

Un modelo de regeneración en mamíferos: La oreja del ratón

René Fernando Abarca Buis*

* Laboratorio de Tejido Con-
juntivo. Centro Nacional de
Investigación y Atención de
Quemados (CENIAQ), INR.

Dirección para correspondencia:
René Fernando Abarca Buis
E-mail: buisr@yahoo.com

Este artículo puede ser consultado
en versión completa en:
<http://www.medigraphic.com/rid>

Palabras clave: Regeneración,
oreja del ratón, ciclo celular,
matriz extracelular.

Key words: Regeneration, mice
ear, cell cycle, extracellular
matrix.

Resumen

Las orejas de los ratones de la cepa MRL y de los ratones adultos de las cepas Balb-c y B6 muestran una respuesta regenerativa cuando son perforadas en el área central. Debido a que la capacidad regenerativa es muy limitada en los tejidos de los mamíferos, la oreja del ratón se ha vuelto un modelo muy atractivo para estudiar los mecanismos celulares y moleculares que inducen esta respuesta regenerativa. Estos estudios, apenas incipientes, han revelado la importancia que la matriz extracelular, la activación de ciertas vías de señalización y los mecanismos de reparación del DNA tienen en la regeneración de la oreja del ratón. En la presente revisión describimos la apariencia morfológica e histológica que ocurre durante la regeneración de la oreja del ratón y del conejo, y mencionamos algunos trabajos en los que se establecen determinados procesos celulares y moleculares que controlan la regeneración de esta región anatómica.

Abstract

The ears of mice from MRL strain and adult in mice from Balb-c and B6 strains shows a regenerative response, when they are drilled in the central area. Because in mammals the regenerative capacity is limited, the mice ear's has become an attractive model to study the cellular and molecular mechanisms that induce regenerative response. These studies, barely emerging, have revealed the importance of Extracellular Matrix, activation of certain signaling pathways and DNA repair during the regenerative process in the mouse ear. This review describes the morphologic and histological appearance that occurs during the regeneration of the mouse and rabbit ears and are mentioned several studies establishing some cellular and molecular processes that control regeneration of this anatomical region.

Introducción

A diferencia de varias especies de peces, anfibios y reptiles, las aves y los mamíferos han perdido casi la capacidad de regenerar sus tejidos y órganos. Estas clases biológicas de animales reparan el daño generado por medio de la cicatrización, proceso que consiste en el cierre de la herida caracterizado por un arreglo alterado e imperfecto de la matriz extracelular que genera una fibrosis excesiva.

Se ha propuesto que la cicatrización fue seleccionada como una respuesta inmediata al ataque de los depredadores que suelen generar heridas intermedias con un alto riesgo de infección. A diferencia de la regeneración, la cicatrización suele producir una respuesta rápida al detener la pérdida de sangre

mediante la formación de un coágulo sanguíneo y reclutar células inflamatorias en el lugar de la herida que detendrán una infección potencial. Aunque el proceso de remodelación de la matriz extracelular suele ser relativamente lento, éste se activa concomitante al proceso inflamatorio para iniciar la síntesis de nueva matriz extracelular en el lugar de la herida y reparar así el tejido dañado lo más pronto posible. De esta manera, aunque la cicatrización no resulta en un tejido completamente funcional, aumentan las posibilidades de sobrevivencia del organismo dañado. Contrariamente, la respuesta regenerativa, que es generalmente un proceso lento, puede poner en riesgo la vida de las aves y los mamíferos debido a que estos organismos han invadido y ampliado su hábitat. Esto resulta en la exposición de estos animales a nuevas

presiones de selección en los que requeriría de una reparación rápida aunque imperfecta.¹

El establecimiento de la civilización humana como una sociedad sedentaria, desarrollada tecnológicamente y capaz de cambiar drásticamente y aceleradamente su hábitat ha generado nuevas necesidades en el ámbito científico y médico. La situación humana ha cambiado del enfrentamiento a los depredadores al enfrentamiento de los accidentes laborales y de tránsito, así como a condiciones patológicas que pueden llevar a heridas muy drásticas y graves que provocan la amputación o la pérdida de estructuras anatómicas importantes. Con el objeto de recuperar estos tejidos perdidos, el ser humano ha dirigido su atención hacia los animales capaces de regenerar y sueña con la llegada de los días en los que la ciencia pueda desarrollar el conocimiento y la tecnología necesaria para superar la falta de estructuras provocadas por estas situaciones a las que está propenso diariamente.

La regeneración de la oreja del conejo y del ratón

La capacidad regenerativa de los mamíferos está limitada exclusivamente a ciertos tejidos u órganos y está siendo extensivamente estudiada. La epidermis de la piel, la línea epitelial del intestino, el hígado y la punta de la última falange de los dedos son algunas de las estructuras que presentan un destacado potencial regenerativo.²⁻⁶ Hace tiempo, un modelo de regeneración en mamíferos que fue ampliamente estudiado desde una perspectiva descriptiva fue el cierre de perforaciones hechas en las orejas de los conejos. Desde 1953 se descubrió que esta reparación se lleva a cabo por un proceso de regeneración.⁷ La oreja del conejo consiste de una lámina de cartílago elástico flanqueado dorsal y ventralmente por piel. Cuando se realiza una perforación de 1 cm de diámetro en la oreja, se forma un coágulo sanguíneo y cartílago necrótico alrededor de la herida. Cinco a seis días después de la perforación, la epidermis migra hacia los bordes de la herida y retira la costra del tejido en regeneración, de tal forma que la epidermis cubra la superficie circular de la herida. Dos semanas después de la perforación, la epidermis que cubre las regiones lesionadas genera una estructura en forma de «lengua» que se orienta hacia los tejidos subyacentes de la herida (*Figura 1a*). Estos crecimientos internos son transitorios y van siendo menos evidentes en los días subsiguientes. A las «lenguas» epidérmicas se les ha atribuido un papel durante la regeneración de la oreja, ya que están ausentes en animales que no regeneran

sus orejas, tal como las ovejas y los perros.⁸ Las áreas previamente ocupadas por las «lenguas» epidérmicas son invadidas por células indiferenciadas altamente proliferativas y forman el denominado blastema de regeneración, que es evidente a la tercera semana.⁶ Los bordes de la herida empiezan a crecer y a elongarse cerrando paulatinamente la perforación; mientras que el blastema que se encuentra adyacente al cartílago dañado empieza a diferenciarse en células de cartílago, las cuales van organizándose conforme la herida se cierra.⁹ Aproximadamente dos meses después, la perforación se cubre con un tejido que morfológica e histológicamente es igual al original. Además del cartílago y la piel, se ha descrito la formación de glándulas sebáceas y folículos pilosos en el área de regeneración.

Con el fin de investigar la interacción entre el cartílago y la piel durante la regeneración de la oreja, Goos y Grimes observaron que la regeneración se inhibía al retirar el cartílago adyacente al área lesionada, lo que indica que se requiere de la interacción y la comunicación entre la piel y el cartílago para que se complete el proceso de regeneración.¹⁰

Posteriormente se descubrió que los ratones de la cepa MRL muestran capacidad regenerativa cuando se les realiza una perforación de hasta 2 mm de diámetro en la oreja. Esta cepa se ha utilizado para estudiar enfermedades autoinmunes, ya que las mutaciones genéticas que acarrearán generan una enfermedad parecida al lupus. En los laboratorios de investigación que comúnmente realizan experimentos con ratones se requiere de diferenciar a ratones experimentales de los controles. El método más común para lograr este fin es perforando una oreja de los individuos experimentales. El grupo de la Dra. Heber-Katz realizaba un estudio inmunológico en estos ratones aplicándoles un fármaco, a los ratones que recibían el fármaco se les marcaba perforándoles la oreja. Tiempo después observaron que la perforación había cerrado por un proceso de regeneración (*Figura 2*).¹¹ Estudios histológicos detallados muestran que hay una respuesta inflamatoria en el borde del tejido dañado a las 24 horas poslesión, concomitante empieza a migrar el epitelio que bordea a la herida. A los dos días hay una reepitelización completa, mostrándose un epitelio engrosado en la región de la herida (*Figura 1a*). A los cinco días el tejido necrótico se despegue y, de manera similar a la regeneración de la oreja del conejo, se forma un blastema que puede reconocerse formalmente alrededor de una semana poslesión con los crecimientos internos epidérmicos (*Figura 1a*).¹² A los 21 días el epitelio se observa delgado, y a las 4 semanas se observa un

Figura 1. Esquemas que representan los cortes histológicos sagitales de las orejas perforadas en el ratón MRL durante algunas etapas de la regeneración: **a)** Extremos del tejido en reparación separados por la perforación. Se observa un epitelio engrosado con crecimientos epidérmicos internos denominados lenguas epidérmicas. Subyacente a la epidermis de reparación se establece el blastema de regeneración. Estas características suelen observarse desde el día 5 al 14 después de la perforación; **b)** Fusión epitelial entre los bordes de la herida en crecimiento y el establecimiento de las

condensaciones condrogénicas que se observan aproximadamente a los 30 días; **c)** Condensaciones o agregaciones cartilaginosas que formarán el cartílago elástico en un borde de la herida (Modificado de Metcalfe y Ferguson, 2005).²⁷

Imagen en color en: www.medigraphic.com/rid

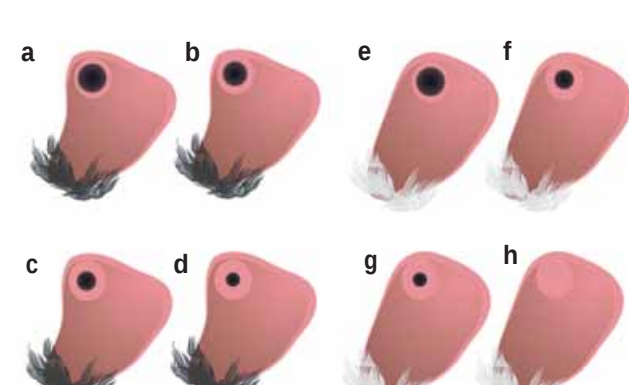
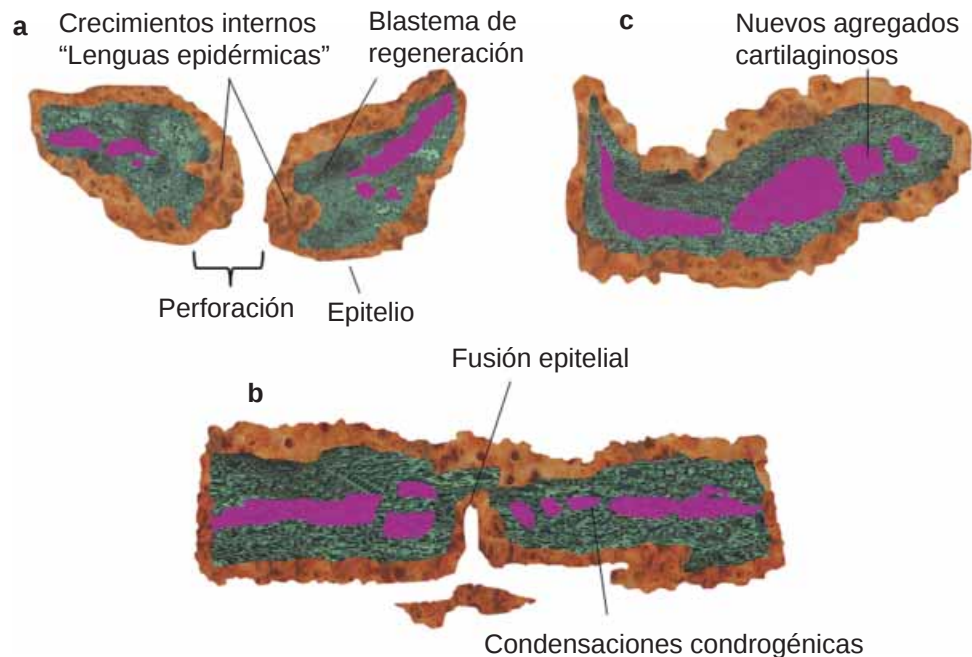


Figura 2. Comparación entre la cepa C57BL/6 que no regenera la oreja y la MRL que sí la regenera. A ambas cepas se les perforó una oreja creando un orificio de 2 mm de diámetro. Los esquemas muestran una oreja de cada cepa a diferentes días después de la perforación: **a), b), c) y d)** corresponden a 1, 9, 20 y 33 días posperforación de la cepa C57BL/6 y los esquemas **e), f), g) y h)** corresponden a los mismos días en la cepa MRL. El orificio realizado en la oreja de la cepa MRL se cierra gradualmente por un proceso regenerativo (basado en Heber-Katz, 1999).

Imagen en color en: www.medigraphic.com/rid

blastema reducido, con formación de músculo nuevo, folículos pilosos y vasos sanguíneos adyacentes a la herida.¹³ El cierre de la perforación ocurre de los 30 a los 40 días posperforación, durante este proceso se puede observar la fusión epitelial de los bordes de la herida¹⁴ (Figuras 2 y 1b) y, paralelamente, la formación de nuevas condensaciones o agregados cartilaginosos que formarán el nuevo cartílago (Figura 1c).

La capacidad regenerativa del ratón MRL no se limita sólo a la oreja, sino al corazón y al cartílago. Una lesión en el ventrículo del corazón de este ratón generó una reparación sin cicatriz con un miocardio totalmente funcional.¹⁵ Además, este ratón mejora la respuesta de reparación en lesiones profundas del cartílago articular en los que se evidencian abundantes condrocitos y una alta síntesis de proteoglicanos, colágena II y colágena VI en el sitio de la herida.¹⁶ Esto ha llevado a la realización de estudios genéticos aplicados en este ratón en el que se han identificado al menos 36 genes que son diferencialmente expresados en esta cepa respecto a las cepas no regenerativas.¹⁷ Debido a las ventajas que presenta el cuidado de la cepa mencionada, dicho modelo está siendo fuertemente explotado para estudiar los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la regeneración.

La remodelación de la matriz extracelular durante la regeneración de la oreja

Una de las diferencias fisiológicas entre las cepas regeneradoras y las no regeneradoras del ratón es que existe un extenso y acelerado proceso de remodelación de la matriz extracelular en las cepas regeneradoras. Durante la reparación de una herida se deposita una matriz provisional, ésta es cambiada por una matriz definitiva que mantendrá estable el tejido cicatrizado. Durante el recambio de la matriz extracelular participan las metaloproteinasas (MMPs), las cuales degradan la matriz provisional que será sustituida por la definitiva. Sin embargo, la actividad de las MMPs debe regularse con el fin de que la matriz nueva que está siendo sintetizada y depositada no sea degradada. Las moléculas que se encargan de manera específica de controlar la actividad de las MMPs, son los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMPs). Estas moléculas interactúan directamente con el sitio activo de las MMPs, inhibiendo su actividad.¹⁸ Durante la regeneración de las orejas del ratón MRL es posible observar un aumento en la actividad de MMP-2 y -9, así como durante los primeros 7 días poslesión. Contrariamente, la cepa C57BL/6 que no regenera presenta mayor expresión de TIMP-2 y de TIMP-3 que inhiben la actividad de MMP-2 y de MMP-9, respectivamente. Asimismo, la expresión y la actividad de estas MMPs son más bajas en este ratón que en el ratón regenerador MRL. Se ha reconocido que una de las fuentes principales de MMP-2 y MMP-9 en el ratón MRL son los neutrófilos, además de los macrófagos y los fibroblastos. La alta actividad de las MMPs está correlacionada con una rápida degradación de la membrana basal y de la matriz extracelular que, al parecer, es necesaria para la formación y establecimiento del blastema de regeneración.¹⁹ Las células del blastema del ratón MRL aisladas en cultivo expresan marcadores de células progenitoras e indiferenciadas como *DLK (Pref-1)* y *Msx-1*. Estas células secretan hacia el medio extracelular un conjunto de factores de crecimiento tales como FGF-2, EGF, HGF, KGF y VEGF, a su vez, éstos son depositados en la matriz extracelular sintetizada por dichas células. La aplicación de estos factores aislados de la matriz extracelular establecida por las células del blastema, promovió la migración y la proliferación de estas mismas células cuando se cultivaron *in vitro* y aceleraron el cierre de heridas realizadas previamente en la espalda de ratones de la cepa B6. Los análisis histológicos realizados durante el transcurso de la reparación de las heridas, las cuales fueron tratadas con los factores derivados

de la matriz, mostraron una reparación regenerativa, ya que se observaron folículos pilosos, glándulas sebáceas, formación de nuevos vasos sanguíneos, así como dermis y epidermis bien desarrollados. Estos resultados indican que algunas citocinas sintetizadas y depositadas en la matriz extracelular por las células del blastema de la oreja en regeneración contribuyen de manera importante en la respuesta de estas mismas células hacia un proceso regenerativo.²⁰

La progresión del ciclo celular durante la regeneración de la oreja

Actualmente, se ha considerado que una característica de las células de la oreja de la cepa MRL, a diferencia de otras que no regeneran, es que sus células se encuentran en fase G2/M del ciclo celular y que, además, su DNA es altamente propenso al daño y a un estado de constante reparación. Se ha observado la falta de activación de p21 en estas células de la oreja regeneradora del ratón MRL; p21 es una molécula que mantiene a las células en fase G1 del ciclo celular, al ausentarse la activación de p21 se provoca que las células pasen a la fase S y después a la fase G2/M en donde quedan quiescentes, deteniendo la progresión de la proliferación. La estancia de las células en esta fase resulta en la activación de los procesos de reparación del DNA que han resultado ser muy eficientes en las células de la oreja del ratón MRL. Se ha sugerido que esta reparación ocurre por recombinación homóloga. Además, el ratón *knock out* para p21 es capaz de regenerar las heridas realizadas por perforación de sus orejas. Las células de la oreja de este ratón mutante presentan detención en fase G2/M del ciclo celular, además de ser propensas al daño y reparación del DNA de manera similar a la cepa MRL y a la LG/J, una cepa parental de la MRL que también regenera.²¹ Se ha reportado que las células de los tejidos u órganos que regeneran tal como las células epiteliales y del pie de la hidra, así como las células musculares de las salamandras y los hepatocitos de los mamíferos muestran detención celular en fase G2/M.²²⁻²⁵

Inesperadamente se ha descrito regeneración de perforaciones en la oreja de cepas comunes, tales como la B6 y la BALB/c, pero sólo en individuos de edad adulta; aproximadamente de 8 meses de edad. Este reporte ha resultado intrigante, ya que el paradigma que más se ha aceptado es que la capacidad regenerativa disminuye al incrementar la edad. Esta afirmación incrementará y facilitará los estudios de regeneración utilizando a la oreja perforada como modelo animal de fácil manutención y manipulación.²⁶

Perspectivas

Este modelo de regeneración en la oreja del ratón MRL y en cepas comunes de individuos adultos está permitiendo aclarar y dilucidar los estudios sobre los mecanismos celulares y moleculares que subyacen al proceso de regeneración. Entendiendo estos mecanismos, la esperanza en el ser humano de regenerar tejidos y órganos perdidos se hará cada vez más tangible.

Bibliografía

- Ferguson MWJ, O'Kane S. Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2004; 359 (1445): 839-850.
- Yu BD, Mukhopadhyay A, Wong C. Skin and hair: Models for exploring organ regeneration. *Hum Mol Genet* 2008; 17: R54-R59.
- Illingworth CM. Trapped fingers and amputated finger tips in children. *J Pediatr Surg* 1974; 9 (6): 853-858.
- Mortensen KE, Revhaug A. Liver regeneration in surgical animal models. A historical perspective and clinical implications. *Eur Surg Res* 2011; 46 (1): 1-18.
- Garrison AP, Helmrath MA, Dekaney CM. Intestinal stem cells. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009; 49 (1): 2-7.
- Carlson BM. Principles of regenerative biology. Academic Press; 2007.
- Williams-Boyce PK, Daniel JC. Comparison of ear tissue regeneration in mammals. *J Anat* 1986; 149: 55-63.
- Gross RJ, Grimes LN. Epidermal downgrowths in regenerating rabbit ear holes. *J Morphol* 1975; 146 (4): 533-542.
- Urist MR, Raskin K, Goltz D, Merickel K. Endogenous bone morphogenetic protein: Immunohistochemical localization in repair of a punch hole in the rabbit's ear. *Plast Reconstr Surg* 1997; 99 (5): 1382-1389.
- Goss RJ, Grimes LN. Tissue interactions in the regeneration of rabbit ear holes. *Am Zool* 1972; 12: 151-157.
- Morelle R. BBC News. Science and environment. Mouse sheds light on regeneration. Documento. 11 April 2006. Disponible en: <http://news.bbc.co.uk/2/hi/sci/tech/4888080.stm>
- Heber-Katz E. The regenerating mouse ear. *Semin Cell Dev Biol* 1999; 10 (4): 415-419.
- Rajnoch C, Ferguson S, Metcalfe AD, Herrick SE, Willis HS, Ferguson MW. Regeneration of the ear after wounding in different mouse strains is dependent on the severity of wound trauma. *Dev Dyn* 2003; 226 (2): 388-397.
- Clark LD, Clark RK, Heber-Katz. A new murine model for mammalian wound repair and regeneration. *Clin Immunol Immunopathol* 1998; 88 (1): 35-45.
- Leferovich JM, Bedelbaeva K, Samulewicz S, Zhang XM, Zwas D, Lankford EB et al. Heart regeneration in adult MRL mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98 (17): 9830-9835.
- Fitzgerald J, Rich C, Burkhardt D, Allen J, Herzka AS, Little CB. Evidence for articular cartilage regeneration in MRL/MpJ mice. *Osteoarthritis Cartilage* 2008; 16 (11): 1319-1326.
- Masinde G, Li X, Baylink DJ, Nguyen B, Mohan S. Isolation of wound healing/regeneration genes using restrictive fragment differential display-PCR in MRL/MPJ and C57BL/6 mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330 (1): 117-122.
- Amalinei C, Caruntu ID, Balan RA. Biology of metalloproteinases. *Rom J Morphol Embryol* 2007; 48 (4): 323-334.
- Gourevitch D, Clark L, Chen P, Seitz A, Samulewicz SJ, Heber-Katz E. Matrix metalloproteinase activity correlates with blastema formation in the regenerating MRL mouse ear hole model. *Dev Dyn* 2003; 226 (2): 377-387.
- Vorotnikova E, McIntosh D, Dewilde A, Zhang J, Reing JE, Zhang L et al. Extracellular matrix-derived products modulate endothelial and progenitor cell migration and proliferation *in vitro* and stimulate regenerative healing *in vivo*. *Matrix Biol* 2010; 29 (8): 690-700.
- Bedelbaeva K, Snyder A, Gourevitch D, Clark L, Zhang XM, Leferovich J et al. Lack of expression links cell cycle control and appendage regeneration in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107 (13): 5845-5850.
- Holstein TW, Hobmayer E, David CN. Pattern of epithelial cell cycling in hydra. *Dev Biol* 1991; 148 (2): 602-611.
- Ulrich H, Tárnok A. Quantification of cell-cycle distribution and mitotic index in Hydra by flow cytometry. *Cell Prolif* 2005; 38 (2): 63-75.
- Tanaka E M, Gann AA, Gates PB, Brockes JP. New myotubes reenter the cell cycle by phosphorylation of the retinoblastoma protein. *J Cell Biol* 1997; 135 (1): 155-165.
- Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science* 1997; 276 (5309): 60-66.
- Reines B, Cheng LI, Matzinger P. Unexpected regeneration in middle-age mice. *Rejuvenation Res* 2009; 12 (1): 45-52.
- Metcalfe AD, Ferguson MWJ. Harnessing wound healing and regeneration for tissue engineering. *Biochem Soc Trans* 2005; 33 (Pt2): 413-417.