

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA**



**Función de endogлина en la regulación de  
las células troncales de la piel y el ciclo de  
crecimiento del folículo piloso**

Tesis Doctoral

**María Inmaculada Calvo Sánchez**

Madrid, 2014



# RESUMEN



La piel es el órgano más extenso del cuerpo, y el más accesible desde un punto de vista experimental y clínico. En particular, el folículo piloso, un apéndice de la piel que presenta ciclos continuos de crecimiento y regresión, constituye un buen modelo para el estudio de la biología de las células troncales adultas y su potencial manipulación con fines terapéuticos en la medicina regenerativa.

El ciclo de crecimiento del pelo está regulado principalmente por dos rutas de señalización, la ruta de Wnt/ $\beta$ -catenina, que controla la entrada del folículo piloso en la fase de crecimiento o anagén, y la ruta Bmp/Tgf- $\beta$ /Smad, que regula la inhibición del crecimiento del pelo durante la fase de reposo o telogén. El ciclo de crecimiento del pelo está determinado por la actividad de un nicho de células troncales adultas localizadas en la región prominente del folículo piloso. En el presente trabajo se ha estudiado el papel de endoglina, un co-receptor de las citoquinas Bmp/Tgf- $\beta$ , en la regulación del ciclo de crecimiento del pelo.

Los resultados obtenidos en este trabajo, empleando un modelo de ratón haploinsuficiente para el gen de endoglina, mostraron que, en la piel, la función de endoglina es requerida para mantener correctamente el ciclo de crecimiento del pelo, y para activar la proliferación de las células troncales foliculares después de un estímulo proliferativo. De forma coherente, endoglina también es necesaria para mantener el patrón de señalización Bmp/Tgf- $\beta$ /Smad en la piel, y para permitir la correcta transición entre las fases anagén/telogén refractaria y telogén competente/ anagén.

Además, los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que  $\beta$ -catenina interacciona con el promotor de endoglina y con distintos miembros de la familia Smad en función de las fases del ciclo del pelo, y de los niveles de expresión de endoglina. En conjunto estos resultados sugieren que endoglina es un regulador central en el ciclo de crecimiento del pelo que regula la alternancia entre la señalización de las rutas de Wnt/ $\beta$ -catenina y Bmp/Tgf- $\beta$ /Smad, identificando esta proteína como una diana terapéutica potencial en la medicina regenerativa de la piel.



## **SUMMARY**



The skin is the largest organ in the human body, and the most accessible from an experimental and clinical point of view. In particular, the hair follicle, a skin appendage showing continuous cycles of growth and regression, is a well characterized model to study the biology of adult stem cells and their potential manipulation for therapeutic purposes in regenerative medicine.

The hair follicle growth cycle is mainly regulated by two signalling pathways, Wnt/ $\beta$ -catenin, controlling the entrance of the hair follicle in the growth phase or anagen, and Bmp/Tgf- $\beta$ /Smad, controlling the inhibition of hair growth during the resting phase or telogen. The hair growth cycle is determined by the activity of a niche of adult stem cells located in the bulge region. Here it has been studied the role of endoglin, a co-receptor of Bmp/Tgf- $\beta$  ligands in the regulation of the hair follicle growth cycle.

The results obtained in this work, using an endoglin haploinsufficiency mouse model, showed that, in mouse skin, endoglin function was required to maintain a correct hair follicle cycle and to fully activate hair follicle stem cell proliferation after stimulation. Consistently, endoglin was also required to maintain Bmp/Tgf- $\beta$ /Smad signalling pattern in the skin and for a proper transition between anagen/refractory telogen and competent telogen/anagen regulatory points of the hair follicle cycle.

Furthermore, the results presented in this work also showed that  $\beta$ -catenin interacts with the *endoglin* promoter and with different Smad partners in hair follicle cycle and endoglin dose-dependent patterns. As a whole, these results suggest that endoglin is a key regulator of the hair follicle growth cycle that regulates the switch of Wnt/ $\beta$ -catenin and Bmp/Tgf- $\beta$ /Smad signalling pathways, identifying this protein as a potential target of skin regenerative medicine therapies.



INTRODUCCIÓN .....	1
1. CÉLULAS TRONCALES.....	3
2. LA PIEL.....	5
3. EL FOLÍCULO PILOSO .....	9
4. RUTAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN LA MORFOGÉNESIS Y EN EL CICLO DE CRECIMIENTO DEL PELO .....	12
5. RUTA DE SEÑALIZACIÓN BMP/TGF- $\beta$ /SMAD.....	16
6. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE ENDOGLINA.....	20
7. ENDOGLINA Y TELANGIECTASIA HEMORRÁGICA HEREDITARIA .....	22
8. ENDOGLINA EN PIEL .....	24
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	27
MATERIALES Y MÉTODOS .....	31
1. MODELO EXPERIMENTAL DE RATÓN HAPLOINSUFICIENTE PARA EL GEN ENDOGLINA.....	33
2. ENSAYOS DE SILENCIAMIENTO DE ENDOGLINA Y ESTIMULACIÓN POR LA CITOQUINA BMP4 EN LA LÍNEA CELULAR E14 .....	39
3. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNA POR INMUNOBLOT .....	41
4. EXTRACCIÓN DE ARNm Y ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA .....	42
5. ENSAYOS DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA .....	44
6. ENSAYOS DE CO-INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS.....	46
7. EVALUACIÓN DE MUESTRAS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	46
RESULTADOS .....	49
1. ENDOGLINA MUESTRA UN PATRÓN DE EXPRESIÓN EN LA PIEL ASOCIADO AL CICLO DE CRECIMIENTO DEL PELO .....	51
2. LA HAPLOINSUFICIENCIA DE ENDOGLINA EN PIEL INDUCE UNA ALTERACIÓN EN EL CICLO DE CRECIMIENTO DEL PELO .....	53
3. LA HAPLOINSUFICIENCIA DE ENDOGLINA PROVOCA UNA ALTERACIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN BMP/SMAD, PERO NO WNT/ $\beta$ -CATENINA, A LO LARGO DEL CICLO DEL PELO .....	55
4. LA HAPLOINSUFICIENCIA DE ENDOGLINA EN PIEL ALTERA LA CAPACIDAD DE PROLIFERACIÓN EN RESPUESTA A ESTÍMULOS EXTERNOS DE LAS CÉLULAS TRONCALES DEL FP.....	59
5. ENDOGLINA ESTÁ IMPLICADA EN LA REGULACIÓN DE LA FASE DE TELOGÉN DEL CICLO DE CRECIMIENTO DEL PELO .....	63
6. $\beta$ -CATENINA INTERACCIONA CON EL PROMOTOR DE <i>ENDOGLINA</i> DURANTE LA TELOGÉN REFRACTARIA.....	69
7. $\beta$ -CATENINA INTERACCIONA CON LAS PROTEÍNAS SMAD DURANTE LA TELOGÉN REFRACTARIA DE FORMA DEPENDIENTE DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE ENDOGLINA .....	71
8. LA SEÑALIZACIÓN BMP REGULA LA INTERACCIÓN DE $\beta$ -CATENINA CON EL PROMOTOR DE ENDOGLINA Y CON LAS PROTEÍNAS SMAD EN LA LÍNEA E14.	72
DISCUSIÓN .....	77
CONCLUSIONES .....	91
BIBLIOGRAFÍA.....	95



# INTRODUCCIÓN



## 1. CÉLULAS TRONCALES

En los organismos pluricelulares, el correcto funcionamiento y la capacidad regenerativa de cada tejido y órgano en cada etapa del desarrollo embrionario depende de la actividad de una pequeña población de células troncales (Wagers, 2012). Las dos características fundamentales y definitorias de las células troncales son la capacidad de diferenciarse en uno o más tipos celulares diferentes, y la capacidad de auto-renovación para originar células con la misma capacidad de diferenciación. A pesar de su elevado potencial proliferativo, las células troncales suelen encontrarse en estado quiescente, lo que las protege decisivamente de los daños asociados a la división celular.

En mamíferos, las células troncales se clasifican en dos tipos básicos: embrionarias y adultas o somáticas. Las células troncales embrionarias pueden presentar diferente potencial de diferenciación en función de su origen. Si proceden del cigoto en estadio de mórula se trata de células totipotentes, capaces de generar un nuevo individuo, incluyendo el tejido extraembrionario, el linaje germinal, y las tres capas embrionarias. Si el origen de las células troncales embrionarias es la masa celular interna del blastocisto previo a la implantación, únicamente son capaces de dar lugar a las tres capas embrionarias que posteriormente originaran todos los órganos y tejidos y todos los tipos celulares del individuo, por lo que se consideran células pluripotentes. Ambos tipos celulares poseen un potencial indefinido de autorenovación. Las células troncales adultas o somáticas son multipotentes, siendo capaces de diferenciarse en uno o más tipos celulares específicos de tejido. Las células troncales somáticas son responsables del mantenimiento homeostático y de la capacidad regenerativa de los órganos y tejidos adultos (Gurley y Sánchez Alvarado, 2008; He y col., 2009; Wagers, 2012).

Las células troncales adultas se alojan en localizaciones específicas en el tejido denominadas nichos, que las protegen frente a daño o pérdida, a la vez que las mantiene en comunicación constante con el entorno para facilitar una respuesta apropiada a las señales fisiológicas para la reparación tisular y renovación celular. Además el nicho proporciona soporte físico y bioquímico capaz de regular interacciones de adhesión, y producir los correspondientes

factores solubles reguladores. La matriz extracelular del nicho presenta así mismo un papel regulador, encargándose de concentrar factores de crecimiento, citoquinas u otras moléculas reguladoras de las células troncales. El hecho de que el nicho sea el regulador principal de la actividad de las células troncales ha permitido postular a esta estructura como una diana terapéutica esencial en medicina regenerativa (Moore and Lemischka, 2006; Kiefer, 2011; Wagers, 2012).

Existe un interés creciente por la biología de las células troncales tanto en el área de la biomedicina en particular, como en la sociedad en general. Esto se debe fundamentalmente a la esperanza puesta en el potencial uso de estos tipos celulares, ya sean de origen embrionario o adulto, como una herramienta en medicina regenerativa que permita el desarrollo "in vitro" de nuevos órganos o tejidos de uso clínico inmediato a partir del propio paciente y, no menos importante, en la identificación de células con características troncales o "stem" como posibles dianas terapéuticas en procesos de cáncer y envejecimiento. Este interés se ha visto enormemente incrementado por los resultados obtenidos en el área durante la última década, como el reciente descubrimiento de que las células somáticas de un individuo adulto pueden revertir al estado pluripotencial de célula troncal embrionaria simplemente por la reactivación de un pequeño y definido número de genes (Rodolfa, 2008; Lowry, 2012; Mahmoudi y Brunet, 2012; Cherry y Daley, 2013).

La capacidad técnica de manipular células troncales embrionarias y adultas, o la capacidad de inducir células pluripotentes a partir de células somáticas, ha abierto, por tanto, la posibilidad real de diseñar nuevas modalidades terapéuticas basadas en estos tipos celulares. Sin embargo, a pesar de la ingente cantidad de datos acumulados en el campo, existen aún diferentes limitaciones que impiden una eficiente y generalizada aplicación clínica de las células troncales. Muchas de estas limitaciones se deben a un conocimiento aún deficiente sobre la biología fundamental de las células troncales y de los mecanismos moleculares que determinan la interacción de estas células con su entorno o nicho. Estos mecanismos son herramientas esenciales para regular la función de las células troncales *in vivo* y para expandir y mantener *ex vivo* estas poblaciones celulares sin una pérdida de

sus propiedades funcionales distintivas. En particular, la falta de información sobre los potenciales efectos secundarios deletéreos o patológicos asociados a la introducción de células pluri o multipotentes en un tejido adulto, junto con los diferentes conflictos éticos que surgen con el uso de células que pueden potencialmente originar un organismo adulto completo, son aspectos críticos al considerar cualquier uso clínico de las células troncales embrionarias o de las células pluripotentes inducidas. En este escenario, hay que considerar el uso de células troncales adultas como una alternativa válida y robusta en medicina regenerativa (He y col., 2009; Saha y Jaenisch, 2009; Mahmoudi y Brunet, 2012).

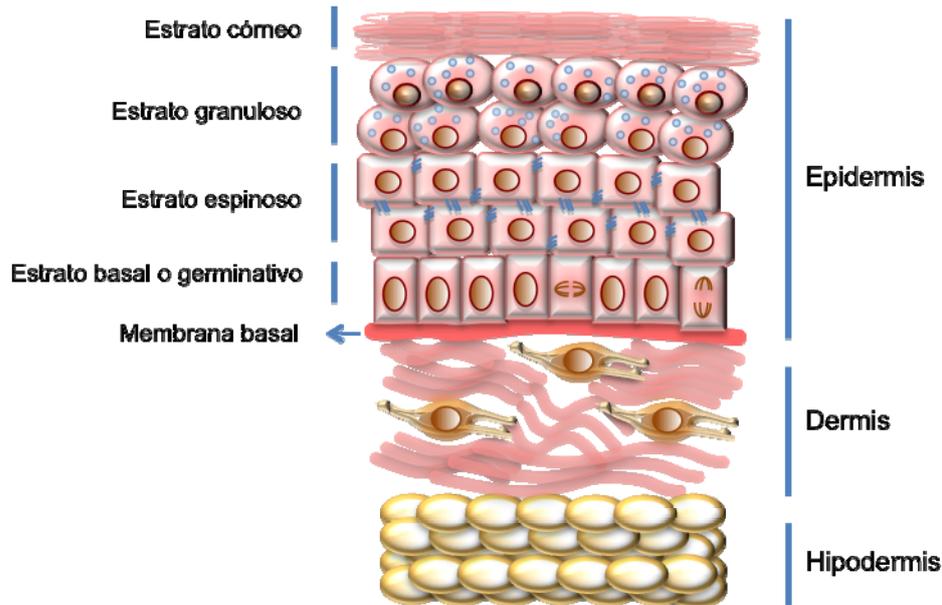
## **2. LA PIEL**

La piel es el órgano más extenso del cuerpo y el más accesible desde un punto de vista experimental y clínico. Se compone de tres capas, la hipodermis y la dermis, que son de origen mesodérmico, y la epidermis, de origen ectodérmico, más sus apéndices asociados, como son los folículos pilosos (FPs) y las glándulas sebáceas y sudoríparas. La dermis, constituida principalmente por los fibroblastos y la matriz extracelular que generan, constituye el apoyo físico de la epidermis además de establecer la base de complejas interacciones de la epidermis con los fibroblastos, células endoteliales, musculares, neuronales y con el sistema inmune (Scheperle y col., 2014).

El principal componente de la epidermis es el epitelio interfolicular (EIF), el cual constituye una barrera protectora frente a agentes externos. El EIF es un epitelio estratificado plano formado principalmente por queratinocitos, conteniendo otras poblaciones celulares como las células de Merkel, células de Langerhans, linfocitos T y melanocitos. En la epidermis los queratinocitos proliferantes se localizan en la membrana basal, que separa la dermis de la epidermis. Los queratinocitos del estrato basal o proliferativo son los más indiferenciados del tejido, y a medida que proliferan van ascendiendo hacia la superficie siguiendo un proceso progresivo de diferenciación, que implica la sustitución de los filamentos intermedios de queratina por otros más resistentes

Así, en los estratos más indiferenciados se expresan las citoqueratinas 5 y 14 y a medida que los queratinocitos se van diferenciando, se expresan las citoqueratinas 1 y 10.

Una vez que las células del estrato basal han completado el proceso de proliferación, pierden afinidad por la membrana basal y comienzan a moverse hacia la superficie de la piel. De esta forma, sobre la capa basal de queratinocitos se constituye un estrato celular más diferenciado, el estrato espinoso, caracterizado por presentar un gran número de desmosomas, a los que se anclan fuertemente las queratinas confiriendo resistencia y flexibilidad al tejido. A medida que avanza el proceso de diferenciación, los queratinocitos, que continúan desplazándose hacia la superficie, sintetizan y acumulan grandes cantidades de gránulos de queratohialina, generando una cubierta cornificada e impermeable. Estos queratinocitos constituyen el estrato granuloso. Finalmente, en la capa más externa de la piel se produce el proceso de diferenciación terminal, en el que, la célula activa un programa de muerte celular similar a la apoptosis, el núcleo se fragmenta y se pierden la mayoría de componentes celulares, la célula epitelial muere cornificada por la acumulación de queratinas y es eliminada en forma de escama (**Figura 1**). Estos restos celulares son renovados constantemente por nuevas poblaciones celulares de queratinocitos. La regeneración de la epidermis es, por tanto, un proceso equilibrado, existiendo un balance entre las células que se eliminan y las nuevas que proliferan a partir de la capa basal. En la piel del ratón este proceso culmina en 10-14 días, mientras que en humanos es más lento, y requiere aproximadamente 4 semanas.



**Figura 1: Estructura de la piel.** La piel está formada por tres capas principales: hipodermis, dermis y epidermis. La membrana basal separa la dermis, compuesta principalmente por fibroblastos y matriz extracelular, de la epidermis. El principal componente celular de la epidermis son los queratinocitos, que sufren un proceso de diferenciación terminal desde el estrato basal hasta el estrato córneo, y son eliminados finalmente en forma de escama.

El mantenimiento homeostático del tejido epidérmico es el resultado de la actividad combinada de una pequeña población de células troncales multipotentes, de muy baja capacidad de proliferación y elevado potencial de diferenciación, y una extensa población de células progenitoras originadas a partir de las primeras, de menor potencial de diferenciación pero mayor capacidad de proliferación, que se diseminan a lo largo de toda la epidermis, constituyendo una población celular transitoriamente amplificada (“Transit Amplifying Cells”, TACs) en respuesta a las necesidades fisiológicas del tejido (Kaur, 2006). En condiciones fisiológicas, la regeneración de la epidermis es un proceso regular y constante (Plikus y col., 2012). Esta población de células progenitoras epidérmicas se encuentra en la capa basal de la epidermis interfolicular y es capaz de mantener la homeóstasis de la epidermis normal (Clayton, 2007).

Las células troncales somáticas o adultas pueden ser detectadas utilizando métodos experimentales basados en su baja tasa proliferativa, utilizando análogos de nucleótido, como bromo deoxiuridina, o timidina tritiada, que se incorporan al ADN de las células en división con cada ronda de

replicación. Una vez que se han incorporado los análogos marcados, sólo las células con baja tasa proliferativa mantienen la marca a lo largo del tiempo (células que retienen la marca, o “Label Retaining Cells” (LRCs) (Braun y col., 2003). Utilizando esta aproximación experimental, se ha identificado y definido un nicho principal de células troncales epidérmicas localizado en la región prominente (o “bulge”) del FP, encargado de mantener la homeostasis del mismo en condiciones fisiológicas (Cotsarelis y col., 1990; Oshima, 2001; Tumber y col., 2004; Plikus y col., 2012). En condiciones de equilibrio homeostático, las células troncales de la región prominente y del EIF constituyen poblaciones independientes, de modo que las primeras dan lugar a líneas epiteliales dentro del folículo, mientras que la epidermis es responsable de su propia auto-renovación. No obstante, el carácter multipotente de las células de la región prominente las hace susceptibles de ser reclutadas para contribuir a la reparación del EIF en respuesta a estímulos naturales como heridas (Cotsarelis, 2006) o artificiales, como el tratamiento con TPA, inductor de la proliferación celular (Cotsarelis y col., 1990; Braun y col., 2003; Espada y col., 2008; Plikus y col., 2012).

En los últimos años se han descrito otras poblaciones de células troncales en la piel, situadas en las regiones del istmo y en la zona de unión de la glándula sebácea al FP, que contribuyen al mantenimiento de las glándulas sebáceas y al infundíbulo, y ocasionalmente a la epidermis. Recientemente se ha descrito que en el caso de la reparación de la epidermis ante un estímulo de herida, las poblaciones de células troncales provenientes del FP son las primeras que contribuyen a la regeneración de la misma. Tras un periodo de tiempo determinado las TACs originadas por estas células son sustituidas por células procedentes del EIF, indicando la pluripotencia de estas poblaciones celulares. En cambio, cuando la epidermis debe generar un FP completo debido al daño producido por estrés, la población de células troncales implicada no procede de los FPs circundantes, sino de células progenitoras epidérmicas que se desdiferencian y se diferencian posteriormente para dar lugar a un linaje folicular (Plikus y col., 2012; Schepeler y col., 2014). Estudios moleculares de los marcadores de las distintas poblaciones de células troncales pertenecientes al FP indican que están dotadas de una gran

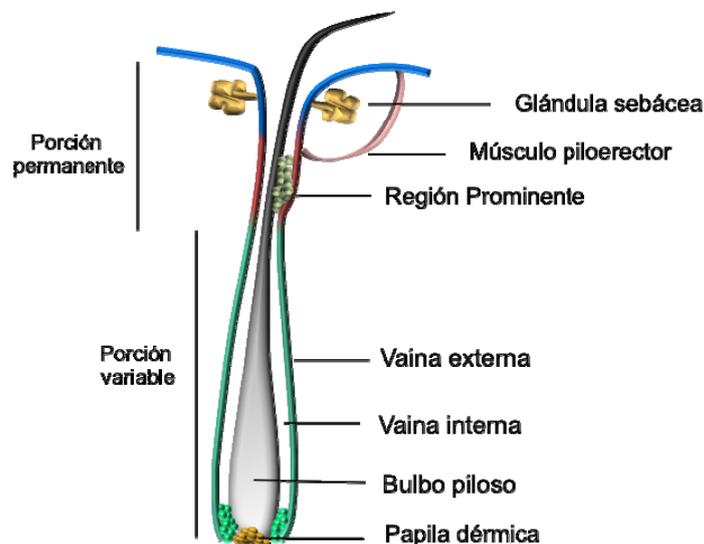
plasticidad, pudiendo intercambiarse entre ellas, incluso en condiciones fisiológicas de la piel. Estudios recientes de reconstitución completa de la piel muestran que las distintas poblaciones de células troncales del folículo son capaces de regenerar por completo la epidermis, incluyendo sus apéndices (Levy y col., 2007). Actualmente existen dos hipótesis referentes a las poblaciones de células troncales que mantienen la piel, defendiendo la existencia de una única población multipotente, que sería la base de todas las poblaciones antes descritas, o la coexistencia de distintas poblaciones de células troncales, capaces de desdiferenciarse completamente para intercambiarse por otras, en respuesta a cambios en la señalización del microambiente (Schepeler y col., 2014).

### **3. EL FOLÍCULO PILOSO**

Uno de los apéndices principales de la piel es el FP, que se origina en la epidermis, pero se aloja en la dermis (Alonso y Fuchs 2006; Fuchs 2007; Plikus y col., 2012; Schepeler y col., 2014). La unidad pilosebácea (el FP y glándulas sebáceas asociadas) y su ciclo de crecimiento constituyen un modelo muy bien caracterizado y ampliamente utilizado para el estudio funcional de las células troncales epidérmicas (Alonso y Fuchs 2006; Fuchs 2007; Plikus y col., 2012; Schepeler y col., 2014; Plikus y col., 2012). Durante el desarrollo embrionario tardío comienza la morfogénesis del FP, con la formación de acúmulos discretos de queratinocitos en la capa basal de la epidermis en respuesta a señales específicas generadas por los fibroblastos subyacentes de la dermis. Una vez activados, estos queratinocitos se dividen, movilizan y diferencian, profundizando en la dermis, y generando una estructura denominada placoda. De forma simultánea, un nódulo de fibroblastos se forma inmediatamente debajo, constituyendo la papila dérmica, que induce a la placoda a desarrollarse más rápidamente, y formar el germen del pelo. La papila dérmica será uno de los componentes permanentemente asociados al FP, quedando siempre en contacto con su parte distal. Posteriormente, una población definida de queratinocitos proliferantes se diferencia en células de la matriz, generando las vainas radiculares internas del FP. Durante este proceso también empieza

a generarse la vaina radicular externa del FP, en la que se formarán dos acúmulos celulares, el situado en la región proximal dará lugar a la glándula sebácea, y el segundo acogerá las células troncales para regenerar la fibra capilar en cada ciclo, constituyendo la región prominente. En este momento, los melanocitos recién diferenciados, que se encontraban en forma de melanoblastos entre los queratinocitos, comienzan a generar pigmento, que se acumula en la fibra capilar que se está formando y que discurre por el canal del pelo, delimitado por la vaina radicular interna (Fuchs, 2007; Lee y Tumber, 2012).

En la etapa posnatal, los FPs experimentan un sistema de crecimiento cíclico estrictamente regulado y subdividido en tres fases: crecimiento activo (anagén), regresión (catagén) y reposo o quiescencia (telogén) (Hardy, 1992; Fuchs, 2007). El ciclo del pelo afecta exclusivamente a los dos tercios inferiores del folículo, denominada región variable o cíclica, mientras que la parte superior constituye la región permanente del FP y se mantiene inalterada, siendo la región prominente el límite entre ambas (Figura 2) (Plikus y col., 2012).

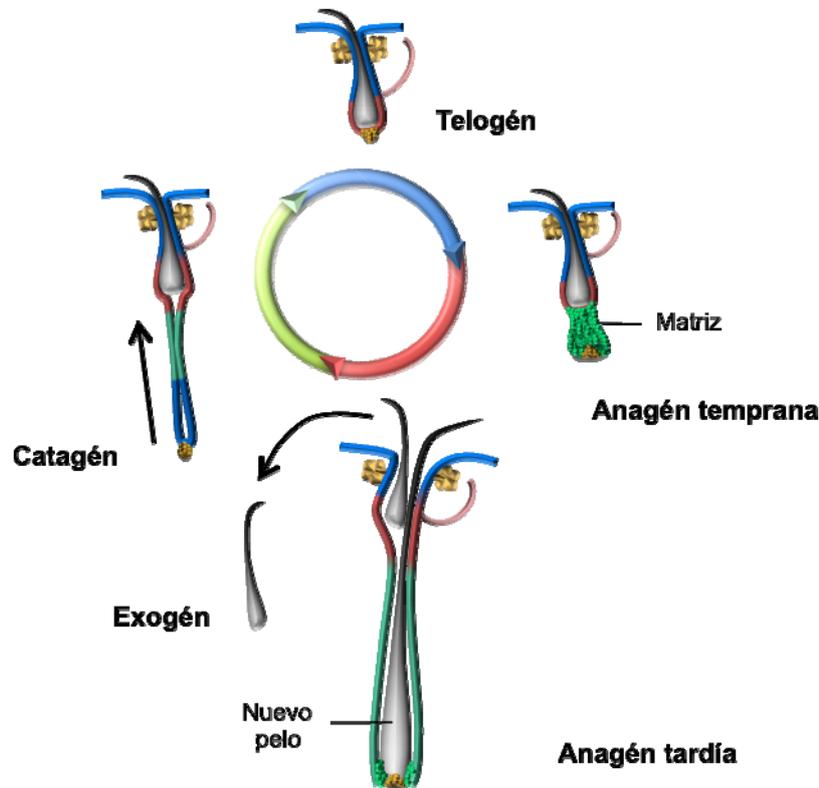


**Figura 2: Estructura anatómica del pelo.** El FP, en fase de anagén, está formado de dentro hacia fuera, por la fibra capilar y las vainas interna y externa que rodean al propio pelo. El músculo piloerector se inserta a la altura de la región prominente (rojo), nicho principal de las células troncales epidérmicas, y divide al FP en dos partes: porción permanente y porción variable (fragmento verde), que crece cíclicamente en profundidad como consecuencia de la proliferación de las células de la matriz. Las glándulas sebáceas vierten su contenido al canal del pelo. Asociada al FP se encuentra la papila dérmica, que durante la fase de telogén se encuentra en contacto con la región prominente.

Tomando la etapa de telogén como punto de partida del ciclo folicular y de acuerdo con la hipótesis de activación de la región prominente (Sun y col., 1991), señales provenientes de la papila dérmica en la transición telogén-anagén temprana, inducen la división asimétrica de las células troncales localizadas en la base de la región permanente, para dar lugar a nuevas células troncales auto-renovadas y a una población activa de TACs. Las TACs, destinadas a diferenciarse en distintos tipos celulares, migran para formar un nuevo bulbo piloso alrededor de la papila dérmica, dando lugar a al desarrollo de la porción cíclica a medida que el FP crece en profundidad.

De manera organizada, la migración y proliferación de estas TACs da lugar a la formación de diferentes capas celulares bien diferenciadas, que constituyen la matriz del pelo. Así, mediante procesos de diferenciación, las células de la matriz dan lugar, de dentro hacia fuera, a la fibra capilar (a su vez formada por la médula, una corteza multicelular y una capa cuticular de células aplanadas), a la vaina radicular interna (constituida por la cutícula, la capa de Huxley y la capa de Henle) y la capa acompañante. Rodeando estas capas procedentes de la diferenciación de la matriz se encuentra la vaina radicular externa, continuación de la epidermis, que como antes se ha descrito, acoge a la región prominente, nicho de las células troncales epidérmicas del FP (Shimomura y Christiano, 2010). Hacia la mitad de anagén, las células troncales de la región prominente inhiben su ciclo de actividad para retomar su estado habitual de quiescencia. Finalmente, cuando el potencial proliferativo de las TACs se agota, cesa la etapa de crecimiento y tiene lugar la entrada en catagén, iniciándose la degradación de la porción cíclica del FP. Como consecuencia, la papila dérmica se retrae hasta la base de la región prominente (junto a la cual permanece durante la fase de telogén) (**Figura 3**). Este ascenso resulta crucial para el establecimiento de futuras interacciones epitelio-mesénquima entre la región prominente y la papila dérmica, capaces de desencadenar una nueva entrada en anagén (Schneider y col., 2009). Por tanto, la actividad cíclica de proliferación y diferenciación de las células troncales del FP, para dar lugar a una población de TACs, y regresar de nuevo

al estado de quiescencia que las caracteriza, constituye la base del mantenimiento del ciclo del pelo (Plikus y col., 2008).



**Figura 3: Ciclo de crecimiento del pelo.** Durante la fase de telogén o reposo, el FP está constituido únicamente por la región permanente. Durante la fase de crecimiento o anagén se desarrolla la región variable. Para ello, señales provenientes de la papila dérmica inducen la proliferación de las células troncales de la región prominente, originando una población de células transitoriamente amplificada, que migra hacia la papila dérmica y promueve el crecimiento del FP en profundidad. Durante la fase de la catagén la región variable sufre un proceso de regresión por apoptosis, y la papila dérmica entra de nuevo en contacto con la región prominente durante la fase de reposo o telogén. Durante la exogén se elimina la fibra capilar antigua.

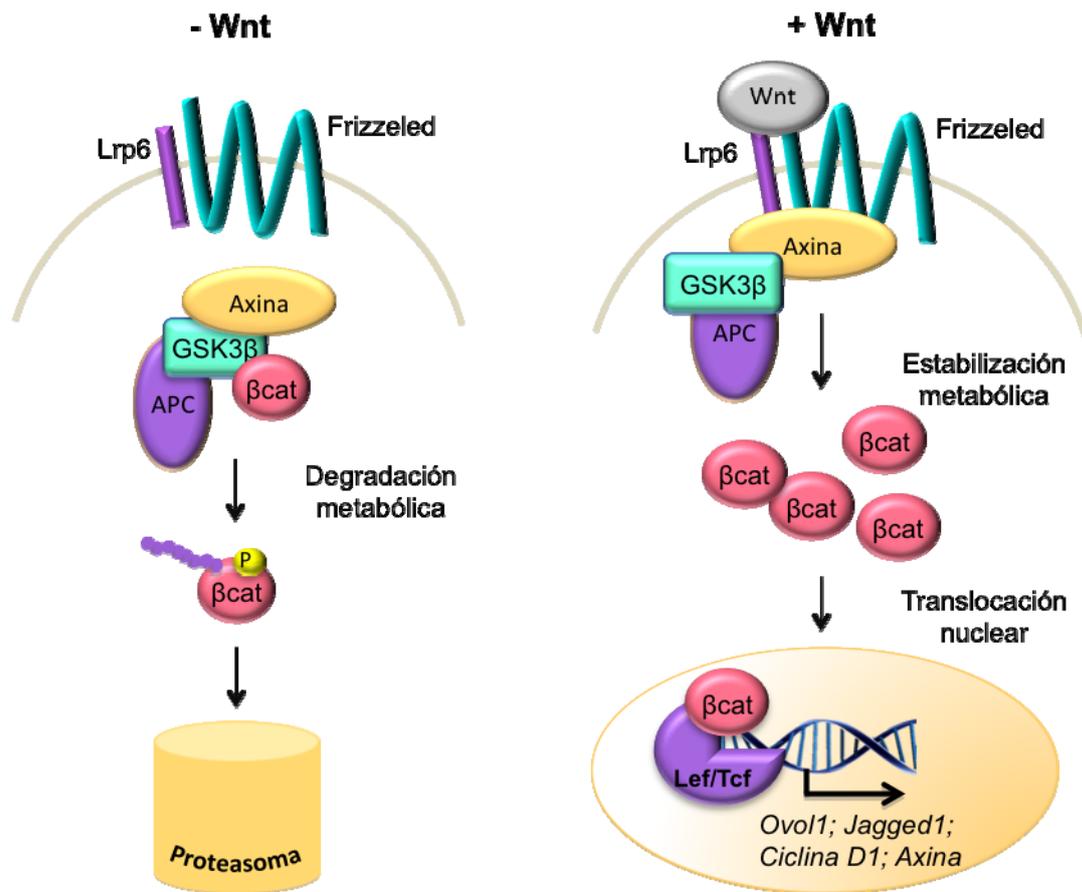
#### 4. RUTAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN LA MORFOGÉNESIS Y EN EL CICLO DE CRECIMIENTO DEL PELO

El establecimiento de las distintas fases del ciclo del pelo se debe a la actividad coordinada de diversas rutas de señalización. Las mejor caracterizadas son la ruta de Wnt/ $\beta$ -catenina, que regula la fase de crecimiento o anagén, y la ruta de Bmp/Smad (del inglés "Bone Morphogenetic Proteins", proteínas morfogenéticas óseas), encargada de frenar e inhibir el crecimiento del pelo durante las fases de anagén y telogén. Las células troncales del FP son las responsables de integrar todas las señales recibidas en un momento

dado, tanto del microambiente (el FP correspondiente), como del macroambiente (los FPs más próximos, así como del EIF, de la dermis y del resto de los componentes de la piel que rodean a cada FP) para poder coordinar las distintas fases del ciclo del pelo (Plikus y col., 2008).

La señalización de la ruta de Wnt por parte de la papila dérmica constituye la base para el desarrollo embrionario del FP. Tras este suceso, la ruta de Wnt se activa en las células de la epidermis, dando lugar a la formación de la placoda y al desarrollo del FP, junto con la cooperación de otros factores (Shimomura y Christiano, 2010). Asimismo, la activación de la ruta de WNT por parte de la papila dérmica es esencial para la inducción de la proliferación de las células de la región prominente, cuando ambas regiones se encuentran en contacto durante la fase de reposo o telogén (Schneider y col., 2009).

La ruta de Wnt canónica, implicada en la homeostasis del FP, se activa por citoquinas de la familia Wnt en el medio extracelular, generadas por células circundantes a las células diana (**Figura 4**). La señalización de la ruta de Wnt comienza con la interacción de la citoquina con su receptor heterodimérico de membrana Frizzled/Lrp6, contribuyendo a la estabilización citoplasmática de la proteína  $\beta$ -catenina, que una vez acumulada en el citoplasma es susceptible de entrar al núcleo e iniciar la activación transcripcional de sus genes diana, a través de la formación de un complejo con los factores de transcripción de la familia Lef/Tcf. En ausencia del ligando Wnt, la proteína  $\beta$ -catenina citoplasmática es rápidamente degradada por la interacción con el complejo de destrucción, constituido por las proteínas GSK3 $\beta$  (glucógeno sintasa quinasa 3 $\beta$ ), APC (*Adenomatous polyposis coli*) y axina, que induce la fosforilación de  $\beta$ -catenina en múltiples sitios, siendo la fosforilación de la serina 33 la que dispara la poliubiquitinación de  $\beta$ -catenina, que constituye la marca de destrucción por el proteasoma. En presencia del ligando Wnt, la actividad GSK3 $\beta$  es inhibida al ser desensamblado y/o secuestrado el complejo de destrucción en la membrana citoplasmática por los correspondientes receptores activados. En esta situación,  $\beta$ -catenina se estabiliza metabólicamente y se acumula en el citoplasma (Kühl y Kühl, 2013).

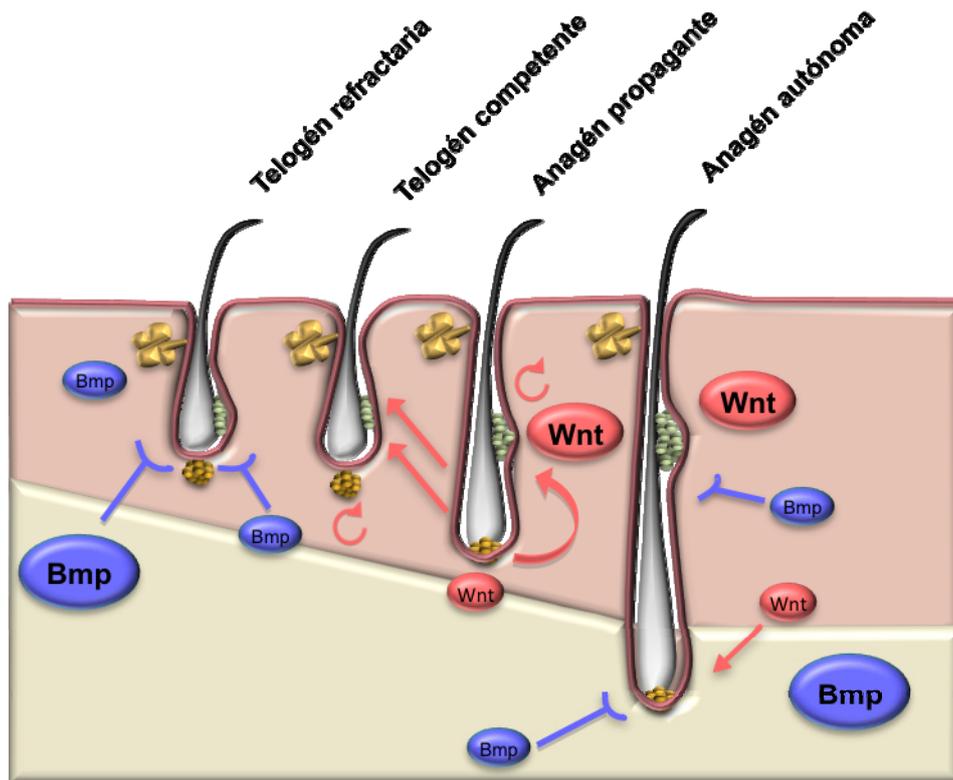


**Figura 4: Vía de señalización de Wnt/β-catenina.** En ausencia de la citoquina Wnt, la proteína transductora β-catenina se une al complejo de destrucción formado por las proteínas APC, GSK3β y axina, que fosforila a β-catenina en la serina 33, promoviendo su degradación por el proteasoma. Cuando Wnt se une a su receptor heterodimérico, constituido por un miembro de la familia frizzled y Lrp6, la proteína β-catenina se acumula en el citoplasma y es capaz de translocarse al núcleo. Una vez en el núcleo, β-catenina se une a factores de transcripción de la familia Lef/Tcf, regulando la expresión de sus genes diana, como *Ovo1*, *Jagged1*, *Ciclina D1* o *Axina*.

Durante el ciclo del pelo, la ruta de Wnt/β-catenina se encuentra activa durante la fase de anagén, regulando el crecimiento del pelo. Durante la anagén temprana, los FP, que presentan activación de la ruta de Wnt/β-catenina, son capaces de estimular la entrada en anagén de los FP que les rodean, siempre que estos se encuentren en un estado receptivo. La receptividad de los FP depende a su vez de la actividad o inactividad de la ruta Bmp, que se encarga de frenar el crecimiento del pelo y de mantenerlo en fase de telogén (Plikus y col., 2008). Así, la fase de anagén temprana es conocida también como anagén propagante. Durante la fase de anagén tardía, el FP sigue creciendo y desarrollándose debido a la actividad de la ruta de Wnt/β-

catenina. Sin embargo, durante este periodo, los FP no son capaces de inducir la activación de los FP circundantes, aunque estos se encuentren receptivos (Plikus y Chuong., 2008). Esta segunda fase de la anagén es conocida como anagén autónoma. Este hecho da lugar a que en la piel del lomo del ratón se encuentren regiones bien delimitadas en distintas fases del ciclo del pelo, y definidas por la actividad de las distintas rutas de señalización que coordinan el ciclo del pelo. Estas regiones son conocidas como dominios (**Figura 5**) (Plikus y Chuong., 2008; Plikus y col., 2009).

El control del ciclo del pelo no depende únicamente del estado activado/inactivado de la ruta de Wnt/ $\beta$ -catenina, sino que está regulado también por citoquinas pertenecientes a la familia de Tgf- $\beta$  (del inglés “Transforming Growth Factor  $\beta$ ”, factor de crecimiento transformante  $\beta$ ), como la citoquina Bmp y el propio Tgf- $\beta$ . En cuanto a la señalización de las citoquinas Tgf- $\beta$  en el contexto del FP, cabe detallar que si bien estas citoquinas señalizan a lo largo de todo el ciclo del pelo, la citoquina implicada en el establecimiento o mantenimiento de cada fase es diferente, y su papel sobre las células troncales foliculares no es del todo conocido (Oshimori y Fuchs, 2012). Así Tgf- $\beta$ 2 está implicada en la morfogénesis del FP durante el desarrollo embrionario, mientras que Tgf- $\beta$ 1 y Tgf- $\beta$ 3 están implicadas en el establecimiento de la catagén a través de su efecto citostático e inductor de apoptosis. No obstante, son las citoquinas Bmp las que tienen un papel preponderante en la regulación del ciclo del FP. La actividad o inactividad de la ruta Bmp durante la telogén (activa durante la telogén temprana, e inactiva durante la telogén tardía) es la que define la receptividad de los FPs. Así, durante la telogén temprana, la ruta de Bmp se encuentra activa y los FPs no son capaces de responder a estímulos de crecimiento de pelo. De esta manera se establece un periodo mínimo en el que el FP, y más importante, las células troncales de la región prominente, se encuentran en un estado de reposo, impidiéndose un estado de activación constante. En cambio, durante la telogén tardía, la ausencia de la señal inhibitoria de Bmp permite que el FP entre de nuevo en anagén en presencia de un estímulo de crecimiento de pelo, a través de la activación de las células troncales de la región prominente (Plikus y col., 2008; Plikus y col., 2009).



**Figura 5: Representación esquemática del microentorno y macroentorno folicular.** Durante la telogén refractaria, la señal inhibitoria de la ruta Bmp, procedente principalmente de la dermis, actúa sobre el FP. Durante la telogén competente, el FP es susceptible de entrar en anagén estimulado por señales provenientes de los FPs circundantes que se encuentran en fase de anagén propagante. La señal activadora, procedente de la papila dérmica, activa la ruta de Wnt en las células troncales de la región prominente, estableciéndose la fase de anagén. En la anagén autónoma la señal inhibitoria de Bmp comienza a activarse para frenar el crecimiento del pelo. Señal inhibitoria Bmp en morado, señal activadora Wnt en rojo.

## 5. RUTA DE SEÑALIZACIÓN BMP/TGF- $\beta$ /SMAD

Las citoquinas de la familia Tgf- $\beta$ , que comprende a Tgf- $\beta$ , Bmp y activina, regulan procesos esenciales durante el desarrollo embrionario, y están directamente implicadas en el mantenimiento homeostático de muchos tejidos y órganos adultos (Blobe y col., 2000). Dentro de la familia Tgf- $\beta$  existen 3 isoformas de Tgf- $\beta$  y en torno a 20 isoformas de Bmp (Goumans y Mummery, 2000). Estos mensajeros moleculares señalizan por unión a un complejo heterodimérico constituido por un receptor tipo I (TbrI, también llamados Alk) y un receptor tipo II (TbrII), constituidos en ambos casos por un dominio extracelular rico en cisteínas, un dominio transmembrana, y el dominio intracelular con actividad serina treonina quinasa. A este complejo

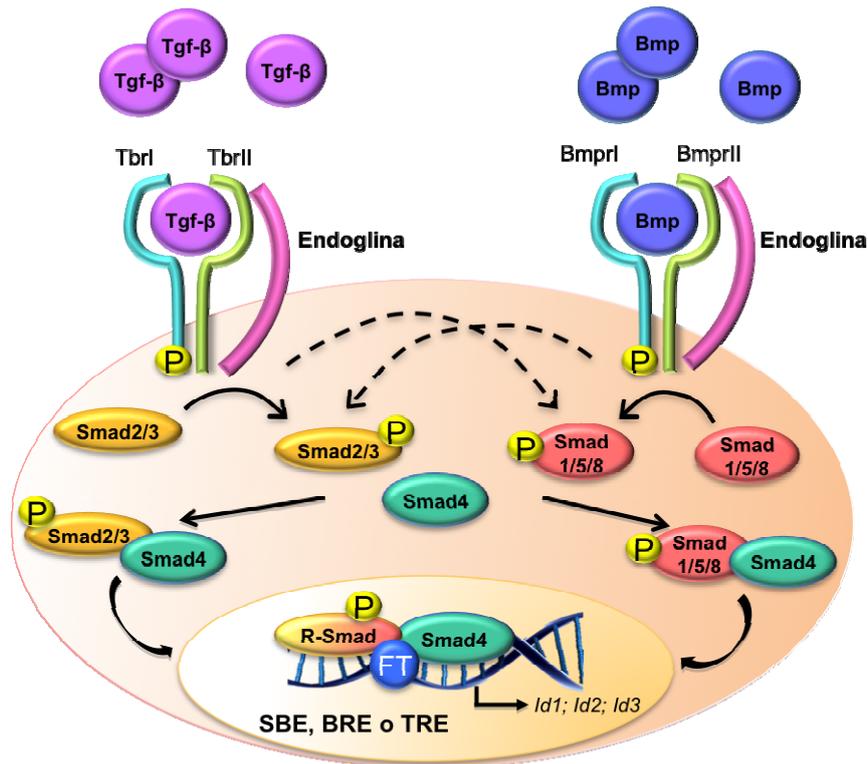
heteromérico se unen los co-receptores endoglina o betaglicano (Cheifetz y col., 1992; Shi y Massague, 2003). La selección de los distintos receptores para la formación del complejo activado depende del tipo de ligando. Así, para mantener la especificidad de la señal, en la mayoría de los tejidos, la señalización por Tgf- $\beta$  implica la formación del complejo con el receptor Tbrl Alk5 (pero también puede ser a través de Alk4 y 7), induciendo la fosforilación de las proteínas Smad reguladoras 2 y 3, mientras que en el caso de la señalización por la citoquina Bmp los receptores tipo I (Tbrl) implicados son Alk1, 2, 3 y 6, que fosforilan las Smad reguladoras 1/5/8 (**Figura 6**) (Ten Dijke y Hill, 2004; David y col., 2009).

Dentro de la señalización de Tgf-  $\beta$  existen varias excepciones, como en el endotelio, donde el tipo de receptor y la señalización varía en función de los niveles de expresión de endoglina. Así, cuando endoglina se sobreexpresa, el Tbrl implicado es Alk,1 que fosforila a las proteínas Smad1, 5 y 8, promoviendo la angiogénesis, mientras que con niveles normales de endoglina, el Tbrl que constituye el receptor es Alk5, que fosforila a las Smad2 y 3, promoviendo un estado de reposo endotelial (Goumans y col., 2002; Blanco y col., 2004). En este contexto, endoglina constituye un modulador directo del balance entre ambas vías de señalización, estimulando la vía de Alk1, e inhibiendo indirectamente la vía de Alk5, y conduciendo, en consecuencia, a la activación del endotelio (Lebrin y col., 2004).

En el caso de las citoquinas Bmp además de estar implicadas en la formación del tejido óseo, también forman parte de la morfogénesis y mantenimiento de muchos tejidos, como el tejido neural o el epitelial (Lopez-coviella y col., 2000; Plikus y col., 2008; Owens y col., 2008 Rider y Mulloi, 2010; Luo y col., 2010). A nivel celular las citoquinas Bmp están implicadas en procesos de apoptosis, proliferación y diferenciación a distintos tipos celulares, entre otros (Blitz y Cho, 2009). Los receptores de Bmp presentan una gran promiscuidad. Los Tbrl de los ligandos Bmp pueden ser Alk1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7, mientras que los Tbrll pueden ser ActRIIA, ActRIIB, y BmpRII. Para que se active la vía dependiente de smads es necesario que ambos receptores formen el complejo receptor, al contrario que Tgf- $\beta$  que interacciona en primer lugar con el receptor tipo II, y reclutan a continuación al tipo I (Mazerbourg y Hsueh

2006; Rider y Mulloy 2010) En cambio, si Bmp se une directamente al receptor tipo I, reclutando posteriormente al receptor tipo II, la vía disparada no es la vía canónica, sino que se desencadena una señalización a través de la ruta de las MAP Quinasas (Botchkarev y Sharov, 2004).

Las proteínas Smad constituyen los efectores intracelulares de la familia Tgf- $\beta$ , existiendo diferentes tipos de Smad: Smad reguladoras (R-smad, smad 1, 2, 3, 5, 8), Smad mediadoras (Co-Smad, Smad 4) y Smads inhibitorias (I-Smads, Smad 6 y 7). Las R-Smads son susceptibles de ser fosforiladas por receptores tipo I en su extremo C terminal, en el motivo SSXS, modificación bioquímica que induce su activación. Una vez activadas interaccionan con la Co-Smad, y este complejo ingresa en el núcleo donde participa en la regulación transcripcional de sus genes diana, interaccionando también con distintos factores de transcripción, co-activadores y co-represores. Las I-Smads ejercen su función mediante varios mecanismos, como son: la competición por la unión al receptor, el reclutamiento de ubiquitina ligasas en el propio receptor para su degradación, o el reclutamiento de fosfatasas para la desfosforilación del receptor (Heldin y col., 1997; Lebrin y col., 2004; Blitz y Cho, 2009). Las Smad reguladoras y la Smad 4 se unen preferentemente a secuencias CAGAC, denominadas SBE (del inglés, "Smad Binding Element", elemento de unión de Smad), que se encuentran en región 5' reguladora de múltiples genes. El complejo de Smads se une con baja afinidad a estas regiones, por lo que son necesarias múltiples copias de la secuencia SBE para que la activación transcripcional del gen sea eficiente. Asimismo se ha descrito la existencia de factores de transcripción que se acomplejan con las smads para dar lugar a la regulación de la expresión de sus genes diana (Blitz y Cho, 2009; Conidi y col., 2011). Además, existe una secuencia consenso denominada BRE (del inglés "Bmp Responsive Element", elemento de respuesta a Bmp), rica en GC, situada en la región reguladora de los genes que responden a estimulación por Bmp, como Id1, a la que se unen únicamente las smads activadas por Bmp pero no por Tgf- $\beta$  (**Figura 6**) (López-Rovira y col, 2002; Conidi y col., 2011).



**Figura 6: Vía de señalización de Bmp/Tgf-β/Smad.** Cuando Tgf-β se une a su complejo receptor, constituido por un receptor tipo I (Tbrl: Alk5) y un receptor tipo II (Tbrll) y endoglina como correceptor, se activan de forma preferente mediante fosforilación en el dominio SSXS las proteínas reguladoras Smad2/3. Eventualmente, y en función del tejido, el receptor tipo I puede ser Alk1, y las Smads reguladoras fosforiladas pueden ser Smad1/5/8. Por su parte, las citoquinas Bmp interaccionan específicamente con un complejo receptor formado por receptores tipo I (Bmprl: Alk1, 2, 3 o 6) y receptores tipo II (Bmprll) formando heterodímeros con endoglina, induciendo la fosforilación activante de las Smad1/5/8. De forma similar a lo que ocurre con los factores de la familia Tgf-β, en función del tejido o de otros factores, también pueden formar parte del receptor de Bmp los receptores Alk 4/5/7, que inducirían la activación por fosforilación de las Smad2/3. Las Smad reguladoras, una vez fosforiladas, se unen a la proteína Smad4 y se translocan al núcleo para activar la transcripción de genes diana, como *Id1*, *Id2* o *Id3*, interaccionando en la región promotora con secuencias TRE, BRE y SBE (respectivamente, “Tgf-β responsive element”, “Bmp responsive element” y “Smad binding element”)

La regulación transcripcional vía Smad comprende un intrincado mecanismo en el que intervienen muchos factores, como la internalización de los receptores por endocitosis, o del correceptor endoglina, la existencia de Smads inhibitorias que actúan en presencia de determinados factores, la modificación postraduccional de las citoquinas para su activación, o la ubiquitinación de las mismas o de sus receptores para inhibir la señalización, así como la desubiquitinación para favorecer la señalización, entre otros. La mayoría de estas citoquinas, así como sus antagonistas, interaccionan con proteínas de la matriz extracelular, para favorecer o inhibir la interacción con

sus receptores (principalmente en el caso de las citoquinas Bmp). A su vez, la familia de Tgf- $\beta$  regula la interacción de la matriz extracelular con las células adyacentes, a través de la regulación de la actividad de proteasas específicas que pueden degradar estos ligandos o de la regulación de los genes que codifican para las proteínas que forman la matriz extracelular (Botchkarev y Sharov, 2004; Valluru y col., 2011; Conidi y col., 2011; Herhaus y Sapkota; 2014). Además, existen distintos modelos experimentales en los que se observa la activación simultánea de los dos grupos de Smad reguladoras por la estimulación con la misma citoquina. Así, la activación de ambos grupos de Smad y de las dianas génicas correspondientes se ha descrito en cultivos establecidos de hepatocitos estimulados con Tgf- $\beta$  (Meurer y col., 2013) y tras la estimulación con la citoquina Bmp2 en células pertenecientes al ligamento periodontal (Ishibashi y col., 2009).

## **6. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE ENDOGLINA**

Endoglina es una glicoproteína homodimérica integral de membrana de 180 KDa que funciona como un co-receptor para las citoquinas de la familia Tgf- $\beta$ , que incluye al propio Tgf- $\beta$ , a Bmp y a Activina (Cheifetz y col., 1992; David y col., 2009). Presenta un dominio extracelular, un dominio transmembrana hidrofóbico, y una región citoplasmática constituida por un dominio serina-treonina, que en humanos y ratón varía en longitud por procesamiento post transcripcional generando dos variantes de endoglina: Endoglina L, y endoglina S. La región citoplasmática de la isoforma L se encuentra altamente conservada en mamíferos y es la forma predominante de endoglina. El dominio N-terminal de endoglina no presenta homología con ningún tipo de proteína, por lo que se denomina dominio huérfano, y es el encargado de interaccionar con las citoquinas de la familia Tgf- $\beta$ . Unido dominio huérfano, endoglina presenta un dominio zona pelúcida (ZP) altamente conservado implicado en la oligomerización del receptor (Llorca y col., 2007; Bernabeu y col., 2007; Kapur y col., 2013).

El dominio extracelular de endoglina puede ser proteolizado por metaloproteasas (MMPs), generando una forma soluble de endoglina, que

circula libremente y constituye un antagonista natural de la señalización de Tgf- $\beta$ , que está implicado en procesos de desarrollo y homeostasis cardiovascular así como en enfermedades relacionadas (Venkatesha y col., 2006; Perez-Gomez y col., 2007; Kapur 2013). El dominio intracelular de endoglina es susceptible de ser fosforilado por los receptores de las citoquinas de la familia Tgf- $\beta$  a través de sus dominios serina treonina quinasa, lo que induce un cambio de localización de endoglina modulando su interacción con las proteínas de adhesión zyxina y las proteínas relacionadas con zyxina (“zyxin related proteins”, o ZRP), confiriendo a endoglina también un papel en el remodelado del citoesqueleto, ya que las proteínas zyxina se encuentran formando parte de las adhesiones focales a través de la interacción con el citoesqueleto de actina (Sanz-Rodríguez y col., 2004; Kapur y col., 2013).

Endoglina se expresa de una forma muy temprana durante el desarrollo embrionario en el tejido mesenquimático derivado del endocardio y en el endotelio vascular, estando implicada en los procesos de remodelado y desarrollo cardiovascular. Ya en la etapa posnatal, endoglina se expresa fundamentalmente en células endoteliales, y en menor medida en macrófagos, en fibroblastos, en las células de músculo liso que forman parte de la vasculatura, en el sincitiotrofoblasto de la placenta, en células troncales mesenquimáticas y hematopoyéticas, pre-eritroblastos, células leucémicas procedentes del linaje mieloide y linfoide, y monocitos activados, así como en diferentes regiones de la piel, como en el estrato basal de la epidermis, en las glándulas sebáceas y en los FPs (Cheifetz y col., 1992; Quintanilla y col., 2003; Fernández-L y col., 2006, Kapur y col., 2013). Endoglina constituye un componente esencial en el mantenimiento de la fisiología vascular a través de la regulación de los procesos de angiogénesis y remodelado necesarios para el mantenimiento vascular y la neovascularización, llevados a cabo a través de la señalización de miembros de la familia Tgf- $\beta$ , de la que endoglina es su correceptor (Cheifetz y col., 1992). Dentro de la familia de citoquinas de Tgf- $\beta$ , endoglina es capaz de interactuar con: Tgf- $\beta$ 1 y 3, Bmp2, 4, 7, 9, 10, y activina A, en presencia del complejo receptor (Cheifetz y col., 1992; Bernabeu y col., 2008; Banerjee y col., 2012; Alt y col., 2012; Borges y col., 2013).

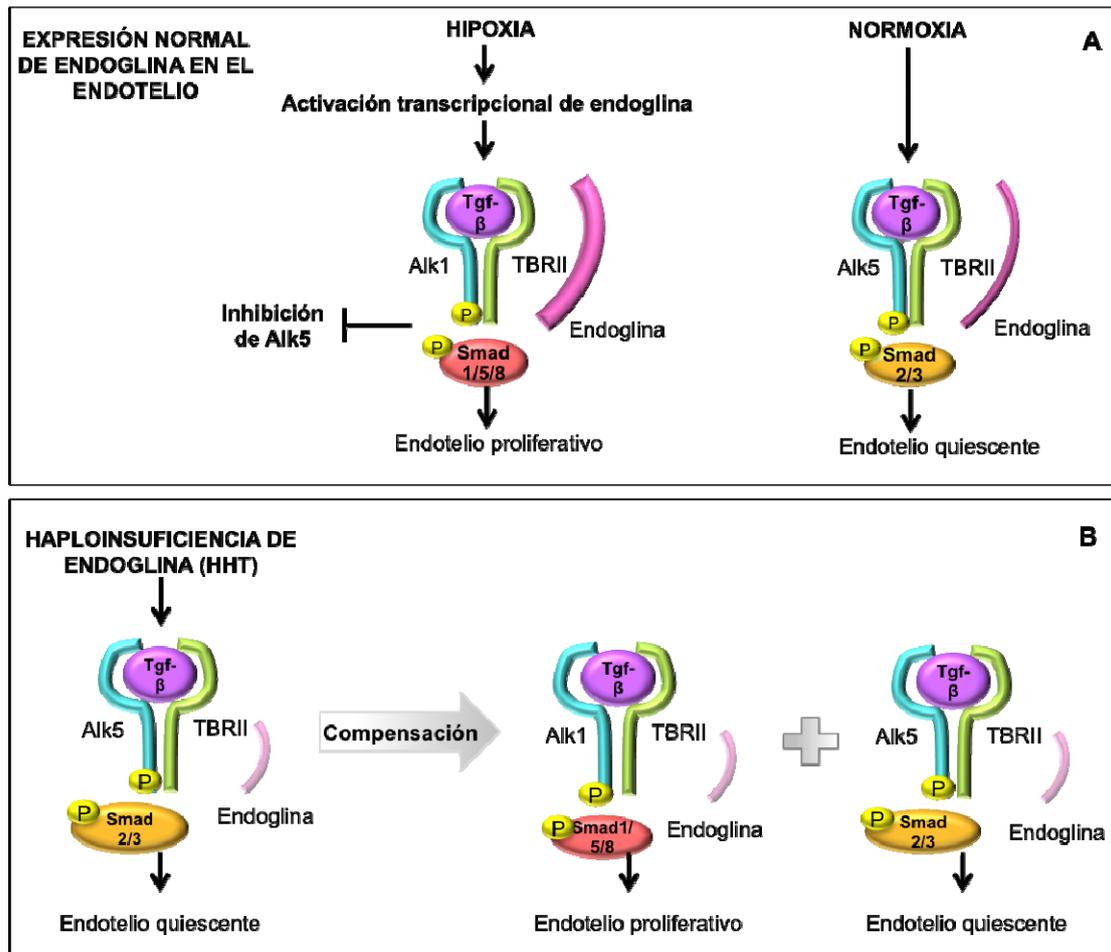
Endogлина regula los procesos de angiogénesis y remodelado vascular mediante variaciones en su nivel de expresión. Así, los factores descritos capaces de inducir la expresión de endogлина son el factor inducible por hipoxia 1 $\alpha$  (Hif-1 $\alpha$ , “Hipoxia Inducible Factor 1 $\alpha$ ”), Tgf- $\beta$ , angiotensina II, hipercolesterolemia, y Klf6 (“factor 6 kruppel-like”). En la región 5' reguladora del gen endogлина no existen elementos reguladores del tipo cajas TATA o CAAT, pero si contiene dos regiones ricas en CG, y secuencias consenso para SP1, ETS; GATA, AP-2, NF $\kappa$ B, MAD, y elementos respuesta para Tgf- $\beta$ , glucocorticoides, vitamina D y estrógenos. Además, cerca de las regiones de unión a SP1, también se encuentran sitios SBE (“Smad binding elements”) (Botella y col., 2001; Kapur y col., 2013).

## 7. ENDOGLINA Y TELANGIECTASIA HEMORRÁGICA HEREDITARIA

Endogлина está implicada en el desarrollo cardiovascular, de forma que ratones homocigotos para una mutación inactivante en el gen de endogлина (*Eng*<sup>-/-</sup>) mueren durante el desarrollo prenatal debido a anomalías vasculares y cardíacas, demostrando la importancia de esta proteína durante el desarrollo cardiovascular embrionario en modelos murinos (Bourdeau y col, 1999; López-Novoa y Bernabeu, 2010). En humanos, la importancia de Endogлина en la fisiología vascular se puso de manifiesto cuando se demostró que la mutación de uno de los alelos de este gen produce el desarrollo de la enfermedad denominada Telangiectasia Hemorrágica Hereditaria (HHT, “Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia”) (McAllister y col, 1994). La HHT es una displasia vascular autosómica dominante que cursa con telangiectasias vasculares en la piel y la mucosa nasal, epistaxis, hemorragias gastrointestinales, y malformaciones arteriovenosas en pulmón, hígado y cerebro. Hasta la fecha se han descrito 155 mutaciones distintas en el gen de endogлина que conducen a la inestabilidad del producto, desde el exón 1 al exón 12, el tipo de mutación es muy variable, pero las más frecuentes son codones de parada prematuros y polipéptidos truncados, y conducen a bajos niveles de expresión de ARNm y proteínas truncadas muy inestables que ni siquiera llegan a alcanzar la superficie celular, con lo que no ejercen ningún efecto negativo sobre endogлина

normal (Abdalla y Letarte, 2006). La haploinsuficiencia de endoglina está aceptada como el mecanismo patogénico de esta enfermedad (Fernandez-L y col., 2006; Alt y col., 2012). Endoglina se sobreexpresa en células endoteliales proliferantes, constituyendo un modulador de las rutas de Tgf- $\beta$  que gobiernan el estado proliferativo o quiescente del endotelio. En estas células endoglina potencia la señalización de Tgf- $\beta$  a través de Alk1, estimulando la fosforilación de la Smad1/5/8. Todo apunta a una interacción entre ambas rutas, de forma que Alk1 y endoglina parecen estar inhibiendo la señalización a través de Alk5 y Smad2/3 (Alt y col., 2012)

En individuos afectados por la HHT1, la menor expresión de endoglina en sus células endoteliales conduce a una regulación negativa de la ruta Tgf- $\beta$ /Alk1/Smad1/5/8, favoreciendo en un principio la señalización por Tgf- $\beta$ /Alk5/Smad2/3, que da lugar a un endotelio quiescente (Kapur y col., 2013). El grupo de Lebrin y colaboradores postuló en el 2004, en base a los resultados obtenidos en cultivos de células endoteliales en los que habían silenciado parcialmente endoglina, que endoglina parecía inhibir la ruta de señalización Tgf- $\beta$ /Alk5/Smad2/3 de manera indirecta, con el objetivo de potenciar ligeramente la señalización a través de Tgf- $\beta$ /Alk1/Smad1/5/8, y favorecer así la proliferación de un endotelio que se encuentra completamente quiescente. Esto parece ser un mecanismo compensatorio de adaptación, sin embargo, en los individuos afectados por HHT1, ambas rutas se encuentran fuertemente afectadas (Lebrin y col., 2004). Una de las consecuencias directas de la deficiencia en la ruta de Tgf- $\beta$ /Alk1/Smad1/5/8 es el fallo en la formación de la estructura tubular que las células endoteliales llevan a cabo para la generación de los vasos sanguíneos, debido a la alteración en el proceso de migración. Esto conduce a una desregulación en la red vascular durante el proceso de angiogénesis, añadido a los defectos en la remodelación del citoesqueleto de las células endoteliales consecuencia también de la disminución de la expresión de endoglina (Sanz-Rodríguez y col., 2004; Fernandez-L y col., 2006; Kapur y col., 2013).



**Figura 7: Modulación de la proliferación celular en el endotelio por endogлина.** (A) En el endotelio, en situaciones de hipoxia, se promueve una sobreexpresión de endogлина, que favorece la señalización vía Tgf-β a través del receptor tipo I (Tbr1) Alk1, induciendo la fosforilación activadora de las proteínas reguladoras Smad1/5/8, que resulta en una activación de la proliferación de las células endoteliales. Este complejo receptor, asociado a endogлина, inhibe la función del receptor tipo I Alk5. Por el contrario, niveles moderados de endogлина regulan la señalización de Tgf-β a través del receptor tipo I Alk5, que activa por fosforilación las proteínas reguladoras Smad 2/3, manteniendo el endotelio en un estado quiescente. (B) En condiciones de haploinsuficiencia o pérdida funcional de endogлина, la señalización de Tgf-β transcurre a través del receptor tipo I (Tbr1) Alk5 que activa por fosforilación las proteínas reguladoras Smads 2/3, lo que tiene como consecuencia un estado quiescente constitutivo en el endotelio. Posteriormente, como mecanismo de compensación para favorecer la proliferación del endotelio, se inhibe parcialmente la señalización a través de Alk5/Smad 2/3, favoreciéndose en parte la señalización a través de Alk1/Smad 1/5/8.

## 8. ENDOGLINA EN PIEL

En procesos de carcinogénesis en piel, Tgf-β presenta un papel claro como supresor de la proliferación en los estadios tempranos. Sin embargo, su papel supresor se torna contrario durante estadios más avanzados, estando esta citoquina involucrada en el proceso de progresión maligna, metástasis e invasión. Endogлина, como correceptor de Tgf-β, está implicada en la

señalización por parte de esta citoquina, de forma que en función de su nivel de expresión, el papel supresor en piel de Tgf- $\beta$  puede verse alterado. Así el grupo de Quintanilla, en 2003 observó que, en protocolos de carcinogénesis química realizados en piel de ratones que expresan una menor dosis de endoglina, el número de lesiones generadas disminuye en comparación con los individuos que presentan dosis normales de endoglina, sin embargo, al analizarlas, se contabiliza un mayor número de lesiones malignas. Es decir, la carencia de endoglina acentúa el papel de Tgf- $\beta$ , a través de una mayor activación de la ruta Smad2/3, sugiriendo que la expresión normal de endoglina en piel, por tanto, constituye un atenuador de la señal de Tgf- $\beta$  (Quintanilla y col., 2003; Pérez-Gómez y col., 2007).

El papel de endoglina en proliferación y diferenciación de epitelios se ha puesto de nuevo de manifiesto a través de ensayos de regeneración de epitelios, donde Tgf- $\beta$  presenta un papel central (Valluru y col., 2011). Recientemente se ha descrito que endoglina incrementa gradualmente su nivel de expresión en las zonas circundantes a una herida, jugando un papel importante en el proceso de cicatrización de las mismas. Ratones heterocigotos para el gen de endoglina, que no muestran síntomas de HHT, presentan una cicatrización deficiente en comparación con sus controles, compatible con una mayor señalización por parte de Tgf- $\beta$  al presentar menores niveles de expresión de endoglina. Asimismo en estos individuos también se ha descrito una proliferación y diferenciación disminuida, ya que una vez cerrada la herida el número de estratos que constituyen la nueva epidermis es significativamente menor en los ratones *Eng*<sup>+/-</sup> en comparación con los *Eng*<sup>+/+</sup> (Pérez-Gómez y col., 2007; Pérez-Gómez y col., 2014). La menor capacidad proliferativa de los queratinocitos en los individuos *Eng*<sup>+/-</sup> quedó confirmada después de que sometieran a estos individuos a un tratamiento con el éster de 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), un agente inductor de la proliferación, descrito como promotor tumoral (Pérez-Lorenzo y col., 2010). Tras estos ensayos observaron que el efecto hiperproliferativo del TPA encontrado en los individuos normales no se detecta en individuos con una menor expresión de endoglina (Pérez-Gómez y col., 2014).



## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



Endoglina forma parte del complejo receptor de varios miembros de la familia Bmp/Tgf- $\beta$ , y tiene un papel esencial en la regulación funcional del endotelio vascular y del proceso de angiogénesis. El papel de endoglina en piel es en gran medida desconocida. En el ratón, esta proteína se expresa en el estrato basal de la epidermis y en los FPs, y su función está implicada en la cicatrización de heridas y en la progresión tumoral en protocolos experimentales de carcinogénesis química en piel. Además, la señalización Bmp/ Tgf- $\beta$  es esencial en la regulación del ciclo del pelo. Estos antecedentes sugieren que, al igual que en el endotelio, endoglina podría tener papeles relevantes en el mantenimiento de la homeóstasis cutánea.

Teniendo en cuenta estas observaciones y la función de endoglina como co-receptor de las citoquinas de la familia Bmp/Tgf- $\beta$ , el objetivo general planteado en este trabajo ha consistido en caracterizar la implicación de esta proteína en la regulación del ciclo de crecimiento del FP y de las células troncales epidérmicas foliculares responsables de su actividad, utilizando como sistema experimental un modelo de ratón haploinsuficiente para el gen de endoglina. El desarrollo de este objetivo constituiría un paso previo para validar la función de endoglina como una importante diana terapéutica en piel. Para abordar este objetivo principal, se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- Establecer el patrón de expresión de endoglina en piel a lo largo del ciclo del pelo y su implicación en el mantenimiento de este ciclo.
- Analizar la implicación de endoglina en la regulación de la proliferación y movilización de las células madre epidérmicas del FP.
- Evaluar la importancia de la función de endoglina en las rutas de señalización que regulan el ciclo de crecimiento del pelo, fundamentalmente Wnt/ $\beta$ -catenina y Bmp/Smad, y caracterizar los mecanismos moleculares implicados.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**



## 1. MODELO EXPERIMENTAL DE RATÓN HAPLOINSUFICIENTE PARA EL GEN ENDOGLINA

En este proyecto se ha utilizado un modelo de ratón heterocigoto, haploinsuficiente para el gen de Endoglina (*Eng*<sup>+/-</sup>) generado por recombinación homóloga, utilizando células troncales embrionarias de origen 129/Ola, y posterior retrocruzamiento sobre la cepa C57Bl/6 (Bourdeau y col., 1999). Los correspondientes hermanos de camada C57Bl/6-*Eng*<sup>+/+</sup> fueron utilizados como control. Los genotipos se determinaron por PCR a partir de ADN extraído de la cola de los ratones. Los ratones C57Bl/6-*Eng*<sup>+/-</sup> son fértiles, su descendencia muestra una relación equitativa en cuanto a sexos, con una esperanza de vida dentro de los rangos de la normalidad para esta cepa de ratón y no presentan alteraciones cardiovasculares significativas (Bourdeau y col., 1999). Todos los animales fueron estabulados en el animalario del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” CSIC-UAM, Madrid, en condiciones estándar y, después de los procedimientos experimentales correspondientes, se sacrificaron en cámara de CO<sub>2</sub> siguiendo los protocolos aprobados por el Comité de Bioética del centro. Todos los experimentos con animales se han realizado conforme a las normativas nacionales e internacionales que regulan la experimentación y cuidado de los animales de laboratorio de acuerdo al Real Decreto 1201/2005.

Para el genotipado de los animales se utilizó ADN extraído a partir de una muestra de 0,5 cm del extremo distal de la cola de los animales utilizando el kit REDEExtract-N-Amp™ Tissue PCR kit (Sigma-Aldrich) siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Para la PCR se utilizaron tres oligonucleótidos cebadores distintos que amplifican selectivamente un producto de 470 pb en el caso del alelo mutado, en el que se ha sustituido la secuencia del gen de endoglina por la del gen de LacZ, cuya expresión está regulada por el promotor de endoglina, y un producto de 300 pb que corresponde al alelo salvaje (Bourdeau y col., 1999). Los oligonucleótidos empleados como cebadores utilizados están descritos en la **tabla 1**

NOMBRE	SECUENCIA
ME1F	TACCTCTGGATACCGGATAAG
ME1R	AAGTTTGGCATCCTATGAAAC
MEZR	AAATGTGAGCGAGTAACAACC

**Tabla 1: Oligonucleótidos cebadores utilizados para el genotipado de los ratones C57Bl/6-Eng<sup>+/-</sup>**

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con una desnaturalización inicial a 94°C durante 2 minutos, seguida de 30 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 56°C durante 35 segundos, 68°C durante 2,5 minutos, con una extensión final de 5 minutos a 68°C.

### **1.1. Identificación de células troncales en la piel y el folículo piloso de ratón**

Para identificar y cuantificar el número de células troncales de la región prominente del FP, se utilizó como fundamento experimental la baja tasa proliferativa de estas células en ensayos de marcaje de ADN a largo plazo con el análogo de timidina 5-bromo-2'-deoxyuridina (BrdU, Sigma-Aldrich). Se usaron ratones neonatos de 8-10 días de edad para evitar el efecto teratogénico de la BrdU (Banningan y col., 1990). Los animales fueron inoculados con BrdU (80-100µL, 6,25 mg/ml) en tampón fosfato PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, K H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM). Se administraron 4 inyecciones intraperitoneales seriadas en intervalos de 24 horas. Con este protocolo experimental la BrdU se incorpora en la práctica totalidad de las células del organismo por procesos de síntesis o reparación del ADN, incluidas las células troncales, que se encuentran activas en esta etapa del desarrollo. Después de un período de tiempo lo suficientemente largo (un mínimo de 50 días) sólo aquellas células con una muy baja tasa de proliferación son capaces de retener la marca de BrdU (Label Retaining Cells, LRCs) (Braun y col., 2003). Se considera que estas células son fundamentalmente células troncales adultas, mantenidas en su nicho en estado quiescente. Las células marcadas

se localizaron por inmunofluorescencia (anti-BrdU-FITC, Roche) en montajes *in toto* de piel de cola de ratón en estado de telogén o reposo.

### **1.2. Identificación de células proliferantes en la piel y el folículo piloso de ratón**

Para identificar y cuantificar el número de células en fase de síntesis activa de ADN se llevaron a cabo experimentos de marcaje a tiempo corto con BrdU. Para ello, animales adultos (de 50 días, cuyas células troncales del FP se encuentran en estado de reposo) recibieron 2 inyecciones de BrdU (80-100  $\mu$ L, 12,5 mg/ml) a intervalos de 24 horas y se sacrificaron 24 horas después. Con este protocolo experimental, la BrdU se incorpora en aquellas células que se están dividiendo activamente. Las células marcadas se localizaron por inmunofluorescencia en montajes *in toto* de piel de cola de ratón en estado de telogén.

### **1.3. Inducción de proliferación celular en la epidermis y el folículo piloso del ratón**

Utilizando como modelo los FPs de la cola del ratón, se realizaron ensayos de proliferación y movilización de las células troncales epidérmicas, y de hiperproliferación epitelial, tanto en la piel dorsal de la cola, como en la piel del lomo. Para ello se utilizaron ratones de 50 días de edad (5 ratones por genotipo y condición experimental), en la fase de telogén, momento en el que las células troncales del FP se encuentran en estado de reposo. Los animales recibieron tópicamente 3 dosis de *12-O-Tetradecanoil-Phorbol-13-Acetate* (TPA, Sigma-Aldrich, 20 nM en acetona) sobre la piel dorsal de la cola y en la piel del lomo, distribuidas durante 48 horas. El grupo de los ratones control recibió únicamente acetona. Para evitar daños en los animales debido a la inhalación del compuesto, se les mantuvo dentro de una campana extractora después de la aplicación del TPA durante al menos 20 minutos. 24 horas después de la última aplicación se procedió al sacrificio de los animales y a la obtención de las muestras de la piel dorsal de la cola y de la piel del lomo.

#### **1.4. Ensayos de inducción capilar por rasuración**

Para los experimentos de inducción capilar por rasuración, se emplearon un mínimo de 10 ratones por genotipo y experimento. En primer lugar se procedió a rasurar el lomo de los ratones (de 50 días, al principio de la telogén refractaria, o de 90 días, durante la telogén competente; Plikus y col., 2008). El estudio de la progresión del crecimiento capilar se realizó mediante observaciones diarias y adquisición de imágenes digitales empleando una cámara réflex digital Canon EOS 610, y utilizando el programa Photoshop CS3 Extended, versión 10.0.1 (Adobe) para el procesamiento de las imágenes. El experimento se dio por finalizado cuando la práctica totalidad del lomo de los animales de un mismo genotipo regeneró por completo el pelaje del lomo, momento en que se procedió al sacrificio de los animales y a la recogida de muestras de la piel dorsal del lomo para su posterior procesamiento histológico.

#### **1.5. Procesamiento histológico, montajes *in toto* e inmunolocalización de proteínas en el tejido**

Para el procesamiento histológico, muestras de piel del lomo de un tamaño aproximado de 1x1 cm, extraídas de animales sometidos a los distintos protocolos experimentales, se fijaron en formaldehído 3,7% en PBS durante al menos 48 horas a 4°C. Para su inclusión en parafina, las muestras fijadas se lavaron en agua destilada y se deshidrataron en soluciones con concentraciones crecientes de etanol. A continuación las muestras se llevaron de etanol absoluto a heptano (10-15 min a temperatura ambiente, RT, y 10-15 min a 56 °C) y se incluyeron en parafina a 56 °C durante 24 h. Las secciones histológicas (4-8 µm de espesor) se montaron sobre portaobjetos tratados con poli-L-lisina. Para el análisis histopatológico correspondiente a cada protocolo experimental, las muestras se tiñeron con H-E siguiendo procedimientos estándar.

Los montajes *in toto* de la epidermis de la cola de animales sometidos a los diferentes protocolos experimentales se prepararon según el protocolo descrito por Braun y colaboradores (Braun y col., 2003). Brevemente, después del sacrificio de los ratones, se aisló la piel de la cola y se incubó durante 5

horas en EDTA 5mM en PBS, a 37°C. Posteriormente, utilizando pinzas, se separó la epidermis de la dermis. Las láminas intactas de epidermis, con los FPs suspendidos de las mismas, se fijaron en formaldehído (3,7% en PBS) durante 2 horas a RT. Las láminas de epidermis ya fijadas se almacenaron a 4 °C en PBS conteniendo azida sódica (0,2%).

Para la inmunocalización en cortes de parafina, las secciones se desparafinaron durante 45 minutos en xilol, se hidrataron en series decrecientes de etanol, finalizando en agua destilada (5 minutos por serie). Para el desenmascaramiento del antígeno, las muestras se trataron con citrato sódico 0,01 M , pH 6, durante 3 minutos en una olla a máxima presión alcanzando en torno a 120-130°C. Para la detección del antígeno mediante inmunofluorescencia indirecta, las muestras fueron permeabilizadas en Tritón X-100 0,1% en PBS y se bloquearon con BSA 0,5% (Sigma-Aldrich) en PBS durante 30 min RT. Posteriormente, las muestras se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente O/N a 4°C, se lavaron en PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente 1 hora a RT (**Tabla 2**). Cuando la detección de un antígeno por un anticuerpo determinado requirió amplificación de señal para su adecuada visualización, se utilizó el sistema TSA Plus Cyanine 3 (Perkin Elmer) siguiendo el protocolo recomendado por la casa comercial. Para la detección de la 5-bromo-2'-deoxyuridina en montajes *in toto* de epidermis de la cola, las piezas de epidermis fueron previamente lavadas abundantemente en agua para eliminar el exceso de formol y sometidas a un tratamiento de hidrólisis ácida (HCl 1N) 45 minutos a 37 °C, que se neutralizó con tampón TBE (Tris-borato 45 mM pH 8,3-EDTA 1 mM) 5 minutos a RT. Finalmente se procedió al bloqueo y permeabilización de las muestras con tampón PBT (Tritón X-100 0,5%, Gelatina 0,2% en PBS) 30 minutos a RT, previo a la incubación O/N con el anticuerpo (**Tabla 2**). Se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-BrdU conjugado con fluoresceína a 37°C. La detección de las roturas en el ADN se realizó mediante el ensayo TUNEL siguiendo el protocolo indicado por la casa comercial (TUNEL Label, Roche). En todos los casos se utilizó como medio de montaje Vectashield (Vector Labs) conteniendo 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI, 5 ng/ml, Molecular Probes) para la contratinción de la cromatina nuclear.

<b>ANTICUERPO</b>	<b>ANIMAL DE ORIGEN</b>	<b>CASA COMERCIAL</b>	<b>APLICACIÓN</b>	<b>DILUCIÓN</b>
<b>BrdU-FITC</b>	Ratón	Roche	IF	1:100
<b>MJ1 (endoglina)</b>	Rata	Cedido por el Dr. Carmelo Bernabéu	WB	1:2
<b>Smad1</b>	Conejo	Cell Signaling	WB	1:1000
			IP	1-2 µg/ muestra
<b>Smad4</b>	Conejo	Cell Signaling	WB	1:1000
			IP	1-2 µg/ muestra
			IF	1:100
<b>P-smad 1/5/8</b>	Conejo	Cell Signaling	WB	1:1000
			IF	1:100
<b>β catenina</b>	Ratón	BD Transduction	WB	1:1000
			IP	1-2 µg/ muestra
<b>ABC (active β catenina)</b>	Ratón	Millipore	IF	1:100
<b>P smad2/3</b>	Conejo	Cell Signaling	IF	1:100
<b>Tubulina</b>	Ratón	Sigma	WB	1:10000
<b>H3</b>	Conejo	Abcam	WB	1:1000
			IP	1-2 µg/ muestra
<b>Anti-IgG de</b>	Cabra	Santa Cruz	WB	1:5000

<b>Rata - HRP</b>				
<b>Anti-IgG de ratón - HRP</b>	Oveja	GE Healthcare	WB	1:2000
<b>Anti-IgG de conejo - HRP</b>	Burro	GE Healthcare	WB	1:5000
<b>Anti-IgG de ratón – Alexa Fluor 546</b>	Cabra	Molecular Probes	IF	1:500
<b>Anti-IgG de conejo – Alexa Fluor 546</b>	Cabra	Molecular Probes	IF	1:500
<b>Anti conejo-HRP específico de cadena ligera</b>	Ratón	Jackson Immuno Research	WB	1:10000

**Tabla 2: Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en este trabajo**

## **2. ENSAYOS DE SILENCIAMIENTO DE ENDOGLINA Y ESTIMULACIÓN POR LA CITOQUINA BMP4 EN LA LÍNEA CELULAR E14**

La línea E14, de células troncales embrionarias se derivó a partir de la masa celular interna del blastocisto de ratón de la cepa 129/Ola (Hooper y col., 1987; Kim y Ryoo, 2012). Las células se cultivaron a 37 °C en atmósfera húmeda con un 5% de CO<sub>2</sub>, en medio de cultivo GMEM (Gibco) suplementado con L-glutamina (2 mM, Gibco), aminoácidos no esenciales (1x, Gibco), sodio piruvato (1 mM, Gibco), 2-mercaptoetanol (0,05 mM, Gibco), Leukemia Inhibitory Factor (LIF, 1000 unidades/ml), gentamicina (64 µg/ml, Genta-Gobens), ampicilina (Sigma-Aldrich) y 10% de suero fetal bovino (FBS, Gibco) previamente inactivado por calor durante 30 minutos a 56 °C. El medio se cambió en días alternos y las células fueron tripsinizadas cada dos días, con tripsina-EDTA 0,05% (Gibco), sembrándose a una dilución 1/6. El material

plástico de cultivo fue tratado previamente a la siembra de células con una solución de gelatina (0,1%, Sigma-Aldrich) durante media hora a 37°C, y posteriormente se lavó con PBS. Todos los experimentos se realizaron una vez alcanzada la estabilización del cultivo tras la descongelación de las células, comprobando que las condiciones de cultivo no inducían diferenciación celular, asociada en esta línea a la actividad de la fosfatasa alcalina (86R-1KT, Sigma-Aldrich).

Para el silenciamiento parcial del gen endoglina se utilizaron 4 tipos de ARN interferente de pequeño tamaño (ARNi, Santa Cruz) de 21 bases de longitud, que se unen específicamente a 4 regiones del ARN mensajero de endoglina, silenciando dicho gen en torno a un 50% cuando se utiliza una concentración final de los cuatro ARNi de 50nM (**Tabla 3**).

<b>NOMBRE</b>	<b>SECUENCIA</b>
<b>Mm_Eng_1</b>	CTCCTGGTTCATCGACATCAA
<b>Mm_Eng_2</b>	CACTAATAAATCAGACATGAA
<b>Mm_Eng_3</b>	CCCATGCTGCTTAGAAGCCTA
<b>Mm_Eng_4</b>	CCGGACGGTGACCGTAATGAT

**Tabla 3: ARNi utilizados para el silenciamiento de endoglina en la línea E14**

Para la transfección reversa, sistema según el cual las células en suspensión se siembran directamente junto con la mezcla de transfección, se partió de 1,5 millones de células por placa de cultivo (P60, Falcon), previamente gelatinizada, sembradas en medio de cultivo sin antibióticos y con menor porcentaje de FBS (3%), conteniendo Lipofectamina<sup>®</sup> 2000 (1:400, Life Technologies) y los 4 ARNi (50 nM) antes descritos (**Tabla 3**). Como control de la transfección se usó un ARNi que no reconoce específicamente ninguna secuencia (control ARNi, 50 nM, Ambion). Las células se mantuvieron en condiciones de cultivo durante 8-10 horas. Al cabo de este tiempo las células se lavaron con PBS y se añadió medio de cultivo completo. La eficacia del silenciamiento de Endoglina se determinó mediante qRT-PCR, a partir del ARN extraído de los cultivos celulares 24 horas después de la transfección. La

extracción del ARN, la conversión a ADNc y el ensayo de qRT-PCR se realizaron tal y como se describe en el apartado 4 de Materiales y Métodos.

Para la estimulación de la ruta de señalización de Bmp se empleó la citoquina Bmp4 (10 ng/ml, R&D) El tratamiento se llevó a cabo en células previamente transfectadas con ARNi para endoglinina o ARNi control, así como sobre los controles de transfección. Antes del tratamiento, las células se sometieron a ayuno con medio de cultivo sin suero durante 4 horas en condiciones de cultivo celular, y a continuación fueron tratadas con Bmp4 durante 1 hora a 37 °C. Los controles de los tratamientos se realizaron de forma paralela, incubando las células con BSA a la misma concentración. Una vez finalizado el tratamiento, las células fueron lavadas con PBS y tripsinizadas. La solución celular fue centrifugada a 900 rpm durante 4 minutos, y los pellets celulares se lavaron nuevamente con PBS y se congelaron a -80 °C para análisis posteriores.

### **3. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNA POR INMUNOBLOT**

Para determinar los niveles de expresión de proteína, las muestras de piel o pellets celulares se extrajeron en tampón RIPA (Tris-HCl pH 7,6 25 mM, NaCl 150mM, NP-40 1%, SDS 0,1%) o en tampón SDS (Tris-HCl pH 6,8 50 mM, SDS 2%, glicerol 10%,  $\beta$ -mercaptoetanol 1%, EDTA 12,5 mM) conteniendo inhibidores de proteasas (Aprotinina 2  $\mu$ g/ml, PMSF, 2 mM y Leupeptina 2  $\mu$ g/ml, de Sigma-Aldrich; o el cóctel inhibidor de proteasas tipo I, Calbiochem) así como inhibidores de fosfatasa (Ortovanadato sódico 2 mM,  $\beta$ -glicerol fosfato 2 mM, y NaF 5 mM de Sigma-Aldrich). Para las muestras de piel el tejido se disgregó con tijeras, y se homogeneizó utilizando un rotor Polytron (PT 1200 E, Kinematica). Las muestras homogeneizadas se incubaron en el buffer de extracción durante 2 horas a 4 °C en agitación, y posteriormente se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 min a 4 °C. Se descartaron la fracción lipídica superior y la fracción proteica insoluble inferior. La concentración de proteína en la fracción soluble se determinó por el método de Bradford (BioRad). Cantidades equivalentes de proteína procedentes de 3-4 ratones de cada condición se combinaron y se resuspendieron en tampón Laemmli (Tris-

HCl pH 6,8 62,5 mM, glicerol 25%, SDS 2%, Azul de bromofenol 0,01%). Las proteínas procedentes de pellets celulares de la línea E14 se extrajeron en tampón RIPA conteniendo inhibidores de proteasas y fosfatasa. Se incubaron en agitación suave durante 20 minutos a 4°C. Una vez centrifugadas las muestras a 12000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, se recogió la fase proteica soluble y se cuantificó utilizando el sistema colorimétrico basado en el ácido bicinconínico (BCA, Pierce)

La separación de proteínas se llevó a cabo por electroforesis en geles de acrilamida (Acrilamida/bis-acrilamida 29:1, Bio-Rad), a distintas concentraciones en función de la proteína de interés, y en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Las proteínas fueron transferidas a membranas de Immobilon-P (Millipore) y se bloquearon en TBST (TBS-Tween 0,1%) con BSA 5%, conteniendo inhibidores de fosfatasa 1 hora a RT. Posteriormente, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en TBST-BSA 0,5%, O/N a 4°C (**Tabla 2**), se lavaron en TBST y se incubaron 1 hora a RT con el correspondiente anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (**Tabla 2**). La detección de la actividad peroxidasa se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia (ECL, Pierce). Las bandas correspondientes a las diferentes proteínas fueron digitalizadas con el programa Photoshop CS3 Extended, versión 10.0.1 (Adobe).

#### **4. EXTRACCIÓN DE ARNm Y ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA**

La obtención de ARN a partir de las muestras de piel del lomo se realizó mediante una extracción orgánica con TriPure™ Isolation Reagent (Roche). Para ello el tejido se disgregó con tijeras, y posteriormente se homogeneizó mediante el rotor Polytron (PT 1200 E). Al volumen de homogeneizado obtenido se añadieron 0,2 volúmenes de cloroformo (Merck), se mezcló totalmente y se centrifugó a 12000 rpm, 15 min, 4°C, para la separación de la muestra en tres fases, a partir de las cuales se puede purificar, de abajo a arriba: proteínas, ADN, y ARN. La purificación del ARN se llevó a cabo mediante el sistema RNeasy (QIAGEN) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial, incluyendo el tratamiento con DNasa (RNase-Free DNase Set,

Quiagen) durante el proceso de extracción para evitar la contaminación con ADN genómico. Para la extracción de ARN a partir de pellets celulares se utilizó únicamente el sistema RNeasy incluyendo el tratamiento con DNasa. La concentración de ARN, así como su pureza (ratio A260:A280  $\geq$  1,8), se determinaron mediante espectrofotometría (Nanodrop ND1000, Nanodrop Technologies)

Para la transcripción reversa de los ARN se empleó la enzima MLV (Promega), siguiendo el protocolo de la casa comercial. Partiendo de la misma concentración de ARN en todas las muestras, se obtuvo el ADNc para posterior análisis mediante qRT-PCR. El análisis de expresión por qRT-PCR se llevó a cabo utilizando la mezcla de reacción Power SYBR Green (Applied Biosystems) y mediante el sistema 7900HT Fast Real Time PCR (Applied Biosystems), utilizando los oligonucleótidos descritos en la **tabla 4**.

	<b>NOMBRE</b>	<b>SECUENCIA</b>
<b>ENDOGLINA</b>	Endo total Fwd	ACAAGGGGTGAGGTGACGTT
	Endo total Rvs	GAAACGAGGACCAGGAACAC
	Ovol1 Fwd	CTCCACGTGCAAGAGGAACT
	Ovol1 Rvs	CTCTGGTTCCCGGTAGGG
	Jagged1 Fwd	ACCACCTGCGAAGTGATTGAC
	Jagged1 Rvs	GAGATATACCGCACCCCTTCAG
<b>RUTA BMP</b>	BMP4 Fwd	CTCCCAAGAATCATGGACTG
	BMP4 Rvs	AAAGCAGAGCTCTCACTGGT
	ID1 Fwd	TGCTACTCACGCCTCAAGGA
	ID1 Rvs	TGCAGGATCTCCACCTTGCT
<b>RUTA TGF-<math>\beta</math></b>	TGF $\beta$ -1 Fwd	TGCGCTTG CAGAGATTA AAA
	TGF $\beta$ -1 Rvs	CTGCCGTACA ACTCCAGTGA

**Tabla 4:** Oligonucleótidos cebadores utilizados para la cuantificación de los niveles de expresión de ARNm mediante qRT-PCR

## 5. ENSAYOS DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA

Para los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina en tejido, las muestras de piel se fijaron en formol 1% en PBS durante 15 minutos, se disgregaron con tijeras y se homogeneizaron con el rotor Polytron (PT 1200 E) a velocidad baja para evitar vibraciones que pudieran romper la interacción de las proteínas con la cromatina. Posteriormente el homogeneizado se filtró con tamices de nylon de 40  $\mu\text{m}$  (Falcon) para descartar los residuos de mayor tamaño, y se centrifugó durante 15 minutos a 4 °C y 12000 rpm, se descartó el sobrenadante, y se lavó el pellet con 1 ml de PBS frío dos veces. Para la inmunoprecipitación de cromatina en la línea celular E14, los pellets celulares se resuspendieron en formol 1% en PBS, y se incubaron durante 15 minutos a RT. Las muestras se procesaron con tampón de lisis (SDS 1%, EDTA 10 mM, Tris HCl pH 8,1 50mM) al que se le añadieron inhibidores de proteasas y fosfatasas, y se sonicaron utilizando el sistema Bioruptor<sup>®</sup> Standard (Diagenode) durante 15 minutos a alta intensidad, con intervalos iguales de 5 segundos de sonicación y reposo, para la fragmentación del ADN de 100 a 1000 pb.

Las muestras se centrifugaron (13000 rpm, 10 min, 4°C), se recogieron los sobrenadantes y se diluyeron 10 veces con tampón de dilución (NaCl 167 mM, Tris HCl pH 8,1 16,7 mM, EDTA 1,2 mM, Tritón 1,1%, SDS 0,01%) añadiendo los inhibidores de proteasas y fosfatasas correspondientes. Después de eliminar las posibles interacciones inespecíficas mediante una incubación de 30 minutos a 4°C en agitación suave, y utilizando proteína A-agarosa y proteína G-sefarosa (Sigma-Aldrich) los sobrenadantes se incubaron ON a 4°C en agitación suave con el anticuerpo de interés, un control negativo (IgG genérica correspondiente) y un control positivo de la reacción (histona H3), en todos los casos 1  $\mu\text{g}$  de anticuerpo por muestra. A continuación los lisados se incubaron con Dynabeads Protein A (Life Technologies) durante una hora en agitación a 4 °C, se lavaron dos veces en tampones de distinta concentración salina (SDS 0,1%, Tritón X-100 1%, EDTA 2mM, Tris HCl pH 8,1 20mM, NaCl 150 mM / SDS 0,1%, Tritón X-100 1%, EDTA 2mM, Tris HCl pH 8,1 20mM, NaCl 500 mM) seguidos de dos lavados en TE, siguiendo el

protocolo descrito para la precipitación de las partículas magnéticas (Dynabeads Protein A, Life Technologies). El pellet final se resuspendió en buffer de elución (SDS 1%, NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M).

Finalmente, se eliminaron las interacciones ADN-proteína generadas durante la fijación en formol de las muestras, tanto de los inmunoprecipitados como del extracto total obtenido, mediante la incubación con NaCl 5M durante 4 horas a 65°C, y se procedió a la extracción del ADN mediante una solución de los alcoholes Fenol:Cloroformo:Isoamílico (25:24:1, Sigma-Aldrich) utilizando tubos Phase Lock Gel Heavy (5prime) que permiten la separación de la fase acuosa, que contiene los ácidos nucleicos, de la fase orgánica proteica. A continuación se precipitó el ADN en etanol y acetato de sodio 0,3 M, y se resuspendió en agua ultrapura Milli-Q para protocolos de PCR semicuantitativa y cuantitativa en tiempo real, utilizando los oligonucleótidos cebadores descritos en la **tabla 5**:

Nombre	Secuencia
<b>Start prom mEng Fwd3</b>	ACTTCCTCTACTCGCCTG
<b>Start prom mEng Rvs3</b>	AGTCACTGGGCTCTTTTCG

**Tabla 5: Oligonucleótidos cebadores utilizados para la amplificación del promotor de endoglina en ensayos de CHIP**

Para el análisis mediante qRT-PCR se utilizó la mezcla de reacción Power Sybr Green (Applied Biosystems) siguiendo el protocolo de la casa comercial, y para su detección se utilizó el sistema CFX384 Touch™ (BioRad). Los análisis de PCR semicuantitativa se llevaron a cabo mediante la amplificación del ADN con la mezcla de reacción enzimática REExtract-N-Amp™ PCR ReadyMix™ (Sigma-Aldrich), y su posterior análisis en geles de agarosa (agarosa 2% en TBE, pH 8,3).

## 6. ENSAYOS DE CO-INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS

Para los ensayos de co-inmunoprecipitación, la extracción de proteínas se realizó en tampón IPH (Tris-HCl pH 7,4 50mM, NaCl 100 mM, glicerol 10%, EDTA 5 mM, Tritón X-100 0,15%) conteniendo los inhibidores de proteasas y fosfatasas descritos en el apartados anteriores. Las muestras de piel del lomo se disgregaron con tijeras, y se homogeneizaron posteriormente con un homogeneizador Polytron (PT 1200 E) manteniendo una velocidad baja para evitar vibraciones que pudieran disgregar los complejos proteicos. Tras una incubación de 2 horas en agitación suave y a 4 °C, la separación de las proteínas solubles se llevó a cabo mediante centrifugación a 13000 rpm, 15 minutos a 4 °C. La concentración de proteínas de los extractos obtenidos de cada una de las muestras fue determinada mediante el reactivo de Bradford (BioRad), y se utilizó un volumen mínimo de 500 µl de extracto proteico de cada muestra a una concentración de 1 µg/µl. Las muestras se incubaron O/N a 4°C en agitación suave con el anticuerpo de interés y un control negativo (IgG genérica correspondiente), empleando en todos los casos 1 µg de anticuerpo por muestra. A continuación los lisados se incubaron con Dynabeads Protein A (Life Technologies) 1 hora en agitación suave a 4 °C, y se lavaron 3 veces en tampón IPH, siguiendo el protocolo descrito para la precipitación de las partículas magnéticas (Dynabeads Protein A, Life Technologies). La elución del complejo Dynabead-Anticuerpo-Antígeno se llevó a cabo en condiciones desnaturalizantes y reductoras, con tampón Laemmli, y las proteínas de interés se detectaron mediante inmunoblot con los anticuerpos correspondientes (Tabla 2)

## 7. EVALUACIÓN DE MUESTRAS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para el análisis histopatológico, las secciones histológicas teñidas con H-E (H-E) se analizaron en un microscopio Axiophot (Zeiss) acoplado a una cámara DP70 (Olympus) con el sistema de captura de imágenes DP Controller. Los montajes *in toto* de las piezas de epidermis de la cola y la inmunolocalización en secciones histológicas se analizaron en microscopios confocales espectrales Leica TCS-SP5-AOBS y LSM710 de Carl Zeiss. Las

reconstrucciones tridimensionales de las piezas de epidermis de la cola se llevaron a cabo con el programa LCS Suite versión 2.61 (Leica), o el programa Zen (Zeiss), respectivamente. Todas las imágenes fueron procesadas posteriormente con el programa Photoshop CS3 extended versión 10.0.1 (Adobe) o con el programa de análisis de imagen ImageJ versión 2.0.0 (FIJI).

La cuantificación de las LRCs se llevó a cabo sobre las reconstrucciones tridimensionales de las imágenes obtenidas en el microscopio confocal, considerando un tamaño muestral de al menos 30 folículos por ratón y un mínimo de 3 ratones por grupo. La cuantificación se llevó a cabo mediante el recuento de las células positivas en el área de la región prominente. Los resultados se expresaron como valores medios  $\pm$  error estándar y el análisis estadístico de las diferencias entre grupos se llevó a cabo utilizando el test T de Student para muestras independientes, con ayuda del programa SPSS (versión 15.0) o Microsoft Excell para Mac (versión 14.4.3). La cuantificación de las células proliferantes del epitelio se llevó a cabo siguiendo el protocolo de cuantificación de las LRCs, cuantificando un área aleatoria de superficie equivalente a la región prominente de los FP, para la estandarización de la cuantificación en las regiones del infundíbulo y EIF.

Para el estudio de los datos obtenidos del ensayo de regeneración capilar, se utilizaron las imágenes digitalizadas recogidas durante el transcurso del experimento. El área de la piel del lomo sin pelo se midió sobre las mismas de manera independiente, empleando el programa de edición fotográfica ImageJ versión 2.0.0. Los resultados se recogieron en una gráfica, que representa los valores medios del porcentaje de lomo sin cubrir en al menos 3 individuos de cada grupo experimental  $\pm$  error estándar. Los valores independientes de cada individuo se compararon utilizando el test T de Student para muestras independientes.

El análisis de los ensayos de qRT-PCR para la cuantificación de la expresión génica se llevó a cabo empleando el método Ct (Schmittgen y Livak, 2008). Con el fin de normalizar las muestras, se utilizó la cuantificación del ARN 18S como control interno ( $\Delta$ Ct), y se representó empleando el valor medio resultante de los  $\Delta$ Cts correspondientes a cada individuo en cada grupo

experimental  $\pm$  error estándar. Los valores independientes de cada individuo se compararon utilizando el test T de Student para muestras independientes, analizando las variaciones entre los distintos grupos experimentales.

El análisis de los ensayos de ChIP se llevó a cabo mediante cuantificación por qRT-PCR del ADN inmunoprecipitado, utilizando el método Ct (Schmittgen y Livak, 2008). El valor obtenido de la inmunoprecipitación con el anticuerpo de interés se normalizó con respecto al extracto total de ADN de cada muestra, o con respecto al valor obtenido de la inmunoprecipitación con el anticuerpo H3 (control positivo). Para la representación gráfica se empleó el valor medio resultante de los  $\Delta$ Cts correspondientes a cada individuo en cada grupo experimental  $\pm$  error típico. Los valores independientes de cada individuo se compararon utilizando el test T de Student para muestras independientes, para analizar las variaciones entre los distintos grupos experimentales.

## **RESULTADOS**



## 1. ENDOGLINA MUESTRA UN PATRÓN DE EXPRESIÓN EN LA PIEL ASOCIADO AL CICLO DE CRECIMIENTO DEL PELO

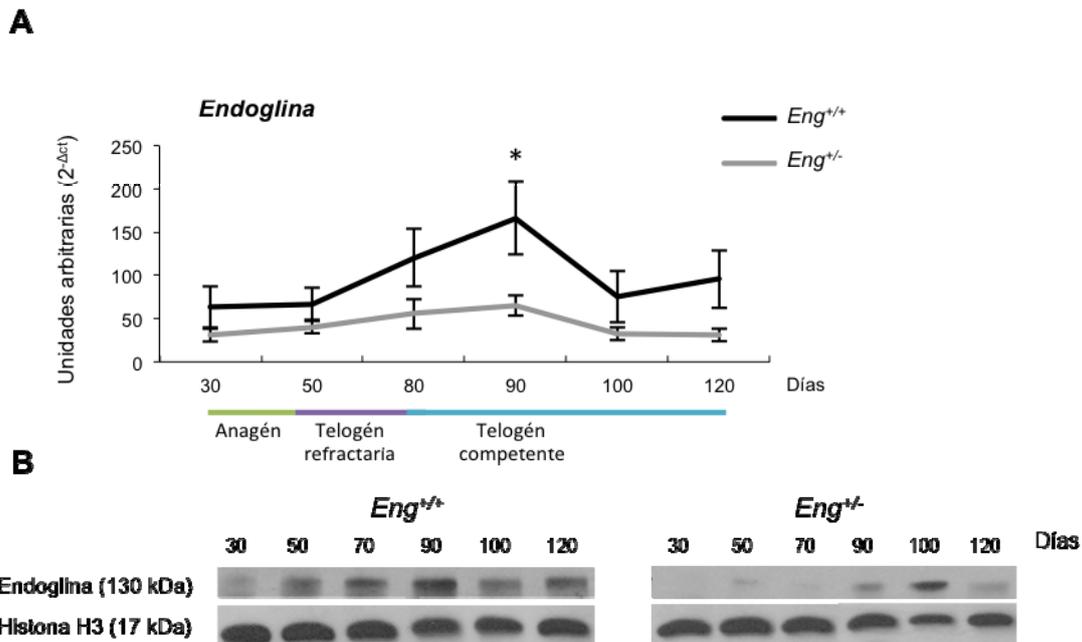
Con objeto de caracterizar posibles funciones de endogлина en la piel se determinó en primer lugar su patrón de expresión en el tejido. Se ha descrito que el nivel de expresión de endogлина en el endotelio depende de señales proliferativas o de quiescencia (Lebrin F., y col. 2004; Ten Dijke P., y col., 2004; Letarte M., y col., 2013). Además, endogлина es un correceptor para las citoquinas Bmp, pertenecientes a la familia de Tgf- $\beta$ , cuya actividad está directamente implicada en la regulación del ciclo de crecimiento del pelo (Plikus y col., 2008). Teniendo en cuenta estos antecedentes, se analizaron posibles variaciones de la expresión de endogлина en la piel en función de la fase del crecimiento del pelo.

Los ratones de la cepa C57BL/6 muestran los dos primeros ciclos postnatales de crecimiento del pelo muy bien definidos temporalmente, regulados por la actividad de las rutas Wnt/ $\beta$ -catenina y Bmp/Smad, principalmente. El primer ciclo de pelo postnatal es muy corto y dura en total 28 días. En el segundo ciclo, la fase de anagén o crecimiento, regulada por la ruta Wnt/ $\beta$ -catenina, comienza entre los días 28 y 30 postnatal. En torno al día 48 se establece la fase de telogén, que se subdivide en dos etapas: telogén refractaria y competente. La telogén refractaria, en la cual el FP es incapaz de responder a estímulos de crecimiento impidiéndose una nueva entrada en anagén, está caracterizada por la señalización inhibitoria de la ruta Bmp/Smad y dura hasta el día 80 postnatal. Durante la telogén competente, caracterizada por ausencia de señalización tanto Bmp/Smad como Wnt/ $\beta$ -catenina, el FP es capaz de entrar de nuevo en anagén en respuesta a estímulos, y por ello, presenta una duración muy variable, que puede extenderse hasta 60 días (día 150 postnatal) (Plikus y col., 2008).

Para caracterizar los niveles de expresión a lo largo del ciclo del pelo se tomaron muestras de piel del lomo de ratones C57BL/6 *Eng*<sup>+/+</sup> sin estimular a distintos tiempos después del nacimiento, cada 10 o 20 días, durante todo el segundo ciclo postnatal de crecimiento del pelo, que tiene una mayor duración y es más manejable experimentalmente. Así se tomaron muestras de 30, 50,

80, 90, 100 y 120 días de edad, correspondientes, en esta cepa, a fases concretas del ciclo del pelo (Plikus y col., 2008; Plikus y col., 2009). Las muestras tomadas a los 30 días corresponden a la fase de anagén, las de 50 días a la fase de telogén refractaria, y las correspondientes a 80, 90, 100 y 120 días corresponden a la fase de telogén competente. Para la caracterización de los niveles de expresión a nivel transcripcional, las muestras se analizaron mediante qRT-PCR. Este análisis demostró que, en la piel de ratón, el gen *endogлина* presenta un nivel de expresión marcadamente dependiente de la fase del ciclo del pelo (**Figura 8A**). Los niveles de expresión más bajos se observaron durante la fase de crecimiento del pelo (anagén, 30 días), que aumentaron significativamente ( $P \leq 0,1$ ) durante la telogén refractaria (50 días), y mostraron un pico de máxima expresión al inicio de la telogén competente (80 y 90 días). A partir de este punto su nivel de expresión disminuyó gradualmente presentando un nivel mínimo a los 100 días, volviendo a incrementar sus niveles de expresión a los 120 días. Así mismo, se pudo determinar que, tal y como se esperaba, en condiciones de haploinsuficiencia (*Eng*<sup>+/-</sup>) el gen *endogлина* mostró un nivel de expresión en piel muy inferior al observado en ratones *Eng*<sup>+/+</sup> y esta expresión no varió significativamente a lo largo de las diferentes fases del ciclo del pelo (**Figura 8A**).

Para corroborar que los cambios de expresión a nivel transcripcional de *endogлина* en piel a lo largo del ciclo del pelo se manifiestan en cambios de expresión a nivel traduccional se llevó a cabo un análisis semicuantitativo de expresión de proteína mediante inmunoblot. Utilizando muestras de piel del lomo tomadas de ratones sin estimular en distintas fases del ciclo del pelo (30, 50, 70, 90, 100 y 120 días), se determinó que las oscilaciones de *endogлина* observadas a nivel de ARNm en los ratones *Eng*<sup>+/+</sup> se traducían en cambios de expresión a nivel de proteína mostrando un incremento paulatino de la expresión de endogлина desde la fase de la anagén (30 días) hasta llegar a su punto máximo de expresión durante la telogén competente (90 días) para disminuir a continuación de forma drástica a los 100 días (**Figura 8B**). Además, el análisis por inmunoblot mostró niveles de expresión muy bajos de endogлина en piel en los ratones *Eng*<sup>+/-</sup> en comparación con los animales control, con pequeños cambios a lo largo del ciclo del pelo (**Figura 8B**).



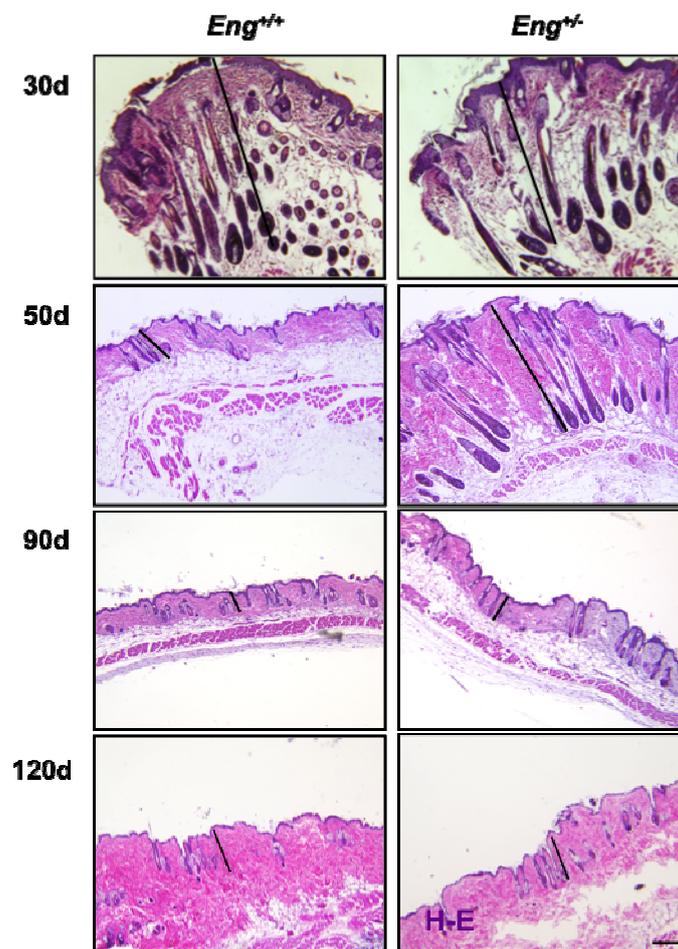
**Figura 8: Endoglin muestra un patrón de expresión en la piel asociado al ciclo de crecimiento del pelo que se desregula en condiciones de haploinsuficiencia (A)** Cuantificación de los niveles de expresión del gen *endoglin* mediante qRT-PCR. Para la normalización se utilizó el ARN ribosómico 18S. Las barras de error indican el error estándar. \*: significativo,  $P \leq 0,1$ . **(B)** Análisis semicuantitativo mediante inmunoblot del nivel de expresión de la proteína endoglin. Control de carga: histona H3.

## 2. LA HAPLOINSUFICIENCIA DE ENDOGLINA EN PIEL INDUCE UNA ALTERACIÓN EN EL CICLO DE CRECIMIENTO DEL PELO

Dado que endoglin presenta una expresión cíclica en piel asociada al patrón de crecimiento del pelo y que este patrón de expresión cíclico se desregula en los animales *Eng*<sup>+/-</sup>, se llevó a cabo un análisis histopatológico del tejido para determinar la existencia de potenciales alteraciones en el ciclo de crecimiento del pelo inducidas por la haploinsuficiencia de este gen. Para ello se realizaron tinciones con H-E (H-E) en cortes histológicos de piel del lomo en distintas fases del ciclo del pelo, tomando muestras de ratones de 30, 50, 90 y 120 días de edad.

El análisis morfológico mostró que a día 30 postnatal (fase de anagén), tanto los ratones *Eng*<sup>+/+</sup> como los *Eng*<sup>+/-</sup> presentaban FPs con la porción variable o cíclica bien desarrollada, creciendo en profundidad en la dermis, corroborando que se encontraban en la fase de anagén (**Figura 9**). El análisis a día 50 postnatal demostró que mientras los ratones *Eng*<sup>+/+</sup> habían entrado en

fase de telogén, tal y como se esperaba, mostrando mayoritariamente FPs constituidos únicamente por la porción permanente, los ratones *Eng*<sup>+/-</sup> todavía presentaban una gran mayoría de FPs con la porción variable completamente desarrollada, manteniéndose en fase de anagén (**Figura 9**). Por otro lado, el análisis a días 90 y 120 postnatal mostró que ambos genotipos se encontraban en fase de telogén, con los FPs constituidos únicamente por la porción permanente (**Figura 9**). Estos resultados indican que endoglina tiene una función importante en la entrada del FP en la fase de telogén refractaria, de modo que una pérdida de función o haploinsuficiencia de endoglina resulta en una alteración importante del ciclo de crecimiento del pelo.



**Figura 9: La haploinsuficiencia de endoglina induce una alteración en el ciclo de crecimiento del pelo.** Cortes histológicos de la piel del lomo de los ratones *Eng*<sup>+/+</sup> y *Eng*<sup>+/-</sup> sin estimular, a lo largo del ciclo del pelo. 30 días, anagén; 50 días, telogén refractaria; 90 y 120 días, telogén competente. Las líneas negras representan la longitud media de los folículos pilosos en cada caso. Tinción H-E. Barra de escala: 200  $\mu$ m.

### 3. LA HAPLOINSUFICIENCIA DE ENDOGLINA PROVOCA UNA ALTERACIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN BMP/SMAD, PERO NO WNT/ $\beta$ -CATENINA, A LO LARGO DEL CICLO DEL PELO

Como se ha indicado, el ciclo de crecimiento del pelo está regulado fundamentalmente por dos vías de señalización molecular, Bmp/Smad y Wnt/ $\beta$ -catenina. La señalización mediada por las citoquinas Bmp, y los transductores moleculares de la familia Smad, regulan la parada del crecimiento del pelo durante la segunda parte de la anagén, siendo también responsables del mantenimiento del estado de telogén refractaria, evitando así que el FP entre de nuevo en la fase de anagén durante un periodo de tiempo establecido (Plikus y col., 2008). Por su parte, la señalización inducida por factores de la familia Wnt, y su transductor  $\beta$ -catenina, regula la entrada del FP en la fase de anagén o crecimiento (Shimomura y Christiano, 2010).

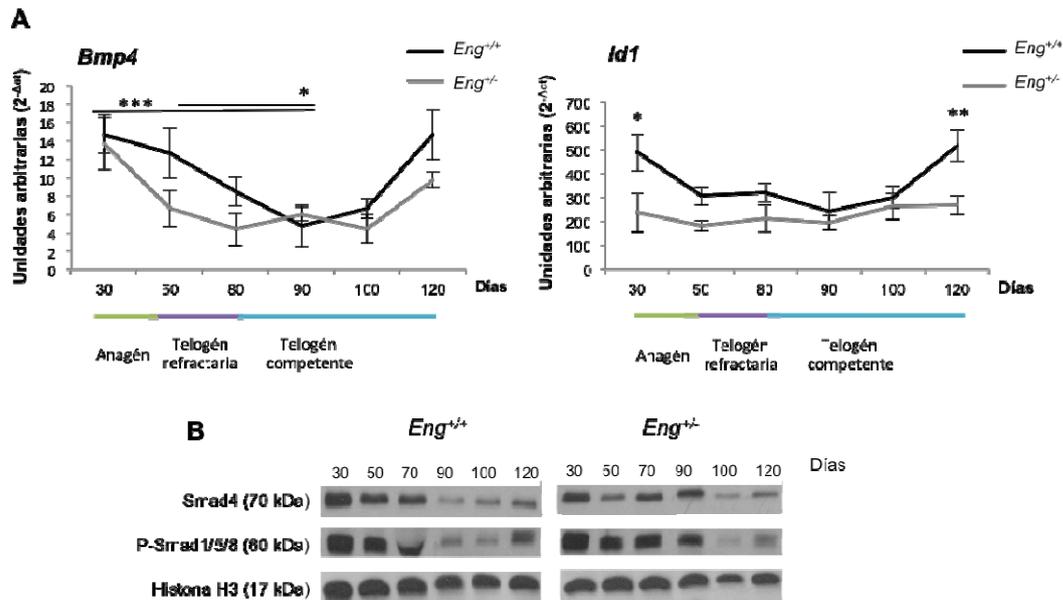
Dado que endogлина es un correceptor de las citoquinas Bmp con una expresión cíclica dependiente de las fases de crecimiento del pelo y teniendo en cuenta que, como se ha mostrado anteriormente, su pérdida de expresión provoca alteraciones en el ciclo del pelo, se analizó la capacidad de endogлина para regular la señalización de la ruta Bmp/Smad. Para ello se determinaron los niveles de expresión a nivel transcripcional de la citoquina *Bmp4*, directamente implicada en la regulación del ciclo del pelo (Plikus y col., 2008), y de *Id1*, una diana transcripcional de la señalización Bmp en piel (Ahmed y col., 2011).

En los individuos *Eng*<sup>+/+</sup> la citoquina *Bmp4* mostró, tal y como se esperaba, variaciones cíclicas en su expresión en piel dependientes de la fase del ciclo de crecimiento del pelo, con una elevada actividad transcripcional en las fases de anagén y telogén refractaria (30 y 50 días respectivamente), una bajada gradual y significativa ( $P \leq 0,1$ ) de su expresión a lo largo de la telogén competente, alcanzando su mínimo a los 90 días, y una reactivación al final de esta fase (120 días), que podría coincidir con la re-entrada en anagén (**Figura 10A**). En estos animales la diana transcripcional *Id1* mostró asimismo un patrón de expresión cíclico paralelo al de *Bmp4* (**Figura 10A**). La haploinsuficiencia de endogлина no provocó alteraciones significativas en los patrones de expresión

de *Bmp4* a lo largo del ciclo del pelo (**Figura 10A**). Sin embargo, en los ratones *Eng*<sup>+/-</sup> se observó una drástica desregulación del patrón cíclico de expresión de *Id1* en piel, que mostró una actividad transcripcional uniforme en las distintas fases del ciclo de crecimiento del FP (**Figura 10A**). Este resultado indica que endogлина no está implicada en la regulación de la expresión de la citoquina *Bmp4* a lo largo del ciclo del pelo, pero, siendo un co-receptor de esta citoquina, su haploinsuficiencia resulta en una significativa falta de respuesta de la correspondiente diana transcripcional, *Id1*.

Para evaluar en mayor detalle el efecto de la haploinsuficiencia de endogлина en la actividad de la ruta Bmp/Smad a lo largo del ciclo del pelo se caracterizaron los niveles de expresión y el patrón de distribución de las Smad1/5/8 fosforiladas en el dominio SSXS situado en la región C-terminal, indicador de la activación de estas proteínas, y de Smad4, co-smad implicada en la transmisión de la señal de las citoquinas de la familia Tgf-β. Para ello se realizó un análisis semicuantitativo de la expresión de las mismas por inmunoblot a lo largo de todo el ciclo del pelo, así como un estudio del patrón de distribución de la Smad1/5/8 fosforilada en cortes histológicos de piel de ratón durante la telogén refractaria (50 días) y durante la telogén competente (90 días).

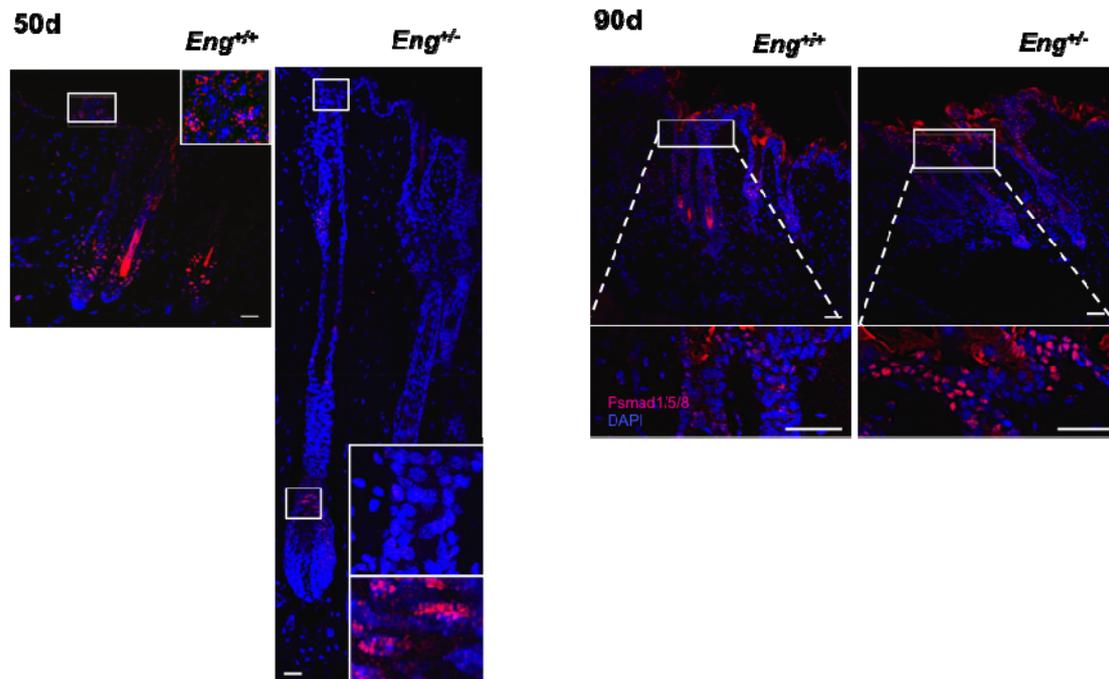
En cuanto al análisis por inmunoblot, los individuos *Eng*<sup>+/+</sup> mostraron elevada expresión de las proteínas Smad4 y P-Smad1/5/8 en las muestras de 30, 50 y 70 días, un período de tiempo que abarca fundamentalmente la anagén y la telogén refractaria, y baja expresión en las muestras de 90 y 100 días, durante la telogén competente, que se incrementaba en las muestras correspondientes a los 120 días, último periodo de la telogén competente (**Figura 10B**). En cambio, los ratones haploinsuficientes para el gen de endogлина mostraron elevada expresión de las proteínas Smad4 y P-Smad1/5/8 hasta el día 90, que disminuía en las muestras tomadas a los 100 días, y que se volvía a incrementar a los 120 días, mostrando, por tanto, activación de la ruta Bmp/Smad durante la primera parte de la fase de telogén competente, periodo en el que debería estar inactiva (**Figura 10B**).



**Figura 10: La haploinsuficiencia de endoglina provoca una alteración de los patrones señalización Bmp/Smad a lo largo del ciclo del pelo (A)** Cuantificación de los niveles de expresión de los genes *Bmp4* e *Id1* mediante qRT-PCR. Para la normalización se utilizó el ARN ribosómico 18S. Barras de error: error estándar de las muestras analizadas. \*: significativo,  $P \leq 0,1$ ; \*\*\*: significativo  $P \leq 0,001$  **(B)** Análisis semicuantitativo por inmunoblot de los niveles de expresión de las proteínas Smad1/5/8 fosforiladas en el dominio SSXS y Smad4. Control de carga: histona H3.

El análisis en los animales *Eng*<sup>+/+</sup> del patrón de localización de las proteínas P-Smad1/5/8 en la piel mostró, según se esperaba (Plikus y col., 2008), una elevada expresión durante la telogén refractaria (50 días), distribuida a lo largo del EIF y el FP, que disminuía drásticamente durante la telogén competente (**Figura 11**). En cambio, los ratones *Eng*<sup>+/-</sup>, que a los 50 días aún presentaban la porción variable de los FP desarrollada en profundidad, correspondiente a la fase de anagén, mostraron bajos niveles de expresión de P-Smad1/5/8 a lo largo del EIF y FP, a excepción de la región del bulbo piloso, donde se detectó un incremento en la expresión de esta proteína, indicando actividad de la ruta Bmp/Smad en esta región, encargada de frenar el crecimiento del pelo al final de la anagén (Plikus y col., 2008), y que en estos animales aparece con retraso. El análisis a los 90 días en los ratones *Eng*<sup>+/-</sup>, que en este momento presentaban FP formados únicamente por la porción permanente, mostró un incremento de la expresión de la P-Smad1/5/8 a lo largo del EIF y FP, indicando, por tanto, una actividad anormal de la ruta

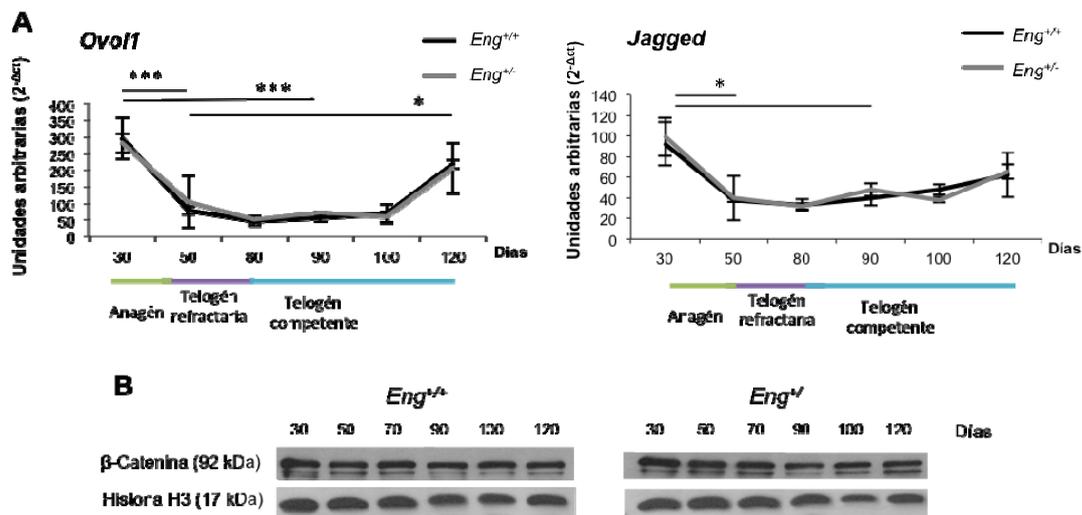
Bmp/Smad durante el periodo correspondiente a la telogén competente (**Figura 11**). En conjunto, estas observaciones están de acuerdo con los resultados anteriormente descritos e indican que la haploinsuficiencia de endoglina desregula la transición anagén/telogén debido a una alteración en el patrón de señalización Bmp/Smad.



**Figura 11: La haploinsuficiencia de endoglina provoca una alteración de los patrones de señalización Bmp/Smad a lo largo del ciclo del pelo.** Inmunodetección de la proteína Smad1/5/8 fosforilada en el dominio SSXS (señal roja) en muestras de piel de lomo obtenida de individuos *Eng*<sup>+/+</sup> y *Eng*<sup>+/-</sup> durante la fase de telogén refractaria (50 d) y competente (90d). Los recuadros muestran un detalle ampliado de cada imagen. Localización de la cromatina nuclear con DAPI. Barra de escala 100µm

Dado que la progresión de las distintas fases del ciclo del pelo requiere una adecuada alternancia entre la señalización Bmp/Smad y Wnt/ $\beta$ -catenina, se evaluaron los efectos potenciales de la alteración de la ruta Bmp/Smad inducida por la haploinsuficiencia de endoglina en la capacidad de señalización de la ruta Wnt/ $\beta$ -catenina. Para ello se analizó el patrón de expresión de dos dianas transcripcionales de esta ruta en piel, los genes *Jagged* y *Ovol1*, a lo largo del ciclo del pelo. Este análisis indicó que, tanto en los individuos *Eng*<sup>+/+</sup> como en los *Eng*<sup>+/-</sup>, ambas dianas transcripcionales mostraron un patrón de expresión cíclico dependiente de la fase del ciclo del pelo, con los niveles más elevados en la fase de anagén (30 días), que disminuían significativamente ( $P \leq 0,001$ , *Jagged*;  $P \leq 0,1$ , *Ovol1*) durante la telogén para volver a

incrementarse gradualmente al final de la telogén competente (120 días) (Figura 12A). Además, los niveles de expresión de la proteína  $\beta$ -catenina no variaron significativamente a lo largo del ciclo del pelo ni en los individuos  $Eng^{+/+}$  ni en los  $Eng^{+/-}$  (Figura 12B). Estos resultados indican la desregulación de la señalización Bmp/Smad en la piel inducida por la haploinsuficiencia de endogлина no altera la señalización Wnt en este tejido.



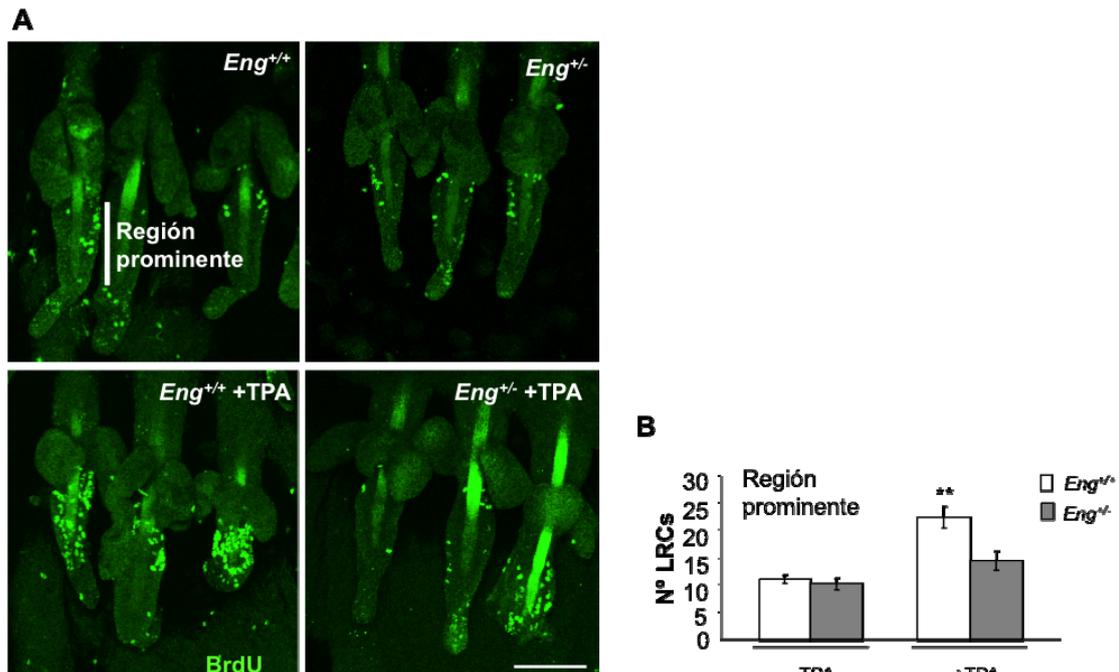
**Figura 12:** La haploinsuficiencia de endogлина no provoca alteraciones significativas en los patrones de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina a lo largo del ciclo del pelo. (A) Cuantificación de los niveles de expresión de los genes *Jagged* y *Ovo11* mediante qRT-PCR. Para la normalización se utilizó el ARN ribosómico 18S. Las barras de error indican el error estándar. \*: significativo,  $P \leq 0,1$ ; \*\*\*: significativo  $P \leq 0,001$ . (B) Análisis semicuantitativo por inmunoblot de la proteína  $\beta$ -Catenina. Control de carga: histona H3.

#### 4. LA HAPLOINSUFICIENCIA DE ENDOGLINA EN PIEL ALTERA LA CAPACIDAD DE PROLIFERACIÓN EN RESPUESTA A ESTÍMULOS EXTERNOS DE LAS CÉLULAS TRONCALES DEL FP

Teniendo en cuenta que el ciclo del pelo está regulado por la actividad de las células troncales alojadas en la región prominente del FP (Plikus y col., 2012), y que la haploinsuficiencia de endogлина induce alteraciones en el ciclo del pelo, se evaluó a continuación el efecto de la haploinsuficiencia de endogлина en la capacidad de proliferación de esta población celular en respuesta a estímulos externos. Para identificar y cuantificar el número de células troncales en la región prominente del FP se usó como herramienta experimental la baja tasa proliferativa de estas células en ensayos de marcaje

a largo plazo con el nucleótido análogo de la timidina, la BrdU (ver Materiales y Métodos). En estos ensayos se promueve en ratones neonatos una incorporación masiva de BrdU en la molécula de ADN en todos los tipos celulares del organismo. Después de un periodo de tiempo lo suficientemente largo (50 días), las células troncales en la región del FP en montajes *in toto* de epidermis de la cola se identificaron como aquellas células que, debido a su baja capacidad proliferativa, mantienen la marca de BrdU ("Label Retaining Cells", LRCs) (Cotsarelis y col, 1990; Braun y col., 2003).

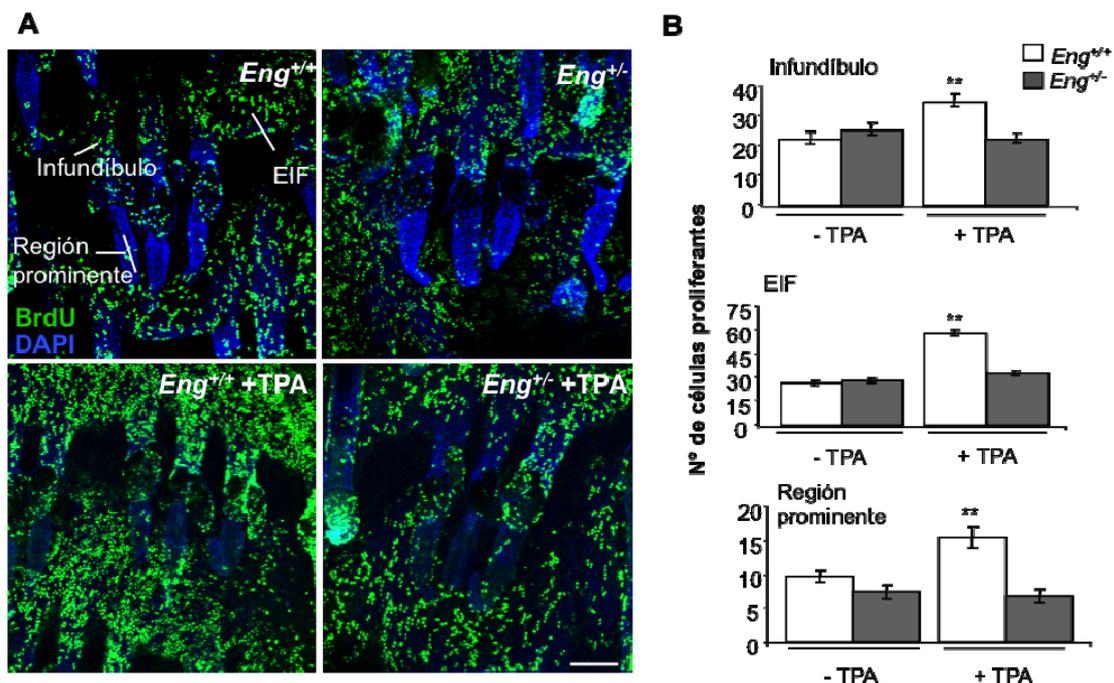
En primer lugar, se llevó a cabo la cuantificación del número de LRCs en ausencia de estimulación. La mayoría de las LRCs en estado de reposo se localizaron, tal y como se esperaba, en la región prominente del FP, no existiendo diferencias significativas en el número de LRCs entre los ratones *Eng*<sup>+/+</sup> y *Eng*<sup>+/-</sup> (Figura 13). Posteriormente, se analizó la capacidad de las células troncales del FP para proliferar y movilizarse en respuesta a un estímulo externo. Para ello se utilizó el ester de forbol TPA, cuya aplicación seriada en la piel induce el crecimiento y diferenciación celular en la epidermis (Cotsarelis y col, 1990; Braun y col, 2003). La cuantificación del número de LRCs en la región prominente del folículo tras la aplicación de TPA mostró un número significativamente menor ( $P \leq 0,01$ ) de LRCs en los ratones *Eng*<sup>+/-</sup> en comparación con los *Eng*<sup>+/+</sup> (Figura 13). Este resultado sugiere que la haploinsuficiencia de endoglin afecta la capacidad de proliferación de las células troncales del FP.



**Figura 13: La haploinsuficiencia de endoglina altera la capacidad de proliferación de las células troncales del folículo piloso en respuesta a TPA. (A)** Inmunolocalización en montajes *in toto* de piel de la cola de LRCs (“Label Retaining Cells”, ver Materiales y Métodos) en condiciones de reposo o tras la estimulación con el éster de forbol TPA. **(B)** Cuantificación del número de LRCs en la región prominente de los ratones  $Eng^{+/+}$  y  $Eng^{+/-}$  en condiciones de reposo o tras la aplicación de TPA. \*\*: significativo,  $P \leq 0,01$ . Las barras de error representan el error estándar. Barra de escala, 100  $\mu\text{m}$ .

Para confirmar la pérdida de potencial proliferativo en respuesta a estímulos externos de las células troncales del FP en los ratones  $Eng^{+/-}$ , se realizaron ensayos de marcajes seriados con BrdU a tiempos cortos (24 horas) en animales adultos en fase de telogén (50 días). Estos ensayos identifican células que presentan una síntesis activa de ADN y que, por tanto, incorporan masivamente el nucleótido análogo BrdU. Los resultados obtenidos indicaron que, tal y como se esperaba, en los FPs en estado de reposo las células con síntesis activa de ADN se localizan fundamentalmente en el EIF y en las regiones del infundíbulo y bulbo piloso del FP, pero están prácticamente ausentes de la región prominente, donde se localizan las células troncales, que se mantienen en estado quiescente, y por tanto, no incorporan la BrdU. La cuantificación del número de células marcadas con BrdU mostró que, en ausencia de estímulos externos, no existen diferencias significativas en el número basal de células en división en los ratones  $Eng^{+/-}$  en comparación a sus controles (**Figura 14**). En particular, en la región prominente del FP se observó

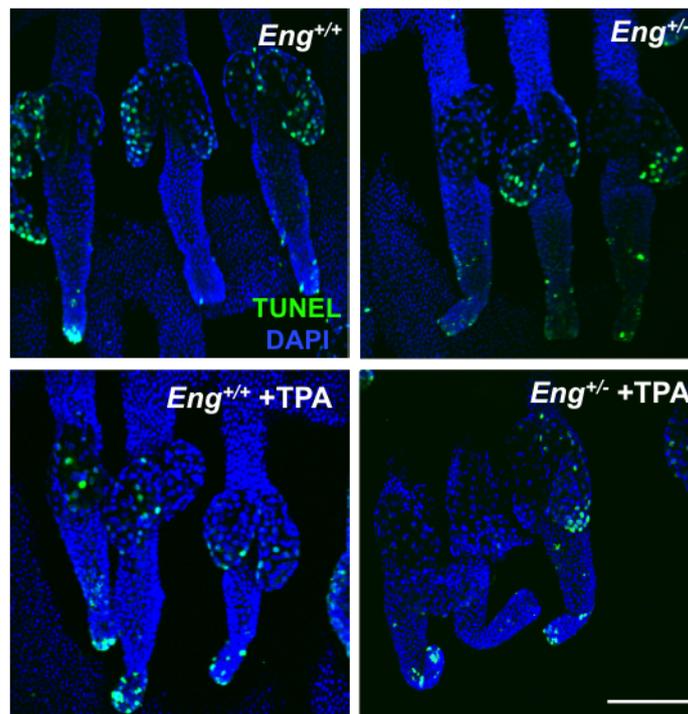
una casi completa ausencia de células marcadas en ambos casos. Tras la estimulación con TPA, en los ratones *Eng*<sup>+/+</sup> se observó un esperable y significativo ( $P \leq 0,01$ ) incremento en el número de células en división en todas las regiones de la epidermis y, en particular, en la región prominente del FP. Sin embargo, los ratones *Eng*<sup>+/-</sup> respondieron de forma deficiente al estímulo de TPA, de forma que no se detectó un incremento significativo en el número de células marcadas con BrdU en ninguna de las partes analizadas, ni, particularmente, en la región prominente del FP (**Figura 14**).



**Figura 14: La haploinsuficiencia de endoglina altera la capacidad de proliferación de las células troncales del FP en respuesta a TPA. (A)** Inmunolocalización en montajes *in toto* de piel de la cola de células con alta tasa de incorporación de BrdU (en verde; células proliferantes, ver Materiales y Métodos) en condiciones de reposo o tras la estimulación con el éster de forbol TPA. Localización de la cromatina nuclear con DAPI. **(B)** Cuantificación del número de células proliferantes en distintas regiones del FP en los ratones *Eng*<sup>+/+</sup> y *Eng*<sup>+/-</sup> en condiciones de reposo o tras la aplicación de TPA. \*\*: significativo,  $P \leq 0,01$ . Las barras de error representan el error estándar. Barra de escala, 100µm.

Para determinar la posible asociación de la pérdida de potencial proliferativo de las células troncales epidérmicas en los ratones *Eng*<sup>+/-</sup> con la activación de un proceso apoptótico, se llevó a cabo mediante el ensayo de TUNEL un análisis de rotura de la doble hebra de ADN, asociada al proceso de apoptosis (Gavrieli y col., 1992). Los resultados obtenidos mostraron que no existen cambios significativos en el número de células apoptóticas

normalmente presentes en el epitelio y FP en los animales  $Eng^{+/+}$  en comparación los  $Eng^{+/-}$ , tanto en condiciones de reposo como tras un estímulo de proliferación (**Figura 15**). En conjunto, estos resultados indican que endoglina está implicada, no tanto en el mantenimiento de las células troncales del FP en estado quiescente, como en los mecanismos de proliferación y movilización de las mismas cuando son estimuladas.



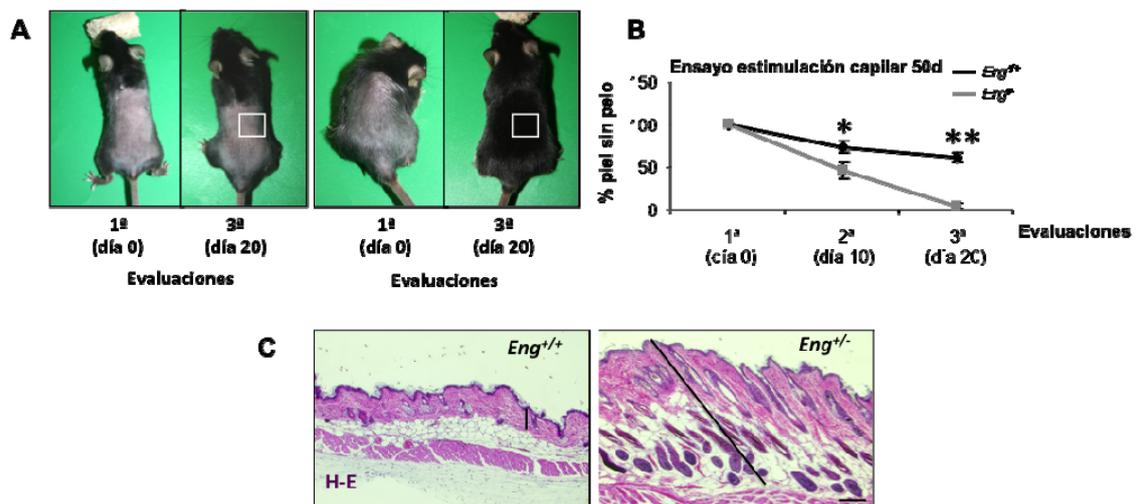
**Figura 15:** La haploinsuficiencia de endoglina no está asociada a un incremento de muerte celular en el FP. Detección de roturas en el ADN mediante el ensayo TUNEL en los FPs de ratones  $Eng^{+/-}$  y  $Eng^{+/+}$  en condiciones de reposo o tras la estimulación con TPA. Barra de escala, 100 $\mu$ m

## 5. ENDOGLINA ESTÁ IMPLICADA EN LA REGULACIÓN DE LA FASE DE TELOGÉN DEL CICLO DE CRECIMIENTO DEL PELO

Los resultados anteriores sugieren que endoglina tiene un papel importante en la regulación de la transición entre las fases de anagén y telogén refractaria mediante la señalización Bmp/Smad y en la activación del programa de proliferación de las células troncales del FP que precede a la entrada en anagén al final de la telogén competente. Para demostrar la implicación de endoglina en estos procesos se llevaron a cabo ensayos de inducción de crecimiento del pelo por rasuración, un protocolo experimental bien caracterizado para activar los mecanismos que regulan la entrada en anagén (Kim y col., 1962; Plikus y Chuong, 2008). Estos experimentos se llevaron a

cabo en ratones de 50 días, principio de la telogén refractaria, y en ratones de 90 días, correspondiente a la telogén competente (Plikus y col., 2008), y se finalizaron cuando la mayoría de los ratones de uno de los dos genotipos mostraron una regeneración completa del pelaje del lomo. Durante la telogén refractaria, las señales que activan el crecimiento del pelo se encuentran completamente reprimidas y el estímulo de crecimiento inducido por la rasuración es ineficaz. Por el contrario, durante la telogén competente, el FP es capaz de responder a estímulos de crecimiento (Plikus y col., 2008).

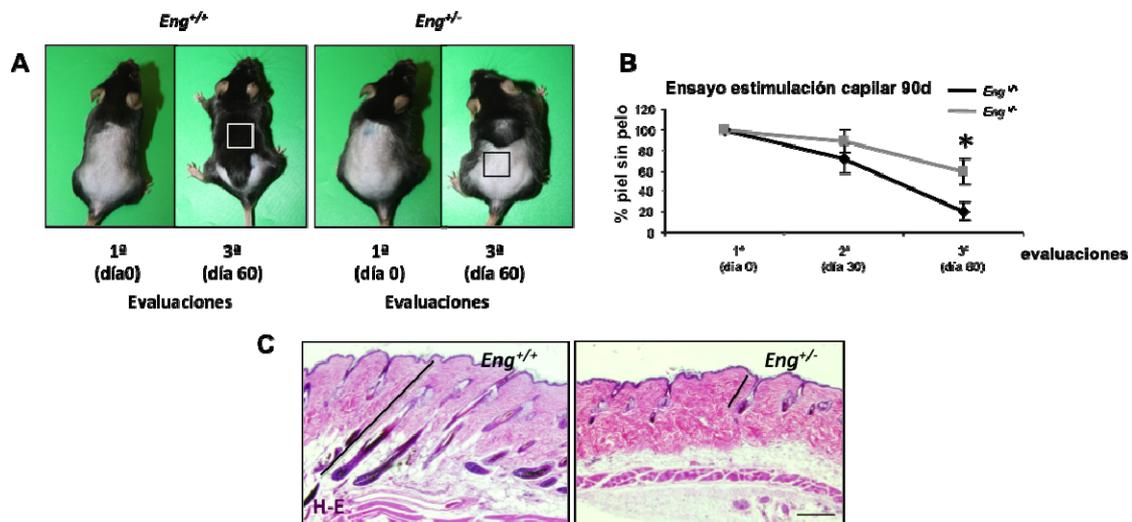
En los experimentos de rasuración durante la telogén refractaria se pudo determinar que los ratones *Eng*<sup>+/-</sup> mostraron una aceleración significativa en el crecimiento del pelo con respecto a los animales *Eng*<sup>+/+</sup> (Figura 16).



**Figura 16: La haploinsuficiencia de endoglina induce una anormal aceleración del crecimiento del pelo durante la telogén refractaria. (A)** Ratones *Eng*<sup>+/+</sup> y *Eng*<sup>+/-</sup> sometidos a estímulos de inducción capilar por rasuración al inicio del experimento (primera evaluación, día 0) y al final del experimento (tercera evaluación, día 20). **(B)** Cuantificación del porcentaje medio del área del lomo sin cubrir por el pelo en las tres evaluaciones, en los individuos *Eng*<sup>+/+</sup> y *Eng*<sup>+/-</sup>. \*: significativo,  $P \leq 0,1$ . \*\*: significativo,  $P \leq 0,01$ . Las barras de error representan el error típico de las medidas tomadas. **(C)** Cortes histológicos de la piel del lomo de los ratones estimulados por rasuración. Las líneas negras representan la longitud media de los folículos pilosos en cada caso. Tinción H-E. Barra de escala: 200  $\mu$ m.

Por el contrario, tras la rasuración durante la telogén competente, los ratones *Eng*<sup>+/-</sup> presentaron un retraso significativo en el crecimiento del pelo en comparación con sus respectivos controles, los ratones *Eng*<sup>+/+</sup> (Figura 17). En ambas condiciones experimentales se comprobó que el crecimiento del pelo estaba asociado a nivel histológico con la presencia de FPs en anágén en los que la región del bulbo piloso penetra profundamente en la dermis y en el tejido

adiposo, mientras que el retraso en el crecimiento del pelo estaba asociado a FPs en fase de telogén (Figura 16 y 17 C).



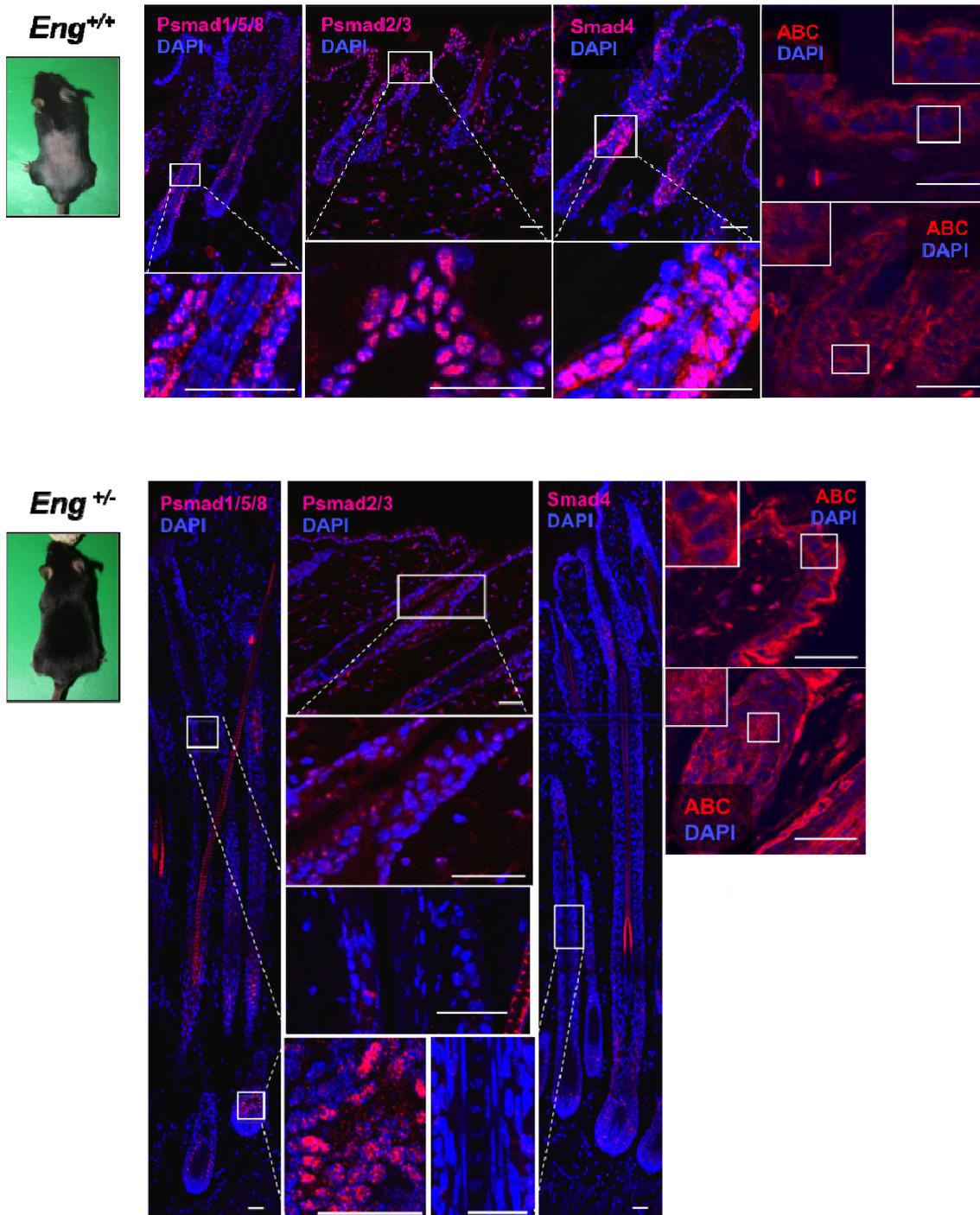
**Figura 17: La haploinsuficiencia de endoglina induce un anormal retraso en el crecimiento del pelo durante la telogén competente. (A)** Ratones  $Eng^{+/+}$  y  $Eng^{+/-}$  sometidos a estímulos de inducción capilar por rasuración durante la telogén competente al inicio del experimento (primera evaluación, día 0) y al final del experimento (tercera evaluación, día 60). **(B)** Cuantificación del porcentaje medio del área de piel que no ha sufrido regeneración capilar tras la estimulación por rasuración en las tres evaluaciones, en individuos  $Eng^{+/+}$  y  $Eng^{+/-}$ . \*: significativo,  $P \leq 0,1$ . Las barras de error representan el error típico de las medidas tomadas. **(C)** Cortes histológicos de la piel del lomo de los ratones estimulados por rasuración. Las líneas negras representan la longitud media de los folículos pilosos en cada caso. Tinción H-E. Barra de escala: 200  $\mu$ m.

Estos resultados indican que, mientras que en condiciones normales el crecimiento del FP está bloqueado en la telogén refractaria por la activación de la señal transmitida por las citoquinas Bmp, esta restricción se desregula en ratones con dosis menores de expresión del co-receptor de Bmp endoglina, condición en la que los FPs se mantienen en estado de anagén. Por el contrario, durante la telogén competente, la señalización vía Wnt/ $\beta$ -catenina activa la proliferación y movilización de las células troncales residentes en el FP, proceso que es defectuoso en los ratones  $Eng^{+/-}$ .

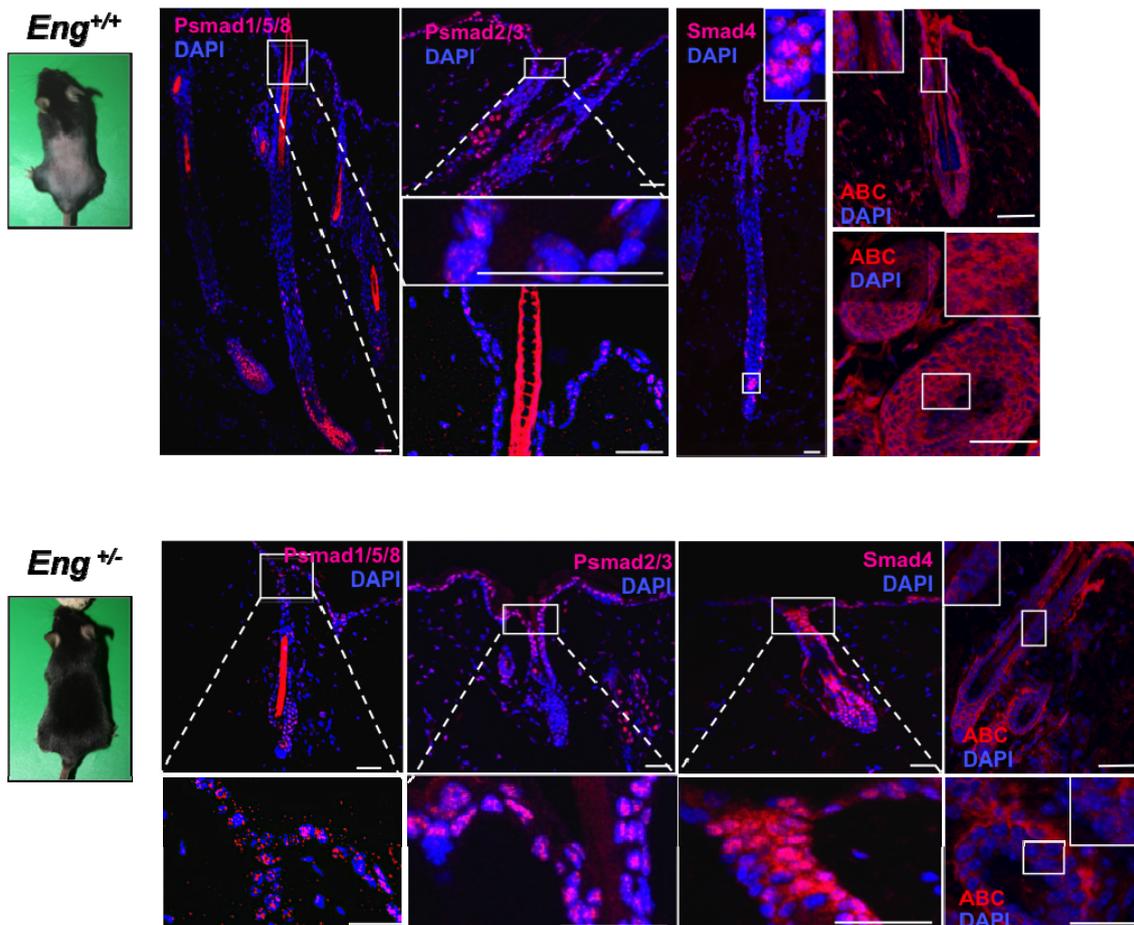
Para corroborar estos resultados, se analizó por inmunofluorescencia el patrón de distribución de las proteínas Smad fosforiladas 1/5/8 y 2/3, indicador de la señalización Bmp/Tgf- $\beta$ , de Smad4, y de una forma metabólicamente estabilizada de  $\beta$ -catenina (“Active B Catenin”, ABC), indicador de la activación de la señalización Wnt/ $\beta$ -catenina, en las secciones histológicas de piel tomadas tras la finalización de los experimentos de rasuración utilizando ratones  $Eng^{+/+}$  y  $Eng^{+/-}$  que habían sido estimulados por este protocolo.

El análisis del patrón de distribución de las proteínas Smad tras los experimentos realizados durante la telogén refractaria, mostró que los animales *Eng*<sup>+/+</sup> presentaban un elevado nivel de expresión de estas proteínas a lo largo del EIF y el FP, asociado a la presencia mayoritaria de FP en fase de telogén, constituidos únicamente por la porción permanente (**Figura 18**). En cambio, los individuos *Eng*<sup>+/-</sup>, con los FP aún en estado de anagén, mostraron un bajo nivel de expresión de las proteínas Smad, a excepción de la región del bulbo piloso, donde se detectó una acumulación de P-Smad1/5/8 y Smad4, indicador de la actividad Bmp/Smad asociada a la inhibición del crecimiento en esta fase de la anagén (**Figura 18**) (Plikus y col., 2008). Durante la telogén competente, los individuos *Eng*<sup>+/+</sup> mostraron un bajo nivel de expresión de las proteínas Smad a lo largo de todo el EIF y FP, a excepción de la región del bulbo piloso en los FP en fase de anagén avanzada, donde se observó una elevada expresión de la proteína P-Smad1/5/8, indicando actividad de la ruta Bmp/Smad asociada, como se ha indicado, a la inhibición del crecimiento en esta fase de la anagén (**Figura 19**). Los ratones *Eng*<sup>+/-</sup> en cambio, con FPs mayoritariamente en fase de telogén, mostraron unos niveles de expresión elevados de las proteínas Smad a lo largo de todo el EIF y FP (**Figura 19**).

El análisis de la expresión y distribución de la proteína ABC tras la estimulación realizada durante la telogén refractaria mostró bajos niveles de expresión de la misma, asociada fundamentalmente a la membrana plasmática, en los individuos *Eng*<sup>+/+</sup>, de acuerdo con la presencia de una mayoría de FP en fase de telogén (**Figura 18**). Sin embargo, los ratones *Eng*<sup>+/-</sup>, con una mayoría de FP en fase de anagén, mostraron unos niveles elevados de expresión y acumulación citoplasmática y nuclear a lo largo del FP de la proteína ABC, indicando actividad de la señalización Wnt/ $\beta$ -catenina (**Figura 18**). Por el contrario, tras los experimentos realizados durante la telogén competente, el patrón de expresión y distribución de la proteína ABC fue diametralmente opuesto, mostrando acumulación citoplasmática y nuclear a lo largo del EIF y FP en los individuos *Eng*<sup>+/+</sup>, y un bajo nivel de expresión, fundamentalmente localizado en la membrana citoplasmática, en los individuos *Eng*<sup>+/-</sup> (**Figura 19**).



**Figura 18:** La haploinsuficiencia de endoglina altera los patrones de expresión y localización de las proteínas P-Smad1/5/8, P-Smad2/3, Smad4 y de una forma metabólicamente estable de β-catenina tras la estimulación capilar durante la telogén refractaria. Inmunolocalización de las proteínas Smad1/5/8 y Smad2/3 fosforiladas en el dominio SSXS, Smad4 y β-catenina metabólicamente estabilizada (ABC, señal roja) en cortes histológicos de piel del lomo de ratones *Eng*<sup>+/+</sup> y *Eng*<sup>+/-</sup> obtenidos tras la estimulación capilar durante la telogén refractaria (50 días). Los recuadros muestran un detalle ampliado de cada imagen. Localización de la cromatina nuclear con DAPI. Barra de escala 100µm.



**Figura 19:** La haploinsuficiencia de endogлина altera los patrones de expresión y localización de las proteínas P-Smad1/5/8, P-Smad2/3, Smad4 y de una forma metabólicamente estable de  $\beta$ -catenina tras la estimulación capilar durante la telogén competente. Inmunolocalización de las proteínas Smad1/5/8 y Smad2/3 fosforiladas en el dominio SSXS, Smad4 y  $\beta$ -catenina metabólicamente estabilizada (ABC, señal roja) en cortes histológicos de piel del lomo de ratones  $Eng^{+/+}$  y  $Eng^{+/-}$  obtenidos tras la estimulación capilar durante la telogén competente (90 días). Los recuadros muestran un detalle ampliado de cada imagen. Localización de la cromatina nuclear con DAPI. Barra de escala 100 $\mu$ m.

En conjunto, el análisis de los patrones de expresión y distribución de las proteínas Smad y ABC tras los experimentos de rasuración indicó que, de forma coherente, los FPs en los que el estímulo de crecimiento de pelo fue ineficaz, mostraban elevados niveles de expresión de las proteínas Smad, y baja expresión de la proteína ABC. En cambio, los FPs que habían respondido al estímulo de crecimiento de pelo mostraron baja expresión de las proteínas Smad, y elevados niveles de expresión citoplasmática y nuclear de la proteína ABC. Estos resultados corroboran que la haploinsuficiencia de endogлина promueve una prolongación de la fase de anagén, indicando así mismo que la

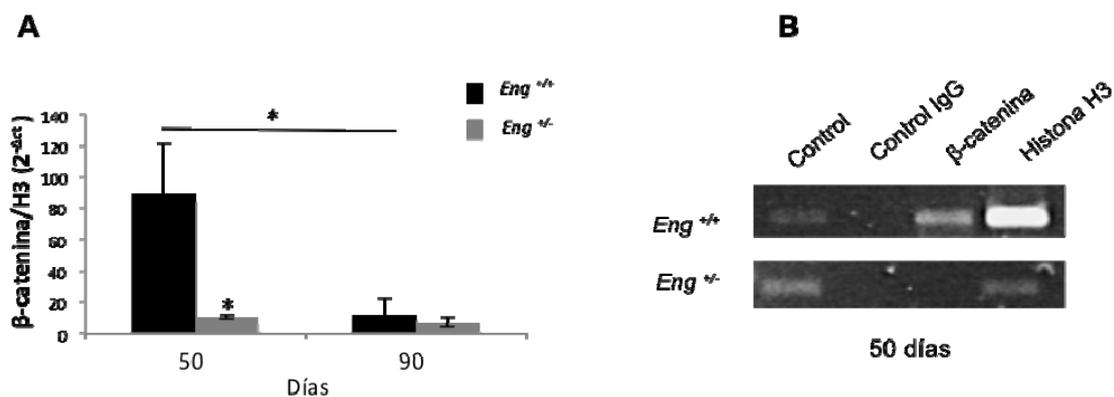
función de esta proteína es necesaria para las transiciones anágén/telogén refractaria y telogén competente/anágén.

## 6. $\beta$ -CATENINA INTERACCIONA CON EL PROMOTOR DE *ENDOGLINA* DURANTE LA TELOGÉN REFRACTARIA

La proteína  $\beta$ -catenina, transductor de la ruta de Wnt, regula la entrada en la fase de anágén a través de la interacción con el promotor de distintos genes diana específicos de la ruta Wnt, activando la expresión de los mismos. Teniendo en cuenta que la actividad transcripcional de *endogлина* en piel es dependiente de la fase del ciclo del pelo, incrementando su nivel de expresión al final de la fase de anágén (**Figura 8**), y que esta activación de la expresión génica coincide con la localización nuclear de  $\beta$ -catenina, uno de los reguladores transcripcionales centrales en esta fase del ciclo del pelo, se planteó la existencia de una potencial interacción de  $\beta$ -catenina con el promotor del gen *endogлина*. Para explorar esta posibilidad, se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina, cubriendo la región reguladora correspondiente al inicio de transcripción del gen *endogлина*, en muestras de piel del lomo a 50 días (telogén refractaria, ruta Bmp/Smad activa) y a 90 días (telogén competente, ruta Bmp/Smad inactiva) dos puntos del ciclo de crecimiento del FP en los que, como se ha mostrado previamente, *endogлина* tiene un importante papel regulador.

Los resultados obtenidos mostraron que, en condiciones normales (animales *Eng*<sup>+/+</sup>),  $\beta$ -catenina interacciona fuertemente con el promotor de *endogлина* al principio de la telogén refractaria (50 días) (**Figura 20**), coincidiendo con elevados niveles de expresión del gen *endogлина* a partir de esta fase (**Figura 8**). Este resultado sugiere una función potencial de este factor como un activador transcripcional de *endogлина* durante la telogén refractaria. Sin embargo, la interacción de  $\beta$ -catenina con el promotor de *endogлина* en esta fase disminuye significativamente ( $P \leq 0,1$ ) en los animales *Eng*<sup>+/-</sup> (**Figura 20**). Este resultado indica que la interacción de  $\beta$ -catenina con el promotor de *endogлина*, probablemente activando su expresión, es necesaria para el establecimiento de la telogén refractaria y está de acuerdo con los

experimentos funcionales de inducción de crecimiento de pelo en esta fase, en la que los animales *Eng*<sup>+/-</sup> son incapaces de responder a la señal inhibitoria de Bmp/Smad, continuando con el crecimiento del pelo. Por el contrario, durante la telogén competente (90 días) se observó una interacción de  $\beta$ -catenina con el promotor de *endoglina* similar en los animales *Eng*<sup>+/+</sup> y *Eng*<sup>+/-</sup>, en ambos casos significativamente menor ( $P \leq 0,1$ ) que la observada durante la telogén refractaria en los individuos *Eng*<sup>+/+</sup> (Figura 20). Teniendo en cuenta los experimentos de rasuración durante la telogén competente, en los que los animales *Eng*<sup>+/-</sup> se mostraron incapaces de reactivar el crecimiento del pelo en esta fase, estos resultados sugieren que la activación del crecimiento del pelo para entrar en anagén al final de la telogén competente no requiere la interacción de  $\beta$ -catenina con el promotor de *endoglina*.



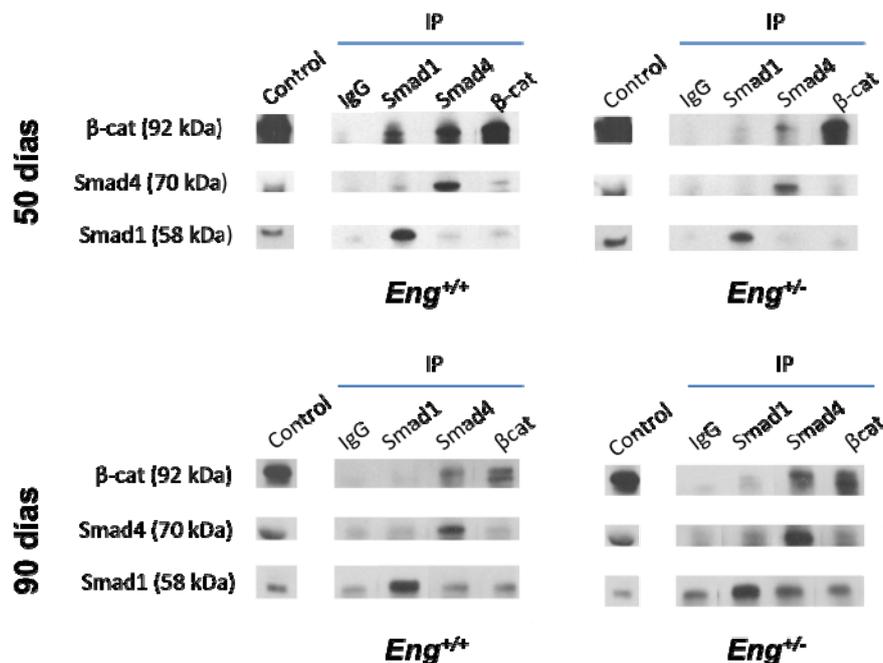
**Figura 20: La proteína  $\beta$ -catenina interacciona con el promotor de *endoglina* durante la telogén refractaria de forma dependiente del nivel de *endoglina* funcional.** Análisis mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) de la asociación de  $\beta$ -catenina con la región correspondiente al inicio de transcripción del promotor de *endoglina* (entre -52 y +135 pb) en muestras de piel de ratones *Eng*<sup>+/+</sup> y *Eng*<sup>+/-</sup> durante la telogén refractaria (50 días) y la telogén competente (90 días). **(A)** Cuantificación de los ensayos de ChIP mediante PCR cuantitativa en tiempo real. La cantidad de promotor de *endoglina* inmunoprecipitado por el anticuerpo anti  $\beta$ -catenina se relativizó con respecto a la cantidad de promotor inmunoprecipitado por el anticuerpo anti histona H3. Las barras de error corresponden al error típico. \*, significativo,  $P \leq 0,1$ . **(B)** Análisis representativo por PCR semi cuantitativa de los ensayos de ChIP realizados en muestras tomadas durante la telogén refractaria. Las bandas correspondientes al ADN inmunoprecipitado por los anticuerpos anti  $\beta$ -catenina e histona H3 fueron secuenciadas y comparadas con la secuencia del promotor de *endoglina*.

## 7. $\beta$ -CATENINA INTERACCIONA CON LAS PROTEÍNAS SMAD DURANTE LA TELOGÉN REFRACTARIA DE FORMA DEPENDIENTE DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE ENDOGLINA

La ruta Wnt/ $\beta$ -catenina regula la entrada en la fase de la anagén promoviendo la acumulación citoplasmática y nuclear de la  $\beta$ -catenina y su correspondiente actividad transcripcional. Al final de la anagén, coincidiendo con la transición anagén/telogén refractaria, la ruta de Bmp/Smad se activa, y las proteínas Smad también presentan una localización citoplasmática y nuclear promoviendo la activación transcripcional de una serie de genes que determinarán la parada del crecimiento del pelo. En este momento las rutas de Wnt/ $\beta$ -catenina y de Bmp/Smad están activas de forma simultánea, y los transductores de ambas rutas pueden coincidir espacialmente en los compartimentos citoplasmático y nuclear (Plikus y col., 2008). La interacción de  $\beta$ -catenina con distintas proteínas de la familia Smad se ha descrito en diferentes modelos experimentales como un sistema de regulación cruzada de la señalización Wnt/ $\beta$ -catenina y Bmp/Smad (Li y col., 2006; Zhang y col., 2009). Teniendo en cuenta que ambas rutas de señalización regulan secuencialmente la actividad del FP, se analizó la existencia de este tipo de interacciones durante la fase de telogén, momento en el que se produce una alternancia de señalización, y donde endoglina presenta un papel regulador.

Para ello se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de proteínas, a partir de muestras de piel del lomo tomadas al principio de la telogén refractaria (50 días) y durante la telogén competente (90 días). Los resultados mostraron que, en condiciones normales (individuos *Eng*<sup>+/+</sup>) las proteínas Smad4 y Smad1 interaccionan intensamente con  $\beta$ -catenina al principio de la telogén refractaria (50 días) (**Figura 21**). Esta interacción se pierde claramente en condiciones de haploinsuficiencia de endoglina (**Figura 21**), de forma similar a lo que ocurre en la interacción de  $\beta$ -catenina con el promotor de endoglina. En cambio, durante la telogén competente se observó una significativa pérdida de interacción entre las proteínas Smad y  $\beta$ -catenina, equivalente en los individuos *Eng*<sup>+/+</sup> y *Eng*<sup>+/-</sup> (**figura 21**). Esta falta interacción probablemente refleja la inactividad de la ruta Bmp/Smad durante la fase de telogén competente, y sugiere que no es necesaria para la activación de la ruta de Bmp/Smad durante la entrada en la

nueva fase de anágén. Por otro lado, dado que los individuos *Eng*<sup>+/-</sup> presentan un retraso en el establecimiento de la telogén refractaria y un alargamiento de la anágén, y teniendo en cuenta las observaciones acerca de la interacción de  $\beta$ -catenina con el promotor de endoglina, estos resultados sugieren que la interacción  $\beta$ -catenina/Smad es necesaria para el establecimiento de la fase de telogén refractaria, probablemente regulando la activación transcripcional de endoglina.

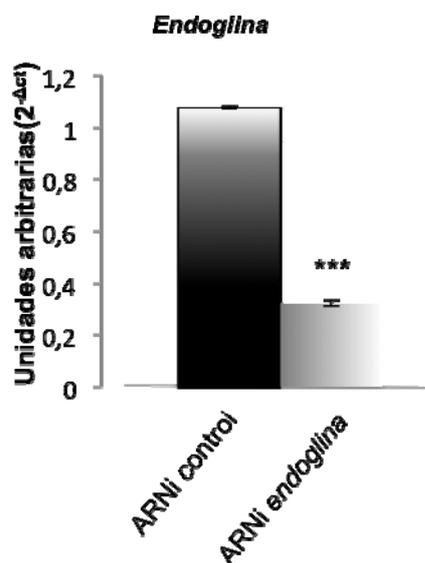


**Figura 21: La proteína  $\beta$ -catenina interacciona con las proteínas Smad1 y Smad4 durante la telogén refractaria de forma dependiente del nivel de endoglina funcional.** Ensayos de inmunoprecipitación (IP) con los anticuerpos indicados analizados por inmunoblot para las proteínas correspondientes en muestras de piel de lomo obtenidas de individuos *Eng*<sup>+/+</sup> y *Eng*<sup>+/-</sup> durante la telogén refractaria (50 días) y la telogén competente (90 días). Como control positivo se utilizó el extracto total de la muestra. IgG, control negativo.

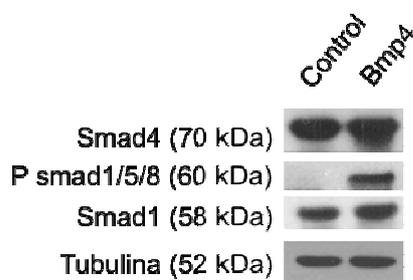
## 8. LA SEÑALIZACIÓN BMP REGULA LA INTERACCIÓN DE $\beta$ -CATENINA CON EL PROMOTOR DE ENDOGLINA Y CON LAS PROTEÍNAS SMAD EN LA LÍNEA E14.

Para determinar la relevancia funcional de la interacción de  $\beta$ -catenina con el promotor de *endoglina* y con las proteínas Smad que ocurre en la piel durante la telogén refractaria, se diseñó un sistema experimental capaz de recapitular en la medida de lo posible la señalización que ocurre durante esta fase del ciclo del pelo en un contexto independiente de tejido. Para ello se

utilizó la línea celular E14 de células troncales embrionarias, un modelo celular que muestra un significativo nivel de expresión de endogлина, tiene constitutivamente activada la señalización Wnt/ $\beta$ -catenina y responde diferencialmente a la citoquina Bmp4 (Hooper y col., 1987; Ying y col., 2003; Kim y Ryoo, 2012; Tamm y col., 2013). En este modelo, el silenciamiento transcripcional de *endogлина* mediante ARNi inhibió la expresión de dicho gen un 70%, emulando una haploinsuficiencia y pérdida funcional de endogлина (Figura 22), mientras que, el tratamiento con Bmp4 promovió la fosforilación de las proteínas Smad1/5/8 (Figura 23), indicando una activación funcional de la vía Bmp/Smad similar a la telogén refractaria en piel.

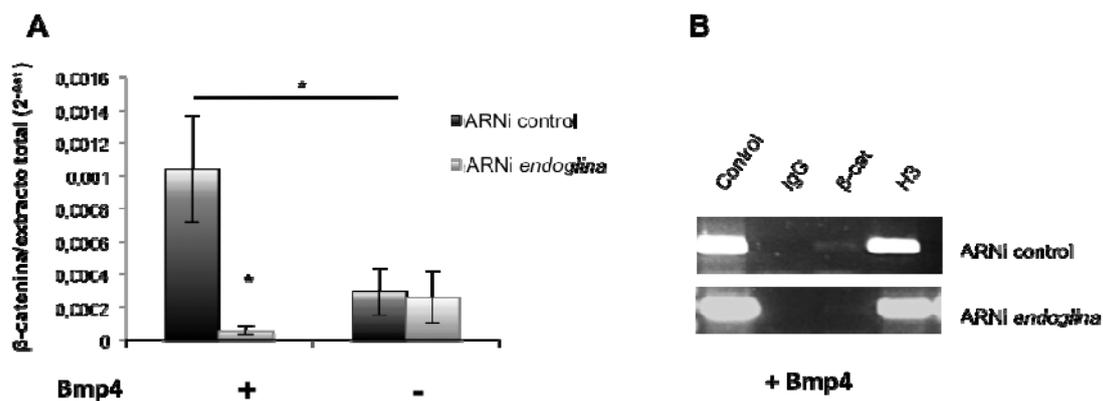


**Figura 22: Inhibición de la expresión endogлина mediante ARNi en la línea celular E14.** Cuantificación del nivel de expresión de endogлина por qRT-PCR realizados tras la transfección con ARNi contra *endogлина*. Para la normalización se utilizó el ARN de *actina*. Las barras de error representan el error estándar. \*\*\*, significativo.  $P \leq 0,001$



**Figura 23: El tratamiento con Bmp4 en la línea celular E14 estimula la activación de la ruta BMP.** Análisis semicuantitativo por inmunoblot de los extractos celulares obtenidos tras la estimulación con Bmp4. Control de carga: Tubulina

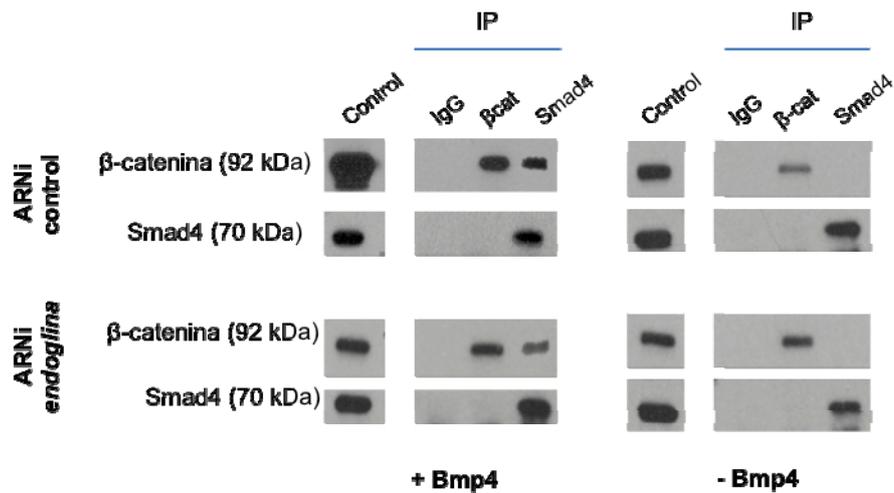
Los ensayos de inmunoprecipitación de cromatina mostraron que, en este sistema experimental, el tratamiento con Bmp4 induce la interacción de  $\beta$ -catenina con el promotor de *endogлина* (figura 24), de forma similar a lo que ocurre durante la telogén refractaria. Dado que en este sistema celular la ruta Wnt/ $\beta$ -catenina está constitutivamente activada por el uso continuado de LIF para inhibir la diferenciación celular (Takao y col., 2007), la unión de  $\beta$ -catenina al promotor de *endogлина* parece un evento específico inducido selectivamente por Bmp4. Así mismo el silenciamiento transcripcional de *endogлина* inhibió significativamente ( $P \leq 0,1$ ) la interacción de  $\beta$ -catenina con el promotor de *endogлина* inducida por Bmp4 (Figura 24). Este resultado indica que la función de *endogлина* es necesaria para la transducción de la señal de la ruta Bmp/Smad que regula la interacción de  $\beta$ -catenina y el propio promotor de *endogлина*.



**Figura 24: La proteína  $\beta$ -catenina interacciona con el promotor de *endogлина* en presencia de Bmp4 de forma dependiente del nivel de *endogлина* funcional en la línea celular E14.** Análisis mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) de la asociación de  $\beta$ -catenina con la región correspondiente al inicio de transcripción del promotor de *endogлина* (entre -52 y +135 pb) tras el tratamiento con Bmp4 o su vehículo, y que han sido transfectadas con ARNi de *endogлина* o con ARNi control. **(A)** Cuantificación de los ensayos de ChIP mediante PCR cuantitativa en tiempo real. La cantidad de promotor de *endogлина* inmunoprecipitado por el anticuerpo anti  $\beta$ -catenina se relativizó con respecto a la cantidad de promotor presente en el extracto total. Las barras de error corresponden al error típico. \*, significativo,  $P \leq 0,1$ . **(B)** Análisis representativo por PCR semi cuantitativa de los ensayos de ChIP realizados en muestras tomadas durante la telogén refractaria. Las bandas correspondientes al ADN inmunoprecipitado por los anticuerpos anti  $\beta$ -catenina e histona H3 fueron secuenciadas y comparadas con la secuencia del promotor de *endogлина*.

Los ensayos de inmunoprecipitación de proteínas mostraron que, en este modelo celular, el tratamiento con Bmp4 induce la interacción de  $\beta$ -

catenina con la proteína Smad4 (**Figura 25**). Este efecto inductor de Bmp4 se vio parcialmente inhibido por el silenciamiento transcripcional de *endoglina* (**figura 25**). Los resultados obtenidos en este modelo celular son equivalentes a los observados durante la telogén refractaria en piel, corroborando la interacción entre  $\beta$ -catenina y la proteína Smad4 durante la telogén refractaria, indicando la relevancia funcional de este sistema de regulación cruzada entre las rutas Bmp/Smad y Wnt.



**Figura 25: La proteína  $\beta$ -catenina interacciona con la proteína Smad4 durante cuando la ruta BMP se encuentra activa, de forma dependiente del nivel de endoglina funcional en la línea celular E14.** Ensayos de inmunoprecipitación (IP) con los anticuerpos indicados analizados por inmunoblot para las proteínas correspondientes a los cultivos celulares tratados con Bmp4 o su vehículo, y transfectados con ARNi contra *endoglina* o con un ARNi control. Como control positivo se utilizó el extracto total de la muestra. IgG, control negativo.



## **DISCUSIÓN**



El FP es una de las pocas estructuras biológicas que está sometida a ciclos regenerativos y degenerativos continuos (Fuchs, 2007), constituyendo un modelo muy adecuado y utilizado para estudiar la biología de las células troncales somáticas o adultas y los distintos mecanismos moleculares que regulan su actividad en mamíferos. Además, la piel en su conjunto es un órgano especialmente propicio para este tipo de estudios debido a su accesibilidad y manejabilidad experimental y a la posibilidad de analizar fácilmente las células troncales residentes dentro de su entorno o nicho en el tejido (Al-Nuami y col., 2010). En la piel, el principal reservorio de células troncales, con potencialidad para generar todas las estructuras de la epidermis, incluyendo el FP y el pelo, las glándulas sebáceas, y el propio EIF, se localiza en la región prominente del FP (Taylor y col., 2000). Los programas de proliferación y diferenciación de las células troncales del FP, de los que dependen procesos como el ciclo de crecimiento del pelo, están regulados por mecanismos de señalización originados en el entorno del nicho, que a su vez depende funcionalmente de estímulos internos o externos (Fuchs, 2007). Dos de las rutas de señalización mejor caracterizadas y con una implicación directa en la regulación de las células troncales del FP son las vías Wnt/ $\beta$ -catenina y Bmp/Tgf- $\beta$ /Smad (Fuchs, 2007). Endoglina es un co-receptor de las citoquinas de la familia Bmp/Tgf- $\beta$ , esencial para su actividad. En este contexto, el objetivo del presente trabajo fue determinar el papel de endoglina en la regulación de las células troncales del FP y del ciclo de crecimiento del pelo, como un paso previo para validar su potencial función reguladora como una diana terapéutica relevante en piel.

En el endotelio, tejido donde se identificó y se caracterizó funcionalmente, endoglina varía su nivel de expresión en función de señales activadoras o inhibitoras procedentes del entorno, como son las señales pro-angiogénicas. El nivel de expresión de endoglina en el endotelio también puede ser regulado por componentes de las propias rutas de señalización de las que forma parte, como es el caso de Alk1, un tipo de receptor Tbr1, y de Tgf- $\beta$  (Fernández-L y col., 2006). Así, esta proteína regula la proliferación de los vasos sanguíneos, tanto durante el desarrollo embrionario como en estadios avanzados de progresión tumoral o reparación de heridas, modulando los

procesos de angiogénesis y de estabilización del endotelio (Botella y col., 2001; Fernández-L y col., 2006; Kapur y col., 2013). Ante una menor expresión de endoglina, estos dos procesos se encuentran alterados (Sanz-Rodríguez y col., 2004; Fernández-L y col., 2006; Kapur y col., 2013). En este trabajo se ha demostrado que, en la piel, endoglina muestra un patrón cíclico de expresión a lo largo del ciclo del pelo que podría reflejar la modulación de la actividad/inactividad del nicho de células troncales epidérmicas del FP a través de su nivel de expresión tal y como lo hace en el endotelio.

El ciclo del pelo está regulado por varias rutas de señalización coordinadas entre sí, que también presentan periodos de actividad/inactividad cíclicos, dependientes de las distintas fases del mismo. Este hecho sugiere que las variaciones en el nivel de expresión de endoglina están reguladas y coordinadas dentro del ciclo del pelo a través de la interacción de endoglina con las rutas de señalización que regulan el establecimiento de las distintas fases del ciclo del pelo. Dos de las principales rutas implicadas en la regulación del ciclo del pelo son las vías Bmp/Tgf- $\beta$ /Smad y Wnt/ $\beta$ -catenina. Como se ha comentado, la segunda telogén posnatal en la cepa de ratón C57Bl/6 puede dividirse en dos subfases, telogén refractaria, caracterizada por la actividad de la ruta BMP y en la que los FP no son capaces de entrar en una nueva anagén ante estímulos de crecimiento de pelo externos o de su macroentorno (otros FPs), y telogén competente, caracterizada por la ausencia de señalización BMP que permite a los FP entrar en una nueva anagén cuando son estimulados (Plikus y col., 2008; Plikus y col., 2009). Plikus y colaboradores, basándose en el nivel de expresión de la proteína Smad1/5/8 fosforilada en el dominio SSXS de la región C-terminal de la proteína, y en la actividad transcripcional del gen Bmp4 en piel a lo largo del ciclo del pelo, determinaron que en los ratones C57Bl/6 durante el segundo ciclo posnatal la vía de señalización Bmp/Tgf- $\beta$ /Smad se está activada durante el final de la anagén y durante la telogén refractaria, pero no durante la telogén competente (Plikus y col., 2008). Este punto de transición entre la señalización que regula la anagén y la que regula la telogén es esencial para el correcto mantenimiento del ciclo de crecimiento del pelo, ya que regula la parada de la proliferación en el FP y la entrada en fase de reposo, lo que supone una alternancia en los mecanismos

moleculares de señalización implicados (Plikus y col., 2008; Plikus y col., 2009; Baker y Murray 2012), constituyendo un marco experimental muy adecuado para analizar este tipo de procesos señalizadores.

A lo largo del presente trabajo, utilizando la misma aproximación experimental, se ha podido determinar que endogлина presenta un patrón de expresión cíclico en la piel en función de la fase de crecimiento del pelo, que es opuesto al de Bmp4, sugiriendo una función de esta proteína en la regulación de la actividad de la vía Bmp/Smad del FP. Corroborando esta hipótesis, se ha podido demostrar que la haploinsuficiencia de endogлина tiene como consecuencia una desregulación de la señalización Bmp/Smad en la piel que resulta en un mantenimiento prolongado de la actividad de la ruta Bmp hasta la telogén competente (día 90 posnatal). Este hecho genera un retraso en el ciclo del pelo, presentando también una fase de anagén más extendida en el tiempo durante el periodo correspondiente a la fase de telogén refractaria, y una actividad continuada de la ruta de señalización BMP hasta los 90 días. El hecho de que la haploinsuficiencia de endogлина tenga como resultado una señalización alterada y extendida de Bmp sugiere que, en este contexto, endogлина esté actuando como inhibidor parcial de la señal de Bmp, tal y como Quintanilla y colaboradores describieron en el caso de Tgf- $\beta$ 1 en piel, empleando el mismo modelo de ratón heterocigoto que en este trabajo para demostrar que la pérdida funcional de endogлина induce una activación de la señalización mediada por Tgf- $\beta$ 1 (Quintanilla y col., 2003; Pérez-Gómez y col., 2007).

Distintas mutaciones en los receptores o citoquinas de las rutas Bmp/Tgf- $\beta$ /Smad implicadas en la regulación de las distintas fases del ciclo del pelo están asociadas a variaciones en la duración de las mismas, y a la generación de malformaciones o tumores de origen folicular, debido, respectivamente, a una diferenciación celular temprana o a la activación constitutiva del nicho de células troncales (Zhang y col., 2006). Así, mutaciones en el gen de Tgf- $\beta$ 2 dan lugar a un retraso en el establecimiento de la anagén tras la segunda telogén (Oshimori y Fuchs, 2012). Del mismo modo, el modelo de ratón Tgf- $\beta$ 1<sup>-/-</sup> muestra un retraso en la entrada en catagén durante el primer ciclo posnatal (Foitzik y col., 2000; Lin y Yang, 2013), mientras que la expresión

condicional en la capa basal de la epidermis de noggina, una citoquina inhibidora de la ruta Bmp, induce una rápida entrada en anagén, debido a un acortamiento drástico de la fase de telogén precedente (Plikus y col., 2008; Lin y Yang, 2013). Asimismo la estimulación puntual y externa con citoquinas de la familia Bmp también induce alteraciones en la duración de las fases del ciclo del pelo. De este modo, la inyección subcutánea de Bmp4 induce una significativa inhibición de la entrada en anagén (Plikus y col., 2008). En este trabajo se ha podido determinar que la haploinsuficiencia de endoglina también altera la duración de las fases del ciclo del pelo, de modo que en los ratones *Eng*<sup>+/-</sup> la fase de la anagén se extiende hasta el día 50 posnatal (telogén refractaria) y la ruta de Bmp se mantiene activa durante un periodo más prolongado, hasta el día 90 posnatal (telogén competente). Dado que endoglina es un co-receptor de las citoquinas de la familia Bmp/Tgf- $\beta$ , este resultado es consistente con la alteración del patrón de señalización de la ruta Bmp, que a su vez conlleva al retraso observado en el ciclo del pelo de los ratones haploinsuficientes para el gen de endoglina.

Las vías de señalización Bmp/Smad y Wnt/ $\beta$ -catenina, de forma autónoma o coordinando sus actividades, están implicadas en la regulación de la homeostasis de multitud de tejidos. En piel, la inhibición de la señalización vía BMP/Smad activa la señalización vía Wnt/ $\beta$ -catenina (Fuchs, 2007). En el intestino, la señalización de la ruta de Wnt/ $\beta$ -catenina se inhibe con la expresión de BMP4, que regula directamente los procesos de diferenciación y renovación celular en este tejido (He y col., 2004; Kühl y Kühl, 2013). En este trabajo se ha demostrado que la desregulación de la señalización Bmp/Smad inducida por la haploinsuficiencia de endoglina no parece alterar la señalización Wnt/ $\beta$ -catenina, aunque si induce un incremento en la duración de la fase de anagén (hasta el día 50 posnatal), regulada por esta vía de señalización, lo que sugiere que esta ruta se mantiene activa durante un periodo más prolongado. Este hecho debería verse reflejado en la actividad transcripcional de dianas de la ruta Wnt/ $\beta$ -catenina. Sin embargo tanto en los individuos *Eng*<sup>+/+</sup> como en los *Eng*<sup>+/-</sup> estas dianas transcripcionales presentan niveles de expresión elevados únicamente durante la fase de anagén (día 30 posnatal) mientras que los FPs de los individuos *Eng*<sup>+/-</sup> se encuentran en crecimiento hasta el día 50 posnatal.

Este hecho sugiere que endoglina es necesaria para la correcta transición de las fases del ciclo del pelo, ya que una menor expresión de endoglina retrasa el cambio de señalización necesario para la transición anagén/telogén refractaria.

El nicho de células troncales situado en la región prominente del FP es el responsable de mantener el ciclo de crecimiento del pelo, activándose en un período de tiempo que abarca el final de la telogén competente y el comienzo de la fase de anagén (Sun y col., 1991; Plikus y col., 2008). En este trabajo se ha demostrado que endoglina está implicada en la regulación de la proliferación de las células del FP, pero no en sus programas de mantenimiento. Este resultado es consistente con las alteraciones inducidas por la haploinsuficiencia de endoglina en el ciclo del pelo y en su regulación a través de la señalización Bmp/Smad. No obstante, el mecanismo molecular por el que endoglina ejerce esta función en el nicho de la región prominente del FP es en gran medida desconocido y requiere investigaciones posteriores. En otros modelos de ratón se ha descrito que la pérdida funcional de determinados genes, como la proteasa *Zmpste24*, está también asociada a una pérdida de la capacidad de proliferación y diferenciación de las células troncales del FP en respuesta a estímulos externos (Espada y col., 2008). *Zmpste24* es responsable del procesamiento de la Pre-lamina A, a su vez responsable del mantenimiento de la integridad estructural del compartimento nuclear y cuya pérdida funcional está asociada a síndromes de envejecimiento acelerado (Pendás y col., 2002). En el caso de *Zmpste24* la pérdida de función está asociada a un incremento en el número de células apoptóticas en el FP, fundamentalmente en la papila dérmica, que se encargan de mantener el nicho de las células troncales foliculares de la región prominente (Espada y col., 2008). En el caso de los animales *Eng<sup>+/-</sup>*, la respuesta deficiente observada en sus células troncales foliculares no está acompañada de un incremento en el número de células apoptóticas en el FP. Esta observación sugiere que, mientras que en el caso de la proteasa *Zmpste24*, la disfunción de las células troncales epidérmicas se debe a defectos extrínsecos que afectan al nicho que las mantiene, en el caso de endoglina la pérdida funcional se debe, probablemente, a defectos intrínsecos de las propias células troncales.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la pérdida de función de endogлина desregula por completo la capacidad de respuesta del FP a estímulos de crecimiento a lo largo de la telogén. Así, tal y como se esperaba, en condiciones normales (animales *Eng<sup>+/+</sup>*), los FP no respondieron a estímulos de crecimiento inducidos por rasuración durante la telogén refractaria, mientras que durante la telogén competente el estímulo de rasuración indujo una respuesta de crecimiento del FP. Por el contrario, la haploinsuficiencia de endogлина resultó en un patrón de crecimiento tras los estímulos de rasuración radicalmente opuesto al observado en condiciones normales. Así, los ratones *Eng<sup>+/-</sup>* mostraron crecimiento de pelo tras la estimulación en la telogén refractaria y una significativa falta de respuesta al estímulo durante la telogén competente. En cada caso, el crecimiento de pelo se encontró siempre asociado a la acumulación de una forma metabólicamente activa de  $\beta$ -catenina y a bajos niveles de proteínas Smad fosforiladas, mientras que la ausencia de crecimiento de pelo estaba asociada a bajos niveles de una forma metabólicamente activa de  $\beta$ -catenina y a altos niveles de proteínas Smad fosforiladas.

Estas observaciones están de acuerdo con la desregulación de la señalización Bmp/Smad y con la falta de respuesta de las células troncales del FP a estímulos de crecimiento, ambos inducidos por la haploinsuficiencia de endogлина. De este modo, en los animales *Eng<sup>+/-</sup>* la alteración del patrón de distribución de las proteínas Smad1/5/8 fosforiladas, activación asociada a la señalización Bmp/Smad durante la telogén refractaria, tendría como consecuencia, como se ha mencionado anteriormente, un alargamiento de la fase de anagén y, por tanto, un crecimiento sostenido del pelo ante un estímulo de rasuración en esta fase. Durante la telogén competente, los estímulos de crecimiento del pelo activan el programa de proliferación del nicho de células troncales del FP, que está desregulado en los animales *Eng<sup>+/-</sup>*, de modo que, en condiciones de haploinsuficiencia de endogлина, un estímulo de crecimiento en esta fase resultaría en una falta de respuesta de los FP.

Por otro lado, en este trabajo también se ha mostrado que en los folículos pilosos del ratón durante la telogén no sólo se fosforilan las proteínas Smad1/5/8, activación asociada a la señalización de BMP, sino también las

proteínas Smad2/3, activación asociada a la señalización de Tgf- $\beta$ . El papel de Tgf- $\beta$  en la regulación de células troncales epiteliales del FP es en gran medida desconocido. Recientemente se ha descrito que durante la telogén tanto Tgf- $\beta$  como Bmp señalizan en el FP con funciones opuestas (Oshimori y Fuchs, 2012). Sin embargo, también se ha descrito que la activación por fosforilación de Smad1/5/8 y Smad 2/3 también ocurre simultáneamente por la estimulación de una misma citoquina, como Bmp2 que activa sinérgicamente ambas vías de señalización en células del ligamento periodontal (Ishibashi y col., 2010).

En el endotelio, endogлина es susceptible de aumentar o disminuir su nivel de expresión en función de las necesidades del entorno (Botella y col., 2001; Kapur y col., 2013). En este trabajo se ha demostrado que, en la piel, endogлина muestra una expresión cíclica asociada al patrón de crecimiento del pelo, activándose su expresión justo antes de la transición anagén/telogén refractaria. En ese momento, la ruta Wnt se encuentra aún completamente activa y la  $\beta$ -catenina es transcripcionalmente competente, mostrando una acumulación citoplasmática y nuclear (Fuchs, 2007; Kühl y Kühl, 2013). Dado que  $\beta$ -catenina es un regulador transcripcional esencial durante la anagén, estas observaciones permiten postular que este factor podría constituir un activador transcripcional del gen de endogлина justo antes de ser inactivado funcionalmente durante la telogén refractaria. Corroborando esta hipótesis, los resultados presentados en este trabajo demuestran que  $\beta$ -catenina interacciona con la región del inicio de transcripción del promotor del gen endogлина al comienzo de la telogén refractaria. Estos resultados son consistentes con las observaciones en otros sistemas experimentales indicando que el estado transcripcional de endogлина está regulado también por las rutas de señalización de los sistemas de los que forma parte (Botella y col., 2001) y sugieren que, en la piel, endogлина podría tener un papel clave en la alternancia de los mecanismos que activan o reprimen el crecimiento del pelo.

Por otro lado, la haploinsuficiencia de endogлина está asociada a una marcada y significativa pérdida de interacción entre  $\beta$ -catenina y el promotor de endogлина durante la telogén refractaria. Desde el punto de vista del mecanismo, esta pérdida de interacción podría significar que el nivel de endogлина en la célula regula la asociación de  $\beta$ -catenina con su propio

promotor por la modificación del entorno como consecuencia de la menor expresión de endogлина. Alternativamente, la haploinsuficiencia del gen endogлина podría reflejar una pérdida de afinidad del factor por el promotor del alelo inactivo. Dado que en este modelo de ratón heterocigoto, una de las dos regiones codificantes del gen endogлина esta sustituida pero las dos regiones promotoras son equivalentes, esta pérdida de asociación implicaría mecanismos epigenéticos de regulación transcripcional. Se requieren estudios adicionales para caracterizar el mecanismo por el que ocurre este proceso, que, en cualquier caso, es consistente con la reducción de la cantidad de endogлина en piel, esperable en este modelo experimental, y la consecuente pérdida del patrón de expresión durante el ciclo del pelo.

La existencia de una regulación cruzada entre las vías de señalización Bmp/Smad y Wnt/ $\beta$ -catenina, como ya se ha comentado, está descrita en distintos modelos experimentales, produciéndose casos tanto de regulación positiva como de regulación negativa. Así, en células humanas de cáncer de colon es necesaria la expresión de  $\beta$ -catenina para que se produzca la expresión de Bmp4 (Kim y col., 2002). Por otro lado, en el intestino, las células troncales regulan los procesos de autorenovación y diferenciación a través de la expresión de Bmp4 que inhibe la señalización de la ruta de Wnt/ $\beta$ -catenina (He y col., 2004; Kühl y Kühl, 2013). Por el contrario, se ha descrito la interacción directa de  $\beta$ -catenina con Smad3 y Smad4 en condrocitos, demostrándose un papel de dicha interacción en la inhibición de la degradación metabólica de  $\beta$ -catenina, favoreciendo su entrada al núcleo y su función como regulador transcripcional (Zhang y col., 2010).

Durante el ciclo de crecimiento del pelo, la ruta de Wnt/ $\beta$ -catenina se silencia cuando la ruta de Bmp/Smad aún está activa. Así, la inhibición de la ruta BMP/Smad, que induce un acortamiento de la fase de telogén refractaria, promueve así mismo una activación de la ruta Wnt/ $\beta$ -catenina, y, en consecuencia, una entrada temprana en la fase de anagén (Plikus y col., 2008). El mecanismo que coordina la alternancia de ambas rutas de señalización a lo largo del ciclo del pelo está muy poco caracterizado. La interacción descrita en el presente trabajo entre  $\beta$ -catenina y las proteínas Smad1 y Smad4, sugieren la existencia de una regulación directa entre ambas

vías de señalización en el contexto del ciclo de crecimiento del FP. Estos resultados son consistentes con las interacciones descritas en otros sistemas, como en condrocitos, donde  $\beta$ -catenina interacciona con Smad3 y Smad4, presentando dicha interacción un papel en la protección frente a la degradación de  $\beta$ -catenina, favoreciendo su entrada al núcleo (Zhang y col., 2010).

El hecho de que la interacción  $\beta$ -catenina/Smad a lo largo de ciclo de crecimiento del pelo tenga lugar fundamentalmente al principio de la telogén refractaria (ruta de Bmp activa), sugiere que esta interacción podría tener un papel inactivador de la ruta de Wnt/ $\beta$ -catenina, de modo que  $\beta$ -catenina podría estar siendo reclutada por las proteínas Smad inhibiendo su función transcripcional y protegiendo al nicho de las células troncales de la región prominente de ser activado de nuevo. Significativamente, en condiciones de haploinsuficiencia de endogлина, asociada en este modelo a un alargamiento de la fase de anagén, se observa una pérdida de interacción  $\beta$ -catenina/Smad, que, de acuerdo con la hipótesis arriba planteada, permitiría mantener a la  $\beta$ -catenina en un estado funcionalmente activo, lo que a su vez se vería reflejado en un anormal mantenimiento de la fase de anagén en este período en los individuos *Eng*<sup>+/-</sup>. En este contexto, la interacción de  $\beta$ -catenina con las proteínas Smad parece presentar un papel inhibidor de la señalización de la ruta Wnt, necesario para la finalización de la anagén y el establecimiento de la telogén. La ausencia de interacción entre las proteínas  $\beta$ -catenina y Smads durante la fase de telogén competente sugiere que la activación de las células troncales de la región prominente necesaria para la entrada en un nuevo ciclo de crecimiento, no requiere de la interacción entre ambas rutas.

Con objeto de corroborar y recapitular la interacción entre las rutas Wnt/ $\beta$ -catenina y Bmp/Smad observada en la piel a lo largo del ciclo del pelo en un contexto independiente de tejido, se utilizó como sistema experimental la línea celular E14 de células troncales embrionarias de la línea de ratón 129/Ola (Tamm y col., 2013) que fueron seleccionadas por su condición de células troncales de ratón, que respondían al tratamiento con Bmp4 estimulando la señalización de Bmp, y que expresaban niveles significativos de la proteína endogлина. Los resultados presentados en este trabajo indican que en este modelo celular la  $\beta$ -catenina interacciona con el promotor de endogлина, en la

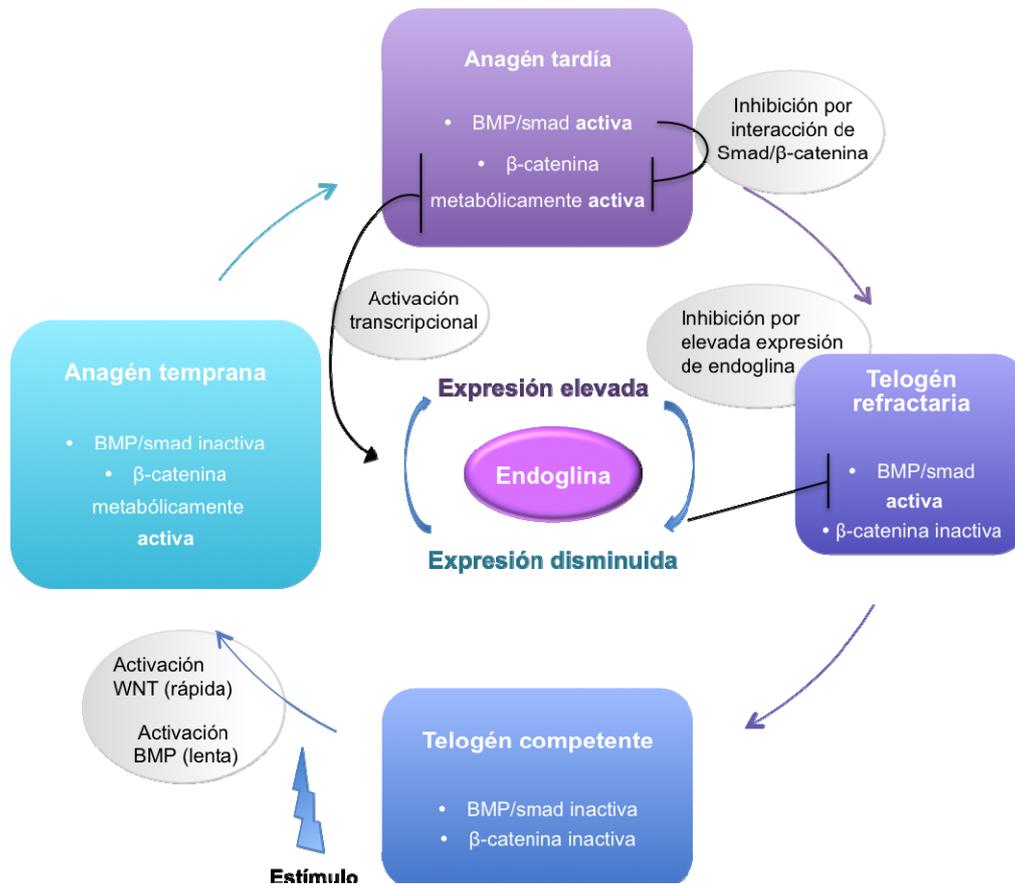
región del inicio de transcripción, cuando se activa la ruta Bmp/Smad mediante el tratamiento puntual con Bmp4. Teniendo en cuenta que la línea celular E14 se trata de forma continuada con el factor Lif para evitar su diferenciación, lo que induce una activación constitutiva de la ruta Wnt/ $\beta$ -catenina (Takao y col., 2007), este resultado sugiere que la regulación transcripcional de endogлина por  $\beta$ -catenina forma parte de un sistema de regulación bien establecido que depende específicamente de la señalización Bmp/Smad.

Como ya se ha comentado anteriormente, la interacción entre componentes de las rutas de Wnt/ $\beta$ -catenina y Bmp/Tgf- $\beta$ /Smad es frecuente en muchos sistemas como mecanismo de regulación y coordinación de ambas rutas de señalización, promoviendo la inhibición de una de las dos rutas de señalización y la consecuente estabilización de la otra (Kühl y Kühl, 2013), o la activación de ambas (Zhang y col., 2010). En este trabajo se ha demostrado que en el modelo celular E14 las rutas Wnt/ $\beta$ -catenina y Bmp/Smad se asocian de forma específica mediante la interacción de  $\beta$ -catenina con la proteína Smad4 estimulada por Bmp4. Teniendo en cuenta que en la línea celular E14 existe una activación constitutiva de la ruta Wnt/ $\beta$ -catenina, estas observaciones sugiere que la actividad de la ruta Bmp regula activamente la interacción entre las rutas de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina y Bmp/Smad.

En este trabajo se han presentado resultados que demuestran un importante papel de endogлина en la regulación del ciclo de crecimiento del pelo. Así, en el sistema experimental utilizado, endogлина tiene una función relevante en la regulación de la transición entre la anagén y la telogén refractaria y en la activación de la proliferación en el nicho de células troncales del FP al final de la telogén competente, coincidiendo con el inicio de una nueva fase de crecimiento. Además, endogлина está implicada en la regulación cruzada entre la señalización Wnt/ $\beta$ -catenina y Bmp/Smad durante la transición anagén/telogén refractaria, de modo que su nivel de expresión modula la interacción entre  $\beta$ -catenina y su propio promotor y entre  $\beta$ -catenina y las proteínas Smad. La importancia de estos dos mecanismos en el contexto de la piel debe ser caracterizada en mayor detalle, pero su existencia perfila un interruptor molecular que regularía la alternancia de la señalización Wnt/ $\beta$ -

catenina y BMP/smad a lo largo del ciclo del pelo y en el que endoglina tendría un papel central.

En conjunto, los resultados presentados en este trabajo son consistentes con un modelo molecular (**figura 26**) basado en un papel central de endoglina en la regulación del ciclo del pelo, funcionando como elemento coordinador entre las rutas de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina y Bmp/Smad. Durante la fase de telogén competente, la ruta de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina se activa rápidamente en respuesta a estímulos apropiados, induciendo la entrada en anagén y promoviendo el crecimiento del pelo (Shimomura y Christiano, 2010). La ruta Bmp/Smad se activa de forma progresiva a lo largo de la anagén (Baker y Murray, 2012), alcanzando valores significativamente elevados a mitad de esta fase, comenzando la inhibición del crecimiento del pelo (Plikus y col., 2008). En este contexto, la señalización Wnt/ $\beta$ -catenina activaría la transcripción del gen *endoglina*, por unión directa de  $\beta$ -catenina a su promotor, en la transición anagén/telogén refractaria, alcanzando su máximo de expresión a lo largo de la telogén competente. La progresiva acumulación de endoglina, funcionando como co-receptor de los ligandos Bmp/Tgf- $\beta$ , promovería la activación por fosforilación y acumulación intracelular de las proteínas Smad, que serían susceptibles de interaccionar con  $\beta$ -catenina, inactivando su función de activador transcripcional. El secuestro funcional de  $\beta$ -catenina tendría como consecuencia la represión transcripcional del gen *endoglina*. La disminución en la dosis de endoglina implicaría a su vez un bloqueo en la señalización de los ligandos Bmp/Tgf- $\beta$  por la pérdida funcional de un componente esencial de su complejo receptor. La pérdida funcional de endoglina al final de la telogén competente permitiría, así mismo, la activación del programa de proliferación del nicho de células troncales del FP.



**Figura 26: Endoglina tiene un papel central en la regulación del ciclo del pelo, modulando la interacción entre las rutas Wnt/β-catenina y Bmp/Smad.** Modelo propuesto de la regulación del ciclo del pelo por endoglina, a través de su nivel de expresión, en base a los resultados obtenidos en el presente trabajo. Cada cuadro corresponde a una fase del ciclo del pelo, en el interior se detallan las rutas de señalización que controla cada fase

Como conclusión de este trabajo se propone que, en la piel, las vías de señalización Wnt/β-catenina y Tgf-β/Bmp/Smad, que alternan su actividad a lo largo del ciclo del pelo para regular las fases de crecimiento y reposo, respectivamente, presentan un mecanismo de regulación entre ellas que está modulado por la proteína endoglina. Estos resultados son importantes y novedosos, caracterizando un nuevo mecanismo molecular implicado en la regulación funcional de las células troncales del FP, un paso importante para definir la función de endoglina como diana farmacológica y terapéutica en medicina regenerativa y, particularmente, en patologías relacionadas con la homeostasis cutánea y el ciclo de crecimiento del pelo.

## **CONCLUSIONES**



- 1.- Endogлина muestra un patrón de expresión cíclico en la piel del ratón dependiente de la fase del ciclo del pelo.
- 2.- La haploinsuficiencia de endogлина desregula el ciclo de crecimiento del pelo.
- 3.- La haploinsuficiencia de endogлина altera el patrón de señalización BMP/Smad durante el ciclo del pelo
- 4.- La haploinsuficiencia de endogлина altera la capacidad de proliferación y movilización de las células troncales del FP de una manera independiente de procesos apoptóticos.
- 5.- Endogлина está implicada en la regulación de las transiciones anagén/telogén refractaria y telogén competente/anagén durante el ciclo de crecimiento del pelo.
- 6.- El transductor de la ruta Wnt,  $\beta$ -catenina, interacciona con el promotor de endogлина y con los transductores de la ruta BMP, Smads, durante la telogén refractaria de una forma dependiente de los niveles de expresión de endogлина funcional.
- 7.- La interacción de  $\beta$ -catenina con el promotor de endogлина y con las proteínas Smad ocurre en células troncales embrionarias en respuesta a la activación de la señalización BMP y es dependiente del nivel de expresión de endogлина funcional.



## **BIBLIOGRAFÍA**



- Abdalla SA, Letarte M. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: current views on genetics and mechanisms of disease. *J Med Genet.* 2006 Feb;43(2):97-110
- Ahmed MI, Mardaryev AN, Lewis CJ, Sharov AA, Botchkareva NV. MicroRNA-21 is an important downstream component of BMP signalling in epidermal keratinocytes. *J Cell Sci.* 2011 Oct 15;124(Pt 20):3399-404
- Al-Nuaimi Y, Baier G, Watson RE, Chuong CM, Paus R. The cycling hair follicle as an ideal systems biology research model. *Exp Dermatol.* 2010 Aug;19(8):707-13
- Alonso L, Fuchs E. Stem cells of the skin epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Sep 30;100 Suppl 1:11830-5
- Alonso L, Fuchs E. The hair cycle. *J Cell Sci.* 2006 Feb 1;119(Pt 3):391-3
- Alt A, Miguel-Romero L, Donderis J, Aristorena M, Blanco FJ, Round A, Rubio V, Bernabeu C, Marina A. Structural and functional insights into endoglin ligand recognition and binding. *PLoS One.* 2012;7(2):e29948
- Baker RE, Murray PJ. Understanding hair follicle cycling: a systems approach. *Curr Opin Genet Dev.* 2012 Dec;22(6):607-12
- Banerjee S, Dhara SK, Bacanamwo M. Endoglin is a novel endothelial cell specification gene. *Stem Cell Res.* 2012 Jan;8(1):85-96
- Bannigan JG, Cottell DC, Morris A. Study of the mechanisms of BUdR-induced cleft palate in the mouse. *Teratology.* 1990 Jul;42(1):79-89
- Bernabeu C, Conley BA, Vary CP. Novel biochemical pathways of endoglin in vascular cell physiology. *J Cell Biochem.* 2007 Dec 15;102(6):1375-88
- Blanco FJ, Santibanez JF, Guerrero-Esteo M, Langa C, Vary CP, Bernabeu C. Interaction and functional interplay between endoglin and ALK-1, two

components of the endothelial transforming growth factor-h receptor complex. *J Cell Physiol.* 2005 Aug;204(2):574-84

Blanpain C, Fuchs E. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009 Mar; 10(3):207-17

Blitz IL, Cho KW. Finding partners: how BMPs select their targets. *Dev Dyn.* 2009 Jun;238(6):1321-31

Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med.* 2000 May 4;342(18):1350-8

Borges L1, Iacovino M, Koyano-Nakagawa N, Baik J, Garry DJ, Kyba M, Perlingeiro RC. Expression levels of endoglin distinctively identify hematopoietic and endothelial progeny at different stages of yolk sac hematopoiesis. *Stem Cells.* 2013 Sep;31(9):1893-901

Botchkarev VA, Sharov AA. BMP signaling in the control of skin development and hair follicle growth. *Differentiation.* 2004 Dec;72(9-10):512-26

Botella LM, Sánchez-Elsner T, Rius C, Corbí A, Bernabéu C. Identification of a critical Sp1 site within the endoglin promoter and its involvement in the transforming growth factor-beta stimulation. *J Biol Chem.* 2001 Sep 14;276(37):34486-94

Bourdeau A, Dumont DJ, Letarte M. A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Invest.* 1999 Nov;104(10):1343-51

Braun KM, Niemann C, Jensen UB, Sundberg JP, Silva-Vargas V, Watt FM.. Manipulation of stem cell proliferation and lineage commitment: visualisation of label-retaining cells in wholemounts of mouse epidermis. *Development.* 2003 Nov; 130(21):5241-55

Cheifetz S, Bellón T, Calés C, Vera S, Bernabeu C, Massagué J, Letarte M. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor

system in human endothelial cells. *J Biol Chem.* 1992 Sep 25; 267(27):19027-30

Cherry AB, Daley GQ. Reprogrammed cells for disease modeling and regenerative medicine. *Annu Rev Med.* 2013;64:277-90

Clayton E, Doupé DP, Klein AM, Winton DJ, Simons BD, Jones PH. A single type of progenitor cell maintains normal epidermis. *Nature.* 2007 Mar 8; 446(7132):185-9

Conidi A, Cazzola S, Beets K, Coddens K, Collart C, Cornelis F, Cox L, Joke D, Dobрева MP, Dries R, Esguerra C, Francis A, Ibrahim A, Kroes R, Lesage F, Maas E, Moya I, Pereira PN, Stappers E, Stryjewska A, van den Berghe V, Vermeire L, Verstappen G, Seuntjens E, Umans L, Zwijsen A, Huylebroeck D. Few Smad proteins and many Smad-interacting proteins yield multiple functions and action modes in TGF $\beta$ /BMP signaling in vivo. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011 Oct-Dec;22(5-6):287-300

Cotsarelis G, Sun TT, Lavker RM. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell.* 1990 Jun 29;61(7):1329-37

Cotsarelis G., Epithelial stem cells: a folliculocentric view. *J Invest Dermatol.* 2006 Jul; 126(7):1459-68

David L, Feige JJ, Bailly S. Emerging role of bone morphogenetic proteins in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009 Jun; 20(3):203-12

Espada J, Varela I, Flores I, Ugalde AP, Cadiñanos J, Pendás AM, Stewart CL, Tryggvason K, Blasco MA, Freije JM, López-Otín C. Nuclear envelope defects cause stem cell dysfunction in premature-aging mice. *J Cell Biol.* 2008 Apr 7;181(1):27-35

- Fernández-L A, Sanz-Rodriguez F, Blanco FJ, Bernabéu C, Botella LM. Hereditary hemorrhagic telangiectasia, a vascular dysplasia affecting the TGF-beta signaling pathway. *Clin Med Res.* 2006 Mar; 4(1):66-78
- Foitzik K, Lindner G, Mueller-Roever S, Maurer M, Botchkareva N, Botchkarev V, Handjiski B, Metz M, Hibino T, Soma T, Dotto GP, Paus R. Control of murine hair follicle regression (catagen) by TGF-beta1 in vivo. *FASEB J.* 2000 Apr;14(5):752-60
- Fuchs E. Scratching the surface of skin development. *Nature.* 2007 Feb 22;445(7130):834-42
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.* 1992 Nov;119(3):493-501
- Gilbert SF. *Developmental Biology.* 6th edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000
- Gordon KJ, Blobel GC. Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Apr;1782(4):197-228
- Goumans MJ, Mummery C. Functional analysis of the TGFbeta receptor/Smad pathway through gene ablation in mice. *Int J Dev Biol.* 2000 Apr;44(3):253-65
- Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, ten Dijke P. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO J.* 2002 Apr 2; 21(7):1743-53
- Gurley KA, Sánchez Alvarado A. Stem cells in animal models of regeneration. *StemBook.* Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; 2008 Dec 31

- Hardy MH., The secret life of the hair follicle. *Trends Genet.* 1992 Feb;8(2):55-61
- He S1, Nakada D, Morrison SJ. Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2009;25:377-406
- He XC, Zhang J, Tong WG, Tawfik O, Ross J, Scoville DH, Tian Q, Zeng X, He X, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L. BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling. *Nat Genet.* 2004 Oct;36(10):1117-21
- Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature.* 1997 Dec 4;390(6659):465-71
- Herhaus L, Sapkota GP. The emerging roles of deubiquitylating enzymes (DUBs) in the TGF $\beta$  and BMP pathways. *Cell Signal.* 2014 Jul 5;26(10):2186-2192
- Hooper M, Hardy K, Handyside A, Hunter S, Monk M. HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature.* 1987 Mar 19-25;326(6110):292-5
- Ishibashi O, Ikegame M, Takizawa F, Yoshizawa T, Moksed MA, Iizawa F, Mera H, Matsuda A, Kawashima H. Endoglin is involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of periodontal ligament cells through a pathway independent of Smad-1/5/8 phosphorylation. *J Cell Physiol.* 2010 Feb;222(2):465-73
- Jamora C, DasGupta R, Kocieniewski P, Fuchs E. Links between signal transduction, transcription and adhesion in epithelial bud development. *Nature.* 2003 Mar 20;422(6929):317-22
- Kapur NK, Morine KJ, Letarte. Endoglin: a critical mediator of cardiovascular health. *Vasc Health Risk Manag.* 2013;9:195-206

- Kaur P. Interfollicular epidermal stem cells: identification, challenges, potential. *J Invest Dermatol.* 2006 Jul; 126(7):1450-8
- Kiefer JC. Primer and interviews: The dynamic stem cell niche. *Dev Dyn.* 2011 Mar;240(3):737-43
- Kim JH, Herrmann F, Sulzberger MB. The effect of plucking and of clipping on the growth of hair in guinea-pigs. *J Invest Dermatol.* 1962 Jun; 38:351-6
- Kim JS, Crooks H, Dracheva T, Nishanian TG, Singh B, Jen J, Waldman T. Oncogenic beta-catenin is required for bone morphogenetic protein 4 expression in human cancer cells. *Cancer Res.* 2002 May 15;62(10):2744-8
- Kim MO, Ryoo ZY. Feeder Independent Culture of Mouse Embryonic Stem Cells. *Reprod Dev Biol.* 2012; 36(4):291-294
- Kühl SJ, Kühl M. On the role of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in stem cells. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Feb;1830(2):2297-306
- Lebrin F, Goumans MJ, Jonker L, Carvalho RL, Valdimarsdottir G, Thorikay M, Mummery C, Arthur HM, ten Dijke P. Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *EMBO J.* 2004 Oct 13;23(20):4018-28
- Lee J, Tumber T. Hairy tale of signaling in hair follicle development and cycling. *Semin Cell Dev Biol.* 2012 Oct;23(8):906-16
- Levy V, Lindon C, Zheng Y, Harfe BD, Morgan BA. Epidermal stem cells arise from the hair follicle after wounding. *FASEB J.* 2007 May;21(7):1358-66
- Li TF, Chen D, Wu Q, Chen M, Sheu TJ, Schwarz EM, Drissi H, Zuscik M, O'Keefe RJ. Transforming growth factor-beta stimulates cyclin D1 expression through activation of beta-catenin signaling in chondrocytes. *J Biol Chem.* 2006 Jul 28;281(30):21296-304

- Lin HY, Yang LT. Differential response of epithelial stem cell populations in hair follicles to TGF- $\beta$  signaling. *Dev Biol.* 2013 Jan 15;373(2):394-406
- Llorca O, Trujillo A, Blanco FJ, Bernabeu C. Structural model of human endoglin, a transmembrane receptor responsible for hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Mol Biol.* 2007 Jan 19;365(3):694-705
- López-Coviella I, Berse B, Krauss R, Thies RS, Blusztajn JK. Induction and maintenance of the neuronal cholinergic phenotype in the central nervous system by BMP-9. *Science.* 2000 Jul 14;289(5477):313-6
- López-Novoa JM1, Bernabeu C. The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010 Oct;299(4):H959-74
- López-Rovira T, Chalaux E, Massagué J, Rosa JL, Ventura F. Direct binding of Smad1 and Smad4 to two distinct motifs mediates bone morphogenetic protein-specific transcriptional activation of Id1 gene. *J Biol Chem.* 2002 Feb 1;277(5):3176-85
- Lowry WE. Does transcription factor induced pluripotency accurately mimic embryo derived pluripotency? *Curr Opin Genet Dev.* 2012 Oct;22(5):429-34
- Luo J, Tang M, Huang J, He BC, Gao JL, Chen L, Zuo GW, Zhang W, Luo Q, Shi Q, Zhang BQ, Bi Y, Luo X, Jiang W, Su Y, Shen J, Kim SH, Huang E, Gao Y, Zhou JZ, Yang K, Luu HH, Pan X, Haydon RC, Deng ZL, He TC. TGFbeta/BMP type I receptors ALK1 and ALK2 are essential for BMP9-induced osteogenic signaling in mesenchymal stem cells. *J Biol Chem.* 2010 Sep 17;285(38):29588-98
- Mahmoudi S, Brunet A. Aging and reprogramming: a two-way street. *Curr Opin Cell Biol.* 2012 Dec;24(6):744-56

- Mazerbourg S, Hsueh AJ. Genomic analyses facilitate identification of receptors and signalling pathways for growth differentiation factor 9 and related orphan bone morphogenetic protein/growth differentiation factor ligands. *Hum Reprod Update*. 2006 Jul-Aug;12(4):373-83
- McAllister KA, Grogg KM, Johnson DW, Gallione CJ, Baldwin MA, Jackson CE, Helmbold EA, Markel DS, McKinnon WC, Murrell J, et al. Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat Genet*. 1994 Dec; 8(4):345-51
- Meurer SK, Alsamman M, Sahin H, Wasmuth HE, Kisseleva T, Brenner DA, Trautwein C, Weiskirchen R, Scholten D. Overexpression of endoglin modulates TGF- $\beta$ 1-signalling pathways in a novel immortalized mouse hepatic stellate cell line. *PLoS One*. 2013;8(2):e56116
- Moore KA1, Lemischka IR. Stem cells and their niches. *Science*. 2006 Mar 31;311(5769):1880-5
- Oshima H, Rochat A, Kedzia C, Kobayashi K, Barrandon Y. Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells. *Cell*. 2001 Jan 26; 104(2):233-45
- Oshimori N, Fuchs E. Paracrine TGF- $\beta$  signaling counterbalances BMP-mediated repression in hair follicle stem cell activation. *Cell Stem Cell*. 2012 Jan 6;10(1):63-75
- Owens P, Han G, Li AG, Wang XJ. The role of Smads in skin development. *J Invest Dermatol*. 2008 Apr;128(4):783-90
- Pendás AM, Zhou Z, Cadiñanos J, Freije JM, Wang J, Hultenby K, Astudillo A, Wernerson A, Rodríguez F, Tryggvason K, López-Otín C. Defective prelamin A processing and muscular and adipocyte alterations in *Zmpste24* metalloproteinase-deficient mice. *Nat Genet*. 2002 May;31(1):94-9

- Pérez-Gómez E, Villa-Morales M, Santos J, Fernández-Piqueras J, Gamallo C, Dotor J, Bernabéu C, Quintanilla M. A role for endoglin as a suppressor of malignancy during mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res.* 2007 Nov 1;67(21):10268-77
- Pérez-Gómez E, Jerkic M, Prieto M, del Castillo G, Martín-Villar E, Letarte M, Bernabeu C, Pérez-Barriocanal F, Quintanilla M, López-Novoa JM. Impaired wound repair in adult endoglin heterozygous mice associated with lower NO bioavailability. *J Invest Dermatol.* 2014 Jan;134(1):247-55
- Pérez-Lorenzo R, Markell LM, Hogan KA, Yuspa SH, Glick AB. Transforming growth factor beta1 enhances tumor promotion in mouse skin carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 2010 Jun;31(6):1116-23
- Plikus MV, Mayer JA, de la Cruz D, Baker RE, Maini PK, Maxson R, Chuong CM. Cyclic dermal BMP signalling regulates stem cell activation during hair regeneration. *Nature.* 2008 Jan 17;451(7176):340-4
- Plikus MV, Chuong CM. Complex hair cycle domain patterns and regenerative hair waves in living rodents. *J Invest Dermatol.* 2008 May;128(5):1071-80
- Plikus MV, Widelitz RB, Maxson R, Chuong CM. Analyses of regenerative wave patterns in adult hair follicle populations reveal macro-environmental regulation of stem cell activity. *J Dev Biol.* 2009;53(5-6):857-68
- Plikus MV, Gay DL, Treffeisen E, Wang A, Supapannachart RJ, Cotsarelis G. Epithelial stem cells and implications for wound repair. *Semin Cell Dev Biol.* 2012 Dec;23(9):946-53
- Quintanilla M, Ramirez JR, Pérez-Gómez E, Romero D, Velasco B, Letarte M, López-Novoa JM, Bernabéu C. Expression of the TGF-beta coreceptor endoglin in epidermal keratinocytes and its dual role in multistage mouse skin carcinogenesis. *Oncogene.* 2003 Sep 4;22(38):5976-85

- Rahimi RA, Leof EB. TGF-beta signaling: a tale of two responses. *J Cell Biochem.* 2007 Oct 15;102(3):593-608
- Rider CC, Mulloy B. Bone morphogenetic protein and growth differentiation factor cytokine families and their protein antagonists. *Biochem J.* 2010 Jul 1; 429(1):1-12
- Rodolfa KT. Inducing pluripotency. *StemBook.* Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; 2008 Sep 30
- Saha K, Jaenisch R. Technical challenges in using human induced pluripotent stem cells to model disease. *Cell Stem Cell.* 2009 Dec 4;5(6):584-95
- Sanz-Rodriguez F, Guerrero-Esteo M, Botella LM, Banville D, Vary CP, Bernabéu C. Endoglin regulates cytoskeletal organization through binding to ZRP-1, a member of the Lim family of proteins. *J Biol Chem.* 2004 Jul 30;279(31):32858-68
- Schepeler T, Page ME, Jensen KB. Heterogeneity and plasticity of epidermal stem cells. *Development.* 2014 Jul;141(13):2559-67
- Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008;3(6):1101-8
- Schneider MR, Schmidt-Ullrich R, Paus R., The hair follicle as a dynamic miniorgan. *Curr Biol.* 2009 Feb 10; 19(3):R132-42
- Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 2003 Jun 13; 113(6):685-700
- Shimomura Y, Christiano AM. Biology and genetics of hair. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2010;11:109-32

- Soma T, Tsuji Y, Hibino T. Involvement of transforming growth factor-beta2 in catagen induction during the human hair cycle. *J Invest Dermatol.* 2002 Jun;118(6):993-7
- Soma T, Dohrmann CE, Hibino T, Raftery LA. Profile of transforming growth factor-beta responses during the murine hair cycle. *J Invest Dermatol.* 2003 Nov;121(5):969-75
- Sun TT, Cotsarelis G, Lavker RM., Hair follicular stem cells: the bulge-activation hypothesis. *J Invest Dermatol.* 1991 May; 96(5):77S-78S
- Takao Y, Yokota T, Koide H. Beta-catenin up-regulates Nanog expression through interaction with Oct-3/4 in embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Feb 16;353(3):699-705
- Tamm C, Pijuan Galitó S, Annerén C. A comparative study of protocols for mouse embryonic stem cell culturing. *PLoS One.* 2013 Dec 10;8(12):e81156
- Taylor G, Lehrer MS, Jensen PJ, Sun TT, Lavker RM. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell.* 2000 Aug 18;102(4):451-61
- Ten Dijke P, Hill CS. New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem Sci.* 2004 May; 29(5):265-73
- Tumbar T, Guasch G, Greco V, Blanpain C, Lowry WE, Rendl M, Fuchs E. Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science.* 2004 Jan 16;303(5656):359-63
- Valluru M, Staton CA, Reed MW, Brown NJ. Transforming Growth Factor- $\beta$  and Endoglin Signaling Orchestrate Wound Healing. *Front Physiol.* 2011 Nov 29;2:89
- Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM, Bdoiah Y,

Lim KH, Yuan HT, Libermann TA, Stillman IE, Roberts D, D'Amore PA, Epstein FH, Sellke FW, Romero R, Sukhatme VP, Letarte M, Karumanchi SA. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med*. 2006 Jun;12(6):642-9

Wagers AJ. The stem cell niche in regenerative medicine. *Cell Stem Cell*. 2012 Apr 6;10(4):362-9

Ying QL1, Nichols J, Chambers I, Smith A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell*. 2003 Oct 31;115(3):281-92

Zhang J, He XC, Tong WG, Johnson T, Wiedemann LM, Mishina Y, Feng JQ, Li L. Bone morphogenetic protein signaling inhibits hair follicle anagen induction by restricting epithelial stem/progenitor cell activation and expansion. *Stem Cells*. 2006 Dec;24(12):2826-39

Zhang M, Wang M, Tan X, Li TF, Zhang YE, Chen D. Smad3 prevents beta-catenin degradation and facilitates beta-catenin nuclear translocation in chondrocytes. *J Biol Chem*. 2010 Mar 19;285(12):8703-10