L. A., Papaloizos, M., Merkle, H. P. & Gander, B. Nerve conduits and growth factor delivery in
peripheral nerve repair. *Journal of the Peripheral Nervous System* 12, 65-82 (2007).
- 253 Chang, C.-H. *et al.* Tissue engineering-based cartilage repair with mesenchymal stem cells in a
porcine model. *Journal of Orthopaedic Research*, n/a-n/a (2011).
- 254 Caplan, A. I. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *The Journal of Pathology* 217, 318-324
(2009).
- 255 Hyun, J. S. *et al.* Rethinking the Blastema. *Plastic and Reconstructive Surgery* 129, 1097-1103 (2012).
- 256 Semer, N. B. Nerve and Vascular Injuries of the Hand in *Practical Plastic Surgery for Nonsurgeons* (ed
Nadine B. Semer) Ch. 33, 313-319 (Hanley & Belfus, Inc., 2001).
- 257 Kumar, A., Godwin, J. W., Gates, P. B., Garza-Garcia, A. A. & Brookes, J. P. Molecular Basis for the
Nerve Dependence of Limb Regeneration in an Adult Vertebrate. *Science* 318, 772-777 (2007).
- 258 Harsum, S., Clarke, J. D. W. & Martin, P. A Reciprocal Relationship between Cutaneous Nerves and
Repairing Skin Wounds in the Developing Chick Embryo. *Developmental Biology* 238, 27-39 (2001).
- 259 Singer, M., Weckesser, E. C., Géraudie, J., Maier, C. E. & Singer, J. Open finger tip healing and
replacement after distal amputation in Rhesus monkey with comparison to limb regeneration in
lower vertebrates. *Anat Embryol* 177, 29-36 (1987).
- 260 Richmond, M. J. & Pollack, E. D. Regulation of tadpole spinal nerve fiber growth by the regenerating
limb blastema in tissue culture. *Journal of Experimental Zoology* 225, 233-242 (1983).
- 261 Libbin, R. M. *et al.* Partial regeneration of the above-elbow amputated rat forelimb. II. Electrical and
mechanical facilitation. *Journal of Morphology* 159, 439-451 (1979).
- 262 Person, P., Libbin, R. M., Shah, D. & Papierman, S. Partial regeneration of the above-elbow amputated
rat forelimb. I. Innate responses. *Journal of Morphology* 159, 427-437 (1979).
- 263 Fowler, I. & Siskin, B. F. Effect of augmentation of nerve supply upon limb regeneration in the chick
embryo. *Journal of Experimental Zoology* 221, 49-59 (1982).
- 264 Siskin, B. F., Fowler, I. & Romm, S. Response of amputated rat limbs to fetal nerve tissue implants
and direct current. *Journal of Orthopaedic Research* 2, 177-189 (1984).
- 265 Mizell, M. Limb Regeneration: Induction in the Newborn Opossum. *Science* 161, 283-286 (1968).
- 266 Mizell, M. & Isaacs, J. J. Induced Regeneration of Hindlimbs in the Newborn Opossum. *American
Zoologist* 10, 141-155 (1970).
- 267 Simpson, S. B. Induction of Limb Regeneration in the Lizard, *Lygosoma laterale*, by Augmentation of
the Nerve Supply. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology
and Medicine (New York, N.Y.)* 107, 108-111 (1961).
- 268 Singer, M. & Géraudie, J. The neurotrophic phenomenon: its history during limb regeneration in the
newt in *A history of regeneration research: milestones in the evolution of a science* (ed Charles E. Dismore) Ch. 7,
101-112 (Cambridge University Press, 1991).
- 269 Rzehak, K. & Singer, M. The number of nerve fibers in the limb of the mouse and its relation to
regenerative capacity. *The Anatomical Record* 155, 537-540 (1966).
- 270 Scadding, S. R. Can differences in limb regeneration ability between amphibian species be explained
by differences in quantity of innervation? *Journal of Experimental Zoology* 219, 81-85 (1982).
- 271 Xu, Q.-G. & Zochodne, D. W. Ischemia and failed regeneration in chronic experimental neuromas.
Brain Research 946, 24-30 (2002).

- 272 Price, J. & Allen, S. Exploring the mechanisms regulating regeneration of deer antlers. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 359, 809-822 (2004).
- 273 Li, C. & Suttie, J. M. Deer antlerogenic periosteum: a piece of postnatally retained embryonic tissue? *Anat Embryol* 204, 375-388 (2001).
- 274 Mount, J. G. *et al.* Evidence that the canonical Wnt signalling pathway regulates deer antler regeneration. *Developmental Dynamics* 235, 1390-1399 (2006).
- 275 Allen, S. P., Maden, M. & Price, J. S. A Role for Retinoic Acid in Regulating the Regeneration of Deer Antlers. *Developmental Biology* 251, 409-423 (2002).
- 276 Price, J., Faucheux, C. & Allen, S. Deer antlers as a model of mammalian regeneration in *Current Topics in Developmental Biology*, Vol 67 Vol. 67 *Current Topics in Developmental Biology* 1-48 (2005).
- 277 Li, C. *et al.* Nerve Growth Factor mRNA Expression in the Regenerating Antler Tip of Red Deer (*Cervus elaphus*). *PLoS ONE* 2, e148 (2007).
- 278 Wislocki, G. B. & Singer, M. The occurrence and function of nerves in the growing antlers of deer. *The Journal of Comparative Neurology* 85, 1-19 (1946).
- 279 Lehoczky, J. A., Robert, B. & Tabin, C. J. Mouse digit tip regeneration is mediated by fate-restricted progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 20609-20614 (2011).
- 280 Han, M., Yang, X., Lee, J., Allan, C. H. & Muneoka, K. Development and regeneration of the neonatal digit tip in mice. *Developmental Biology* 315, 125-135 (2008).
- 281 Muller, T. L. *et al.* Regeneration in higher vertebrates: Limb buds and digit tips. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 10, 405-413 (1999).
- 282 Muneoka, K. Regeneration of higher vertebrate limbs: Developing a roadmap. *Faseb Journal* 19, A1357-A1357 (2005).
- 283 Yu, L. *et al.* BMP signaling induces digit regeneration in neonatal mice. *Development* 137, 551-559 (2010).
- 284 Poss, K. D. Advances in understanding tissue regenerative capacity and mechanisms in animals. *Nat Rev Genet* 11, 710-722 (2010).
- 285 Dinsmore, C. E. *A history of regeneration research: milestones in the evolution of a science* (Cambridge University Press, New York, 1991).
- 286 Tsonis, P. A. & Fox, T. P. Regeneration according to Spallanzani. *Developmental Dynamics* 238, 2357-2363, (2009).
- 287 Allan, C. H. *et al.* Tissue response and Msx1 expression after human fetal digit tip amputation in vitro. *Wound Repair and Regeneration* 14, 398-404 (2006).
- 288 Cai, J. & Ma, L. Msx2 and Foxn1 regulate nail homeostasis. *genesis* 49, 449-459 (2011).
- 289 Neufeld, D. A. & Zhao, W. Bone regrowth after digit tip amputation in mice is equivalent in adults and neonates. *Wound Repair and Regeneration* 3, 461-466 (1995).
- 290 Bier, E. & McGinnis, W. Model Organisms in the Study of Development and Disease in *Inborn Errors of Development. The Molecular Basis of Clinical Disorders of Morphogenesis* eds Charles J. Epstein, Robert P. Erickson, & Anthony Wynshaw-Boris) Ch. 3, 25-48 (Oxford University Press, 2008).
- 291 Fleckman, P., Jaeger, K., Silva, K. A. & Sundberg, J. P. Comparative Anatomy of Mouse and Human Nail Units. *The Anatomical Record* 296, 521-532 (2013).
- 292 Zhao, W. *Bone regrowth in vivo and in vitro following digit-tip amputation in mice* Doctor of Philosophy thesis, The University of South Dakota, (1983).
- 293 Zhao, W. & Neufeld, D. Bone regeneration after amputation stimulated by basic fibroblast growth factor in vitro. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* 32, 63-65 (1996).
- 294 Taylor, A. J. & Beck, C. W. Histone deacetylases are required for amphibian tail and limb regeneration but not development. *Mechanisms of Development* 129, 208-218, (2012).
- 295 Zhao, W. & Neufeld, D. A. Bone regrowth in young mice stimulated by nail organ. *Journal of Experimental Zoology* 271, 155-159 (1995).
- 296 Han, M. J., Yang, X. D., Farrington, J. E. & Muneoka, K. Digit regeneration is regulated by Msx1 and BMP4 in fetal mice. *Development* 130, 5123-5132 (2003).
- 297 Odelberg, S. J., Kollhoff, A. & Keating, M. T. Dedifferentiation of Mammalian Myotubes Induced by msx1. *Cell* 103, 1099-1109 (2000).
- 298 Kawakami, Y. *et al.* Wnt/ β -catenin signaling regulates vertebrate limb regeneration. *Genes & Development* 20, 3232-3237 (2006).

- 299 Yokoyama, H., Ogino, H., Stoick-Cooper, C. L., Grainger, R. M. & Moon, R. T. **Wnt/[beta]-catenin signaling has an essential role in the initiation of limb regeneration.** *Developmental Biology* 306, 170-178 (2007).
- 300 Stocum, D. L. **The role of peripheral nerves in urodele limb regeneration.** *European Journal of Neuroscience* 34, 908-916 (2011).
- 301 Stocum, D. L. **Regeneration of the Urodele Limb in *c*LS** (John Wiley & Sons, Ltd, 2001).
- 302 Smith, M. D., Healy, E., Thompson, V., Morley, A. & Rees, J. L. **Use of in situ detection of histone mRNA in the assessment of epidermal proliferation: comparison with the Ki67 antigen and BrdU incorporation.** *British Journal of Dermatology* 132, 359-366 (1995).
- 303 Rice, F., Kinnman, E., Aldskogius, H., Johansson, O. & Arvidsson, J. **The innervation of the mystacial pad of the rat as revealed by PGP 9.5 immunofluorescence.** *J Comp Neurol.* 337, 366-385 (1993).
- 304 Ann, E., Mizoguchi, A., Okajima, S. & Ide, C. **Motor axon terminal regeneration as studied by protein gene product 9.5 immunohistochemistry in the rat.** *Arch Histol Cytol.* 57, 317-330 (1994).
- 305 Lundberg, L., Alm, P., Wharton, J. & Polak, J. **Protein gene product 9.5 (PGP 9.5). A new neuronal marker visualizing the whole uterine innervation and pregnancy-induced and developmental changes in the guinea pig.** *Histochemistry* 90, 9-17 (1988).
- 306 Netter, F. H. *Atlas de Anatomía Humana.* 3 edn, (Icon Learning Systems, 2003).
- 307 Yan, R. H. Y., Bunning, M., Wahlsten, D. & Hurd, P. L. **Digit Ratio (2D:4D) Differences between 20 Strains of Inbred Mice.** *PLoS ONE* 4, e5801 (2009).
- 308 Simkin, J., Han, M., Yu, L., Yan, M. & Muneoka, K. **The Mouse Digit Tip: From Wound Healing to Regeneration in Wound Regeneration and Repair** Vol. 1037 *Methods in Molecular Biology* eds Robert G. Gourdie & Tereance A. Myers) Ch. 24, 419-435 (Humana Press, 2013).
- 309 Conboy, I. M. *et al.* **Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment.** *Nature* 433, 760-764 (2005).
- 310 Bryant, S. V., Endo, T. & Gardiner, D. M. **Vertebrate limb regeneration and the origin of limb stem cells.** *International Journal of Developmental Biology* 46, 887-896 (2002).
- 311 Han, M. *et al.* **Limb regeneration in higher vertebrates: Developing a roadmap.** *The Anatomical Record Part B: The New Anatomist* 287B, 14-24 (2005).
- 312 Mescher, A. L., White, G. W. & Brokaw, J. J. **Apoptosis in regenerating and denervated, nonregenerating urodele forelimbs.** *Wound Repair and Regeneration* 8, 110-116 (2000).
- 313 Stocum, D. L. **Amphibian Regeneration and Stem Cells Regeneration: Stem Cells and Beyond.** *Current Topics in Microbiology and Immunology* 280, 1-70 (2004).
- 314 Mchedlishvili, L. *et al.* **Reconstitution of the central and peripheral nervous system during salamander tail regeneration.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, E2258-E2266 (2012).
- 315 Cass, D. T. & Mark, R. F. **Re-Innervation of Axolotl Limbs. I. Motor Nerves.** *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences* 190, 45-58 (1975).
- 316 Johnston, B. T., Schrameck, J. E. & Mark, R. F. **Re-Innervation of Axolotl Limbs. II. Sensory Nerves.** *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences* 190, 59-75 (1975).
- 317 Kumar, A. & Brockes, J. P. **Nerve dependence in tissue, organ, and appendage regeneration.** *Trends in neurosciences* 35, 691-699 (2012).
- 318 Coderre, T. J., Grimes, R. W. & Melzack, R. **Deafferentation and chronic pain in animals: An evaluation of evidence suggesting autotomy is related to pain.** *Pain* 26, 61-84 (1986).
- 319 Kauppila, T. **Nerve Resuturation Decreases Autotomy in the Rat.** *Experimental Neurology* 125, 106-110 (1994).
- 320 Abad, F., Feria, M., Sánchez, A. & González Mora, J. L. **Autotomy in rats following peripheral nerve transection is attenuated by preceding formalin injections into the same limb.** *Neuroscience Letters* 243, 125-128 (1998).
- 321 Henderson, J., Terenghi, G., McGrouther, D. A. & Ferguson, M. W. J. **The reinnervation pattern of wounds and scars may explain their sensory symptoms.** *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery* 59, 942-950 (2006).
- 322 Taylor, K. S., Anastakis, D. J. & Davis, K. D. **Cutting your nerve changes your brain.** *Brain* 132, 3122-3133 (2009).
- 323 Krarup, C., Upton, J. & Creager, M. A. **Nerve regeneration and reinnervation after limb amputation and replantation: Clinical and physiological findings.** *Muscle & Nerve* 13, 291-304 (1990).

- 324 Murawala, P., Tanaka, E. M. & Currie, J. D. Regeneration: The ultimate example of wound healing. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 23, 954-962 (2012).
- 325 Bauduin, B., Lassalle, B. & Boilly, B. Stimulation of axon growth from the spinal cord by a regenerating limb blastema in newts. *Developmental Brain Research* 119, 47-54 (2000).
- 326 Aaronson, O. S., Golding, J. P. & Tonge, D. A. Oriented growth of regenerating axons in axolotl forelimbs is consistent with guidance by diffusible factors from distal nerve stumps. *Neuroscience* 66, 201-213 (1995).
- 327 Tonge, D. A. & Leclere, P. G. Directed axonal growth towards axolotl limb blastemas in vitro. *Neuroscience* 100, 201-211 (2000).
- 328 Schlosser, S. *et al.* Paracrine effects of mesenchymal stem cells enhance vascular regeneration in ischemic murine skin. *Microvascular Research* 83, 267-275 (2012).
- 329 Cuevas, P. *et al.* Peripheral nerve regeneration by bone marrow stromal cells. *Neurological Research* 24, 634-638 (2002).
- 330 Ferretti, P. *Regeneration of Vertebrate Appendages*. eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester., (2006).
- 331 Iten, L. & Bryant, S. Forelimb regeneration from different levels of amputation in the newt, *Notophthalmus viridescens*: Length, rate, and stages. *W. Roux' Archiv f. Entwicklungsmechanik* 173, 263-282 (1973).
- 332 Patton, J. T. & Kaufman, M. H. The timing of ossification of the limb bones, and growth rates of various long bones of the fore and hind limbs of the prenatal and early postnatal laboratory mouse. *Journal of Anatomy* 186, 175-185 (1995).
- 333 Vachon, P. Anatomical and histological observations of fore- and hind limb toes in adult mice after amputations performed at the age of two weeks. *Canadian Journal of Veterinary Research* 62, 311-313 (1998).
- 334 Hamzeh, H. *et al.* Expression of PGP9.5 on Langerhans' cells and their precursors. *Acta Derm Venereol* 80, 14-16 (2000).
- 335 Scott, J. R. *et al.* Topical substance P increases inflammatory cell density in genetically diabetic murine wounds. *Wound Repair and Regeneration* 16, 529-533 (2008).
- 336 Falanga, V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *The Lancet* 366, 1736-1743 (2005).
- 337 Han, M. & Muneoka, K. The role of *Msx1* and *Bmp4* in digit tip regeneration of mice. *Developmental Biology* 235, 127 (2001).
- 338 Buckley, G., Metcalfe, A. D. & Ferguson, M. W. J. Peripheral nerve regeneration in the MRL/MpJ ear wound model. *Journal of Anatomy* 218, 163-172 (2011).
- 339 Ochs, S. *Nerve Regeneration in A History of Nerve Functions. From Animal Spirits to Molecular Mechanisms* Ch. 9, 169-186 (Cambridge University Press, 2004).
- 340 Rotshenker, S. Wallerian degeneration: the innate-immune response to traumatic nerve injury. *Journal of Neuroinflammation* 8, 109 (2011).
- 341 Neufeld, D. A. Epidermis, basement membrane, and connective-tissue healing after amputation of mouse digits: Implications for mammalian appendage regeneration. *The Anatomical Record* 223, 425-432 (1989).
- 342 Christen, B., Robles, V., Raya, M., Paramonov, I. & Belmonte, J. Regeneration and reprogramming compared. *BMC Biology* 8, 5 (2010).
- 343 Graham, V., Khudyakov, J., Ellis, P. & Pevny, L. SOX2 Functions to Maintain Neural Progenitor Identity. *Neuron* 39, 749-765 (2003).
- 344 Okubo, T., Pevny, L. H. & Hogan, B. L. M. Sox2 is required for development of taste bud sensory cells. *Genes & Development* 20, 2654-2659 1457106 (2006).
- 345 Kiernan, A. E. *et al.* Sox2 is required for sensory organ development in the mammalian inner ear. *Nature* 434, 1031-1035 (2005).
- 346 Surzenko, N., Crowl, T., Bachleda, A., Langer, L. & Pevny, L. SOX2 maintains the quiescent progenitor cell state of postnatal retinal Müller glia. *Development* 140, 1445-1456 (2013).
- 347 Brockes, J. P., Fryxell, K. J. & Lemke, G. E. Studies on cultured Schwann cells: the induction of myelin synthesis, and the control of their proliferation by a new growth factor. *Journal of Experimental Biology* 95, 215-230 (1981).
- 348 Rege, T. A. & Hagoood, J. S. Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. *The FASEB Journal* 20, 1045-1054 (2006).

- 349 Nakamura, H. *et al.* Localization of Thy-1-positive Cells in the Perichondrium During Endochondral
Ossification. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 58, 455-462 (2010).
- 350 Iwamoto, M. *et al.* Expression and role of c-myc in chondrocytes undergoing endochondral
ossification. *Journal of Biological Chemistry* 268, 9645-9652 (1993).
- 351 Arnold, I. & Watt, F. M. c-Myc activation in transgenic mouse epidermis results in mobilization of
stem cells and differentiation of their progeny. *Current Biology* 11, 558-568 (2001).
- 352 Waikel, R. L., Kawachi, Y., Waikel, P. A., Wang, X.-J. & Roop, D. R. Deregulated expression of c-Myc
depletes epidermal stem cells. *Nat Genet* 28, 165-168 (2001).
- 353 Fonsatti, E., Altomonte, M., Nicotra, M. R., Natali, P. G. & Maio, M. Endoglin (CD105): a powerful
therapeutic target on tumor-associated angiogenic blood vessels. *Oncogene* 22, 6557-6563 (2003).
- 354 Yoon, D. S., Kim, Y. H., Jung, H. S., Paik, S. & Lee, J. W. Importance of Sox2 in maintenance of cell
proliferation and multipotency of mesenchymal stem cells in low-density culture. *Cell Proliferation* 44,
428-440 (2011).
- 355 Seo, E. *et al.* SOX2 Regulates YAP1 to Maintain Stemness and Determine Cell Fate in the Osteo-
Adipo Lineage. *Cell Reports* 3, 2075-2087 (2013).
- 356 Sancho-Martinez, I., Baek, S. H. & Izpisua Belmonte, J. C. Lineage conversion methodologies meet the
reprogramming toolbox. *Nat Cell Biol* 14, 892-899 (2012).
- 357 Martínez-Martínez, E., Galván-Hernández, C. I., Toscano-Márquez, B. & Gutiérrez-Ospina, G.
Modulatory Role of Sensory Innervation on Hair Follicle Stem Cell Progeny during Wound Healing
of the Rat Skin. *PLoS ONE* 7, e36421 (2012).
- 358 Bulut, K. *et al.* Sensory neuropeptides and epithelial cell restitution: the relevance of SP- and CGRP-
stimulated mast cells. *International Journal of Colorectal Disease* 23, 535-541 (2008).
- 359 Delgado, A. V., McManus, A. T. & Chambers, J. P. Exogenous Administration of Substance P Enhances
Wound Healing in a Novel Skin-Injury Model. *Experimental Biology and Medicine* 230, 271-280 (2005).
- 360 Felderbauer, P. *et al.* Substance P induces intestinal wound healing via fibroblasts—evidence for a
TGF- β -dependent effect. *International Journal of Colorectal Disease* 22, 1475-1480 (2007).
- 361 Fristad, I., Jacobsen, E. B. & Hals Kvinnsland, I. Coexpression of vasoactive intestinal polypeptide and
substance P in reinnervating pulpal nerves and in trigeminal ganglion neurones after axotomy of the
inferior alveolar nerve in the rat. *Archives of Oral Biology* 43, 183-189 (1998).
- 362 Senapati, A. *et al.* Depletion of neuropeptides during wound healing in rat skin. *Neuroscience Letters* 71,
101-105 (1986).
- 363 Xu, Y., Wellner, D. & Scheinberg, D. A. Substance P and Bradykinin Are Natural Inhibitors of
CD13/Aminopeptidase N. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 208, 664-674 (1995).
- 364 Wang, J. T., Medress, Z. A. & Barres, B. A. Axon degeneration: Molecular mechanisms of a self-
destruction pathway. *The Journal of Cell Biology* 196, 7-18 (2012).
- 365 Mescher, A. L. Nerve-dependent Tissue and Organ Regeneration in *eLS* (John Wiley & Sons, Ltd,
2001).
- 366 Petr, D. Wallerian degeneration and peripheral nerve conditions for both axonal regeneration and
neuropathic pain induction. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger* 193, 267-275 (2011).
- 367 Gaudet, A., Popovich, P. & Ramer, M. Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory
events after peripheral nerve injury. *Journal of Neuroinflammation* 8, 110 (2011).
- 368 Lin, G., Chen, Y. & Slack, Jonathan M. W. Imparting Regenerative Capacity to Limbs by Progenitor
Cell Transplantation. *Developmental cell* 24, 41-51 (2013).

Esta tesis se escribió en el procesador de texto de Microsoft Office Word 2007 a I2, I4, I6 y I8 puntos con un interlineado de 2 puntos. El tipo de letra utilizado fue Traveling Typewriter. El texto se convirtió a formato pdf con el programa Adobe Acrobat 9 Pro Extended. La biblioteca de referencias se administró con el programa End Note X3 y se utilizó el formato de citas y referencias de la revista *Nature*. Para los estilos de títulos se siguió las indicaciones de la APA. Las figuras, ilustraciones, tablas y composiciones se procesaron con el programa Adobe Photoshop CS5. En la escritura de esta tesis se siguieron las reglas ortográficas de la RAE 2010 donde “la palabra solo, tanto cuando es adverbio como cuando es adjetivo, así como los demostrativos este, ese y aquel, con sus femeninos y plurales, cuando funcionen como pronombres o como determinantes, no deben llevar tilde según las reglas generales de acentuación. Por eso, a partir de ahora se podrá prescindir de la tilde en estas formas incluso en casos de ambigüedad. La recomendación general es, pues, la de no tildar nunca estas palabras. Las posibles ambigüedades pueden resolverse casi siempre por el propio contexto comunicativo (lingüístico o extralingüístico), en función del cual solo suele ser admisible una de las dos opciones interpretativas. Los casos reales en los que se produce una ambigüedad son raros y rebuscados, y siempre pueden evitarse por otros medios, como el empleo de sinónimos, una puntuación adecuada, la inclusión de algún elemento que impida el doble sentido o un cambio en el orden de palabras que fuerce una única interpretación”. Abril 2014.