



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE

DOCTORADO

EFFECTOS MOLECULARES DE NUEVOS
AGENTES PROMOTORES DE LA MIGRACIÓN
CELULAR Y LA REEPITELIZACIÓN DE HERIDAS:
MEMBRANA AMNIÓTICA Y ÁCIDO OLEANÓLICO.

D. Ángel Bernabé García

2018

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi jefe y director de tesis, el Doctor Francisco José Nicolás Villaescusa por darme una oportunidad en su grupo de investigación, por la cual me he formado como investigador y he podido plasmarlo en esta Tesis Doctoral. Con Franjo he aprendido bastantes técnicas de laboratorio y manejo de instrumentos que me han servido y me servirán para ser un buen investigador. Gracias por todo lo expuesto y por comprender cada situación personal y familiar que se me ha cruzado en este camino.

Esta tesis ha sido una recopilación de mi trabajo científico en este laboratorio, que no hubiese sido posible sin la aportación de mi compañero de trabajo y también director de tesis el Doctor Sergio Liarte, que me ha ayudado en como redactar ciencia y me ha dado muy buenos consejos.

He de agradecer a mi tutor de tesis el Doctor Victoriano Garre por resolver todas las dudas de los trámites del doctorado que son difíciles de entender y me han sido de gran ayuda.

He de agradecer al Decano de Enfermería, el Doctor David Armero por los buenos ratos en el laboratorio aprendiendo a hacer técnicas de Western Blot entre otras.

A lo largo de mi formación he pasado por diferentes laboratorios, entre ellos el de patología con el Doctor Carlos Manuel Martínez, al que quiero agradecerle sus enseñanzas, maestro, tu sí que sabes enseñar a base de golpes, he aprendido mucho de ti y seguiré aprendiendo, eso sí, te llevaré un café con leche cuando vaya a pedirte un favor.

También agradecer al Doctor Diego Angosto por el periodo que pasó por el laboratorio, que aunque fue corto, me enseñó a manejar programas estadísticos aparte de hacer un colega.

He de agradecer al Doctor Gregorio Castellanos que me proporcionaba no solo biopsias de pacientes para su posterior estudio sino de cualquier cosa que fuera necesaria.

También agradecer a Mónica Rodríguez, por su ayuda en la obtención de MA aparte de aportar muchas cosas valiosas para el grupo en conjunto.

He de agradecer a la Doctora Laura Martínez Alarcón el apoyo y ánimo que me dio para realizar la tesis además de ser mi enfermera personal vacunándome para la alergia cada mes.

Del mismo modo agradecer a mis nuevos alumnos / compañeros o futuros compañeros, Javier, Juanjo e Irene, por ayudarme a buscar errores y ayudarme con la redacción de la tesis.

También agradecer a mis amigos personales todo el apoyo dado y en especial al Doctor Daniel González, siempre estás ahí cuando se necesita, incluso para entretener a mis hijos mientras escribía la tesis, al igual que el Doctor José Luis Cánovas, sin ti no hubiese podido darle formato al manuscrito de la tesis, eres un buen colega y como Dani siempre estás dispuesto a ayudar en lo que sea.

No hubiese llegado aquí sin el apoyo e ímpetu de mis padres, que nos enseñaron a que podíamos conseguir lo que nos propusiésemos trabajando duro y siendo constantes en los estudios.

También quiero agradecer a mis hermanos, con los que he vivido casi toda mi vida y con los que me ponía a estudiar los exámenes de la carrera. Mi hermano mayor, Antonio, que siempre ha estado protegiéndonos y ayudando cuando había necesidad, y que decir de mi clon, el Doctor en Biología, Don Manuel Bernabé, toda una vida juntos y encima trabajando uno al lado de otro, siempre compitiendo a ver quien acababa la carrera, el doctorado y siempre seguiremos así, tú ya eres Doctor pero yo te saco 2 hijos de ventaja. También a mi hermana Ana que me ha ayudado con mis peques para poder sacar tiempo para escribir la tesis.

De la misma manera he de agradecer a mis suegros todo el apoyo y el ánimo que me han proporcionado, ayudándome con mis hijos y dándome muchas veces de comer y cenar. Y a mis cuñados que han estado a mi lado siempre que los he necesitado, en especial a Miguel Ángel, que aparte me has ayudado a desconectar cuando estaba saturado y me has ayudado, no solo con la tesis sino con cualquier situación.

Además, dar gracias a mis hijos que habéis llegado en el transcurso de esta tesis y me habéis llenado de alegría pasando muy buenos momentos, con vuestras risas y peculiaridades que hicieron que fuese más fácil y llevadera la realización de esta tesis.

Y por último y no menos importante le doy gracias a mi mujer Isabel, tu siempre me has apoyado, has confiado en mí, has estado a mi lado y me has hecho feliz durante todos estos años que nos conocemos, me has dado 2 hijos maravillosos y espero que me des un tercero.

DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

Vicerrectorado de
Planificación de Enseñanzas

D. ANGEL BERNABÉ GARCÍA

Vista la solicitud presentada el día 13 de febrero de 2018, por D. ANGEL BERNABÉ GARCÍA, con DNI: 48398182H, sobre autorización para presentación de tesis doctoral como compendio de publicaciones con carácter previo a la tramitación de la misma en la Universidad de Murcia, le comunico que la Comisión de General de Doctorado, vistos:

- el informe previo de la Comisión Académica del Programa de Doctorado en Biología Molecular y Biotecnología, y
- el visto bueno de la Comisión de Ramas de Conocimiento de Ciencias.

resolvió, en su sesión de 14 de febrero de 2018, **ACCEDER** a lo solicitado por el interesado pudiendo, por tanto, presentar su tesis doctoral en la modalidad de compendio de publicaciones, con los siguientes artículos:

1. "Amniotic membrane stimulates cell migration by modulating transforming growth factor- β signalling".
2. "Oleanolic acid induces migration in Mv1Lu and MDA-MB-231 epithelial cells involving EGF receptor and MAP kinases activation".
3. "Amniotic membrane promotes focal adhesion remodeling to stimulate cell migration".

La presente resolución no pone fin a la vía administrativa. Frente a ella, de conformidad con lo previsto en el capítulo II del título V de la Ley 39/2015, de 1 de octubre, del Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas y en el artículo 21 de los Estatutos de la Universidad de Murcia, aprobados por Decreto 85/2004, de 27 de agosto, los interesados pueden interponer recurso de alzada ante el Rector de la Universidad de Murcia, en el plazo de un mes, contado desde el día siguiente al de la notificación o publicación, sin perjuicio de que puedan intentar cualquier otro recurso que a su derecho convenga.

Lo que en cumplimiento del artículo 40.1 de la vigente Ley 39/2015, de 1 de octubre del Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas, se notifica a D. ÁNGEL BERNABÉ GARCÍA.

El Vicerrector de Planificación de Enseñanzas, y
Presidente de la Comisión General de Doctorado

José Manuel Mira Ros

Firmado con certificado electrónico reconocido.
La información sobre el firmante, la fecha de
firma y el código de verificación del documento
se encuentra disponible en los márgenes
izquierdo e inferior

Firmante: JOSÉ MANUEL MIRA ROS. Fecha-hora: 15/02/2018 09:59:22. Emisor del certificado: CN=AC PRMT Usuarios, OU=Ceres, O=PRMT-UM, C=ES.



Edificio Rector Soler 3ª planta. Campus Universitario de Espinardo. 30100 Murcia
T. 968 364 294 – F. 968 363 304 – email: 3rciclo@um.es – www.um.es/academic/sec-postgrado/



REGISTRO ELECTRÓNICO - SALIDA; Asiento: 2018/3218; Fecha-hora: 15/02/2018 09:59:22

Código seguro de verificación:
RUxPMteB-doVEkiEs-TZiyIRI3-5M1AzimG

COPIA ELECTRÓNICA - Página 1 de 1

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento administrativo electrónico archivado por la Universidad de Murcia, según el artículo 27.3 c) de la Ley 39/2015, de 2 de octubre. Su autenticidad puede ser contrastada a través de la siguiente dirección: <https://sede.um.es/validador/>

APORTACIONES EN ARTÍCULOS PUBLICADOS EN REVISTAS INDEXADAS

A/A. de la Comisión de Doctorado.

A continuación, se detalla la contribución en los artículos que conforman la propuesta de Tesis Doctoral por compendio de publicaciones del alumno de doctorado Ángel Bernabé García, con DNI 48398182H.

En el artículo “Amniotic membrane promotes focal adhesion remodeling to stimulate cell migration”: (i) realización del total de los experimentos necesarios para la investigación y desarrollo del trabajo; (ii) recolección de todos los datos y ejecución del análisis y cuantificación de las imágenes significativas; (iii) colaboración en la elaboración de las figuras que aparecen en artículo; (iv) redacción y revisión del manuscrito.

En el artículo “Amniotic membrane stimulates cell migration by modulating transforming growth factor- β signalling”: (i) realización de los experimentos necesarios para la investigación; (ii) ejecución del análisis y cuantificación de las imágenes significativas; (iii) elaboración de las figuras que aparecen en el artículo; (iv) revisión del manuscrito.

En el artículo “Oleanolic acid induces migration in Mv1Lu and MDA-MB-231 epithelial cells involving EGF receptor and MAP kinases activation”: (i) diseño y realización de los experimentos necesarios para la investigación; (ii) obtención de datos cuantitativos; (iii) análisis y cuantificación de las imágenes significativas; (iv) elaboración de las figuras que aparecen en el artículo; (v) redacción y revisión del manuscrito.

El alumno da fe de la información aquí reflejada y para que conste firma el presente informe en Murcia a 4 de febrero de 2018, con visto bueno de los Directores de Tesis.

Fdo: Á. Bernabé García

VºBº. F. J. Nicolás

VºBº. S. D. Liarte



Datos personales, por orden alfabético, de los autores de los artículos que componen la Tesis doctoral:

Efectos moleculares de nuevos agentes promotores de la migración celular y la reepitelización de heridas: Membrana Amniótica y ácido Oleanólico.

- Antonio Jesús Ramos Morcillo: Doctor en Enfermería por la Universidad de Murcia, profesor en la Facultad de Enfermería de la universidad de Murcia, ajramos@um.es.
- Catalina Ruiz Cañada: Doctora en Biología por la Universidad de Murcia, investigadora en la Universidad de Massachusetts, en el departamento de Neurobiología. catalinaruizcana@gmail.com.
- Carmen Luisa Insausti: Licenciada en medicina y cirugía por la Universidad Central de Venezuela y Doctora en Medicina por la Universidad de Murcia, adjunto de la Unidad de Terapia Celular y Trasplante Hematopoyético del Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca-IMIB y secretaria general de la Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia, Caymed@gmail.com.
- David Armero Barranco: Doctorado en Enfermería por la Universidad de Murcia, Decano de la Facultad de Enfermería y profesor titular en la Facultad de Enfermería de la Universidad de Murcia, darmero@um.es.
- Diego Angosto Bazarra: Doctor en Bioquímica por la Universidad de Murcia, Investigador en el grupo de Inflamación Molecular del IMIB-Arrixaca, dangosto@um.es.



- Francisco José Nicolás Villaescusa: Doctor en Biología por la Universidad de Murcia, Jefe de grupo de la Línea de investigación de Regeneración, Oncología Molecular y TGF- β , IMIB-Arrixaca, franciscoj.nicolas2@carm.es.
- Gregorio Castellanos: Doctor en Medicina por la Universidad de Murcia, profesor titular de la facultad de Medicina de la Universidad de Murcia y Jefe de Servicio de Cirugía General y Aparato Digestivo de HCUVA, gcastellanos@ono.com.
- José María Moraleda: Doctor en Medicina, Catedrático de la universidad de Murcia, profesor de Medicina de la Universidad de Murcia y Jefe de Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca-IMIB, jmoraled@um.es.
- María Ruzafa Martínez: Doctora en enfermería por la Universidad de Murcia, profesora en la Facultad de Enfermería de la Universidad de Murcia, maruzafa@um.es.
- Sergio David Liarte Lastra: Doctor en Biología por la Universidad de Murcia, Investigador del grupo de Regeneración, Oncología Molecular y TGF- β , IMIB-Arrixaca, sdll1@um.es.



Referencias de las revistas de las publicaciones:

Artículo 1.

Revista: Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine.

Título: *Amniotic membrane stimulates cell migration by modulating transforming growth factor- β signalling.*

Dirección web: DOI: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/term.2501>

Artículo 2.

Revista: Scientific Reports

Título: *Amniotic membrane promotes focal adhesion remodeling to stimulate cell migration.*

Dirección web: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-15509-z>

Artículo 3.

Revista: PLOS ONE

Título: *Oleanolic acid induces migration in Mv1Lu and MDA-MB-231 epithelial cells involving EGF receptor and MAP kinases activation.*

Dirección web: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172574>



Los coautores del artículo “Amniotic membrane stimulates cell migration by modulating transforming growth factor- β signalling” DECLARAN:

1) Su conformidad con la presentación del presente artículo por parte del doctorando Ángel Bernabé García con el propósito de formular su Tesis Doctoral como compendio de publicaciones.

2) Su compromiso de no presentar el presente artículo como parte de otra Tesis Doctoral.

3) Reconoce la relevancia de la contribución del doctorando en la investigación cuyos resultados son plasmados en el presente artículo.

Fdo. Catalina Ruiz-Cañada

Fdo. Sergio Liarte

Fdo. Carmen Luisa Insausti

Fdo. Diego Angosto

Fdo. José María Moraleda

Fdo. Gregorio Castellanos

Fdo. Francisco José Nicolás



Los coautores del artículo “Amniotic membrane promotes focal adhesion remodeling to stimulate cellmigration”, DECLARAN:

- 1) Su conformidad con la presentación del citado artículo por parte del doctorando Ángel Bernabé García con el propósito de formular su Tesis Doctoral como compendio de publicaciones.
- 2) Su compromiso de no presentar el presente artículo como parte de otra Tesis Doctoral.
- 3) Reconoce la relevancia de la contribución del doctorando en la investigación cuyos resultados son plasmados en el presente artículo.

Fdo. Sergio Liarte

Fdo. José María Moraleda

Fdo. Gregorio Castellanos

Fdo. Francisco José Nicolás



Los coautores del artículo “Oleanolic acid induces migration in Mv1Lu and MDA-MB-231 epithelial cells involving EGF receptor and MAP kinases activation” DECLARAN:

- 1) Su conformidad con la presentación del citado artículo por parte del doctorando Ángel Bernabé García con el propósito de formular su Tesis Doctoral como compendio de publicaciones.
- 2) Su compromiso de no presentar el presente artículo como parte de otra Tesis Doctoral.
- 3) Reconoce la relevancia de la contribución del doctorando en la investigación cuyos resultados son plasmados en el presente artículo.

Fdo. David Armero-Barranco

Fdo. Sergio Liarte

Fdo. María Ruzafa-Martínez

Fdo. Antonio Jesús Ramos-Morcillo

Fdo. Francisco José Nicolás

SIGLAS Y ABREVIATURAS

AF	Adhesiones focales
AO	Ácido oleanólico
BMP	Proteínas Morfogénicas Óseas
CF	Complejos focales
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico
EMT	Transición epitelio-mesénquima
EGFR, HER2, HER3,	
HER4	Receptores tirosina kinasa de la familia de EGF
ERK	Kinasa Regulada por la señal Extracelular
FAK	Kinasa de adhesiones focales
FGF-2	Factor de Crecimiento Fibroblástico
HGF	Factor de Crecimiento Hepático
HIF-1α	Factor Inducible por Hipoxia-1 α
IGF-1	Factor de Crecimiento Insulínico-1
(IL)-1α, IL-1β, IL-6	Interleuquinas
ITGB6	Integrina beta 6
JNK	Kinasa N-terminal de Jun
KGF	Factor de Crecimiento de Queratinocitos
MA	Membrana amniótica
MEC	Matriz Extracelular
MMC	Mitomicina-C
MMP9	Metaloproteinasas 9 de la matriz
p38	Proteína Kinasa Activada por Mitógenos p38
PDGF	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas

PI3K	Fosfatidilinositol 3'-Kinasa
TGF-α	Factor de Crecimiento Transformante- α
TGF-β	Factor de Crecimiento Transformante $-\beta$
TIMP	Inhibidores Tisulares de las Metaloproteinasas
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral
VEGF-A	Factor de Crecimiento Vascular Endotelial-A

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	iii
DOCUMENTACIÓN.....	vii
SIGLAS Y ABREVIATURAS	xix
ÍNDICE.....	xxiii
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 La piel	3
1.2 Resolución de heridas agudas	4
1.2.1 Hemostasia e inflamación	6
1.2.2 Proliferación	8
1.2.3 Fase de remodelado.....	9
1.2.4 Angiogénesis	10
1.3 Aspectos moleculares de la resolución de heridas.....	11
1.3.1 Factores de crecimiento y citoquinas en migración de heridas.....	11
1.3.2 MAP Kinasas y migración celular	18
1.4 Migración celular.....	20
1.4.1 Polarización.....	21
1.4.2 Protusiones y focos de adhesión.....	22
1.4.3 Dinámica de las adhesiones focales y mecánica de la migración celular	24
1.4.4 Migración celular colectiva.....	26
1.4.5 Transición epitelio-mesénquima y migración	29
1.5 Heridas crónicas.....	31
1.6 Membrana amniótica	34

1.6.1 Membrana amniótica: estructura y procesado.....	35
1.6.2 Mecanismos implicados en la reepitelización de la piel inducida por MA....	37
1.7 Estimulación de la reepitelización por triterpenoides: Ácido oleanólico	39
1.7.1 Propiedades farmacológicas del ácido oleanólico.....	40
1.7.2 Ácido Oleanólico y curación de heridas	41
II. OBJETIVOS	45
2.1 Referidos a los efectos de la membrana amniótica (MA).....	47
2.2 Referidos a los efectos del ácido oleanólico (AO)	47
III. ARTÍCULOS.....	49
Artículo 3.1	51
Artículo 3.2	52
Artículo 3.3	53
IV. DISCUSIÓN.....	55
4.1 Membrana amniótica	57
4.2 Ácido oleanólico	67
4.3 Reflexiones finales.....	74
V. CONCLUSIONES	77
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	81

I. INTRODUCCIÓN

1.1 La piel

La piel, del latín *pellis*, representa el órgano de mayor extensión en los seres humanos. Como parte del tegumento que cubre el cuerpo, se configura en una eficaz barrera que contribuye al mantenimiento de la homeostasis del organismo participando, entre otros procesos, en la regulación del balance hídrico y de electrolitos, además de la regulación de la temperatura corporal (Baroni et al., 2012; Enoch and Price, 2004). En este sentido, la piel constituye una eficaz defensa física del organismo frente agresiones externas, ya sean físicas, químicas o mecánicas, y una defensa activa frente la infección por agentes patógenos y oportunistas (Baroni et al., 2012; Takeo et al., 2015).

Para la diversidad de funciones que cumple, la piel presenta diversas adaptaciones funcionales. Así, se puede constatar que la piel está formada por dos capas o niveles principales: uno más interno en contacto con el tejido subdérmico que lo separa de las estructuras internas del organismo, la dermis; y otro contiguo más superficial, la epidermis, que queda expuesto al medio externo (Baroni et al., 2012; Rittie, 2016). La dermis se constituye de una densa red de fibras colágenas y elásticas mantenida por la actividad de los fibroblastos, en cuyo seno se encuentran vasos sanguíneos, vasos linfáticos, nervios, folículos pilosos y glándulas anejas de la piel, así como una variedad de receptores de tipo nerviosos capaces de señalar la presión, el dolor o la temperatura (Baroni et al., 2012; Rittie, 2016). Su observación microscópica permite discriminar dos áreas por su morfología: la dermis reticular, inmediatamente adyacente al tejido subcutáneo y que presenta grandes acúmulos de fibras de colágeno; y la dermis papilar, en la que se desarrollan multitud de capilares y que está estrechamente relacionada con la epidermis por medio de ondulaciones del tejido conocidas como papilas (Baroni et al., 2012) (Figura 1). A su vez, la epidermis muestra en su estructura varios niveles o estratos

que son resultado de la diferenciación progresiva del principal tipo celular que la constituye: el queratinocito. Desde el nivel más profundo hacia la superficie encontramos, adyacente a la dermis papilar, el estrato basal, compuesto por células germinales que mediante su división activa son responsables del mantenimiento de la estructura epidérmica. Adyacente a él, el estrato espinoso está formado por células de apariencia poligonal estrechamente unidas mediante desmosomas que conforman prolongaciones del citosol a modo de espigas. A continuación, el estrato granuloso se distingue por el acúmulo de abundantes gránulos basófilos de queratohialina, precursor de la queratina; seguidamente, el estrato lúcido se configura como una estrecha banda celular en la que se observa la liberación del núcleo; y finalmente, el más grueso y superficial de todos, el estrato córneo, que está compuesto por hileras de queratinocitos planos anucleados, también denominados células córneas o escamas. Éstas constituyen una barrera física funcional debido a las propiedades de sus componentes, en especial de la queratina (Baroni et al., 2012; Rittie, 2016).

1.2 Resolución de heridas agudas

Cuando se produce una lesión que provoca una disrupción en la integridad de la piel, resulta vital la restauración de su estructura tan pronto como sea posible. Dependiendo de la severidad del traumatismo inductor, la pérdida de integridad, coloquialmente conocida como herida, puede afectar a capas más o menos profundas del órgano. En condiciones normales, la cicatrización de heridas representa un proceso biológico dinámico y ordenado que involucra mediadores solubles, células sanguíneas, elementos de la Matriz Extracelular (MEC) y células parenquimatosas (Singer and Clark, 1999). Cuando el daño

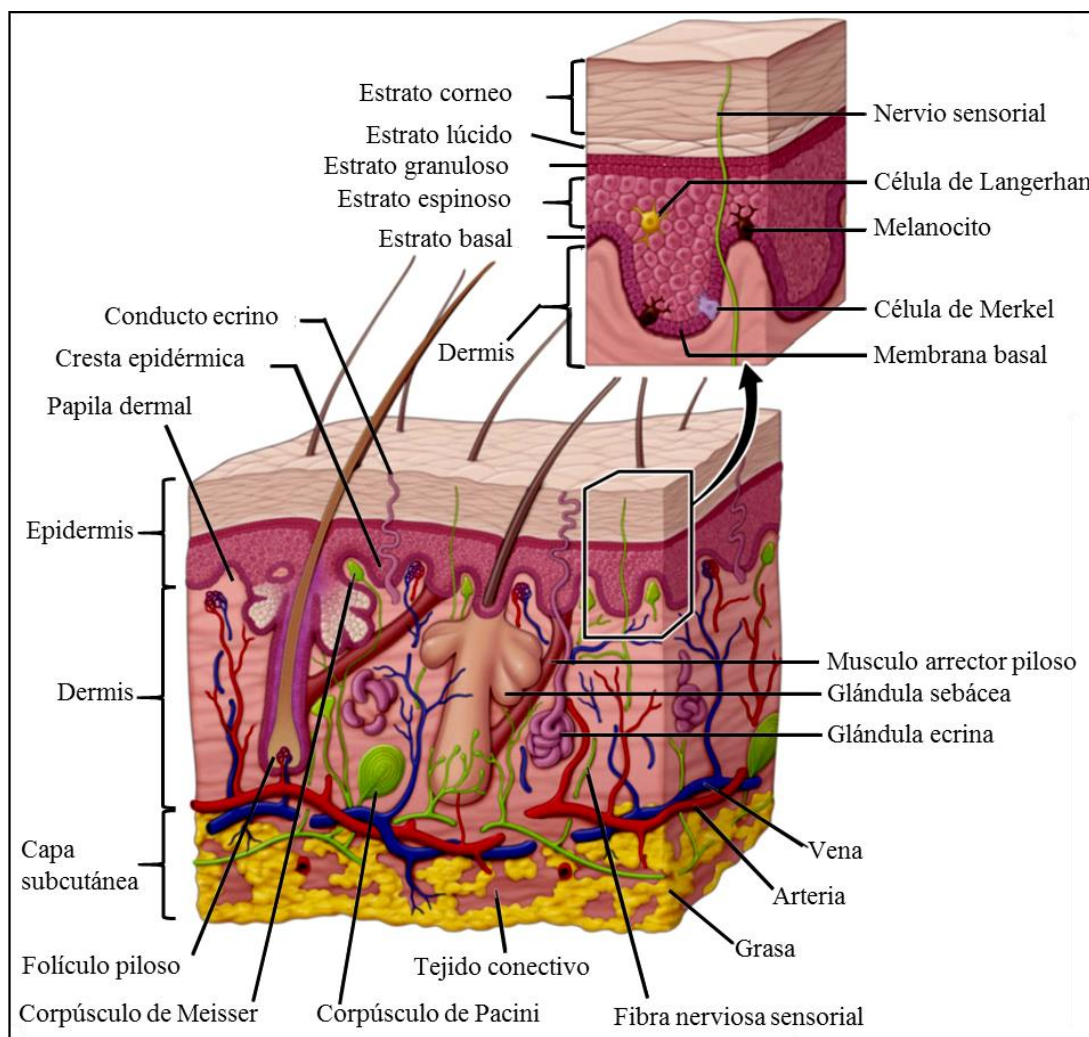


Figura 1: Estructura de la piel modificado de (Bohjanen, 2013)

es leve, se produce la restitución completa de la estructura epitelial, es decir, reparación íntegra de la piel y anejos afectados. Sin embargo, cuando el daño es extenso, se produce una regeneración estructural que no guarda similitud con la morfología original, dando lugar a cicatrices conectivas (Enoch and Price, 2004; Singer and Clark, 1999). En ocasiones, los mecanismos de reparación son incapaces de completar el proceso, dando lugar a heridas crónicas que no cicatrizan.

Se define la curación de una herida como el proceso biológico que se inicia inmediatamente tras una lesión, y que es el responsable de restaurar la integridad morfológica y funcional del tejido dañado. De forma general, la curación de una herida aguda pasa por varias fases, superpuestas en el tiempo, que son diferenciables por

patrones moleculares y celulares detectables en su transcurso. Diferenciamos entre hemostasia e inflamación, proliferación y remodelación tisular, fases que concurren en el tiempo con la formación de nuevos vasos (Enoch and Price, 2004; Werner and Grose, 2003) (Figura 2).

1.2.1 Hemostasia e inflamación

La primera etapa de la cicatrización fisiológica de la herida está enfocada a la formación de una matriz tisular provisional capaz de ocupar el defecto dérmico originado por el traumatismo. La generación de esta matriz, que se completa después de algunas horas, se sustenta en el fenómeno de la hemostasia y se produce inmediatamente después de la lesión. En las lesiones con componente vascular, las plaquetas son las primeras células que aparecen y juegan un papel central. En su activación, las plaquetas son estimuladas por componentes de la MEC como el colágeno fibrilar, la fibronectina y otras proteínas de adhesión. Ante estos estímulos, las plaquetas experimentan adherencia y agregación, a la vez que liberan multitud de mediadores de la coagulación: serotonina, difosfato de adenosina y tromboxano A₂; y proteínas con propiedades adhesivas: fibrinógeno, fibronectina, trombospondina y factor VIII de von Willebrand. Estos factores, junto con la trombina generada localmente, inducen una agregación plaquetaria superior que termina por constituir un tapón plaquetario que, a modo de matriz provisional, actuará como andamiaje para la migración de leucocitos, queratinocitos, fibroblastos y células endoteliales (Li et al., 2007; Robson et al., 2001). Además, esta matriz provisional se constituye en un reservorio de factores tróficos esenciales para el proceso de reepitelización, liberados en ella tanto por plaquetas como por los leucocitos reclutados (Li et al., 2007). Por lo general, estos factores de crecimiento, entre los que se encuentran

el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), el Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF-2), el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF), el Factor de Crecimiento Insulínico (IGF-1) o el Factor de Crecimiento Transformante- α (TGF- α), estimulan globalmente el proceso. Algunos de ellos, sin embargo, destacan por su actividad específica, como es el caso del Factor de Crecimiento Vascular Endotelial-A (VEGF-A) y el Factor Inducible por Hipoxia-1 α (HIF-1 α) encargados de estimular la angiogénesis; o el Factor de Crecimiento Transformante - β (TGF- β), aún de mayor relevancia por su capacidad de regular múltiples respuestas celulares que se producen a lo largo de las tres fases de la cicatrización de heridas (Finnson et al., 2013; Werner and Grose, 2003).

Los mecanismos moleculares de la inflamación se activan, en paralelo, durante la hemostasia a consecuencia de la liberación de citoquinas por parte de células dañadas y las plaquetas. En la herida, estas citoquinas, entre las que se incluyen las Interleuquina (IL)-1 α , IL-1 β , IL-6 y el Factor de Necrosis Tumoral (TNF)- α , impulsan el reclutamiento temprano de neutrófilos, encargados de iniciar el desbridamiento del tejido dañado mediante la liberación de proteasas y la fagocitación de desechos celulares (Kunkel et al., 1991). A su vez, los neutrófilos liberan nuevos mediadores de la inflamación que amplifican la respuesta inflamatoria y promueven el reclutamiento de monocitos circulantes al sitio de la herida (Clark, 1996; Lorenz and Longaker, 2003). En los días sucesivos a la lesión, los monocitos extravasados se diferencian en macrófagos que, junto a los macrófagos residentes, son responsables de orquestar el proceso de reparación a largo plazo (Enoch and Price, 2004). Referente al macrófago, hay que hacer hincapié en la diversidad de funciones que este tipo celular ejecuta durante el proceso de reepitelización: la defensa, la promoción y resolución de la inflamación, la eliminación de las células apoptóticas, el soporte para la proliferación celular y la restauración de

tejidos después de la lesión (Koh and DiPietro, 2011). Esta participación intensa que ocurre en una respuesta curativa exitosa parece estar estimulada por la presencia de potentes factores de crecimiento tales como TGF- α , TGF- β , FGF, PDGF o VEGF que son producidos por plaquetas y otras células como los mastocitos, macrófagos o neutrófilos. Todos estos factores están implicados en promover la proliferación celular y la síntesis de moléculas de la MEC por células de la piel (DiPietro and Polverini, 1993; Li et al., 2007).

1.2.2 Proliferación

Esta fase comienza alrededor del tercer día y se puede extender por un periodo de hasta dos semanas después de la lesión. Se caracteriza por la progresiva sustitución de la matriz provisional por tejido de granulación de nueva formación. Este recambio se fundamenta en un aumento de la proliferación de queratinocitos y fibroblastos en el borde de la herida, unido a la migración de ambas células, así como la síntesis de nueva MEC en respuesta a factores de crecimiento incluyendo EGF, FGF-2 y el Factor de Crecimiento de Queratinocitos (KGF) (Reinke and Sorg, 2012; Werner and Grose, 2003). Inicialmente, de tres a cinco días después de la lesión en heridas limpias y no infectadas, los fibroblastos se erigen en el tipo celular destacado a medida que proliferan (Lorenz and Longaker, 2003). Tras su división, contribuyen a la síntesis y la secreción de MEC necesaria para la sustitución del tapón inicial de fibrina por una matriz enriquecida en glucosaminoglicanos y ácido hialurónico, la cual facilitará la migración celular y el proceso de epitelización (Insausti et al., 2010a; Lorenz and Longaker, 2003). La epitelización es el recubrimiento de una herida con nuevo epitelio y se fundamenta en la migración y proliferación de queratinocitos desde la periferia de la herida (Santoro and Gaudino, 2005). Los

queratinocitos que cierran la herida son provistos por las células basales ancladas en la zona cerca del borde de la herida. Éstas, para migrar, se vuelven aplanadas y no se dividen hasta que se restaura la continuidad epidérmica. (Lorenz and Longaker, 2003; Woodley, 1996). Es después del restablecimiento de la capa epitelial cuando los queratinocitos y los fibroblastos secretan laminina y colágeno tipo IV para volver a formar la membrana basal (Lorenz and Longaker, 2003; Marinkovich et al., 1993). Es entonces cuando los queratinocitos adquieren la forma columnar y comienzan a dividirse, restableciendo la estructura de la epidermis (Castellanos et al., 2017; Lorenz and Longaker, 2003).

1.2.3 Fase de remodelado

La fase de remodelado se inicia simultáneamente con el desarrollo del tejido de granulación y se extiende en el tiempo hasta la resolución de la herida. Su regulación, de manera simplista, puede conceptualizarse como el equilibrio entre la síntesis, la deposición y la degradación de los componentes de la MEC (Li et al., 2007). Este equilibrio está influenciado por la regulación de la actividad de colagenasas, gelatinasas y estromelisin, conocidas como metaloproteinasas (MMPs) de la MEC, en conjunción con sus inhibidores tisulares (TIMP). A medida que la matriz madura, la fibronectina y el ácido hialurónico son degradados y sustituidos por haces de colágeno que, mediante su reticulación e incremento en diámetro, contribuyen a la mayor resistencia tensional del nuevo tejido (Enoch and Price, 2004; Welch et al., 1990). Aunque la deposición temprana del colágeno es errática, su posterior organización se logra principalmente mediante la contracción de la herida. Progresivamente, los fibroblastos migrados al tapón fibrinoso se han ido transformando en miofibroblastos que jugarán un papel fundamental en la contracción de la herida (Werner and Grose, 2003). Esta contracción, que se produce a

través de las interacciones entre los miofibroblastos y la MEC circundante, consigue acercar los márgenes de la herida y aumenta la eficiencia del proceso. Todas estas interacciones están influenciadas por una serie de factores extracelulares incluyendo PDGF y FGF, pero con especial relevancia de TGF- β , pues desempeña un papel importante en la mediación de todo el remodelado, acción evidenciada por su capacidad para promover la acumulación de nueva MEC (Grinnell, 1994).

1.2.4 Angiogénesis

El proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos es concurrente a todas las etapas del proceso de cicatrización. Durante la fase hemostática, el TGF- β y el PDGF secretados por las plaquetas atraen a macrófagos y granulocitos que promueven la angiogénesis (Li et al., 2007).

Los macrófagos, en particular, juegan un papel clave en la angiogénesis al liberar diferentes sustancias angiogénicas: TNF- α y FGF-b. Así, los nuevos capilares invaden la matriz transitoria de fibrina y se organizan en una red microvascular a través del tejido de granulación (Enoch and Price, 2004; Tonnesen et al., 2000). A medida que el colágeno se acumula en el tejido de granulación para producir tejido cicatricial, la densidad de los vasos sanguíneos disminuye en un proceso dinámico que puede influir en el desarrollo de heridas crónicas (Enoch and Price, 2004; Lorenz and Longaker, 2003).

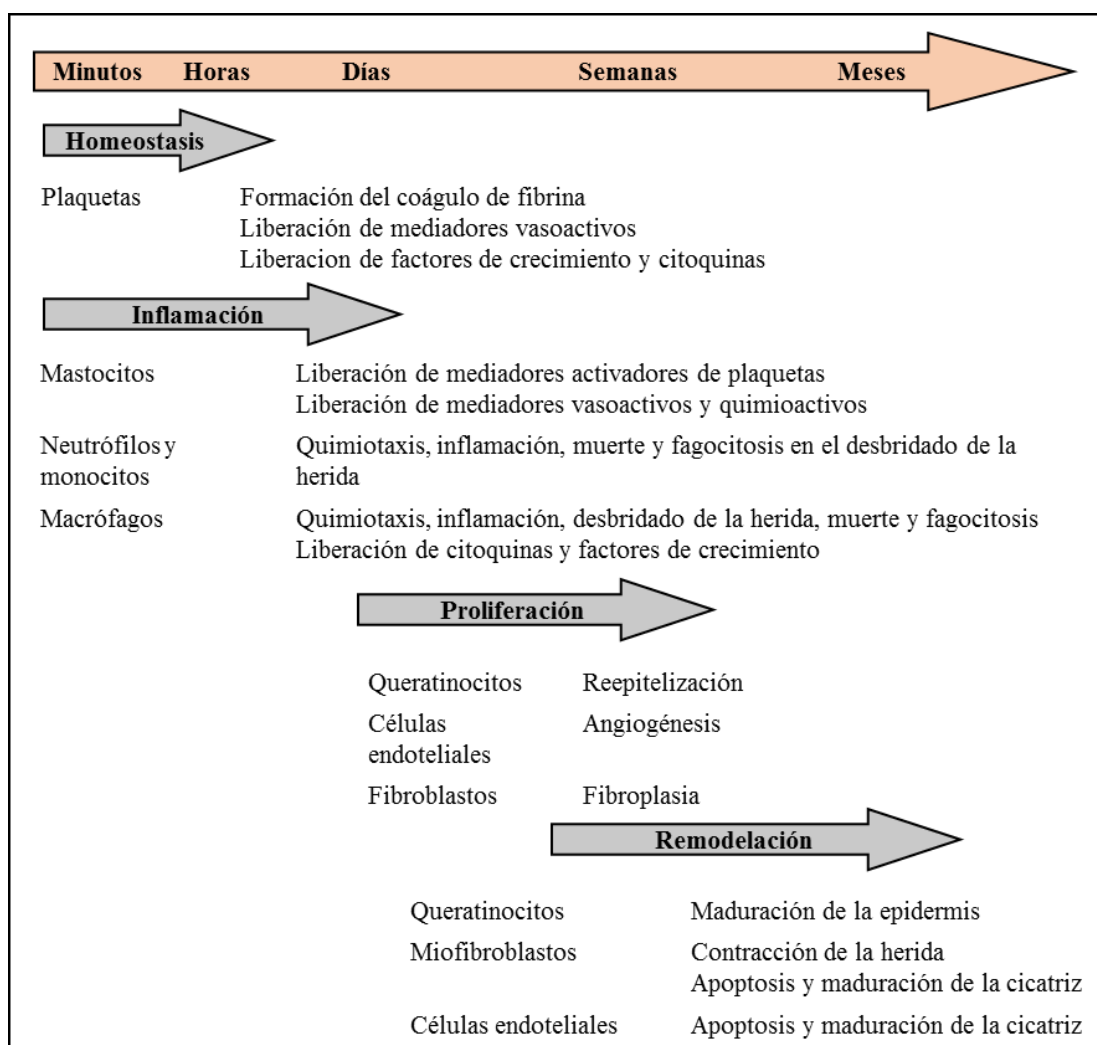


Figura 2: Esquema general de la curación de heridas, modificado de (Li et al., 2007).

1.3 Aspectos moleculares de la resolución de heridas

1.3.1 Factores de crecimiento y citoquinas en migración de heridas

Los factores de crecimiento pueden ser moléculas de pequeño tamaño, tales como algunas hormonas peptídicas, o grandes macromoléculas de tipo proteico. En su metabolismo, los factores de crecimiento se secretan como moléculas completamente funcionales o como precursores que requieren un procesamiento postraducciona para ser activos, solo entonces

son capaces de estimular procesos como la proliferación, la diferenciación o la migración celular.

A medio y largo plazo los efectos de un factor de crecimiento suelen ser el resultado de cambios en el transcriptoma de las células estimuladas, mediados por la señalización de rutas de transducción que se activan tras la interacción de dichos factores de crecimiento con sus respectivos receptores en la superficie plasmática, y que conllevan cambios en los factores de transcripción que terminan afectando a la expresión génica (Seeger and Paller, 2015). Sin embargo, en otras ocasiones, esta interacción ligando-receptor desencadena además la activación de varias rutas de señalización intracelular cuyos efectos pueden ser más inmediatos y no necesariamente ligados a cambios en la expresión génica, como es el caso la señalización de las Proteínas Kinasas Activadas por Mitógenos (MAPK) (Huang et al., 2004; Kim and Choi, 2010).

En la reepitelización de heridas, varios factores de crecimiento son la clave para inducir, además de proliferación, la migración individual o colectiva de queratinocitos y fibroblastos, ya sea *in vitro* sobre una matriz tridimensional o en la piel en modelos de herida en animales (Barrientos et al., 2008; Shirakata, 2010). Entre las distintas familias de factores de crecimiento con efecto sobre el comportamiento de estas células durante la cicatrización, destacan los miembros de la familia del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) y los miembros de la Familia del Factor de Crecimiento Transformante- β (TGF- β).

EGF

La familia EGF está compuesta por varios factores de crecimiento que desarrollan un rol crítico en la inducción de la migración en queratinocitos. Todos ellos comparten ser

sintetizados como proteínas transmembrana tipo I, que para su activación han de someterse a un procesamiento proteolítico, quedando libres para actuar como factores de crecimiento autocrinos o paracrinos (Higashiyama et al., 2008; Normanno et al., 2006). Una vez liberados, los ligandos de la familia EGF se unen a receptores con actividad tirosin-kinasa que forman homo o heterodímeros, conociéndose de ellos cuatro isoformas diferentes: HER1 (comúnmente conocido como EGFR, ErbB-1), HER2 (ErbB-2), HER3 (ErbB-3) y HER4 (ErbB-4) (Figura 3). La activación de estos receptores resulta en cambios en la expresión génica, que en el contexto cutáneo son mediados principalmente por EGFR, el cual se detecta en toda la epidermis y con una expresión más prominente en la capa basal (Nanney et al., 1984; Normanno et al., 2006).

Entre los factores de la familia EGF los queratinocitos humanos expresan varios de ellos, destacando TGF- α , HB-EGF, Amphiregulina, Betacellulina, y Epiregulina (Hashimoto, 2000; Shirakata, 2010). Así, en estas células, EGFR se puede activar de forma autocrina por ligandos sintetizados por los propios queratinocitos, que pueden ser activados a su vez de forma paracrina por factores que han sido liberados por plaquetas, linfocitos, macrófagos o fibroblastos (Barrientos et al., 2008; Shirakata, 2010; Yahata et al., 2006). De esta manera, el propio EGF es detectado en el fluido de las heridas, siendo capaz de inducir la migración de queratinocitos *in vitro* (Peplow and Chatterjee, 2013), además de promover su proliferación *in vivo* (Werner and Grose, 2003). Paralelamente, TGF- α y HB-EGF también muestran cierta capacidad de promover migración. Además HB-EGF muestra un efecto mitogénico sobre los fibroblastos y los queratinocitos que juega un papel importante en la reepitelización y la formación de tejido de granulación (Li et al., 2006; Stoll et al., 2012). También, por su lado, Neuregulina y Epiregulina son capaces de estimular la migración de queratinocitos vía EGFR, HER2 o HER3 indistintamente (Draper et al., 2003; Kim et al., 2011; Schelfhout et al., 2002).

Por último, los factores de la familia EGF son capaces de afectar al proceso de reepitelización desencadenando efectos a corto plazo que son independientes de su efecto transcriptómico. Estas manifestaciones se deben a la estimulación de la vía MAPK/ERK mediada por la unión de ligando y posterior activación de EGFR. Entre otras acciones, esta vía lleva a la contracción y proliferación celular, y la estimulación de la vía de la fosfatidilinositol-3-Kinasa (PI3K), que resulta en la generación de protrusiones de la membrana en la propagación de las células (Haase et al., 2003).

TGF- β

El TGF- β es un factor multifuncional que controla proliferación, diferenciación y otras funciones en muchos tipos celulares. TGF- β pertenece a la superfamilia de Factores de Crecimiento Transformante, formada además por las Proteínas Morfogénicas Óseas(BMP), las Activinas, las Inhibinas y la Hormona Antimulleriana (Akhurst and Hata, 2012; Finnson et al., 2013). TGF- β presenta tres isoformas (1, 2 y 3) de las cuales TGF- β 1 es la que muestra una mayor diversidad funcional y por esto ha sido el más estudiado, estando involucradas en una variedad de procesos celulares cruciales como la hematopoyesis, proliferación celular, angiogénesis, diferenciación, migración, apoptosis celular y el desarrollo (Finnson et al., 2013). TGF- β 1 (en adelante TGF- β) es una proteína homodimérica sintetizada como precursor inactivo, el cual debe ser escindido proteolíticamente para generar la proteína activa. Una vez activo, TGF- β se une a receptores celulares (tipo I y II) que presentan actividad serin-treonin-kinasa. Tras la estimulación con TGF- β , estos receptores heterodimerizan, se activan y entonces fosforilan las R-Smads, Smads reguladas por receptor, Smad2 y Smad3 (Finnson et al., 2013) (Figura 4).

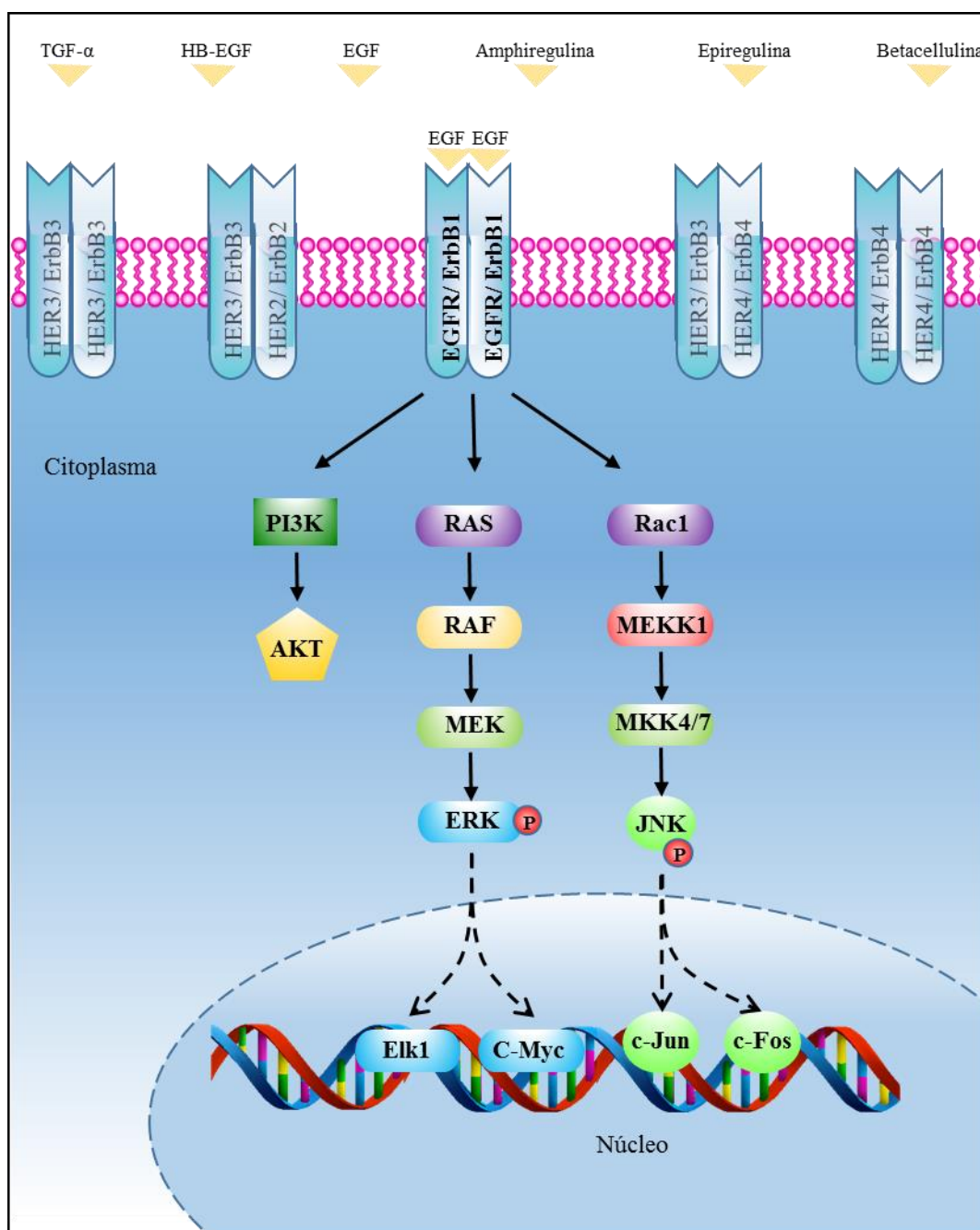


Figura 3: Rutas de señalización de EGFR, modificado de (Normanno et al., 2006).

Las Smads constituyen un grupo de proteínas con alta similitud encargadas de transducir la señal generada por los miembros de la superfamilia de TGF. En el caso del TGF- β , una vez activadas, las Smad2 y 3, viajan al núcleo donde interactúan con Smad4, co-Smad, una proteína mediadora de interacciones o facilitadora, formando complejos que, en cooperación con otros factores de transcripción, co-activadores o co-

represores, regulan la transcripción de genes concretos con efectos a medio y largo plazo (Heldin and Moustakas, 2012; Nicolas et al., 2004; Pierreux et al., 2000). Sin embargo, la estimulación por TGF- β también muestra capacidades a corto y medio plazo que parecen estar mediadas por un sistema distinto a la anteriormente descrita ruta canónica. Este mecanismo, denominado ruta no canónica, implica la activación de distintas kinasas, incluyendo la Kinasa Regulada por señal Extracelular (ERK), la Kinasa N-terminal de Jun (JNK), la Proteína Activada por Mitógenos p38 (MAP) Kinasa, la Tirosina Kinasa Src o la fosfatidilinositol 3'-Kinasa (PI3K) (Moustakas and Heldin, 2005; Mu et al., 2012) (Figura 4), dichas kinasas, se activan directamente por el receptor tipo II e influyen multitud de procesos celulares entre los que destaca la regulación de la migración celular (Akhurst and Hata, 2012).

En el contexto de la cicatrización de heridas, el TGF- β tiene un amplio espectro de acción puesto que afecta al comportamiento de una amplia variedad de células y media una diversidad de funciones celulares (Ashcroft and Roberts, 2000). Así, queratinocitos, fibroblastos y monocitos están entre las células diana de TGF- β (Ashcroft and Roberts, 2000), mostrando efectos tan relevantes como la promoción de la síntesis de colágeno o la transformación de fibroblastos en miofibroblastos (Werner and Grose, 2003). Aunque se cree que en estadios iniciales las plaquetas son la fuente primaria de TGF- β en la herida, la activación del TGF- β latente en la herida también parece contribuir a sus efectos a lo largo del proceso en el que macrófagos y fibroblastos contribuyen a autorregular las altas concentraciones (Ashcroft and Roberts, 2000; Finnson et al., 2013). En el caso de las heridas crónicas, hay que destacar como los efectos del TGF- β promueven una disminución de la actividad de diversas MMPs, a la vez que se impulsa la síntesis de TIMPs. Consecuentemente, la señalización por TGF- β juega un papel importante en la patogénesis de la fibrosis y la formación de queloides (Mauviel et al., 1996;

Papakonstantinou et al., 2003; Wang et al., 2007; White et al., 2000; Zeng et al., 1996). En este sentido, se ha visto como los niveles de esta citoquina disminuyen una vez que la herida crónica comienza a cicatrizar, lo que indica una correlación significativa entre las heridas que no cicatrizan y un nivel aumentado de esta citoquina (Trenrove et al., 2000). Así el estudio de la vía de señalización del TGF- β es un campo prometedor para entender las dinámicas moleculares que originan diversas afecciones cutáneas patológicas, incluyendo las heridas crónicas que no cicatrizan (Finnsen et al., 2013).

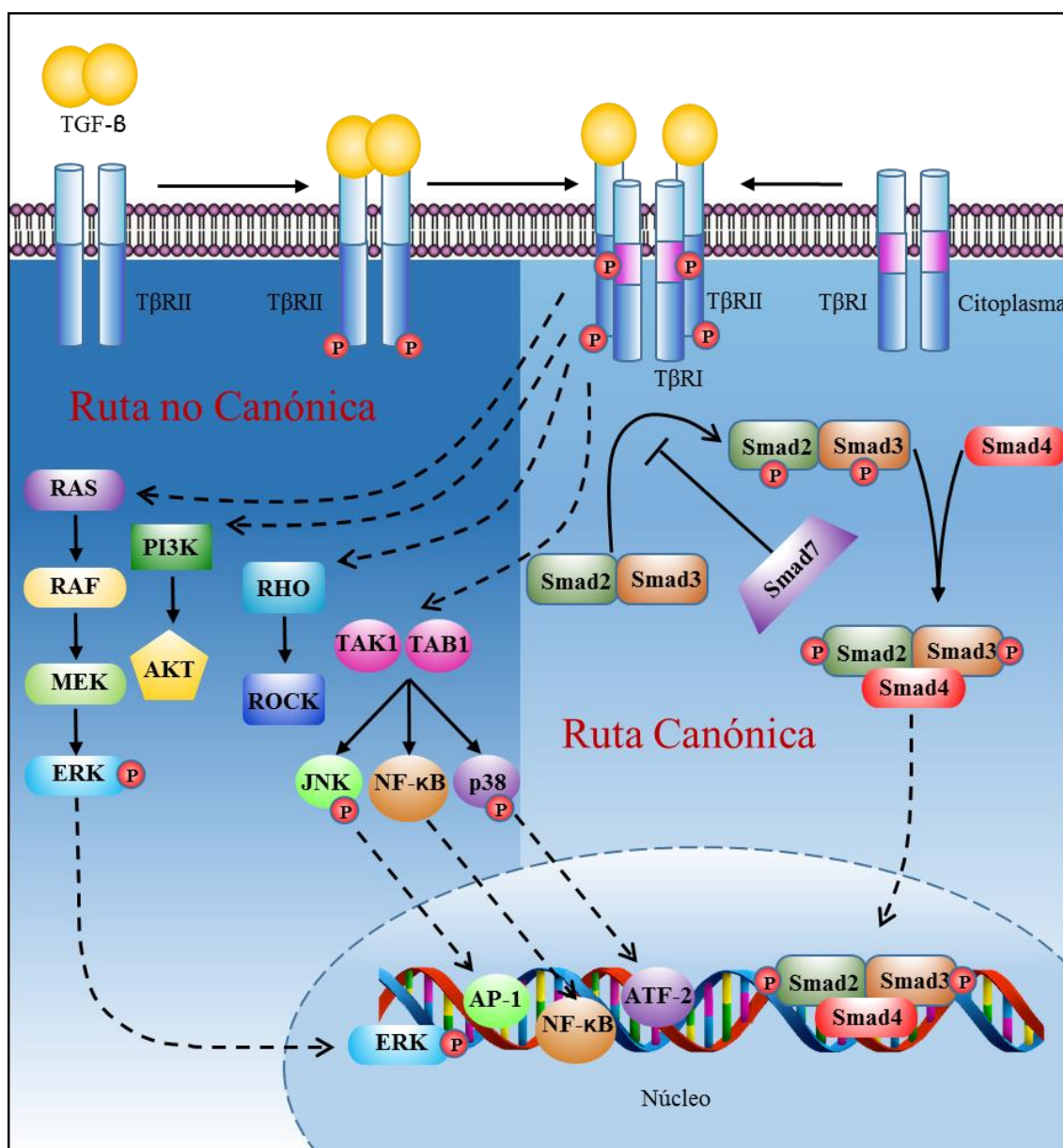


Figura 4: Rutas de señalización de TGF- β , modificado de (Akhurst and Hata, 2012).

1.3.2 MAP Kinasas y migración celular

Las Proteínas Kinasas Activadas por Mitógenos (MAPK) presentan una actividad serín/treonín kinasa y actúan de forma secuencial para convertir los estímulos extracelulares en un amplio rango de respuestas celulares. Todas las células eucariotas poseen múltiples rutas MAPK que regulan coordinadamente la expresión génica, la mitosis, el metabolismo, la motilidad, la supervivencia, la apoptosis y la diferenciación. Las MAPK convencionales comprenden la kinasa Regulada por señal Extracelular 1/2 (ERK1/2), la Kinasa N-terminal de Jun 1/2/3 (JNK1/ 2/3), y la Kinasa p38 (Chen et al., 2001; Kyriakis and Avruch, 2001; Pearson et al., 2001) (Figura 5). En concreto, para el caso de la cicatrización de heridas, multitud de estudios evidencian el rol crucial que estas

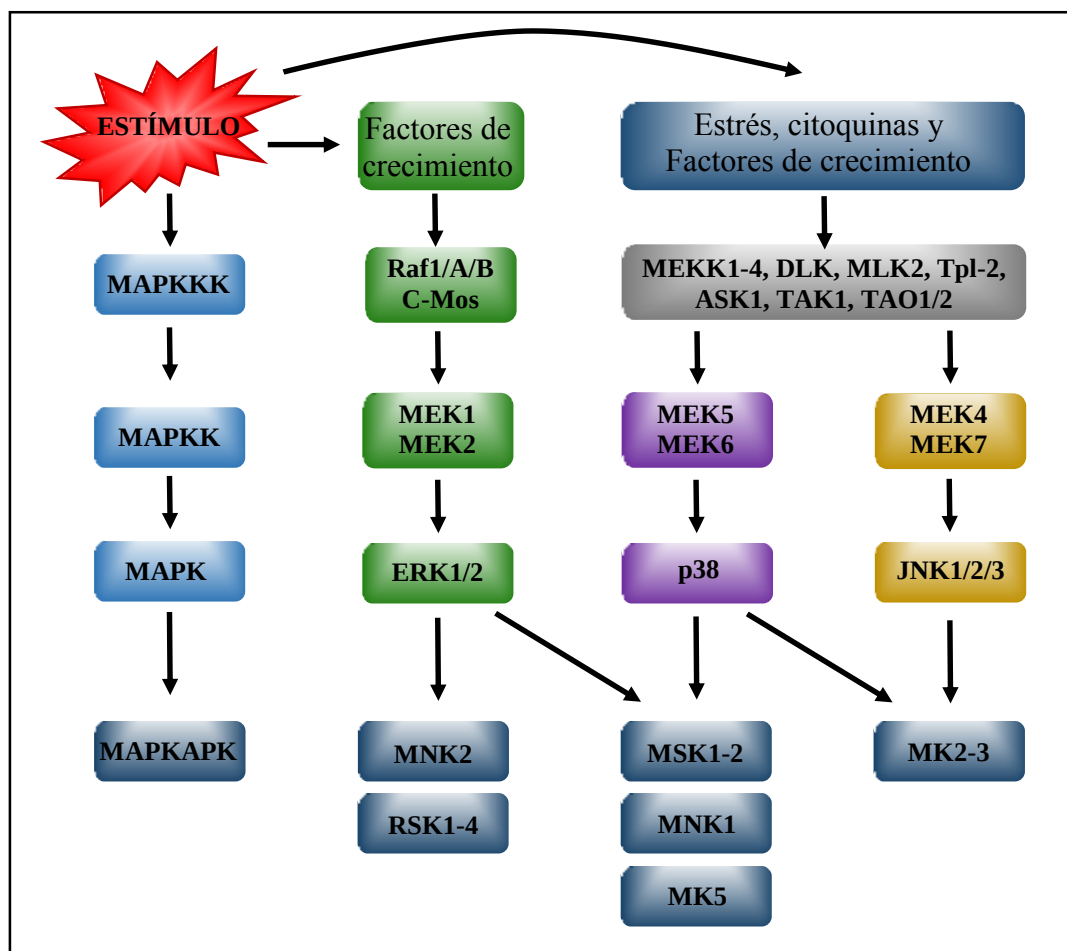


Figura 5: Rutas de señalización de MAPKs, modificada de (Cargnello and Roux, 2011).

quinasas desarrollan, principalmente ERK1/2 y JNK1/2/3 para la migración celular, y p38 para la inflamación (Johnson and Lapadat, 2002).

Ruta de señalización de ERK

La actividad de ERK es modulada por una amplia variedad de factores de crecimiento, incluyendo PDGF, EGF y TGF- β , además de en respuesta a la insulina (Boulton et al., 1990; Johnson and Lapadat, 2002). Estos factores de crecimiento activan la señalización mediante la estimulación de RAS, reclutando y actuando específicamente a MEK-1 y MEK-2, que están inmediatamente aguas arriba de ERK1/2 y la fosforilan (Seger and Krebs, 1995). ERK1/2 juega un papel central en el control de proliferación celular, modulando la función de factores de transcripción y otras proteínas nucleares, siendo necesaria su activación para una progresión eficiente de fase G1 a S (Zhang and Liu, 2002). Además, con respecto a la migración, se ha identificado que ERK es capaz de fosforilar, y por tanto modificar el comportamiento de diversas proteínas involucradas en la formación de focos de adhesión y en la contractibilidad celular, incluyendo la cadena ligera de Miosina, la Kinasa de los Focos de Adhesión (FAK), Calpaína y Paxilina (Deak et al., 1998; Frodin and Gammeltoft, 1999; Fukunaga and Hunter, 1997; Glading et al., 2004; Hunger-Glaser et al., 2003; Klemke et al., 1997b; Waskiewicz et al., 1997).

Ruta de señalización de JNK

Las isoformas de JNK se activan en respuesta a diversos estímulos extracelulares, incluyendo EGF, PDGF y el TGF- β , así como diferentes señalizaciones de estrés celular (Derijard et al., 1994; Huang et al., 2003; Kyriakis et al., 1994; Rosette and Karin, 1996; Xia et al., 2000; Yujiri, 2000; Zhang et al., 2003). JNK1 y JNK2 han demostrado tener

un papel importante en el control de la proliferación celular, a través de la activación por fosforilación de c-jun. Así, la actividad de JNK promueve la formación del complejo transcripcional AP-1 y la transcripción de genes que contienen sitios de unión a AP-1, incluidos los genes que controlan el ciclo celular, como ciclina D1 (Sabapathy et al., 2004). De forma paralela, varias vías de señalización que controlan la migración celular, incluida RAC, FAK y la vía de SRC, convergen en JNK (Minden et al., 1995; Oktay et al., 1999). En este sentido, es especialmente significativa la identificación de varias proteínas asociadas al citoesqueleto y proteínas estructurales como sustratos de JNK. Esto incluye proteínas formadoras de los filamentos intermedios como la queratina 8, proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs), proteínas de unión a Actina como Paxilina, entre otras (Chang et al., 2003; Gdalyahu et al., 2004; Huang et al., 2003; Otto et al., 2000). De todas ellas, Paxilina y las proteínas asociadas a microtúbulos desarrollan actividades directamente involucradas en la migración celular (Lopez-Colome et al., 2017).

1.4 Migración celular

La migración celular es un fenómeno fundamental para multitud de procesos biológicos y patológicos, como la embriogénesis, la respuesta inflamatoria, el cáncer, la artritis, la aterosclerosis, la osteoporosis y los defectos cerebrales congénitos del desarrollo (Lauffenburger and Horwitz, 1996). En general, la migración celular puede entenderse como un proceso cíclico en el que, ante un estímulo promotor, la respuesta inicial de la célula es la de polarizarse y extender protrusiones de membrana hacia la dirección de migración (Lauffenburger and Horwitz, 1996). Así, las células migran direccionalmente en respuesta a diferentes estímulos como gradientes de quimioquinas, factores de crecimiento o moléculas de la MEC. Es precisamente la interacción con elementos de la

MEC y/o células adyacentes la que media la estabilización de tales protrusiones, que incorporan entonces puntos de tracción útiles para la migración celular fundamentada en una reorganización del citoesqueleto (Ridley, 2003). En el contexto de la curación de heridas, la migración celular representa un mecanismo esencial para la resolución exitosa de la lesión, con implicaciones que abarcan todas las etapas del proceso regenerativo y con especial relevancia en el desarrollo de la fase proliferativa y durante el curso de la epitelización (Demidova-Rice et al., 2012; McCarty and Percival, 2013).

1.4.1 Polarización

Durante la migración de células individuales, el motor principal para el movimiento se localiza en el frente de la célula, donde se produce la protrusión activa de la membrana por la que la célula se adhiere a la MEC (Ridley, 2003). Es por ello que el éxito del estímulo migratorio se fundamenta en el establecimiento de un eje de polaridad que rige el reordenamiento del citoesqueleto y la organización polarizada del tráfico de membrana (Ridley, 2003) (Figura 6). El mecanismo detrás de esta polarización funcional parece estar basado en la activación de cascadas de señalización que implican proteínas GTPasa de la familia Rho. En concreto, en la parte frontal, RAC y CDC42 inducen reordenamientos del citoesqueleto, incluida la polimerización rápida de la Actina, que conducen a la formación de protuberancias de la membrana: filopodios y lamelipodios (Pollard and Cooper, 2009). Simultáneamente, en la parte posterior, una vía de señalización distinta y que involucra a Rho resulta en la activación de ROCK, que a su vez fosforila la cadena ligera de Miosina, generando una contracción del citoesqueleto y la retracción de la parte posterior (Mayor and Etienne-Manneville, 2016; Ridley, 2003).

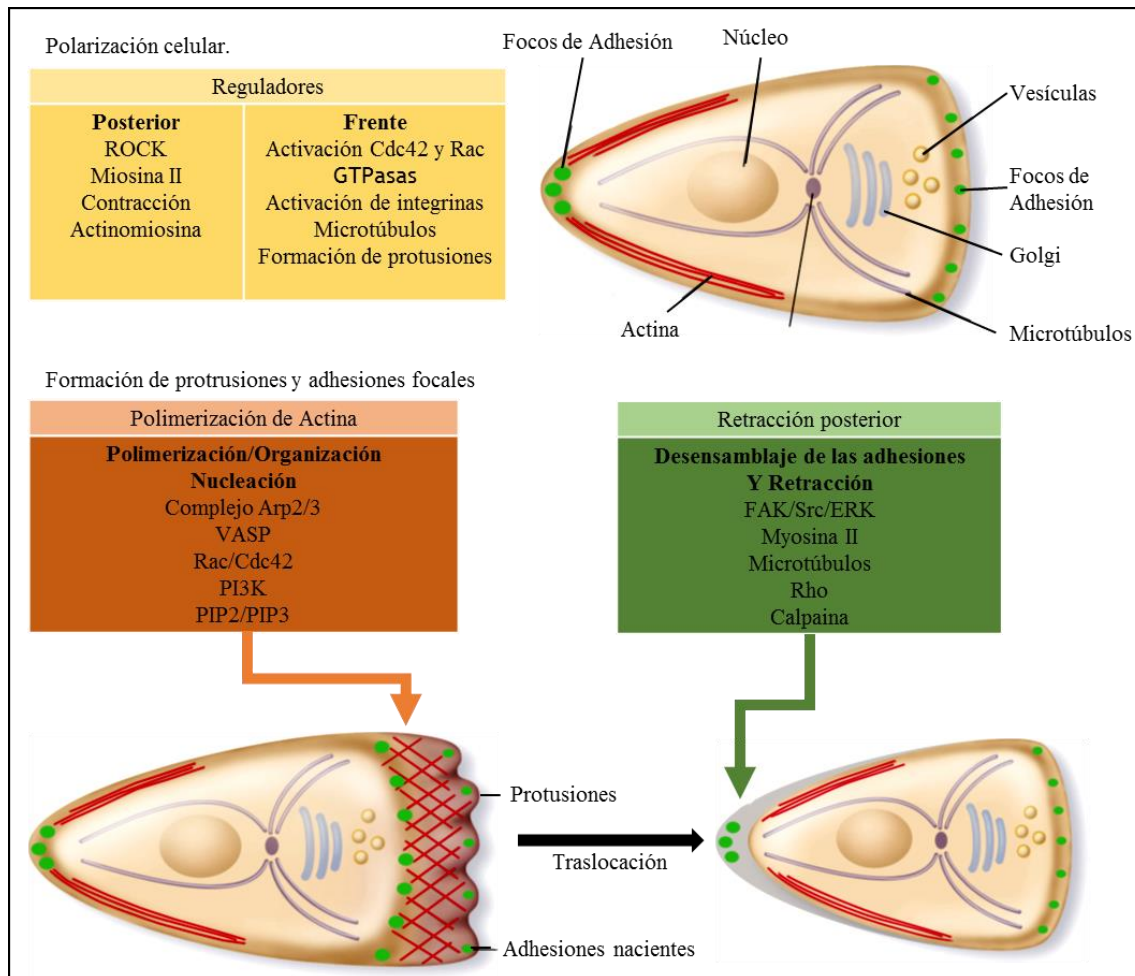


Figura 6: Etapas de la migración celular modificada de (Ridley, 2003).

1.4.2 Protusiones y focos de adhesión

Como se ha indicado, la polarización de la célula conlleva la emisión, en el frente celular, de protusiones estructuradas entorno a la polimerización local de Actina. Dichas protusiones se diferencian, en función de su morfología y componente estructural, en dos tipos principales: los lamelipodios, un tipo de protrusión plana y en forma de abanico, en las que la Actina desarrolla ramificaciones; y los filopodios, que presentan filamentos de Actina rectos dispuestos en haces largos paralelos que les da apariencia de espículas (Nemethova et al., 2008). Se cree que estas dos formas de protrusión cumplen funciones diferentes; los filopodios actuarían como dispositivos mecanosensoriales y exploratorios,

mientras los lamelipodios habrían de proporcionar superficies extendidas capaces de soportar la tracción necesaria para el desplazamiento celular (Mayor and Etienne-Manneville, 2016). Para que se produzca la migración es necesario que las protrusiones sean estabilizadas de manera que puedan soportar esfuerzos de tracción. La adhesión al substrato se produce principalmente a través de los receptores de la familia de las integrinas. Las integrinas son una gran superfamilia de receptores heterodiméricos que se unen a diferentes ligandos de la MEC o a otras células y que al ser activados disparan diversas vías de señalización que regulan la evolución de la protrusión y el desarrollo de complejos proteicos de anclaje. Así, a medida que se extiende la protrusión citoplasmática, las adhesiones nacientes compuestas por integrinas maduran en puntos de adhesión focal, también conocidos simplemente como adhesiones focales (AFs), en donde se anclan los componentes estructurales del citoesqueleto (Mayor and Etienne-Manneville, 2016).

Las AFs se organizan en complejos de señalización que, junto a los elementos puramente estructurales, incorporan kinasas y proteínas adaptadoras que permiten reunir los diferentes componentes capaces de integrar los estímulos de la MEC y de otras células durante la migración. Consecuentemente, se han identificado más de 150 moléculas diferentes involucradas en la formación de las AFs. Aun así, de forma genérica, la composición de las AFs se puede subdividir espacialmente en tres niveles funcionales: un grupo externo (i) que mantiene la relación con la membrana y la MEC formado por Integrinas, Paxilina y la kinasa de Adhesión Focal (FAK); un grupo intermedio (ii) de transición de fuerza, formado por Talina y Vinculina; y un grupo interno (iii) regulador de la Actina, formado por Zyxina, α -Actinina y Fosfoproteína Estimulada por vasodilatadores (VASP)(Kanchanawong et al., 2010) (Figura 7).

Dentro de la estructura de las AFs, Paxilina es un componente principal pues, intermediando la unión entre Integrinas y Vinculina, desempeña un papel importante en

la transducción de las señales extracelulares que la célula recibe en el transcurso de la migración. Además, como proteína de andamiaje, Paxilina contribuye al reclutamiento de kinasas específicas y fosfatasas implicadas en las cascadas de señalización intracelular (Lopez-Colome et al., 2017) (Figura 7). La activación de estas vías, en última instancia, conduce a la reorganización del citoesqueleto de Actina y al ensamblaje/desensamblaje de las AFs requerida para el progreso de la migración. La función y localización de Paxilina está estrechamente regulada por su fosforilación (Webb et al., 2005). En este sentido, se ha demostrado que diversos estímulos inducen la fosforilación de Paxilina mediada por la incorporación de FAK a las AFs, en un proceso esencial para el reclutamiento de otras moléculas de andamiaje y señalización involucradas en la consolidación de las AFs y la progresión de la migración (Lopez-Colome et al., 2017).

Aunque incapaz de unirse directamente a las integrinas, Vinculina resulta otro componente principal en la conformación de las AFs. Mediante su unión a otras proteínas de andamiaje, Talina y Paxilina, Vinculina es responsable de la propagación de esfuerzos mecánicos hacia otros componentes más internos de la AF con los que se relaciona directa o indirectamente: Tensina, Filamina, α -Actinina o Actina, entre otros. Aún más, la unión de Vinculina con Paxilina parece ser capaz de modular la interacción de esta última con FAK, estableciendo una relación capaz de poner en consonancia el esfuerzo mecánico y la maduración de la AF en un proceso fundamental para la dinámica de las AF en conjunto y la migración celular (Ciobanasu et al., 2014; Dumbauld et al., 2013; Mierke, 2009).

1.4.3 Dinámica de las adhesiones focales y mecánica de la migración celular

La polarización que caracteriza el fenómeno migratorio va generalmente acompañada de

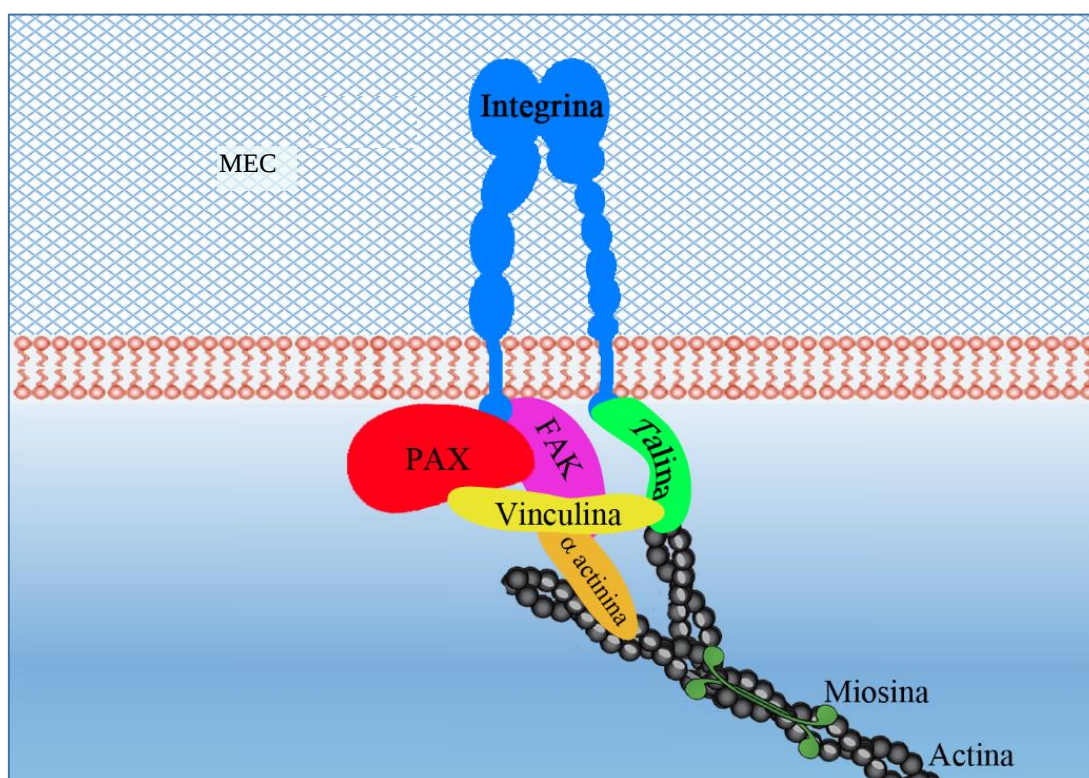


Figura 7: Esquema simplificado que muestra los componentes principales de un complejo de adhesión focal, modificada de (Lopez-Colome et al., 2017).

una sensibilización de los receptores en el frente celular, lo que favorece el movimiento continuado en la misma dirección (Ridley, 2003). De este modo, las AFs que maduran en el frente son superadas por el soma celular hasta alcanzar el borde retráctil de las células, donde se desmontan. Así, asociado a las AFs, se promueve una fuerza de flujo retrógrado de F-Actina que polimeriza formando protrusiones en el borde anterior de la membrana plasmática y que, posteriormente, transmiten la fuerza de tracción generada por la Miosina, ejerciendo así tracción contra los elementos de la MEC (Suter and Forscher, 2000). De esta manera, las fuerzas locomotoras aplicadas sobre las AFs dirigen el movimiento de la célula sobre el sustrato.

Aunque el estudio de las dinámicas de las AFs muestra que Paxilina y FAK son eminentemente estacionarias con respecto al sustrato subyacente (Gardel et al., 2008), en

realidad el desensamblaje de las adhesiones se produce tanto en el frente celular, donde está acompañado de la formación de nuevas protrusiones, como en la parte posterior de la célula, donde promueve la retracción. Así, en la parte posterior de las células en migración, las adhesiones de la base de las protrusiones se separan y reciclan a la vez que se forman nuevas adhesiones en el frente celular de migración (Webb et al., 2002). De esta manera, de entre todas las que aparecen, solo persisten aquellas adhesiones que reciben las señales adecuadas, madurando hasta AFs sólidas cuyo desensamblaje ocurre únicamente al alcanzar el borde posterior de la célula. (Larsen et al., 2003). En cualquier caso, el desensamblaje parece estar controlado por la propia dinámica del citoesqueleto en relación con el esfuerzo mecánico soportado, en conjunción con varias vías de señalización que incluyen a las proteínas FAK, ERK, Src y Calpaína, junto con la actividad de la GTP-asa Rho para la retracción en la parte posterior de la célula (Ridley, 2003).

1.4.4 Migración celular colectiva

La migración celular colectiva se define como el movimiento simultáneo de múltiples células relacionadas entre sí a través de uniones célula-célula, fenómeno que ocurre de manera fisiológica tanto durante el desarrollo embrionario como en la curación de heridas (Weijer, 2009). Si bien los mecanismos ya descritos están operativos tanto en la migración individual como en la colectiva (Ridley, 2011), en los grupos celulares cohesivos, como es el caso de los queratinocitos, los contactos celulares estrechos modifican la distribución de algunas de las características encontradas en las células migratorias aisladas (Rappel and Edelstein-Keshet, 2017). Así, además de una alta cohesión celular, la migración colectiva precisa organización en forma de polarización colectiva y coordinación de la

actividad del citoesqueleto, ambas necesarias para la correcta quimiotaxis y el desplazamiento (Friedl and Gilmour, 2009) (Figura 8). En relación con lo anterior, el estudio mediante técnicas de imagen de células vivas en migración sugiere que hay una primera línea de células en migración que extiende protusiones de manera selectiva, las células líder, mientras que hay otras células, las células posteriores o seguidoras, que rara vez las extienden (Diz-Munoz et al., 2010; Friedl and Gilmour, 2009).

El mecanismo por el cuál un colectivo en migración se diferencia entre células líder y seguidoras parece estar relacionado con el proceso de polarización (Boettiger, 2012; Dabiri et al., 2012). En este sentido, en respuesta a estímulos quimiotácticos, las células posicionadas en el frente migratorio desarrollan uniones formadas por cadherinas que las solidariza, componiendo una línea frontal con capacidad de coordinar el comportamiento de los componentes del citoesqueleto (Etienne-Manneville, 2011, 2012; Etienne-Manneville and Hall, 2001) (Figura 8). Una vez adquirida esta solidaridad, las células líder propician la migración de las células seguidoras mediante la secreción de MMPs que remodelan la MEC, de forma que se promueve la tracción ejercida a través de las AFs que siguen generando así una tensión 'tira y afloja' entre las células líder y las células seguidoras que permite la transmisión a gran distancia del estímulo migratorio (Alexander et al., 2008; Tambe et al., 2011; Trepap and Fredberg, 2011; Ventre et al., 2012). En este sentido, las células seguidoras resultan a su vez esenciales para el comportamiento de todo el grupo, pues controlan indirectamente el papel de los líderes influyendo en su polarización, a través de la inhibición por contacto de la locomoción en el borde posterior (Mayor and Etienne-Manneville, 2016).

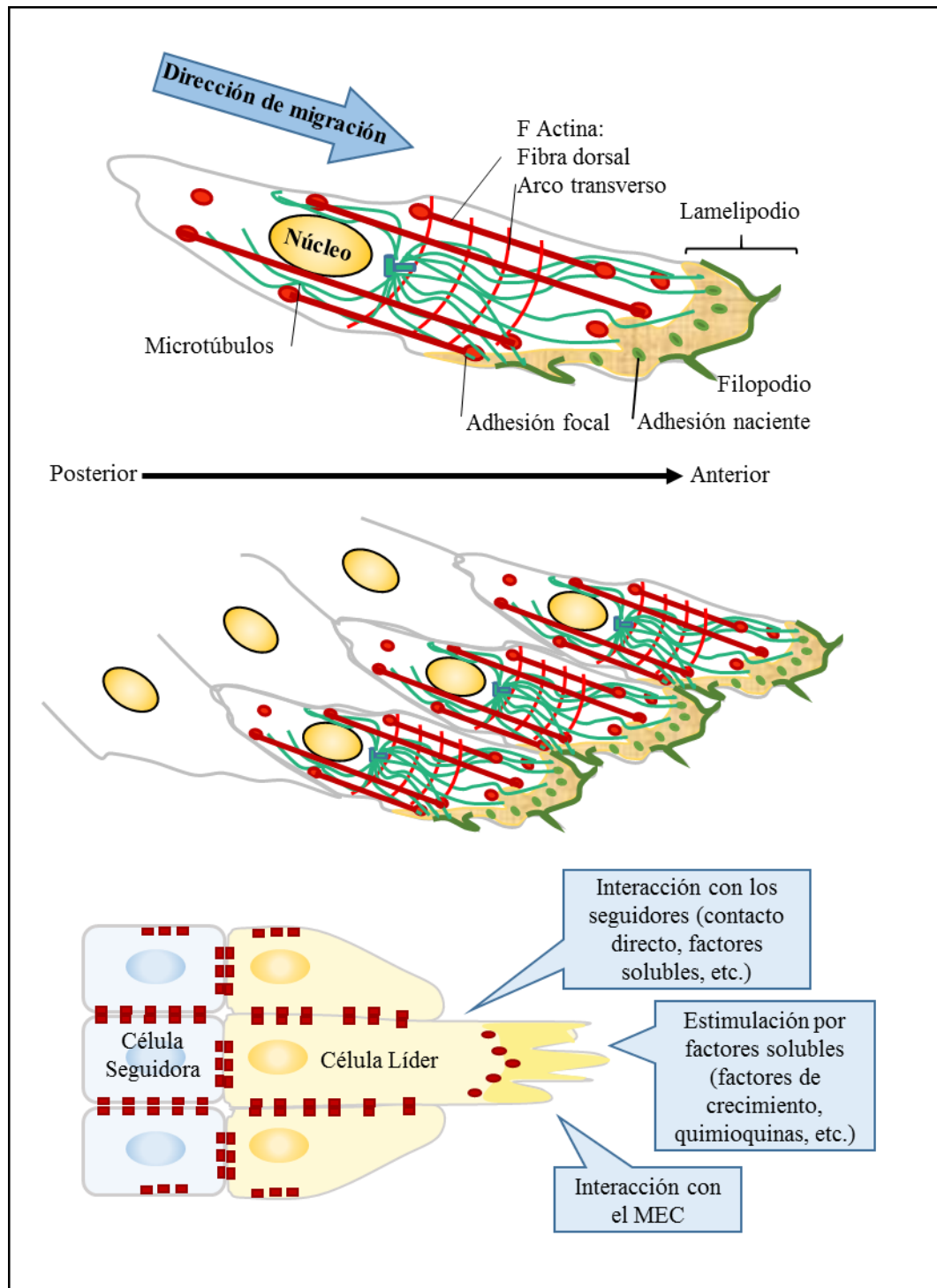


Figura 8: Esquemas de migración celular y migración colectiva, modificado de (Mayor and Etienne-Manneville, 2016).

1.4.5 Transición epitelio-mesénquima y migración

Los epitelios se establecen como capas celulares únicas o pluricelulares con diversas funciones. Las células epiteliales muestran polaridad apical-basal y se adhieren y comunican entre sí a través de uniones intercelulares especializadas estando posicionadas con respecto a una membrana basal que ayuda a definir su fisiología. Sin embargo, en ocasiones, este orden se altera. La capacidad que tienen las células epiteliales para desdiferenciarse cambiando sus características fenotípicas epiteliales y adquiriendo características mesenquimales se denomina transición epitelio-mesénquima (EMT) (Lamouille et al., 2014). Durante la EMT, las células epiteliales pierden sus uniones y polaridad apical-basal, reorganizan su citoesqueleto, sufren un cambio en los programas de señalización que definen la forma celular y reprograman la expresión génica; esto permite la motilidad de las células individuales y contribuye al desarrollo de un fenotipo invasivo (Thiery et al., 2009; Thiery and Sleeman, 2006). La EMT es parte integral del desarrollo, de los procesos subyacentes que se reactivan durante la cicatrización de heridas, la fibrosis y la progresión del cáncer (Kalluri and Weinberg, 2009; Thiery et al., 2009).

En la mayoría de los contextos tisulares, los eventos clave de la EMT son:

- La disolución de las uniones célula-célula; Durante la desestabilización de las uniones adherentes, la cadherina epitelial (E-cadherina) se rompe en la membrana plasmática y posteriormente se degrada (Yilmaz and Christofori, 2009). también interrumpe los desmosomas (Huang et al., 2012; Yilmaz and Christofori, 2009), y la integridad de las uniones GAP se ve comprometida por la disminución de los niveles de conexina (Bax et al., 2011).

- La pérdida de una polaridad apical-basal y la adquisición de una polaridad antero-posterior; la disolución de las uniones epiteliales durante la EMT confiere una pérdida de polaridad apical-basal, reduciendo la adhesión y aumentando la motilidad celular, adquiriendo una polaridad antero-posterior (Huang et al., 2012).
- La reorganización de la arquitectura citoesquelética y los cambios en la forma celular; las células reorganizan su citoesqueleto de Actina cortical aumentando la contractilidad celular y la formación de fibras de tensión de Actina permitiendo la elongación dinámica de la célula y la motilidad direccional (Thiery and Sleeman, 2006).
- La desregulación de la expresión génica epitelial característica y activación de genes que ayudan a definir el fenotipo mesenquimal; los cambios en la expresión génica que contribuyen a la represión del fenotipo epitelial y a la activación del fenotipo mesenquimal involucran a reguladores maestros, entre los que se incluyen los factores de transcripción SNAIL, TWIST y ZEB (Zinc-finger E-box-binding) (Lamouille et al., 2014).
- El aumento de las protuberancias celulares y la motilidad; se forman nuevas proyecciones de membrana ricas en Actina, lamelipodios y filopodios, que facilitan el movimiento celular y actúan como extensiones sensoriales del citoesqueleto. En muchos casos, estas proyecciones tienen la capacidad de degradar las proteínas de la MEC para permitir el comportamiento invasivo (Lamouille et al., 2014).

La EMT está mediada por diversos factores de crecimiento y citoquinas. Entre las citoquinas, la principal es TGF- β , que induce la EMT en procesos fisiológicos como la cicatrización de heridas y en procesos patológicos como la fibrosis y cáncer. En respuesta a TGF- β , los complejos Smad no sólo activan la expresión, sino que también aumentan

la actividad de los factores de transcripción de la EMT (Lamouille et al., 2014). En este sentido, el TGF- β induce la expresión de SNAIL1 y 2, de ZEB1 y 2, y la actividad TWIST (Lamouille et al., 2014). A parte, los complejos Smad activan directamente la expresión de algunos genes mesenquimales; por ejemplo, los que codifican Fibronectina, Vimentina y Colágeno I- α (Navarro et al., 2005). Además, complementando su señalización a través de Smad, TGF- β también induce señalización a través de GTPasas tipo RHO, la señalización de PI3K (activando AKT) y MAPK (comprendidas por ERK, p38 y JNK) que también contribuyen a la EMT (Lamouille et al., 2014).

Entre los factores de crecimiento celular destacarían los miembros de la familia del EGF. En el cultivo celular, el factor de crecimiento epidérmico (EGF) induce la endocitosis de la E-cadherina, así como la expresión de SNAIL1 o TWIST, lo que lleva a una reducción de los niveles de E-cadherina (Lo et al., 2007; Lu et al., 2003). El EGF también induce la EMT en explantes epiteliales, lo que resulta en un aumento de la motilidad celular y en la proteólisis mediada por MMP2 y MMP9 que depende de la Kinasa Ligada a Integrinas (ILK) y de la vía de ERK de las MAPK (Ahmed et al., 2006).

1.5 Heridas crónicas

En condiciones patológicas graves, la cicatrización de una herida puede verse seriamente alterada (Baskovich et al., 2008; Bello and Phillips, 2000). Una herida crónica se define como aquella que no consigue resolver de forma completa y sostenida en el tiempo la integridad anatómica y funcional de la piel (Singer and Clark, 1999). Aunque presentan una etiología diversa: úlceras vasculares, úlceras diabéticas y úlceras por presión; las heridas crónicas suelen compartir una fase inflamatoria prolongada o excesiva, infección recurrente y la incapacidad de las células dérmicas y/o epidérmicas para responder a los

estímulos reparativos (Edwards and Harding, 2004; Eming et al., 2007; Wolcott et al., 2008).

La existencia de una lesión tisular mantenida en el tiempo estimula la afluencia constante de células inmunes: neutrófilos y macrófagos; las cuales aumentan la cascada de citoquinas (Figura 9). De este modo, el fluido derivado de úlceras crónicas, y en especial las de origen venoso, es rico en citoquinas proinflamatorias incluyendo $\text{TNF}\alpha$, y $\text{TGF-}\beta 1$ (Harris et al., 1995). Esta señalización exacerbada resulta en un desbalance entre los niveles de MMPs y TIMPs que conduce a la degradación excesiva de MEC y

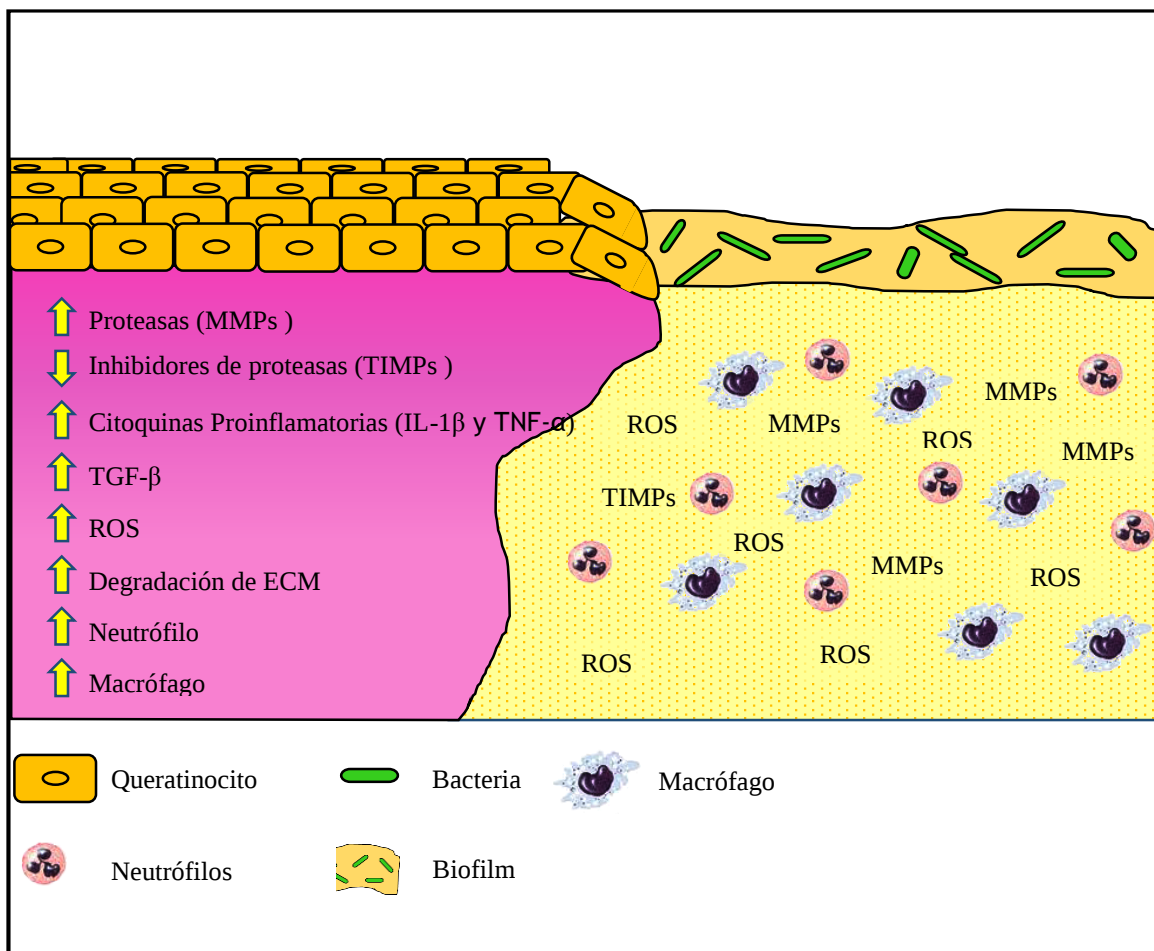


Figura 9: Representación de herida crónica, modificado de (Demidova-Rice et al., 2012).

de los factores de crecimiento (Enoch and Price, 2004; Harris et al., 1995). Esta proteólisis persistente de MEC, no solo bloquea el avance hacia la fase proliferativa, sino que atrae

más células inflamatorias que amplifican de nuevo este ciclo (McCarty and Percival, 2013). A su vez en este contexto, predomina un entorno hipóxico e inflamatorio que aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno, lo que provoca daños en las células del tejido de granulación apareciendo queratinocitos, células endoteliales, fibroblastos y macrófagos con características senescentes (Bourguignon, 2014; Cook et al., 2000; Schreml et al., 2010; Telgenhoff and Shroot, 2005; Wall et al., 2008).

Frecuentemente, las heridas crónicas requieren de intervención para salvar la limitación existente. Si bien de forma general se recurre al desbridado de la herida (Ayello and Cuddigan, 2004; Granick et al., 2006), en ocasiones se hace necesaria la aplicación de terapias específicas avanzadas para promover la epitelización y la formación de tejido de granulación (Leaper et al., 2012).

Entre las terapias avanzadas, aquellas que emplean derivados de tejidos placentarios destacan por su capacidad de promover la resolución de las heridas complicadas. Entre los derivados usados del tejido placentario encontramos (Frykberg and Banks, 2015):

- Tejido amniótico.
- Líquido amniótico.
- Cordón umbilical.
- Membrana amniótica/coriónica deshidratada (DHACM).

Sin embargo, a pesar de sus capacidades, el conocimiento sobre los mecanismos moleculares y celulares por los que los tejidos placentarios consiguen promover la resolución de heridas es escaso (Castellanos et al., 2017).

1.6 Membrana amniótica

La membrana amniótica (MA) o amnios, es la capa más interna de la bolsa amniótica, representa un biomaterial atractivo en medicina regenerativa por sus propiedades anti-inflamatorias, antifibróticas y antimicrobianas, entre otras (Parolini et al., 2008).

El uso de la MA en clínica, y en concreto para el tratamiento de heridas dérmicas, se remonta a hace más de 100 años. La literatura muestra como ya durante el primer cuarto del siglo XX diversos autores informaron por separado sobre el uso de la MA para el tratamiento de quemaduras y varios tipos de heridas y úlceras (Davis, 1910; Sabella, 1913; Stern, 1913). Desde entonces, el uso clínico de la MA se ha expandido, aunque con ciertas limitaciones. Hoy en día, la MA es un recurso ampliamente utilizado en oftalmología (Baradaran-Rafii et al., 2007; Dua et al., 2004), además de emplearse con éxito en procedimientos quirúrgicos y no quirúrgicos para la regeneración de órganos y tejidos, incluyendo boca, lengua, mucosa nasal, laringe, tímpano, vestíbulo, vejiga, uretra, vagina o tendones (Brandt et al., 2000; Fishman et al., 1987; Georgy and Aziz, 1996; Insausti et al., 2010a; Morton and Dewhurst, 1986; Redondo et al., 2011; Sangwan et al., 2006; Tolhurst and van der Helm, 1991; Zohar et al., 1987). En su utilización para las heridas, existen diversas investigaciones que indican que la MA ejerce un efecto promotor de la cicatrización, acelerando la migración de queratinocitos desde el borde de la herida además de inducir su diferenciación, contribuyendo así a la generación de nuevo epitelio intacto (Lee and Tseng, 1997).

A pesar de ello, y aunque la evidencia científica demuestra como el uso de MA en lesiones cutáneas ofrece considerables ventajas, que llegan a superar las del trasplante autólogo de piel por su reducido coste y menor posibilidad de complicación, su utilización

para el tratamiento de lesiones cutáneas, quemaduras y úlceras crónicas puede considerarse escaso (Mermet et al., 2007).

1.6.1 Membrana amniótica: estructura y procesado

La MA se compone de un delgado epitelio, una membrana basal y un estroma de tejido conjuntivo que carece de nervios, fibras musculares o vasos (Figura 10). El epitelio está formando por una única capa, continua e ininterrumpida, de células cuboides, que están en contacto con el líquido amniótico. Este epitelio se sitúa sobre una lámina basal resistente bien definida, conectada con una capa de mesodermo amniótico en el que se identifican tres estratos: una primera capa acelular formada por fibras de colágeno y fibronectina; una malla de células mesenquimales denominada capa fibroblástica; y una capa intermedia esponjosa rica en proteoglicanos, glicoproteínas y colágeno no fibrilar que permite la fácil separación del corion subyacente (Bourne, 1962; Parolini and Soncini, 2006).

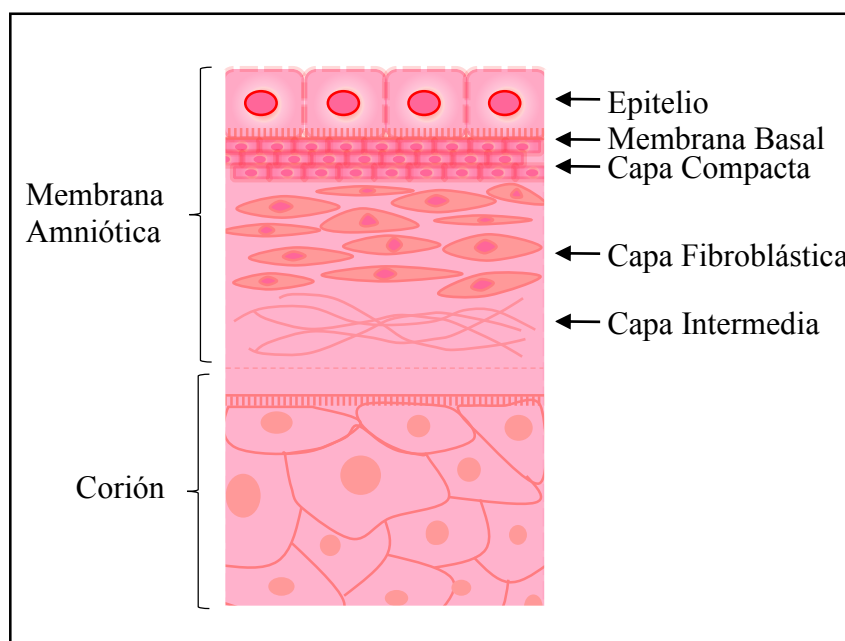


Figura 10: Estructura de la Membrana Amniótica y Corión modificado de (Bourne, 1962).

Tanto las células amnióticas epiteliales como las mesenquimatosas poseen características de células madre con, al menos, capacidad de diferenciación multipotencial y baja inmunogenicidad (Insausti et al., 2010b; Parolini et al., 2008). La aplicación de la MA no produce rechazo a la vez que no induce proliferación incontrolada (Insausti et al., 2010b). Además la MA puede funcionar como un sustrato donde otras células pueden proliferar y diferenciarse. En suma, todo esto hace de este tejido un recurso formidable para su uso en terapia celular y medicina regenerativa (Insausti et al., 2010b; Miki and Strom, 2006; Parolini et al., 2008).

Hoy en día se sabe que el uso de MA en fresco no es práctico en clínica (Zelen et al., 2015). Por este motivo, se han desarrollado diversas metodologías para su conservación (Tabla 1).

Procesamiento	Referencias
MA hervida	(Troensegaard-Hansen, 1950)
Membrana amniótica/coriónica humana deshidratada (DHACM).	(Shah, 2014; Zelen, 2013; Zelen et al., 2014; Zelen et al., 2015).
MA en fresco	(Faulk et al., 1980; Ward and Bennett, 1984; Ward et al., 1989).
MA irradiada	(Gajiwala and Lobo Gajiwala, 2003; Singh et al., 2004).
MA criopreservada	(Kruse et al., 2000; Mermet et al., 2007; Yang et al., 2006);(Insausti et al., 2010a).

Tabla 1: Métodos de conservación de la MA (Insausti et al., 2016).

Generalmente, el tratamiento con MA para la cicatrización de heridas se realiza a partir de MA obtenidas por donación y que es sometida a alguno de los métodos citados

en la tabla 1 para su procesado antes de la aplicación en clínica. Entre ellos, destaca la criopreservación por su excelente compromiso en términos de practicidad, coste y pervivencia de las capacidades del material amniótico (Akle et al., 1985; Wilshaw et al., 2006).

1.6.2 Mecanismos implicados en la reepitelización de la piel inducida por MA

Desde el comienzo del presente siglo, el desarrollo tecnológico y el estudio de los fenómenos moleculares que promueven los efectos descritos para la MA está recibiendo mayor atención. Si bien existe cierto consenso sobre como las diversas ventajas terapéuticas que muestra la MA parecen estar relacionadas con su capacidad para sintetizar y liberar un gran número de sustancias biológicamente activas, incluyendo citoquinas y moléculas de señalización tales como TNF- α , TGF- α , TGF- β , b-EGF, EGF, KGF, Factor de Crecimiento Hepático (HGF), IL-4, IL-6, IL-8, TIMPs, beta-defensinas y prostaglandinas, entre otros (Parolini and Soncini, 2006; Yang et al., 2006), los mecanismos concretos implicados en la inducción de la reepitelización de la piel por la MA son en gran parte desconocidos.

Algunos autores han mostrado la capacidad de la MA para estimular la actividad de ciertos factores de transcripción pertenecientes a la familia de la AP1, que participan en la regulación de la migración de queratinocitos en el proceso de cicatrización de heridas (Angel et al., 2001; Gangnuss et al., 2004; Li et al., 2003; Yates and Rayner, 2002). En esa línea, los trabajos del laboratorio de Regeneración, Oncología Molecular y TGF- β , IMIB-Arixaca, constituyen una referencia en el área por el uso de modelos celulares para la comprensión de las consecuencias moleculares que la aplicación de la MA tiene en heridas humanas (Alcaraz et al., 2015; Insausti et al., 2010a). Entre las

investigaciones vanguardistas desarrolladas por el laboratorio, destacan aquellas que emplean células HaCaT como modelo, una línea celular de queratinocitos humanos espontáneamente inmortalizada. Este modelo de trabajo ha permitido evaluar la respuesta de los queratinocitos tras la estimulación con MA (Insausti et al., 2010a). En concreto, la aplicación de MA fue capaz de inducir la activación de rutas moleculares clave para la migración, como son las mediadas por ERK1/2, JNK1/2 y p38, todos miembros de la familia de las Kinasas Activadas por Mitógenos (MAP Kinasas) (Insausti et al., 2010a). También, se demostró como la adición de medio condicionado de MA fue capaz de inducir respuestas similares, indicando que tales efectos son mayoritariamente atribuibles a la acción de factores solubles liberados por ésta (Insausti et al., 2010a). Además, se encontró que las células HaCaT estimuladas con MA mostraban un aumento de la expresión de un factor de transcripción miembro de la familia AP-1, c-JUN, con un acusado patrón de expresión local en los márgenes de heridas artificiales generadas *in vitro* (Alcaraz et al., 2015; Insausti et al., 2010a). De igual manera, mediante ensayos de cicatrización de heridas *in vitro*, se demostró como la MA es capaz de promover la migración de las células HaCaT (Alcaraz et al., 2015). En este sentido, hay que resaltar como similares resultados fueron obtenidos al estudiar muestras provenientes de pacientes tratados con MA, donde además, al examinar los bordes de la herida unos días después de la aplicación, se observó una clara proliferación y migración celular (Alcaraz et al., 2015). Por último, es de destacar que en estos trabajos se estableció la capacidad que tiene el tratamiento con MA para activar JNK1. Sorprendentemente, la activación de JNK1 parece estar en una encrucijada determinante para estos efectos, ya que el uso de inhibidores de JNK1 impidió la migración celular inducida por MA.

1.7 Estimulación de la reepitelización por triterpenoides: Ácido oleanólico

El ácido oleanólico (ácido 3 β -hidroxiolean-12-en-28-oico; AO) es un compuesto triterpenoide pentacíclico (Figura 11-A) biológicamente activo que se ha podido aislar hasta ahora de más de 1620 especies de plantas, incluidas variedades de uso alimentario y medicinal (Fukushima et al., 2011; Liu, 1995). Los triterpenoides no conjugados, como el AO, se encuentran a menudo en las ceras epicuticulares de los tejidos fotosintéticos de plantas donde evitan la pérdida de agua y sirven como primera barrera de defensa contra los patógenos. En nuestro ámbito geográfico, este compuesto está presente en las plantas pertenecientes a la familia *Oleaceae*, entre las cuales se encuentran los jazmines (*Jasminum spp.*) o el olivo (*Olea europaea*). En el caso de las hojas del olivo, el AO está presente en su superficie como cristales casi puros, formando una barrera física que se revela muy útil contra el ataque de hongos (Pollier and Goossens, 2012).

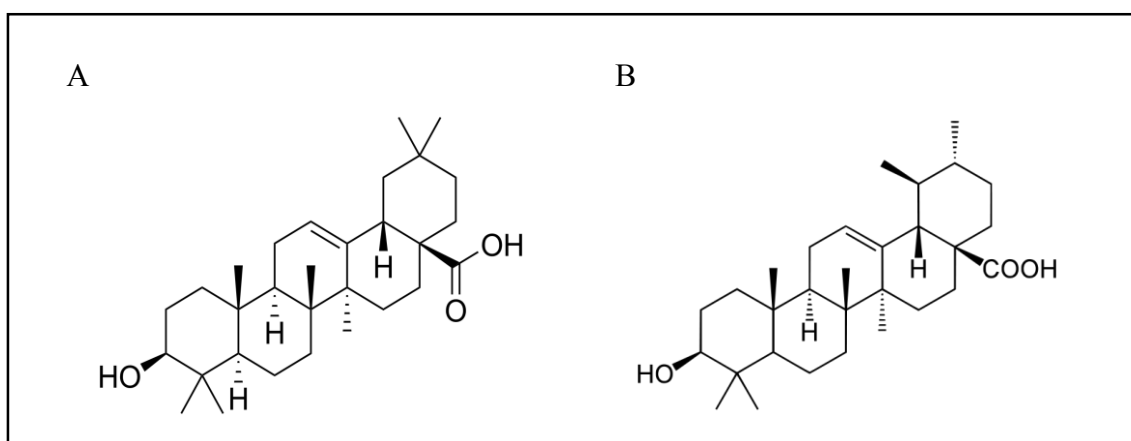


Figura 11: A) Estructura del Ácido Oleanólico, B) Estructura del Ácido Ursólico. Modificado de (Pollier and Goossens, 2012).

1.7.1 Propiedades farmacológicas del ácido oleanólico

En la actualidad, el estudio de las propiedades farmacológicas del AO está despertando cierto interés sobre su potencial aplicación clínica, puesto que distintos estudios indican como el consumo regular de suplementos alimenticios enriquecidos en AO podría ayudar en el tratamiento diversas enfermedades. En este sentido, entre las propiedades farmacológicas atribuidas al AO destacan sus efectos protectores hepático y cardiovascular, así como cierta capacidad para el abordaje del cáncer. En cuanto a lo primero, se ha demostrado del AO que es eficaz protegiendo al hígado de la lesión hepática aguda inducida químicamente, además de reducir la fibrosis y la cirrosis causadas por enfermedades hepáticas crónicas (Liu, 2005; Reisman et al., 2009; Wang et al., 2010). En cuanto a su capacidad protectora cardiovascular, el estudio de los efectos del AO en un modelo de rata resistente a la insulina y con hipertensión de origen genético muestra también variedad de efectos: anti-hipertensivo, anti-hiperlipémico, anti-oxidante e hipo-glucemiante (Somova et al., 2003b). Además, se han descrito actividades anticancerígena y antiinflamatorias para el AO, que estarían mediadas por cierta capacidad para frenar la proliferación celular y de provocar la parada del ciclo celular (Li et al., 2015; Li et al., 2016; Wei et al., 2013; Zhu et al., 2015), a la par que modular el estado de inflamación en el entorno tumoral (Laszczyk, 2009; Van Waes, 2007).

Dada su naturaleza química, policíclica y con presencia de dobles enlaces, tradicionalmente se ha entendido que los efectos farmacológicos de AO se debían a su capacidad para eliminar especies reactivas de oxígeno y otros de radicales libres (Ovesna et al., 2006; Somova et al., 2003a; Somova et al., 2003b; Sultana and Ata, 2008). Sin embargo, recientemente se ha demostrado como la actividad del AO no se desarrolla únicamente mediante reacciones químicas directas e inespecíficas. Al parecer, en el caso de modelos de lesión hepática, su principal capacidad antioxidante estaría mediada por el

aumento en la expresión de diversas enzimas antioxidantes, incluyendo Catalasa, Tiorredoxina o Peroxidasa, así como en la biosíntesis mejorada del antioxidante glutatión (Wang et al., 2010). En este sentido, se ha observado como el AO es capaz de promover la actividad del factor de transcripción Nrf2, regulador clave de la transcripción de enzimas antioxidantes y desintoxicantes (Klaassen and Reisman, 2010; Reisman et al., 2009). Sin embargo, es de destacar que efectos similares también se han sido observados en ratones Nrf2 nulos, lo que indicaría que el AO tiene la capacidad para activar mecanismos citoprotectores a través de otros factores de transcripción (Reisman et al., 2009). De este modo, la capacidad del AO para activar mecanismos citoprotectores mediados por factores de transcripción propicia un marco teórico adecuado con el que explicar la diversidad de sus efectos.

1.7.2 Ácido Oleanólico y curación de heridas

El conocimiento práctico entorno a las propiedades del AO para la regeneración de heridas se ha centrado en su capacidad para el tratamiento de afectaciones del tracto gastrointestinal. Así, se ha podido demostrar como el AO ejerce efectos protectores contra las úlceras en diferentes modelos experimentales desarrollados en ratas y ratones. Es de resaltar que, en estos modelos basados en la generación de lesiones artificiales mediante métodos químicos y quirúrgicos, el OA no solo actúa como factor protector, sino que además promueve la curación (Astudillo et al., 2002; Matsuda et al., 1998; Rodriguez et al., 2003). Tal es el caso del modelo de úlcera gástrica inducida con ácido acético en ratas, donde el suministro de AO por vía oral durante 14 días logra la reducción del área de la lesión de forma dosis dependiente (Rodriguez et al., 2003). En el contexto celular, el AO parece capaz de proteger *in vitro* a células gástricas epiteliales humanas y fibroblastos del

daño inducido por sales biliares como el taurocolato de sodio, a la vez de estimular una respuesta antioxidante fundamentada en el sistema glutatión o la producción de prostaglandinas, efectos que son compartidos en mayor o menor medida por algunos derivados semisintéticos del AO (Sanchez et al., 2006). Sin embargo, hay que destacar que todos estos ensayos celulares muestran un estrecho compromiso entre los beneficios de la exposición a AO o sus derivados y la aparición de respuestas desfavorables debidas a cierta toxicidad celular que presentan estos compuestos (Sanchez et al., 2006).

En cuanto a la experiencia sobre el AO en lesiones cutáneas, se puede considerar cuando menos limitada. El AO aparece como componente mayoritario en elaboraciones preparadas a partir de extractos de plantas que son empleados en diversos ámbitos de la medicina tradicional para el tratamiento de heridas. Tal es el caso de especies como *Anredera diffusa*, una planta de la familia Basellaceae con características medicinales empleada asiduamente en América de Sur para el tratamiento de lesiones cutáneas (Moura-Letts et al., 2006). Así, mientras la infusión de *Anredera diffusa* se usa tradicionalmente para lavar heridas externas, las hojas húmedas pueden ser usadas a modo de apósito. Sobre esta supuesta capacidad cicatrizante, un estudio controlado realizado en ratones avaló las observaciones sobre los efectos cicatrizantes de los extractos de esta planta, identificando al AO como el constituyente principal responsable de dichos efectos (Moura-Letts et al., 2006). En una línea similar, estudios realizados empleando los extractos de especies vegetales con una distribución más universal, muestran los efectos del AO sobre la biología celular de la reepitelización. Así, en ensayos de cicatrización artificial ejecutados *in vitro* sobre fibroblastos NIH/3T3 de ratón o células HaCaT expuestas a extractos lipofílicos del muérdago blanco (*Viscum álbum*) o al AO, como triterpeno dominante en esos extractos, se muestra una estimulación dosis dependiente de la migración hasta cierto umbral, a partir del cual dosis mayores retrasan o suprimen el

cierre de la herida (Kuonen et al., 2013). A pesar de que estos trabajos no profundizan en los aspectos moleculares que fundamentan los efectos del AO, es de destacar que sus autores describen que tales efectos son independientes de la proliferación tanto de fibroblastos como queratinocitos (Kuonen et al., 2013).

Como se ha mencionado ya, estos dos compuestos, la membrana amniótica y el ácido oleanólico, ayudan a resolver la cicatrización de heridas, al menos, mejorando la migración en estas. Nuestro objetivo principal al plantear esta tesis fue dilucidar los mecanismos por los cuales estos agentes consiguen la mejoría de la cicatrización quizás estimulando, entre otros, la migración celular. Para ello realizamos diferentes experimentos que están plasmados en tres artículos científicos que se detallan a continuación. Referente a la MA, el artículo “Amniotic membrane stimulates cell migration by modulating transforming growth factor- β signalling” describe como establecimos la implicación de la ruta de TGF- β en la migración celular promovida por la MA. En el artículo “Amniotic membrane promotes focal adhesion remodeling to stimulate cell migration” nos centramos en el efecto de la MA sobre proteínas importantes que están relacionadas con la migración celular mediante la formación y recambio de los focos de adhesión, estructuras críticas para el anclaje/desanclaje de las células al sustrato por el que migran. Finalmente, con el AO hicimos una serie de experimentos que han sido plasmados en el artículo “Oleanolic acid induces migration in Mv1Lu and MDA-MB-231 epithelial cells involving EGF receptor and MAP kinases activation” donde proponemos qué rutas celulares activa el AO para promover la migración celular.

II. OBJETIVOS

2.1 Referidos a los efectos de la membrana amniótica (MA)

1. Ponderar el efecto de la aplicación de MA sobre la migración celular.
2. Estudiar el efecto de la MA sobre la expresión de proteínas implicadas en la migración celular.
3. Examinar la remodelación de estructuras de adhesión celular relacionadas con la migración en respuesta a MA.
4. Investigar la implicación de la señalización dependiente de TGF- β y su relevancia para la migración celular inducida por la MA.

2.2 Referidos a los efectos del ácido oleanólico (AO)

1. Determinar el efecto del AO sobre la migración celular.
2. Caracterizar el efecto del AO sobre la capacidad proliferativa y ciclo celular.
3. Estudiar la expresión de genes, involucrados en la migración celular, promovida por AO.
4. Profundizar en los mecanismos moleculares que median la respuesta celular al AO.

III. ARTÍCULOS

Artículo 3.1

Revista: Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine.

Título: Amniotic membrane stimulates cell migration by modulating transforming growth factor- β signalling.

Abstract.

Keratinocyte migration is a mandatory aspect of wound healing. We have previously shown that amniotic membrane (AM) applied to chronic wounds assists healing through a process resulting in the overexpression of c-Jun at the wound's leading edge. We have also demonstrated that AM modifies the genetic programme induced by transforming growth factor- β (TGF- β) in chronic wounds. Here we used a scratch assay of mink lung epithelial cells (Mv1Lu) and a spontaneously immortalized human keratinocyte cell line (HaCaT) cells to examine the influence of AM application on the underlying signalling during scratch closure. AM application induced c-Jun phosphorylation at the leading edge of scratch wounds in a process dependent on MAPK and JNK signalling. Strikingly, when the TGF- β -dependent Smad-activation inhibitor SB431542 was used together with AM, migration improvement was partially restrained, whereas the addition of TGF- β had a synergistic effect on the AM-induced cell migration. Moreover, antagonizing TGF- β with specific antibodies in both cell lines or knocking out TGF- β receptors in Mv1Lu cells had similar effects on cell migration as using SB431542. Furthermore, we found that AM was able to attenuate TGF- β -Smad signalling specifically at the migrating edge; AM treatment abated Smad2 and Smad3 nuclear localization in response to TGF- β in a process dependent on mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MEK1) activation but independent of EGF receptor or JNK activation. The involvement of Smad signalling on AM effects on HaCaT keratinocytes was further corroborated by overexpression of either Smad2 or Smad3 and the use of Smad phosphorylation-specific inhibitors, revealing a differential influence on AM-induced migration for each Smad. Thus, AM TGF- β -Smad signalling abating is essential for optimal cell migration and wound closure.

Dirección Web: DOI: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/term.2501>

Artículo 3.2

Revista: Scientific Reports

Título: Amniotic membrane promotes focal adhesion remodeling to stimulate cell migration.

Abstract.

During wound healing, the migration of keratinocytes onto newly restored extracellular matrix aims to reestablish continuity of the epidermis. The application of amniotic membrane (AM) to chronic, deep traumatic, non-healing wounds has proven successful at stimulating re-epithelialization. When applied on epithelial cell cultures, AM activates extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2) and c-Jun N-terminal kinases 1/2 (JNK1/2), with the overexpression and phosphorylation of c-Jun along the wound edge. The effect of AM on the migration of cells was investigated by studying critical proteins involved in the focal adhesions turn-over: Focal Adhesion Kinase (FAK), Paxillin and Vinculin. In Mv1Lu and HaCaT cells, validated models for cell migration and wound healing, AM affected the expression and activation of Paxillin, but did not affect Vinculin expression, both factors which integrate into focal adhesions. Moreover, AM regulation also affected FAK activity through phosphorylation. Finally, we have determined that AM regulation of focal adhesions involves both JNK and MEK MAP kinase signaling pathways. This data provides a molecular background to understand how AM regulates critical cell and molecular aspects of cell migration, organizing and directing the movement of cells by the continuous formation, maturation, and turnover of focal adhesion structures at the migration leading edge.

Dirección Web: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-15509-z>

Artículo 3.3**Revista:** PLOS ONE**Título:** Oleanolic acid induces migration in Mv1Lu and MDA-MB-231 epithelial cells involving EGF receptor and MAP kinases activation.**Abstract.**

During wound healing, skin function is restored by the action of several cell types that undergo differentiation, migration, proliferation and/or apoptosis. These dynamics are tightly regulated by the evolution of the extra cellular matrix (ECM) contents along the process. Pharmacologically active flavonoids have shown to exhibit useful physiological properties interesting in pathological states. Among them, oleanolic acid (OA), a pentacyclic triterpene, shows promising properties over wound healing, as increased cell migration in vitro and improved wound resolution in vivo. In this paper, we pursued to disclose the molecular mechanisms underlying those effects, by using an in vitro scratch assay in two epithelial cell lines of different lineage: non-malignant mink lung epithelial cells, Mv1Lu; and human breast cancer cells, MDA-MB-231. In every case, we observed that OA clearly enhanced cell migration for in vitro scratch closure. This correlated with the stimulation of molecular pathways related to mitogen-activated protein (MAP) kinases, as ERK1,2 and Jun N-terminal kinase (JNK) 1,2 activation and c-Jun phosphorylation. Moreover, MDA-MB-231 cells treated with OA displayed an altered gene expression profile affecting transcription factor genes (c-JUN) as well as proteins involved in migration and ECM dynamics (PAI1), in line with the development of an epithelial to mesenchymal transition (EMT) status. Strikingly, upon OA treatment, we observed changes in the epidermal growth factor receptor (EGFR) subcellular localization, while interfering with its signalling completely prevented migration effects. This data provides a physiological framework supporting the notion that lipophilic plant extracts used in traditional medicine, might modulate wound healing processes in vivo through its OA contents. The molecular implications of these observations are discussed.

Dirección web: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172574>

IV. DISCUSIÓN

La curación de heridas es un proceso complejo que incluye inflamación, reepitelización, neoangiogénesis y remodelación tisular con el objetivo de restaurar la integridad del tejido lesionado (Santoro and Gaudino, 2005; Singer and Clark, 1999). Si se interrumpe el proceso normal de curación, se puede llegar a dar casos de lesiones no cicatrizantes conocidas como heridas crónicas. Éstas, por definición, son heridas que están en un estado inflamatorio patológico y no progresan a través de las etapas normales de curación. El desarrollo de la investigación que muestra la presente Tesis Doctoral tuvo como objetivo principal profundizar en el conocimiento de aquellos mecanismos moleculares por los cuales la membrana amniótica (MA) y el ácido oleanólico (AO) ayudan a la reepitelización de lesiones cutáneas. Para ello se han empleado diferentes modelos celulares de migración, como lo son las células de epitelio pulmonar de armiño (Mv1Lu), las células epiteliales de mama humana (MDA-MB-231) o los queratinocitos espontáneamente inmortalizados humanos (HaCaT). Estos modelos han permitido realizar estudios de cierre de heridas *in vitro* en presencia MA o AO a la vez de inhibidores de rutas específicas, lo cual ha permitido detectar con precisión la inducción de mecanismos cruciales para la migración por estos agentes. Además, se han desarrollado experimentos de proliferación y se ha medido su incidencia sobre el ciclo celular para evidenciar otros efectos celulares de estos factores, junto con estudios de expresión génica realizados para concretar el efecto de MA y AO sobre genes involucrados en proliferación y migración celular. Por último, la observación microscópica mediante técnicas de inmuno-fluorescencia ha permitido caracterizar el efecto que la exposición a estos factores tiene sobre la topografía en un epitelio “herido” y sobre la arquitectura celular en relación con la migración celular. Todos estos datos nos llevan a proponer el concurso de diversas rutas moleculares en la migración promovida tanto por MA como por AO.

4.1 Membrana amniótica

La MA es un tejido que despierta gran interés como apósito biológico debido a su especial estructura y comportamiento. Se caracteriza por tener propiedades antiinflamatorias, antifibróticas y antimicrobianas bien documentadas. Además, presenta una baja inmunogenicidad y efectos promotores de la reepitelización, estando desprovista de

tumorigenicidad (Insausti et al., 2010a; Parolini et al., 2008). En el contexto de las heridas complejas y crónicas, la aplicación de MA ofrece ventajas considerables en comparación con el trasplante autólogo de piel, ya no solo por las características antes citadas, si no por representar un método con coste de aplicación reducido y baja probabilidad de complicación. Esto hace la aplicación de MA una buena alternativa para ayudar al proceso de cicatrización de heridas complejas y úlceras crónicas, como se ha demostrado en el caso lesiones traumáticas profundas (Insausti et al., 2010a).

Los efectos pro-cicatrizantes de MA parecen estar ligados a su capacidad para producir y liberar, en un proceso no del todo comprendido, multitud de factores solubles capaces de activar numerosas vías de señalización molecular. En este sentido, es conocido que la migración de queratinocitos está afectada por un gran conjunto de señales moleculares distintas, evidenciado por el hecho de que la eliminación de la señalización por un único factor se muestra ineficaz en prevenir la migración, diferenciación o proliferación de queratinocitos (Peplow and Chatterjee, 2013). Entre estas señales, las citoquinas y los factores de crecimiento desempeñan un papel especial, como lo refleja la cantidad y diversidad de receptores encontrados para estas moléculas en los queratinocitos (Peplow and Chatterjee, 2013). Así, diversos trabajos constatan la capacidad de la MA para producir citoquinas como TNF- α , TGF- α , TGF- β , IL-4, IL-6 o IL-8, factores de crecimiento como EGF, b-EGF, KGF o el factor de crecimiento hepático (HGF), además de otras moléculas de señalización y funcionales como lo son los inhibidores naturales de metaloproteasas, las β -defensinas o las prostaglandinas, entre otros (Parolini et al., 2008; Yang, 2006 #3278; Parolini and Soncini, 2006 3280). En conjunto serían estas señales, sumadas a otras no caracterizadas, las responsables de promover los efectos beneficiosos de la MA.

Entre los elementos moleculares reseñados, distintos trabajos destacan las funciones del TGF- β y el EGF en el proceso de cicatrización. La presencia de altos niveles de TGF- β se considera una característica intrínseca a la herida crónica. Si bien TGF- β desempeña un papel destacado en el proceso regenerativo agudo, estimulando el reclutamiento de fibroblastos y modulando el proceso de EMT de los queratinocitos, determinando así su estado migratorio y proliferativo (Davies et al., 2005; Massague,

1999), sus efectos en la herida crónica parecen relacionarse con el estancamiento en la regeneración (Cooper et al., 1994; Trengove et al., 2000). En este sentido, diversos estudios muestran como una reducción en los niveles de esta citoquina en la herida crónica pueden ligarse a una reactivación de la cicatrización (Cooper et al., 1994; Trengove et al., 2000). Mientras, el EGF, como factor de crecimiento, desempeña un papel genérico en el mantenimiento de la homeostasis tisular de la piel, dada su capacidad para promover la proliferación, la diferenciación epidérmica y la migración fisiológica de los queratinocitos (Borena et al., 2015). Siguiendo esta línea, en el estudio de lesiones cutáneas, el tratamiento de células epiteliales cultivadas con EGF se muestra capaz de estimular la proliferación y la migración de colonias de queratinocitos *in vitro*. De la misma manera, la aplicación de preparados tópicos que contienen EGF recombinante en heridas experimentales realizadas sobre modelos animales, muestran la capacidad de este factor para promover la regeneración epidérmica *in vivo* (Brown et al., 1989; Schultz et al., 1991). Sin embargo, en el contexto de la herida compleja, la existencia de un proceso inflamatorio crónico conlleva una alta actividad proteolítica que deriva en una tasa de degradación elevada de los factores de crecimiento como EGF (Hardwicke et al., 2008), empobreciendo la farmacocinética de su aplicación tópica y limitando por ello sus efectos (Berlanga-Acosta et al., 2017). Si bien se han desarrollado esfuerzos para intentar revertir esta condición mediante el tratamiento adyuvante con inhibidores de proteasas a nivel local, la relación terapéutica no termina de ser ventajosa debido a un beneficio exiguo en relación a la aparición de efectos secundarios sistémicos de tipo metabólico (Kiyohara et al., 1993a; Kiyohara et al., 1991; Kiyohara et al., 1993b), que mantienen esta opción terapéutica excluida en el manejo de úlceras crónicas.

En nuestro caso, los estudios moleculares realizados sobre cultivos de células epiteliales Mv1Lu y queratinocitos HaCaT en los que se ha simulado una herida crónica añadiendo TGF- β , el tratamiento con MA parece desencadenar efectivamente una respuesta mediada por EGF. Esta observación se sustenta en el hecho de que el bloqueo de la señalización mediada por el receptor de EGF, por la presencia del inhibidor específico PD153035, previene completamente la migración promovida por MA en los ensayos de cierre de heridas, destacando esta inhibición por su potencia, que invita a considerar que sus efectos irían más allá de un efecto antiproliferativo (Cole et al., 2005; Peus et al., 1997). La activación de la vía de EGF acarrea, principalmente, una activación

de la vía de las MAP Kinasas que conduce al control de la transcripción de genes importantes para la proliferación y diferenciación celular (Hill and Treisman, 1995). En nuestro modelo, tanto en células Mv1Lu como en células HaCaT, tal activación provoca un aumento de la expresión cerca del borde de la herida del factor de transcripción c-Jun (Alcaraz et al., 2015; Insausti et al., 2010a), factor que se encuentra en el extremo de la vía transcriptómica de la MAP Kinasas y que desempeña un papel clave en la regulación de los efectos del EGF sobre la expresión génica. En este sentido, es sabido que las mutaciones condicionales de c-Jun en la epidermis retrasan el cierre de la herida (Li et al., 2003). Así, se pudo apreciar un aumento de la expresión de c-Jun también en el borde de migración de la epidermis de pacientes con heridas crónicas (Alcaraz et al., 2015; Insausti et al., 2010a). El análisis detallado *in vitro* empleando inhibidores específicos de este fenómeno permitió establecer como el efecto pro-migratorio del tratamiento con MA implica la activación de ERK1/2 y JNK1/2, pero no de p38 (Alcaraz et al., 2015; Insausti et al., 2010a), todos ellos factores pertenecientes a la ruta de las MAP Kinasas. Aún relacionada con el nivel de expresión, el desarrollo por c-Jun de sus actividades depende de su activación por fosforilación. Para nuestra sorpresa, hemos podido constatar como la inhibición de la señalización por EGF en presencia de PD153035 no previene la fosforilación de c-Jun en respuesta al tratamiento con MA, así como el aumento de su expresión, un comportamiento divergente que parece indicar la ausencia de compromiso entre el tratamiento con MA o EGF. Teniendo en cuenta la importancia de la actividad c-Jun para el proceso de cicatrización, esto indicaría que otro tipo de señales concurrentes han de ser las responsables de estimular el proceso migratorio en respuesta a MA, si bien existe una contribución definitiva dependiente de EGF. Así, estos resultados ofrecen un marco de investigación para detectar los factores responsables de estas ventajas y su potencial desarrollo en biomedicina.

Como se ha mencionado anteriormente, en trabajos previos desarrollados en nuestro grupo de investigación, al estudiar los eventos moleculares aguas abajo de la activación del receptor de EGF, pudimos observar como el efecto pro-migratorio del tratamiento con MA implica la activación de ERK1/2 y JNK1/2. Además, se pudo constatar con sorpresa como la co-estimulación con TGF- β , lejos de atenuar la respuesta, aumentaba el rendimiento migratorio del tratamiento con MA. Esta última observación parece estar ligada a un incremento añadido de la expresión de c-Jun, respecto a la

estimulación con MA cuando el co-estímulo con TGF- β está presente (Alcaraz et al., 2015; Insausti et al., 2010a). En este sentido, algunos autores apuntan que algunos de los efectos beneficiosos observados para el tratamiento con EGF de heridas experimentales desarrolladas en modelos animales pueden estar vinculados a una modulación de la señalización dependiente de TGF- β (Kim et al., 2010). Así, en el contexto de la herida crónica, tal perspectiva proporciona un posible mecanismo de actuación de la MA sobre el cual profundizar.

Para estudiar el posible antagonismo de la señalización dependiente de TGF- β por el tratamiento con MA, en nuestro grupo de trabajo inicialmente se emplearon queratinocitos primarios como un modelo celular cercano a la situación de los queratinocitos de la piel. En este modelo, se pudo comprobar como el tratamiento concurrente con TGF- β y MA resultó en una atenuación del nivel de fosforilación de Smad2 y Smad3, principales transductores de la señalización canónica dependiente de TGF- β junto con Smad4, en comparación con células tratadas únicamente con TGF- β . Este efecto se encontró igualmente en las células HaCaT, un modelo celular con menor complejidad de manejo, donde además se pudo vincular la atenuación de fosforilación de las Smads a cambios en la expresión de *CDKN2B* (p15) y *CDKN1A* (p21) en relación con la regulación del ciclo celular (Alcaraz et al., 2015; Nicolas and Hill, 2003). Muchos son los estudios que demuestran la interrelación entre la proliferación celular y el proceso migratorio en el cierre de la herida (Pastar et al., 2014; Reinke and Sorg, 2012). Así, en este sentido, nuestros experimentos permitieron concluir que la exposición a MA posee capacidad para modular negativamente la parada del ciclo celular producida en respuesta a la vía canónica de TGF- β , generando un efecto positivo sobre la proliferación de las células HaCaT y Mv1Lu (Alcaraz et al., 2015).

Si bien la proliferación contribuye al proceso regenerativo, la migración celular puede desarrollarse por mecanismos independientes de la división celular. Para determinar los efectos que el tratamiento con MA puede tener sobre los mecanismos migratorios, cultivos celulares Mv1Lu y HaCaT se expusieron a Mitomicina-C (MMC), un quimioterapéutico capaz de promover la reticulación del ADN y detener la división celular (An et al., 2015; Lee et al., 2006). Sorprendentemente, mientras el tratamiento con

MMC afectó el comportamiento migratorio de las células HaCaT tratadas con MA, en las células Mv1Lu el tratamiento con MMC no detuvo la migración (Alcaraz et al., 2015). Estos resultados parecerían indicar que la capacidad de la MA para impulsar los mecanismos migratorios independientemente de la proliferación. En este sentido, el análisis profundo de los efectos transcriptómicos de la atenuación sobre la fosforilación de las Smads ejercida por la MA, reveló como este efecto no ocasionó repercusiones sobre la expresión de *ITGB6*, *TMEPAI*, *SNAI2* o *PAI1*, marcadores genéticos que se corresponden tanto con proteínas con actividad funcional como con factores de transcripción involucrados en la migración celular, la regulación de la EMT y el cierre de heridas y que se saben inducidos en respuesta a TGF- β (Andreasen et al., 2000; Breuss et al., 1995; DiMilla et al., 1993; Ghosh and Vaughan, 2011; Hudson et al., 2009; Lauffenburger and Horwitz, 1996; Savagner et al., 2005; Watanabe et al., 2010). Aún más, en aquellas muestras co-estimuladas con TGF- β la expresión de estos marcadores aumentó (Alcaraz et al., 2015).

En conjunto, los datos acumulados hasta este momento parecían indicar la existencia de un requerimiento al menos parcial de la señalización canónica por TGF- β para la estimulación óptima de la migración por la MA. Para confirmar esta hipótesis, se diseñaron experimentos capaces de diseccionar con precisión la señalización por TGF- β del resto de señalizaciones ejercidas por la MA en el contexto migratorio. Así, en ensayos de herida artificial practicados sobre células Mv1Lu, se ha podido encontrar como la presencia del inhibidor específico del receptor I de TGF- β (T β R-I), SB431542, ocasiona una disminución del impulso migratorio en respuesta a MA, mientras que el co-tratamiento con TGF- β y MA fue capaz de mejorar este impulso. En cambio, al replicar estos experimentos empleando células R1B, una variante de clonal de las células Mv1Lu que carecen de T β R-I, no se apreciaron diferencias significativas ni con el uso del inhibidor ni como consecuencia del co-tratamiento con TGF- β , si bien el tratamiento con MA consiguió aumentar la migración aunque en menor medida que en Mv1Lu que sí expresan T β R-I. Así, estos resultados permiten confirmar la participación de la señalización dependiente de TGF- β en la promoción de la migración causada por el tratamiento con MA sobre células epiteliales tales como las Mv1Lu.

Los resultados anteriores sugieren una contribución significativa de la vía canónica del TGF- β en los efectos promigratorios de la MA. A fin de determinar fehacientemente la participación de esta vía, se realizó el estudio topológico, en respuesta a MA, de la distribución subcelular de las R-Smads en ensayos de cierre de heridas realizados sobre células Mv1Lu. La observación de estos ensayos permitió ilustrar cómo con MA es capaz de atenuar de forma efectiva la señalización por TGF- β en el borde de la herida, constatada por un descenso del marcaje anti-Smad 2/3 detectado a nivel nuclear. Es sabido que ambas R-Smad presentan papeles relacionados pero no solapantes en el proceso de cierre de heridas, pues mientras Smad2 se asocia con migración celular y proliferación (Ito et al., 2001), Smad3 se sabe controla la producción de componentes de la matriz, como el colágeno, principal componente de la MEC implicado en la cicatrización y fibrosis (Brown et al., 2007). Así, para evaluar de forma individual como la contribución de la señalización dependiente de las R-Smads puede estar afectada por esta atenuación, se realizaron ensayos en los que se sobre-expresó Smad2 o Smad3, observando la capacidad de tal condición para modificar la capacidad de la MA para inducir la migración de células HaCaT. En línea con lo descrito en la literatura (Ito et al., 2001), la sobreexpresión de Smad2 fue capaz de aumentar la migración de células HaCaT, condición que se vio potenciada aún más por la presencia de MA. De forma similar, la sobre-expresión de Smad3 por si sola también potenció la migración, pero sorprendentemente, en este caso la presencia de MA no consiguió potenciar la migración, mientras que la inhibición de la activación de Smad3 utilizando un inhibidor selectivo de su fosforilación resultó neutra para el rendimiento migratorio inducido por MA en comparación con el deterioro causado por la presencia del inhibidor específico del receptor-I de TGF- β . Relacionado con lo anterior, en el contexto de la curación de heridas, distintos autores informan sobre cómo la supresión de Smad3 en modelos murinos resulta en una aceleración de la reepitelización y la proliferación de queratinocitos (Ashcroft et al., 1999; Jinno et al., 2009). En esta línea, nuestras observaciones sobre la topología de las Smads revelan que el tratamiento con MA reduce selectivamente la localización nuclear de fosfo-Smad3 independientemente de la estimulación con TGF- β . Así, en conjunto, las observaciones anteriores permitieron confirmar la existencia de una modulación de la vía canónica de transducción de TGF- β , con consideraciones específicas para Smad2 y Smad3, en los efectos promovidos por la MA y la potenciación de la migración observada en el co-tratamiento con TGF- β .

Si bien la existencia de una modulación de la vía canónica del TGF- β resultó evidente, la literatura parece indicar también la posibilidad de que de que elementos de la vía no canónica pudieran estar implicados. En este sentido, la activación indirecta de ERK1/2 a partir de la estimulación por TGF- β se ha relacionado con la regulación del metabolismo de R-Smads en células mesenquimales (Hough et al., 2012). Así, se recurrió al uso de inhibidores selectivos de la activación de algunos de los elementos para evaluar su participación. En las células Mv1Lu y en las células HaCaT, la presencia de un inhibidor específico para la actividad de MEK previno los efectos promotores de la migración de la MA.

En consonancia y para nuestra sorpresa, cuando se estudió la topología de las R-Smads en estas muestras, encontramos como la presencia del inhibidor de MEK neutralizó la capacidad atenuatoria de la MA sobre la translocación nuclear de Smads dependiente de TGF- β . Así, estos resultados sugieren una participación crucial de ERK1/2 en la atenuación producida por la MA sobre la señalización de TGF- β . Aquí cabe recordar que MEK, siendo una MAP Kinasa, también participa de la ruta canónica del EGF, teniendo este elemento común la capacidad de vincular ambas señalizaciones para la potencial reducción del efecto crónico del TGF- β que algunos autores apuntaban para EGF (Kim et al., 2010). Sin embargo, otros autores indican que tal modulación de la actividad de MEK1/2 puede ocurrir por una vía independiente de EGF, ya que se ha comprobado como el tratamiento con EGF no bloquea la fosforilación de Smad2 y Smad3 ni modifica la localización nuclear de Smad2/3 (Liu et al., 2014). Así, nuestro trabajo muestra un panorama inexplorado para los efectos de la imbricación de las señalizaciones por EGF, miembros de la familia de EGF y TGF- β en el proceso de resolución de heridas crónicas, aportando nuevos retos que pretendemos estudiar en el futuro.

Independientemente del sistema aferente activador, ya sea señalización dependiente de EGF, TGF- β o quizá terceros elementos no determinados, en el contexto migratorio es sabido como algunos de los elementos de la ruta de las MAP Kinasas son capaces de actuar directamente sobre elementos celulares externos a la propia vía, pudiendo generar así respuestas celulares a corto plazo. Durante el movimiento

direccional de las células se requiere la ocurrencia de cambios dinámicos de los filamentos de Actina añadido a la formación continua de nuevos complejos focales (CF), su maduración en adhesiones focales (AF) y el recambio de estas estructuras en la parte posterior para promover la migración de éstas células (Hu et al., 2014; Lauffenburger and Horwitz, 1996; Mayor and Etienne-Manneville, 2016; Ridley, 2003). En este sentido, la migración es un fenómeno coordinado que requiere de un elaborado control de los eventos moleculares conducentes al desplazamiento celular, proceso que en su regulación cuenta con la participación de las MAP Kinasas (Klemke et al., 1997a). Tal es el caso tanto de ERK1/2 como de JNK1/2, cuya activación y acción sobre distintos sustratos parece crucial para un correcto desarrollo de la migración celular (Fitsialos et al., 2007; Huang et al., 2003; Klemke et al., 1997a; Stupack et al., 2000). En relación a lo anterior, la observación mediante microscopía confocal mostró como el tratamiento con MA fue capaz de estimular la migración celular promoviendo la reorganización y aumento del número de los focos de adhesión en el borde migratorio de células Mv1Lu y HaCaT sometidas a ensayos de migración en herida artificial. Por el contrario, en presencia de inhibidores específicos para las actividades de ERK1/2 y de JNK1/2 esta reorganización no fue detectada, encontrando un reducido número de focos de adhesión acompañados de una profusa estructura de Actina.

El principal factor implicado en la regulación de la formación, remodelación y desarme de las adhesiones focales es la Kinasa de Adhesiones Focales (FAK). FAK funciona como un controlador maestro para la remodelación de focos de adhesión en el frente de migración, impulsando con su actividad el movimiento direccional de la célula (Hu et al., 2014; Mitra et al., 2005). FAK también participa en la remodelación citoesquelética y en el ensamblaje-desensamblaje de la adhesión celular interactuando con proteínas de la MEC, integrinas y factores de crecimiento para promover la migración celular (Hu et al., 2014; Mitra et al., 2005; Sieg et al., 2000). Nuestros datos, empleando anticuerpos específicos para la versión activa de FAK (fosfo-Tyr-100) muestran un acúmulo de la actividad FAK en respuesta al tratamiento MA en nuestros modelos celulares. La observación mediante microscopía confocal muestra que este aumento se localiza principalmente en el frente migratorio de los ensayos de herida artificial. En este sentido, el aumento de la localización de FAK en el frente de migración se ha asociado con una mayor remodelación de los focos de adhesión (Hu et al., 2014). De nuevo, en

línea con lo descrito en el párrafo anterior, la exposición en estos modelos celulares a inhibidores específicos de las actividades JNK y MEK, abolió los efectos de la MA sobre la actividad FAK. Así, estas observaciones permitieron confirmar la implicación de las actividades MAP Kinasa de ERK1/2 y de JNK1/2 en la regulación de las dinámicas de los focos de adhesión en la respuesta migratoria a la MA, afectando de forma precisa la actividad FAK.

En relación a lo anterior, es conocido como Paxilina se encuentra entre los sustratos principales de la actividad FAK (Hu et al., 2014). Paxilina es una proteína de andamiaje clave para el ensamblaje, la maduración y el desensamblado de las adhesiones focales (Ishibe et al., 2003), cuya fosforilación por FAK se corresponde con un incremento del dinamismo y reemplazo de las adhesiones focales (Hu et al., 2014). Nuestros datos muestran como el tratamiento con MA no solo resultó en un aumento en los niveles de fosforilación de la Serina 178 de Paxilina, modificación que marca el incremento en su dinamismo, sino que además promovió un aumento en los niveles de expresión absolutos de esta proteína. Alternativamente, también se estudió el comportamiento de Vinculina, una proteína de anclaje al citoesqueleto que está involucrada en la consolidación de los focos de adhesión, con la función principal de fijar los filamentos de Actina a las integrinas fortaleciendo así los puntos de adhesión (Carisey and Ballestrem, 2011; Kanchanawong et al., 2010). Al contrario que para Paxilina, en el caso de Vinculina nuestros datos no mostraron regulación transcripcional al alza por la presencia de MA. En este sentido, se ha descrito en fibroblastos murinos como la supresión de Vinculina resulta en un incremento de la capacidad migratoria, a la vez que se reduce su nivel de extensión así como la fuerza con que estas células se unen a sustratos en la superficie de cultivo (Xu et al., 1998). Si bien, como hemos indicado, la aplicación de inhibidores específicos para JNK y MEK parece abolir la activación de FAK y así alterar el proceso migratorio, sorprendentemente, la exposición a inhibidores no afectó al incremento en la expresión de Paxilina a resultas del tratamiento con MA, a pesar de que coherentemente sí consiguió abolir su fosforilación. Así, estas observaciones permitieron demostrar la capacidad del tratamiento con MA para impulsar la fisiología de los focos de adhesión, afectando la actividad del principal factor involucrado en su dinamismo tanto a nivel transcriptómico como a nivel post-traducciona.

Curiosamente, aunque el conocimiento sobre los mecanismos que afectan a la expresión de Paxilina es escaso, se ha descrito que la fosforilación de Paxilina por JNK en posiciones alternativas promueve aún más su asociación con FAK (Huang et al., 2003; Huang et al., 2008). Además, se ha observado que la señalización de TGF- β es capaz de promover la acumulación de Paxilina a través de un mecanismo independiente de la transcripción (Han et al., 2001). De este modo, puesto que TGF- β se encuentra entre los factores liberados por la MA, que como ya se ha tratado muestra modulación de su señalización en respuesta al tratamiento con MA y además, es capaz de activar elementos de las MAP Kinasas incluyendo JNK por su vía no canónica, resulta tentador pensar que en este modelo los niveles de Paxilina puedan estar regulados no solo por la transcripción, sino también por la estabilización de la proteína en respuesta a su señalización. Quizá, trabajos a desarrollar en un futuro por nuestro grupo puedan ayudar a resolver esta cuestión.

4.2 Ácido oleanólico

El AO es un triterpeno pentacíclico que forma parte de la familia de los flavonoides. Los flavonoides se identifican como uno de los grupos principales de compuestos activos presentes en las plantas que tienen propiedades deseadas sobre la salud y con potencial para su uso biosanitario (Manach et al., 2004). En el campo de la medicina regenerativa, estos compuestos se han usado como sustancias cicatrizantes en forma de extractos derivados de fuentes botánicas ampliamente utilizadas en medicina tradicional (Kasote et al., 2015). Los triterpenos pentacíclicos, entre ellos los flavonoides, se han utilizado experimentalmente con éxito para tratar la cicatrización de heridas, aparentemente mejorando el rendimiento estético del proceso de cicatrización en comparación con los enfoques clínicos al uso, sin afectar negativamente al cierre de la herida (Metelmann et al., 2012). Precisamente entre los triterpenos pentacíclicos, el AO ha sido caracterizado en el pasado por sus explícitas propiedades cicatrizantes, así como por su capacidad para aumentar de la resistencia a la tracción de heridas experimentales en ratones (Moura-Letts et al., 2006). Sin embargo, a pesar de estas consideraciones, la información disponible sobre los mecanismos específicos por los cuales el AO ejerce estos efectos es escasa.

Una revisión de la bibliografía disponible muestra como entre las principales áreas de interés con respecto a las propiedades del AO, destaca su potencial uso en el tratamiento anti-tumoral. Esto se fundamenta en aquellas observaciones que muestran la capacidad del AO para suprimir la proliferación y la angiogénesis en modelos de glioma, afectando además la supervivencia de estas células (Banno et al., 2004; Fujiwara et al., 2011; Lucio et al., 2011). Si bien estas capacidades pueden ser de clara utilidad biomédica, parecen contraponerse a los efectos observados en cuanto al cierre de heridas, por cuanto la proliferación y supervivencia celular en el lecho de la herida son componentes fundamentales del rendimiento cicatricial. Nuestros datos, obtenidos en ensayos de herida artificial realizados sobre células Mv1Lu y células MDA-MB-231, demuestran como el tratamiento con AO tiene un claro efecto neto promotor de la migración celular. Sin embargo, en base a lo descrito sobre su uso anti-tumoral analizamos los efectos del AO sobre la proliferación en nuestros modelos mediante ensayos de ciclo celular y para nuestra sorpresa, encontramos como el tratamiento tuvo cierta capacidad anti-proliferativa, si bien solo detectable a corto plazo, pues a largo plazo no se registró alteración significativa en la distribución del ciclo celular. De esta manera, nuestras observaciones parecen confirmar el potencial del AO en la curación de heridas por cuanto potencia el comportamiento migratorio. Simultáneamente, las observaciones sobre la respuesta a nivel de ciclo celular estarían en línea de lo descrito para el caso de las células de la glía, sugiriendo la existencia de un mecanismo común, al menos de forma parcial, entre ambos efectos.

Algunos autores han sugerido que los efectos observados para el AO sobre las células de glía podrían estar mediados por la capacidad de este compuesto para interferir con la señalización dependiente de las MAP Kinasas, promoviendo un resultado global de supresión de la EMT de las células tumorales (Guo et al., 2013). En este sentido, como se ha expuesto en apartados anteriores, está bien establecido como los miembros de la familia MAP Kinasas participan en la promoción de la motilidad celular (Huang et al., 2004; Klemke et al., 1997b; Pearson et al., 2001; Stupack et al., 2000). En nuestro estudio, lejos de tener efectos negativos, los resultados obtenidos mediante Western Blot, muestran una clara inducción de la respuesta migratoria mediada por la activación e inducción del factor de transcripción c-Jun, resultado final de la participación de las MAP Kinasas en respuesta al tratamiento con AO en nuestros modelos celulares. En esta línea,

diversos autores han demostrado que la activación de JNK desempeña un papel crítico en la migración de fibroblastos en experimentos de cicatrización de heridas, mientras que la exposición a inhibidores específicos de su actividad afecta negativamente la migración de distintos tipos celulares (Huang et al., 2003; Javelaud, 2003). De esta misma manera, los datos obtenidos en las líneas celulares Mv1Lu y MDA-MB-231, apuntan que el tratamiento con AO es capaz de desencadenar la fosforilación de JNK1/2 en un proceso relevante para el rendimiento migratorio, afectado por la exposición a un inhibidor específico de la actividad JNK, capaz de reducir la migración en respuesta a AO. De igual forma, la activación de MEK1 parece ser también necesaria para la migración dependiente de AO, puesto que la fosforilación de ERK1/2 se detecta tras el tratamiento mientras que la exposición a un inhibidor específico de la actividad MEK1 es capaz de afectar la migración en un grado similar al alcanzado con un inhibidor de JNK.

Sin embargo, en el caso de p38, también una MAP Kinasa, considerada una pieza clave en los eventos de señalización intracelular relacionados con el estrés ambiental y el daño inmunológico (Katholnig et al., 2013), no se apreció que la presencia del inhibidor de su actividad ocasionara una diferencia significativa en la estimulación de la migración por AO. De esta manera, nuestras observaciones parecen confirmar la implicación de una respuesta tipo MAP Kinasa en los efectos mediados por el AO para la migración de células epiteliales.

En un estudio más profundo sobre la posible señalización subyacente a los efectos del AO, resultó curioso apreciar como en los ensayos de cierre de heridas co-tratados con EGF, el rendimiento migratorio de la estimulación simultánea nunca superó significativamente el alcanzado por las células tratadas únicamente con EGF. Cabe aquí recordar que la estimulación por el receptor de EGF representa uno de los principales mecanismos aferentes de la vía de las MAP Kinasas (Haase et al., 2003). En este sentido, encontramos como en nuestros modelos celulares la exposición a un inhibidor específico de la actividad tirosin-kinasa del receptor de EGF inhibió por completo cualquier efecto del AO sobre la migración. Aún más, la exposición en estos modelos a la combinación de inhibidores específicos para las actividades MEK y JNK proporcionó resultados similares a la inhibición del receptor de EGF, observaciones que no se repitieron con la

exposición por separado a estos inhibidores de MEK y JNK. Puesto que en la vía de las MAP Kinasas tanto MEK como JNK se ubican aguas abajo de la señalización por el receptor de EGF, pero ambos factores son activados por ramas distintas de la vía, nuestros resultados sugerían que los efectos pro-migratorios observados del tratamiento con AO debían estar canalizados a través de EGFR. Esta posibilidad contrasta con lo descrito para el ácido ursólico, otro compuesto triterpenoide con estructura similar al AO, que parece poseer efectos antiproliferativos y proapoptóticos en modelos de cáncer de colon humano y de ratón, ya que para este compuesto se ha propuesto que sus efectos estarían impulsados por la interacción directa con el EGFR, bloqueando la capacidad del receptor para realizar la señalización EGF/MAP kinasas (Prasad et al., 2012; Shan et al., 2009).

En cualquier caso, siendo el de EGF uno de los primeros receptores con actividad enzimática intrínseca descritos en la literatura (Schlessinger, 2014), existe un conocimiento detallado de su fisiología. Este conocimiento ha permitido el desarrollo de distintas técnicas para detectar su activación así como para evitarla en situaciones clínicas. Así, se sabe cómo la unión al receptor de su ligando principal EGF, así como otros factores de la familia de factores de crecimiento con menor afinidad, genera un cambio conformacional que activa su actividad tirosin-kinasa endógena y resulta en su auto-fosforilación. Una vez activo, el receptor fosforila multitud de factores solubles en las cercanías de la hemi-membrana plasmática interna, transmitiendo la señal hacia las vías PI3K/AKT y Ras/Raf/MEK/MAPK. Nuestros datos obtenidos empleando un anticuerpo específico contra la versión auto-fosforilada del receptor de EGF mostraron como el tratamiento con AO desencadenó su activación, abolida por la presencia en el medio de cultivo de un inhibidor de la actividad tirosin-kinasa. Teniendo en cuenta la potencia y posibles efectos adversos de la sobre-estimulación de las vías aguas abajo del receptor de EGF, la evolución ha dotado a la célula diana de un sistema de reciclaje de los receptores de EGF basado en endocitosis por envolturas de Clatrina. Este sistema, que se acciona poco después de la activación del receptor, lo retira de la membrana disminuyendo así la población de receptores activos y por tanto el nivel de señalización (Henriksen et al., 2013; Normanno et al., 2001; Tanaka et al., 2018). Los anticuerpos bloqueantes del receptor de EGF son empleados en el tratamiento de varios tipos de cáncer de tipo epitelial, como los anticuerpos Cetuximab y Panitumumab empleados en cáncer metastásico colorrectal y neoplasias de cabeza y cuello (Martinelli et al., 2009). En

nuestro caso, con el objetivo de confirmar la activación explícita del receptor de EGF en los efectos pro-migratorios del AO, empleamos el anticuerpo monoclonal mAb-225 conocido por desencadenar su internalización sin inducir su activación (Sunada et al., 1986). Así, se comprobó como el tratamiento con mAb-225 abolió los efectos pro-migratorios del AO. Aún más, la observación en paralelo mediante microscopía confocal de muestras expuestas a mAb-225, EGF o AO, usando anticuerpos específicos para el receptor de EGF, reveló como ocurría la internalización del receptor en todos los casos. Además, como sistema de control redundante, la expresión del receptor de EGF decae en respuesta a su señalización (Henriksen et al., 2013; Normanno et al., 2001; Tanaka et al., 2018). De nuevo, el estudio de la expresión génica evidenció como los niveles de RNA mensajero para el receptor de EGF disminuyeron marcadamente en respuesta a corto plazo al tratamiento con AO, observación coherente con la activación de este receptor. En consecuencia, todos estos resultados apoyan la existencia de una participación activa, quizá potenciada, de la señalización dependiente del receptor de EGF en los efectos pro-migratorios del AO, distando esta respuesta de lo propuesto para el ácido ursólico.

Como se ha comentado en apartados anteriores, una de las principales manifestaciones de la activación de la vía de las MAP Kinasas por la ruta del receptor de EGF es un aumento de la proliferación de las células (Jorissen et al., 2003; Wells, 1999). Sin embargo, como se ha indicado en el caso de la exposición a AO, se observa una leve afectación negativa a corto plazo sobre el ciclo celular que parece resultar inocua posteriormente. Como se ha comentado anteriormente, al igual que el ácido ursólico, el AO se ha intentado usar como agente anti-tumoral. En este sentido, algunos autores indican que este potencial depende de la concentración utilizada, pues el AO parece ser capaz de inhibir la proliferación e inducir apoptosis en células cancerígenas a altas dosis (Shan et al., 2011). En modelos relacionados con el cierre de heridas, algunos autores han informado sobre la capacidad de altas concentraciones de AO para interferir con la proliferación en fibroblastos NIH-3T3 (Kuonen et al., 2013) así como fibroblastos primarios humanos, modelo este último que muestra una respuesta similar a la exposición a ácido ursólico (Wojciak-Kosior et al., 2011). De manera similar, nuestros datos exponen un rango de óptimo de concentración para el uso del AO, de 5 μ M o 10 μ M para las células Mv1Lu y MDA-MB-231 respectivamente, mientras dosis superiores mostraron ser perjudiciales para el resultado de la migración. En cualquier caso, en el rango de

concentración óptimo, nuestros análisis no permitieron establecer un vínculo entre los efectos observados para el AO y un cambio en la capacidad proliferativa de las células. Aún y así, se decidió tratar las células con MMC con el objetivo de aislar posibles distorsiones de la proliferación en la cuantificación del efecto migratorio. Sorprendentemente, en las células Mv1Lu y MDA-MB-231, a pesar de la eliminación del componente proliferativo mediante MMC, el tratamiento con AO aún conservó importantes propiedades de mejora de la migración. Estas observaciones apoyan así la idea de que las propiedades pro-migratorias del AO se nutren de manera relevante por mecanismos independientes de la división celular, como lo son las dinámicas vinculadas al esqueleto celular, que pueden ser activadas en respuesta a una señal dependiente de EGF.

A fin de intentar comprender como el tratamiento de AO afecta simultáneamente mecanismos vinculados al desplazamiento celular y la proliferación, se decidió realizar el estudio de la expresión génica de algunos marcadores de relevancia estos procesos. Entre las proteínas reguladoras del ciclo celular, el inhibidor de la kinasa dependiente de ciclina *CDKN1A* desempeña un papel esencial en la respuesta al daño del ADN, induciendo la detención del ciclo celular, la inhibición directa de la replicación del ADN, así como regulando procesos fundamentales, como la apoptosis y la transcripción (Cazzalini et al., 2010). En los estudios con AO se pudo comprobar un aumento en la expresión de *CDKN1A*, especialmente a corto plazo, observación que podría estar relacionada con el efecto negativo inicial del AO sobre la proliferación. Como se ha indicado, ese efecto negativo no parece ser detrimento para las propiedades beneficiosas de la migración producidas por el AO. De hecho, otro de los efectos transcriptómicos del AO fue el aumento sostenido de la expresión *c-JUN*. Como se ha expuesto con anterioridad, la regulación al alza de c-Jun se detecta en el borde de migración de las células durante la cicatrización de la herida (Insausti et al., 2010a; Li et al., 2003). Además, la actividad de c-Jun parece ser crucial en condiciones en las que la proliferación y la motilidad del epitelio cambian rápidamente (Hameedaldeen et al., 2014; Huang et al., 2003, todas observaciones en línea con un efecto beneficioso en la migración celular y el cierre de heridas para el AO. De igual manera, FOXO1 codifica para otro factor de transcripción, que es miembro de la subfamilia fForkhead dentro de la familia O-box. Los miembros de esta familia participan en una amplia gama de procesos celulares relevantes

en el contexto cicatrizativo, como lo son la detención del ciclo celular, la reparación del ADN o la apoptosis, protegiendo a los queratinocitos del estrés oxidativo {Ponugoti, 2013 #3754; Mori et al., 2014). Por su parte, *SNAI2*, como se ha mencionado, desempeña un papel importante en la regulación de la EMT durante la reepitelización de la herida. En ambos casos, para *FOXO1* y *SNAI2* se apreció un aumento significativo de la expresión únicamente a largo plazo. Teniendo en cuenta el posicionamiento jerárquico de c-Jun como un regulador maestro y de *FOXO1* y *SNAI2* como reguladores de la expresión de proteínas funcionales, estas observaciones fueron consistentes con los efectos observados para el AO en la migración celular y la proliferación, en relación con el desarrollo de un fenotipo EMT.

Con respecto a los genes implicados directamente en eventos de migración y EMT, se la vía de señalización JNK / c-Jun guía la inducción de varios genes diana, uno de los cuales es el gen del inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (*PAI-1*) (Geh et al., 2011; Samarakoon et al., 2009). Durante la cicatrización, niveles elevados de *PAI-1* protegen de la degradación proteolítica a las proteínas de la matriz extracelular, lo que facilita la reepitelización del lecho de la herida (Czekay et al., 2011; DiMilla et al., 1993; Lauffenburger and Horwitz, 1996). Así, en nuestro modelo, la clara inducción de *PAI1* por AO a corto plazo podría contribuir a la migración acelerada sobre el lecho de la herida artificial. A largo plazo, destaca la inducción de un conjunto de genes relacionados también con migración y a su vez con EMT. En el caso del gen de *PAXILINA*, se encontró una ligera inducción en el tratamiento con AO. Si bien esta inducción no pudo verificarse mediante Western Blot, este hecho puede ser coherente con la alta tasa de recambio que estas proteínas sufren durante la migración celular (Turner, 2000). En cuanto a la expresión del gen de la subunidad de integrina beta 6 (*ITGB6*) y el gen de la metaloproteínasa 9 de la matriz (*MMP9*), ambos factores intervienen directamente en la adhesión celular migración y la remodelación tisular que ocurren durante la cicatrización (Breuss et al., 1995; Mohan et al., 2002; Santoro and Gaudino, 2005). De nuevo, la modulación de la expresión génica descrita apoya la conformación de un marco molecular necesario para la reconfiguración del citoesqueleto, la remodelación de la MEC y por tanto, la migración celular y la curación de lesiones epiteliales en células tratadas con AO.

4.3 Reflexiones finales

Durante la reepitelización de las lesiones cutáneas, las células involucradas en la recuperación de la homeostasis tisular precisan integrar de manera espaciotemporal multitud de señales, que regulan actividades esenciales para la división y el movimiento celular en un ambiente hostil como lo es el lecho de una herida. Así, la modificación del dinamismo del esqueleto celular y el ensamblaje/desmontaje continuo de los sitios de adhesión celular facilitan la migración celular, mientras que el fomento de la proliferación facilita la aparición de nuevas células que den consistencia a la nueva cobertura epidérmica. En relación a lo anterior, en esta Tesis Doctoral, se proporcionan evidencias sólidas sobre las capacidades de la MA y el AO para promover la migración de células epiteliales en el contexto del cierre de heridas, proceso que, al tiempo, genera también cambios en la dinámica proliferativa de estas células. De esta manera, ambos elementos, migración y proliferación, contribuyen al rendimiento total del proceso regenerativo y al cierre de la herida en respuesta a estos tratamientos (Figura 12).

En lo concerniente a la MA, se aportan evidencias sobre como la señalización molecular que la exposición a este tejido peri-natal desencadena el reclutamiento al receptor de EGF, determinando la activación de MEK1 y la fosforilación de c-Jun en el borde migratorio, fenómeno que es crucial para el correcto cierre de la herida. Además, nuestros resultados muestran como este proceso se acompaña de una modulación efectiva de la señalización por TGF- β , patente por el descenso de la localización en el núcleo de las R-Smads. Por último, la observación del borde de migración de las células epiteliales tratadas con MA demuestra diferencias morfológicas evidentes en forma de un incremento en los filopodios y lamelipodios en las células en migración (Mayor and Etienne-Manneville, 2016). Estas diferencias se relacionaron con un comportamiento divergente que involucra estructuras citoesqueléticas y adhesiones focales, caracterizado por un incremento en su dinamismo que propicia la capacidad migratoria. En consecuencia, proponemos que, entre otros mecanismos, para generar sus efectos sobre los queratinocitos, la MA libera un cóctel de citoquinas y factores de crecimiento que, al menos en parte, modulando la señalización de TGF- β y estimulando la fosforilación de c-Jun, es capaz de restablecer el proceso de re-epitelialización de las heridas crónicas. Si el fenómeno de la atenuación de la señal TGF- β es la consecuencia de la existencia de

una re-alimentación entre la vía no canónica y los mecanismos migratorios o el resultado de la activación adicional de receptores endógenos o exógenos por parte de la MA, quizás también involucrando a JNK, es algo que será objeto de investigación en el futuro. La aplicación de este conocimiento en la curación de heridas crónicas tiene un potencial impacto positivo en tratamientos futuros y el rendimiento del procedimiento.

En el caso del AO, demostramos cómo, junto con un modesto efecto sobre la actividad proliferativa, este compuesto es capaz de promover la migración de células epiteliales en modelos celulares correspondientes con mucosas, con la participación de mecanismos comunes a aquellos activados por la MA. Estos efectos parecen implicar la participación de la ruta de señalización por EGF, algo que parece estar relacionado con lo descrito para el ácido ursólico. Si bien la activación explícita del receptor de EGF ha quedado contrastada, que esto sea el resultado de una interacción directa del AO con él activándolo, que el AO actúe como facilitador de las interacciones ligando-receptor o que el AO provoque la liberación de factores tróficos potenciando la señalización autocrina son interrogantes que habrá que responder en el futuro. En relación a la última posibilidad, se ha constatado como la señalización molecular desencadenada por el AO conduce al desarrollo de un perfil de expresión génica coherente con la migración y la adquisición de habilidades de remodelación tisular similares a un estatus de EMT. En este punto, de nuevo la señalización dependiente de TGF- β y su relación con la regulación de la EMT abren la posibilidad a continuar profundizando en la investigación sobre las propiedades del AO, conocimiento que puede abrir oportunidades para futuras innovaciones en la síntesis de compuestos para la curación y regeneración de heridas.

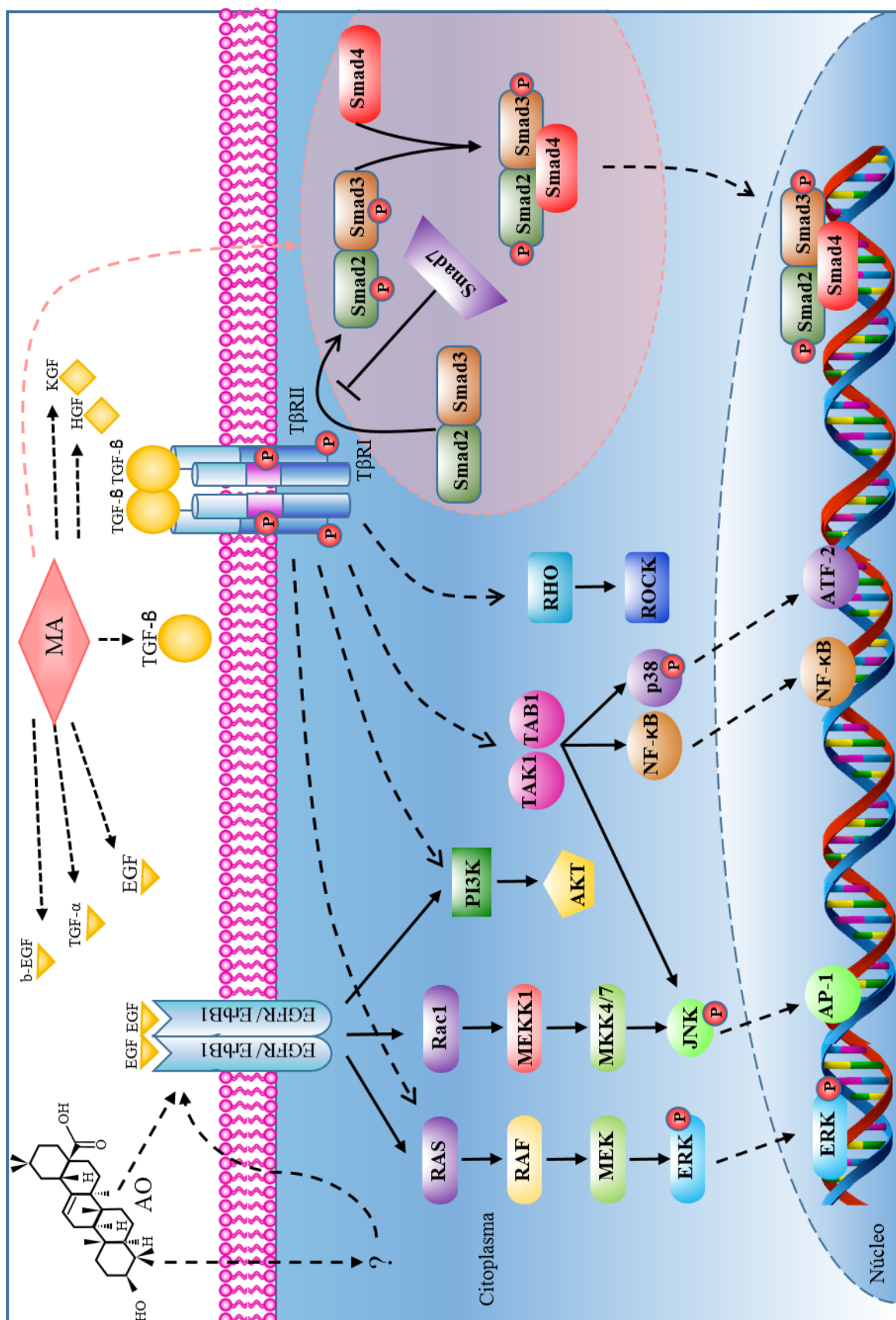


Figura 12: Posibles rutas de señalización del AO y MA.

V. CONCLUSIONES

1. La membrana amniótica y el ácido oleanólico promueven la migración celular mediante la activación de la vía de las MAPK, incluyendo ERK y JNK.
2. Los inhibidores de MEK, JNK y EGF evitan la migración celular inducida por ácido oleanólico y membrana amniótica.
3. El efecto del ácido oleanólico sobre la proliferación celular es independiente de su efecto sobre la migración de las células Mv1Lu y MDA MD231.
4. El ácido oleanólico modifica el perfil de expresión de los genes implicados en la migración celular.
5. El tratamiento con membrana amniótica promueve el remodelado de los focos de adhesión e induce la expresión de Paxilina en las células Mv1Lu y HaCaT.
6. El aumento de los niveles de Paxilina se corresponde con cambios de la dinámica de los complejos focales en las células en migración Mv1Lu y HaCaT.
7. Los cambios en la dinámica de Paxilina inducidos por la membrana amniótica se correlacionan con el aumento de la activación de FAK, la kinasa de adhesión focal en el borde de migración de células HaCaT.
8. La estimulación de la migración celular inducida por la membrana amniótica tiene un componente de señalización de TGF- β basado en la ruta de las Smad en las células Mv1Lu y HaCaT.
9. La membrana amniótica ejerce un efecto atenuador sobre la señalización de TGF- β que contribuye positivamente al hecho migratorio
10. Los efectos del ácido oleanólico están mediados por la activación del receptor de EGF.
11. Smad2 y Smad3 contribuyen de manera diferencial al proceso migratorio estimulado por la membrana amniótica en las células HaCaT.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, N., Maines-Bandiera, S., Quinn, M.A., Unger, W.G., Dedhar, S., and Auersperg, N. (2006). Molecular pathways regulating EGF-induced epithelio-mesenchymal transition in human ovarian surface epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol* 290, C1532-1542.
- Akhurst, R.J., and Hata, A. (2012). Targeting the TGFbeta signalling pathway in disease. *Nat Rev Drug Discov* 11, 790-811.
- Akle, C., McColl, I., Dean, M., Adinolfi, M., Brown, S., Fensom, A.H., Marsh, J., and Welsh, K. (1985). Transplantation of amniotic epithelial membranes in patients with mucopolysaccharidoses. *Experimental and clinical immunogenetics* 2, 43-48.
- Alcaraz, A., Mrowiec, A., Insausti, C.L., Bernabe-Garcia, A., Garcia-Vizcaino, E.M., Lopez-Martinez, M.C., Monfort, A., Izeta, A., Moraleda, J.M., Castellanos, G., *et al.* (2015). Amniotic Membrane Modifies the Genetic Program Induced by TGFs, Stimulating Keratinocyte Proliferation and Migration in Chronic Wounds. *PLoS One* 10, e0135324.
- Alexander, S., Koehl, G.E., Hirschberg, M., Geissler, E.K., and Friedl, P. (2008). Dynamic imaging of cancer growth and invasion: a modified skin-fold chamber model. *Histochem Cell Biol* 130, 1147-1154.
- An, Q., Han, C., Zhou, Y., Li, F., Li, D., Zhang, X., Yu, Z., Duan, Z., and Kan, Q. (2015). In vitro effects of mitomycin C on the proliferation of the non-small-cell lung cancer line A549. *Int J Clin Exp Med* 8, 20516-20523.
- Andreasen, P.A., Egelund, R., and Petersen, H.H. (2000). The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell Mol Life Sci* 57, 25-40.
- Angel, P., Szabowski, A., and Schorpp-Kistner, M. (2001). Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology. *Oncogene* 20, 2413-2423.
- Ashcroft, G.S., and Roberts, A.B. (2000). Loss of Smad3 modulates wound healing. *Cytokine Growth Factor Rev* 11, 125-131.
- Ashcroft, G.S., Yang, X., Glick, A.B., Weinstein, M., Letterio, J.L., Mizel, D.E., Anzano, M., Greenwell-Wild, T., Wahl, S.M., Deng, C., *et al.* (1999). Mice lacking Smad3

show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response. *Nature cell biology* 1, 260-266.

Astudillo, L., Rodriguez, J.A., and Schmeda-Hirschmann, G. (2002). Gastroprotective activity of oleanolic acid derivatives on experimentally induced gastric lesions in rats and mice. *J Pharm Pharmacol* 54, 583-588.

Ayello, E.A., and Cuddigan, J.E. (2004). Debridement: controlling the necrotic/cellular burden. *Adv Skin Wound Care* 17, 66-75; quiz 76-68.

Banno, N., Akihisa, T., Tokuda, H., Yasukawa, K., Higashihara, H., Ukiya, M., Watanabe, K., Kimura, Y., Hasegawa, J., and Nishino, H. (2004). Triterpene acids from the leaves of *Perilla frutescens* and their anti-inflammatory and antitumor-promoting effects. *Biosci Biotechnol Biochem* 68, 85-90.

Baradaran-Rafii, A., Aghayan, H.R., Arjmand, B., and Javadi, M.A. (2007). Amniotic Membrane Transplantation. *IRANIAN JOURNAL OF OPHTHALMIC RESEARCH* 2, 58-75.

Baroni, A., Buommino, E., De Gregorio, V., Ruocco, E., Ruocco, V., and Wolf, R. (2012). Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clinics in dermatology* 30, 257-262.

Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M.S., Brem, H., and Tomic-Canic, M. (2008). Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen* 16, 585-601.

Baskovich, B., Sampson, E.M., Schultz, G.S., and Parnell, L.K. (2008). Wound dressing components degrade proteins detrimental to wound healing. *Int Wound J* 5, 543-551.

Bax, N.A., Pijnappels, D.A., van Oorschot, A.A., Winter, E.M., de Vries, A.A., van Tuyn, J., Braun, J., Maas, S., Schalijs, M.J., Atsma, D.E., *et al.* (2011). Epithelial-to-mesenchymal transformation alters electrical conductivity of human epicardial cells. *J Cell Mol Med* 15, 2675-2683.

Bello, Y.M., and Phillips, T.J. (2000). Recent advances in wound healing. *JAMA* 283, 716-718.

- Berlanga-Acosta, J., Fernandez-Montequin, J., Valdes-Perez, C., Savigne-Gutierrez, W., Mendoza-Mari, Y., Garcia-Ojalvo, A., Falcon-Cama, V., Garcia Del Barco-Herrera, D., Fernandez-Mayola, M., Perez-Saad, H., *et al.* (2017). Diabetic Foot Ulcers and Epidermal Growth Factor: Revisiting the Local Delivery Route for a Successful Outcome. *Biomed Res Int* 2017, 2923759.
- Boettiger, D. (2012). Mechanical control of integrin-mediated adhesion and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 24, 592-599.
- Bohjanen, K. (2013). Structure and Functions of the Skin. In *Clinical Dermatology*, M.K.H. Carol Soutor, ed. (McGraw-Hill Education), p. 15.
- Borena, B.M., Martens, A., Broeckx, S.Y., Meyer, E., Chiers, K., Duchateau, L., and Spaas, J.H. (2015). Regenerative Skin Wound Healing in Mammals: State-of-the-Art on Growth Factor and Stem Cell Based Treatments. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 36, 1-23.
- Boulton, T.G., Yancopoulos, G.D., Gregory, J.S., Slaughter, C., Moomaw, C., Hsu, J., and Cobb, M.H. (1990). An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science* 249, 64-67.
- Bourguignon, L.Y. (2014). Matrix hyaluronan-activated CD44 signaling promotes keratinocyte activities and improves abnormal epidermal functions. *Am J Pathol* 184, 1912-1919.
- Bourne, G. (1962). The foetal membranes. A review of the anatomy of normal amnion and chorion and some aspects of their function. *Postgraduate medical journal* 38, 193-201.
- Brandt, F.T., Albuquerque, C.D., and Lorenzato, F.R. (2000). Female urethral reconstruction with amnion grafts. *International journal of surgical investigation* 1, 409-414.
- Breuss, J.M., Gallo, J., DeLisser, H.M., Klimanskaya, I.V., Folkesson, H.G., Pittet, J.F., Nishimura, S.L., Aldape, K., Landers, D.V., Carpenter, W., *et al.* (1995).

Expression of the beta 6 integrin subunit in development, neoplasia and tissue repair suggests a role in epithelial remodeling. *J Cell Sci* 108 (Pt 6), 2241-2251.

Brown, G.L., Nanney, L.B., Griffen, J., Cramer, A.B., Yancey, J.M., Curtsinger, L.J., 3rd, Holtzin, L., Schultz, G.S., Jurkiewicz, M.J., and Lynch, J.B. (1989). Enhancement of wound healing by topical treatment with epidermal growth factor. *N Engl J Med* 321, 76-79.

Brown, K.A., Pietenpol, J.A., and Moses, H.L. (2007). A tale of two proteins: differential roles and regulation of Smad2 and Smad3 in TGF-beta signaling. *J Cell Biochem* 101, 9-33.

Cargnello, M., and Roux, P.P. (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 75, 50-83.

Carisey, A., and Ballestrem, C. (2011). Vinculin, an adapter protein in control of cell adhesion signalling. *Eur J Cell Biol* 90, 157-163.

Castellanos, G., Bernabe-Garcia, A., Moraleda, J.M., and Nicolas, F.J. (2017). Amniotic membrane application for the healing of chronic wounds and ulcers. *Placenta* 59, 146-153.

Cazzalini, O., Scovassi, A.I., Savio, M., Stivala, L.A., and Prosperi, E. (2010). Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21(CDKN1A) in the DNA damage response. *Mutat Res* 704, 12-20.

Ciobanasu, C., Faivre, B., and Le Clainche, C. (2014). Actomyosin-dependent formation of the mechanosensitive talin-vinculin complex reinforces actin anchoring. *Nat Commun* 5, 3095.

Clark, R.A.F. (1996). Wound repair. Overview and general considerations. In *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*, R.A.F. Clark, ed. (New York, Plenum Press), pp. 3-50.

Cole, G.W., Jr., Alleva, A.M., Reddy, R.M., Maxhimer, J.B., Zuo, J., Schrump, D.S., and Nguyen, D.M. (2005). The selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor PD153035 suppresses expression of prometastasis phenotypes in

- malignant pleural mesothelioma cells in vitro. *J Thorac Cardiovasc Surg* 129, 1010-1017.
- Cook, H., Davies, K.J., Harding, K.G., and Thomas, D.W. (2000). Defective extracellular matrix reorganization by chronic wound fibroblasts is associated with alterations in TIMP-1, TIMP-2, and MMP-2 activity. *J Invest Dermatol* 115, 225-233.
- Cooper, D.M., Yu, E.Z., Hennessey, P., Ko, F., and Robson, M.C. (1994). Determination of endogenous cytokines in chronic wounds. *Ann Surg* 219, 688-691; discussion 691-682.
- Czekay, R.-P., Wilkins-Port, C.E., Higgins, S.P., Freytag, J., Overstreet, J.M., Klein, R.M., Higgins, C.E., Samarakoon, R., and Higgins, P.J. (2011). PAI-1: An Integrator of Cell Signaling and Migration. *International Journal of Cell Biology* 2011, 1-9.
- Chang, L., Jones, Y., Ellisman, M.H., Goldstein, L.S., and Karin, M. (2003). JNK1 is required for maintenance of neuronal microtubules and controls phosphorylation of microtubule-associated proteins. *Dev Cell* 4, 521-533.
- Chen, Z., Gibson, T.B., Robinson, F., Silvestro, L., Pearson, G., Xu, B., Wright, A., Vanderbilt, C., and Cobb, M.H. (2001). MAP kinases. *Chem Rev* 101, 2449-2476.
- Dabiri, B.E., Lee, H., and Parker, K.K. (2012). A potential role for integrin signaling in mechanoelectrical feedback. *Prog Biophys Mol Biol* 110, 196-203.
- Davies, M., Robinson, M., Smith, E., Huntley, S., Prime, S., and Paterson, I. (2005). Induction of an epithelial to mesenchymal transition in human immortal and malignant keratinocytes by TGF-beta1 involves MAPK, Smad and AP-1 signalling pathways. *Journal of cellular biochemistry* 95, 918-931.
- Davis, J.S. (1910). A method of splinting skin grafts. *Bulletin of The Johns Hopkins Hospital, Skin transplantation* 21, 44.
- Deak, M., Clifton, A.D., Lucocq, L.M., and Alessi, D.R. (1998). Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *EMBO J* 17, 4426-4441.

- Demidova-Rice, T.N., Hamblin, M.R., and Herman, I.M. (2012). Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 2: role of growth factors in normal and pathological wound healing: therapeutic potential and methods of delivery. *Advances in Skin & Wound Care* 25, 349-370.
- Derijard, B., Hibi, M., Wu, I.H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M., and Davis, R.J. (1994). JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 76, 1025-1037.
- DiMilla, P.A., Stone, J.A., Quinn, J.A., Albelda, S.M., and Lauffenburger, D.A. (1993). Maximal migration of human smooth muscle cells on fibronectin and type IV collagen occurs at an intermediate attachment strength. *J Cell Biol* 122, 729-737.
- DiPietro, L.A., and Polverini, P.J. (1993). Role of the macrophage in the positive and negative regulation of wound neovascularization. *Behring Inst Mitt*, 238-247.
- Diz-Munoz, A., Krieg, M., Bergert, M., Ibarlucea-Benitez, I., Muller, D.J., Paluch, E., and Heisenberg, C.P. (2010). Control of directed cell migration in vivo by membrane-to-cortex attachment. *PLoS Biol* 8, e1000544.
- Draper, B.K., Komurasaki, T., Davidson, M.K., and Nanney, L.B. (2003). Epiregulin is more potent than EGF or TGF α in promoting in vitro wound closure due to enhanced ERK/MAPK activation. *J Cell Biochem* 89, 1126-1137.
- Dua, H.S., Gomes, J.A.P., King, A.J., and Maharajan, V.S. (2004). The amniotic membrane in ophthalmology. *Survey of Ophthalmology* 49, 51-77.
- Dumbauld, D.W., Lee, T.T., Singh, A., Scrimgeour, J., Gersbach, C.A., Zamir, E.A., Fu, J., Chen, C.S., Curtis, J.E., Craig, S.W., *et al.* (2013). How vinculin regulates force transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 9788-9793.
- Edwards, R., and Harding, K.G. (2004). Bacteria and wound healing. *Curr Opin Infect Dis* 17, 91-96.
- Eming, S.A., Krieg, T., and Davidson, J.M. (2007). Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *The Journal of investigative dermatology* 127, 514-525.

- Enoch, S., and Price, P. (2004). Cellular, molecular and biochemical differences in the pathophysiology of healing between acute wounds, chronic wounds and wounds in the aged. *World Wide Wounds*, 1-16.
- Etienne-Manneville, S. (2011). Control of polarized cell morphology and motility by adherens junctions. *Semin Cell Dev Biol* 22, 850-857.
- Etienne-Manneville, S. (2012). Adherens junctions during cell migration. *Subcell Biochem* 60, 225-249.
- Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2001). Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKC ζ . *Cell* 106, 489-498.
- Faulk, W.P., Matthews, R., Stevens, P.J., Bennett, J.P., Burgos, H., and Hsi, B.L. (1980). Human amnion as an adjunct in wound healing. *Lancet* 1, 1156-1158.
- Finnsen, K.W., McLean, S., Di Guglielmo, G.M., and Philip, A. (2013). Dynamics of Transforming Growth Factor Beta Signaling in Wound Healing and Scarring. *Advances in wound care* 2, 195-214.
- Fishman, I.J., Flores, F.N., Scott, F.B., Spjut, H.J., and Morrow, B. (1987). Use of fresh placental membranes for bladder reconstruction. *J Urol* 138, 1291-1294.
- Fitsialos, G., Chassot, A.A., Turchi, L., Dayem, M.A., LeBrigand, K., Moreilhon, C., Meneguzzi, G., Busca, R., Mari, B., Barbry, P., *et al.* (2007). Transcriptional Signature of Epidermal Keratinocytes Subjected to in Vitro Scratch Wounding Reveals Selective Roles for ERK1/2, p38, and Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling Pathways. *Journal of Biological Chemistry* 282, 15090-15102.
- Friedl, P., and Gilmour, D. (2009). Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 445-457.
- Frodin, M., and Gammeltoft, S. (1999). Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. *Molecular and cellular endocrinology* 151, 65-77.
- Frykberg, R.G., and Banks, J. (2015). Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. *Advances in wound care* 4, 560-582.

- Fujiwara, Y., Komohara, Y., Kudo, R., Tsurushima, K., Ohnishi, K., Ikeda, T., and Takeya, M. (2011). Oleanolic acid inhibits macrophage differentiation into the M2 phenotype and glioblastoma cell proliferation by suppressing the activation of STAT3. *Oncol Rep* 26, 1533-1537.
- Fukunaga, R., and Hunter, T. (1997). MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates. *EMBO J* 16, 1921-1933.
- Fukushima, E.O., Seki, H., Ohyama, K., Ono, E., Umemoto, N., Mizutani, M., Saito, K., and Muranaka, T. (2011). CYP716A subfamily members are multifunctional oxidases in triterpenoid biosynthesis. *Plant Cell Physiol* 52, 2050-2061.
- Gajiwala, K., and Lobo Gajiwala, A. (2003). Use of Banked Tissue in Plastic Surgery. *Cell Tissue Banking* 4, 141-146.
- Gangnuss, S., Cowin, A.J., Daehn, I.S., Hatzirodos, N., Rothnagel, J.A., Varelias, A., and Rayner, T.E. (2004). Regulation of MAPK activation, AP-1 transcription factor expression and keratinocyte differentiation in wounded fetal skin. *J Invest Dermatol* 122, 791-804.
- Gardel, M.L., Sabass, B., Ji, L., Danuser, G., Schwarz, U.S., and Waterman, C.M. (2008). Traction stress in focal adhesions correlates biphasically with actin retrograde flow speed. *J Cell Biol* 183, 999-1005.
- Gdalyahu, A., Ghosh, I., Levy, T., Sapir, T., Sapoznik, S., Fishler, Y., Azoulai, D., and Reiner, O. (2004). DCX, a new mediator of the JNK pathway. *EMBO J* 23, 823-832.
- Geh, E., Meng, Q., Mongan, M., Wang, J., Takatori, A., Zheng, Y., Puga, A., Lang, R.A., and Xia, Y. (2011). Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 (MAP3K1) integrates developmental signals for eyelid closure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Georgy, M., and Aziz, N. (1996). Vaginoplasty using amnion graft: new surgical technique using the laparoscopic transillumination light. *Journal of Obstetrics & Gynecology* 16, 262-264.

- Ghosh, A.K., and Vaughan, D.E. (2011). PAI-1 in Tissue Fibrosis. *Journal of Cellular Physiology*, n/a-n/a.
- Glading, A., Bodnar, R.J., Reynolds, I.J., Shiraha, H., Satish, L., Potter, D.A., Blair, H.C., and Wells, A. (2004). Epidermal growth factor activates m-calpain (calpain II), at least in part, by extracellular signal-regulated kinase-mediated phosphorylation. *Mol Cell Biol* 24, 2499-2512.
- Granick, M., Boykin, J., Gamelli, R., Schultz, G., and Tenenhaus, M. (2006). Toward a common language: surgical wound bed preparation and debridement. *Wound Repair Regen* 14 Suppl 1, S1-10.
- Grinnell, F. (1994). Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. *J Cell Biol* 124, 401-404.
- Guo, G., Yao, W., Zhang, Q., and Bo, Y. (2013). Oleanolic acid suppresses migration and invasion of malignant glioma cells by inactivating MAPK/ERK signaling pathway. *PLoS One* 8, e72079.
- Haase, I., Evans, R., Pofahl, R., and Watt, F.M. (2003). Regulation of keratinocyte shape, migration and wound epithelialization by IGF-1- and EGF-dependent signalling pathways. *J Cell Sci* 116, 3227-3238.
- Hameedalddeen, A., Liu, J., Batres, A., Graves, G.S., and Graves, D.T. (2014). FOXO1, TGF-beta regulation and wound healing. *Int J Mol Sci* 15, 16257-16269.
- Han, X., Stewart, J.E., Jr., Bellis, S.L., Benveniste, E.N., Ding, Q., Tachibana, K., Grammer, J.R., and Gladson, C.L. (2001). TGF-beta1 up-regulates paxillin protein expression in malignant astrocytoma cells: requirement for a fibronectin substrate. *Oncogene* 20, 7976-7986.
- Hardwicke, J., Schmaljohann, D., Boyce, D., and Thomas, D. (2008). Epidermal growth factor therapy and wound healing--past, present and future perspectives. *Surgeon* 6, 172-177.

- Harris, I.R., Yee, K.C., Walters, C.E., Cunliffe, W.J., Kearney, J.N., Wood, E.J., and Ingham, E. (1995). Cytokine and protease levels in healing and non-healing chronic venous leg ulcers. *Exp Dermatol* 4, 342-349.
- Hashimoto, K. (2000). Regulation of keratinocyte function by growth factors. *J Dermatol Sci 24 Suppl 1*, S46-50.
- Heldin, C.H., and Moustakas, A. (2012). Role of Smads in TGFbeta signaling. *Cell Tissue Res* 347, 21-36.
- Henriksen, L., Grandal, M.V., Knudsen, S.L., van Deurs, B., and Grovdal, L.M. (2013). Internalization mechanisms of the epidermal growth factor receptor after activation with different ligands. *PLoS One* 8, e58148.
- Higashiyama, S., Iwabuki, H., Morimoto, C., Hieda, M., Inoue, H., and Matsushita, N. (2008). Membrane-anchored growth factors, the epidermal growth factor family: beyond receptor ligands. *Cancer Sci* 99, 214-220.
- Hill, C.S., and Treisman, R. (1995). Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell* 80, 199-211.
- Hough, C., Radu, M., and Dore, J.J. (2012). Tgf-beta induced Erk phosphorylation of smad linker region regulates smad signaling. *PLoS One* 7, e42513.
- Hu, Y.L., Lu, S., Szeto, K.W., Sun, J., Wang, Y., Lasheras, J.C., and Chien, S. (2014). FAK and paxillin dynamics at focal adhesions in the protrusions of migrating cells. *Scientific reports* 4, 6024.
- Huang, C., Jacobson, K., and Schaller, M.D. (2004). MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci* 117, 4619-4628.
- Huang, C., Rajfur, Z., Borchers, C., Schaller, M.D., and Jacobson, K. (2003). JNK phosphorylates paxillin and regulates cell migration. *Nature* 424, 219-223.
- Huang, R.Y., Guilford, P., and Thiery, J.P. (2012). Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci* 125, 4417-4422.

- Huang, Z., Yan, D.P., and Ge, B.X. (2008). JNK regulates cell migration through promotion of tyrosine phosphorylation of paxillin. *Cell Signal* 20, 2002-2012.
- Hudson, L.G., Newkirk, K.M., Chandler, H.L., Choi, C., Fossey, S.L., Parent, A.E., and Kusewitt, D.F. (2009). Cutaneous wound reepithelialization is compromised in mice lacking functional Slug (Snai2). *Journal of Dermatological Science* 56, 19-26.
- Hunger-Glaser, I., Salazar, E.P., Sinnett-Smith, J., and Rozengurt, E. (2003). Bombesin, lysophosphatidic acid, and epidermal growth factor rapidly stimulate focal adhesion kinase phosphorylation at Ser-910: requirement for ERK activation. *J Biol Chem* 278, 22631-22643.
- Insausti, C.L., Alcaraz, A., Garcia-Vizcaino, E.M., Mrowiec, A., Lopez-Martinez, M.C., Blanquer, M., Pinero, A., Majado, M.J., Moraleda, J.M., Castellanos, G., *et al.* (2010a). Amniotic membrane induces epithelialization in massive posttraumatic wounds. *Wound Repair Regen* 18, 368-377.
- Insausti, C.L., Blanquer, M., Bleda, P., Iniesta, P., Majado, M.J., Castellanos, G., and Moraleda, J.M. (2010b). The amniotic membrane as a source of stem cells. *Histol Histopathol* 25, 91-98.
- Insausti, C.L., Moraleda, J.M., Castellanos, G., and Nicolas, F.J. (2016). The Human Placenta in Wound Healing: Historical and Current Approaches. In *Placenta The Tree of Life*, O. Parolini, and A.R. Silini, eds. (Boca Raton, CRC Press), pp. 49-68.
- Ishibe, S., Joly, D., Zhu, X., and Cantley, L.G. (2003). Phosphorylation-dependent paxillin-ERK association mediates hepatocyte growth factor-stimulated epithelial morphogenesis. *Molecular cell* 12, 1275-1285.
- Ito, Y., Sarkar, P., Mi, Q., Wu, N., Bringas, P., Liu, Y., Reddy, S., Maxson, R., Deng, C., and Chai, Y. (2001). Overexpression of Smad2 reveals its concerted action with Smad4 in regulating TGF-beta-mediated epidermal homeostasis. *Dev Biol* 236, 181-194.
- Javelaud, D. (2003). Disruption of Basal JNK Activity Differentially Affects Key Fibroblast Functions Important for Wound Healing. *Journal of Biological Chemistry* 278, 24624-24628.

- Jinno, K., Takahashi, T., Tsuchida, K., Tanaka, E., and Moriyama, K. (2009). Acceleration of palatal wound healing in Smad3-deficient mice. *Journal of dental research* 88, 757-761.
- Johnson, G.L., and Lapadat, R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298, 1911-1912.
- Jorissen, R.N., Walker, F., Pouliot, N., Garrett, T.P., Ward, C.W., and Burgess, A.W. (2003). Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res* 284, 31-53.
- Kalluri, R., and Weinberg, R.A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119, 1420-1428.
- Kanchanawong, P., Shtengel, G., Pasapera, A.M., Ramko, E.B., Davidson, M.W., Hess, H.F., and Waterman, C.M. (2010). Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature* 468, 580-584.
- Kasote, D., Ahmad, A., and Viljoen, A. (2015). Chapter 6 - Proangiogenic Potential of Medicinal Plants in Wound Healing A2 - Mukherjee, Pulok K. In *Evidence-Based Validation of Herbal Medicine* (Boston, Elsevier), pp. 149-164.
- Katholnig, K., Kaltenecker, C.C., Hayakawa, H., Rosner, M., Lassnig, C., Zlabinger, G.J., Gaestel, M., Muller, M., Hengstschlager, M., Horl, W.H., *et al.* (2013). p38alpha senses environmental stress to control innate immune responses via mechanistic target of rapamycin. *J Immunol* 190, 1519-1527.
- Kim, E.K., and Choi, E.J. (2010). Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 1802, 396-405.
- Kim, J.S., Bak, E.J., Lee, B.C., Kim, Y.S., Park, J.B., and Choi, I.G. (2011). Neuregulin induces HaCaT keratinocyte migration via Rac1-mediated NADPH-oxidase activation. *J Cell Physiol* 226, 3014-3021.
- Kim, Y.S., Lew, D.H., Tark, K.C., Rah, D.K., and Hong, J.P. (2010). Effect of recombinant human epidermal growth factor against cutaneous scar formation in murine full-thickness wound healing. *J Korean Med Sci* 25, 589-596.

- Kiyohara, Y., Komada, F., Iwakawa, S., Fuwa, T., and Okumura, K. (1993a). Systemic effects of epidermal growth factor (EGF) ointment containing protease inhibitor or gelatin in rats with burns or open wounds. *Biol Pharm Bull* 16, 73-76.
- Kiyohara, Y., Komada, F., Iwakawa, S., Hirai, M., Fuwa, T., and Okumura, K. (1991). Improvement in wound healing by epidermal growth factor (EGF) ointment. II. Effect of protease inhibitor, nafamostat, on stabilization and efficacy of EGF in burn. *J Pharmacobiodyn* 14, 47-52.
- Kiyohara, Y., Nishiguchi, K., Komada, F., Iwakawa, S., Hirai, M., and Okumura, K. (1993b). Cytoprotective effects of epidermal growth factor (EGF) ointment containing nafamostat, a protease inhibitor, on tissue damage at burn sites in rats. *Biol Pharm Bull* 16, 1146-1149.
- Klaassen, C.D., and Reisman, S.A. (2010). Nrf2 the rescue: effects of the antioxidative/electrophilic response on the liver. *Toxicology and applied pharmacology* 244, 57-65.
- Klemke, R.L., Cai, S., Giannini, A.L., Gallagher, P.J., de Lanerolle, P., and Cheresch, A.D. (1997a). Regulation of Cell Motility by Mitogen-activated Protein Kinase. *The Journal of Cell Biology* 137, 481-492.
- Klemke, R.L., Cai, S., Giannini, A.L., Gallagher, P.J., de Lanerolle, P., and Cheresch, D.A. (1997b). Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J Cell Biol* 137, 481-492.
- Koh, T.J., and DiPietro, L.A. (2011). Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert Rev Mol Med* 13, e23.
- Kruse, F.E., Joussen, A.M., Rohrschneider, K., You, L., Sinn, B., Baumann, J., and Volcker, H.E. (2000). Cryopreserved human amniotic membrane for ocular surface reconstruction. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 238, 68-75.

- Kunkel, S.L., Standiford, T., Kasahara, K., and Strieter, R.M. (1991). Stimulus specific induction of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) gene expression. *Adv Exp Med Biol* 305, 65-71.
- Kuonen, R., Weissenstein, U., Urech, K., Kunz, M., Hostanska, K., Estko, M., Heusser, P., and Baumgartner, S. (2013). Effects of Lipophilic Extract of *Viscum album* L. and Oleanolic Acid on Migratory Activity of NIH/3T3 Fibroblasts and on HaCat Keratinocytes. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013, 718105.
- Kyriakis, J.M., and Avruch, J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81, 807-869.
- Kyriakis, J.M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E.A., Ahmad, M.F., Avruch, J., and Woodgett, J.R. (1994). The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases. *Nature* 369, 156-160.
- Lamouille, S., Xu, J., and Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 178-196.
- Larsen, M., Tremblay, M.L., and Yamada, K.M. (2003). Phosphatases in cell-matrix adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 700-711.
- Laszczyk, M.N. (2009). Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy. *Planta medica* 75, 1549-1560.
- Lauffenburger, D.A., and Horwitz, A.F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84, 359-369.
- Leaper, D.J., Schultz, G., Carville, K., Fletcher, J., Swanson, T., and Drake, R. (2012). Extending the TIME concept: what have we learned in the past 10 years?(*). *Int Wound J* 9 Suppl 2, 1-19.
- Lee, S.H., and Tseng, S.C. (1997). Amniotic membrane transplantation for persistent epithelial defects with ulceration. *Am J Ophthalmol* 123, 303-312.
- Lee, Y.J., Park, S.J., Ciccone, S.L., Kim, C.R., and Lee, S.H. (2006). An in vivo analysis of MMC-induced DNA damage and its repair. *Carcinogenesis* 27, 446-453.

-
- Li, G., Gustafson-Brown, C., Hanks, S.K., Nason, K., Arbeit, J.M., Pogliano, K., Wisdom, R.M., and Johnson, R.S. (2003). c-Jun is essential for organization of the epidermal leading edge. *Dev Cell* 4, 865-877.
- Li, H.F., Wang, X.A., Xiang, S.S., Hu, Y.P., Jiang, L., Shu, Y.J., Li, M.L., Wu, X.S., Zhang, F., Ye, Y.Y., *et al.* (2015). Oleanolic acid induces mitochondrial-dependent apoptosis and G0/G1 phase arrest in gallbladder cancer cells. *Drug Des Devel Ther* 9, 3017-3030.
- Li, J., Chen, J., and Kirsner, R. (2007). Pathophysiology of acute wound healing. *Clinics in dermatology* 25, 9-18.
- Li, X., Song, Y., Zhang, P., Zhu, H., Chen, L., Xiao, Y., and Xing, Y. (2016). Oleanolic acid inhibits cell survival and proliferation of prostate cancer cells in vitro and in vivo through the PI3K/Akt pathway. *Tumour Biol* 37, 7599-7613.
- Li, Y., Fan, J., Chen, M., Li, W., and Woodley, D.T. (2006). Transforming growth factor- α : a major human serum factor that promotes human keratinocyte migration. *J Invest Dermatol* 126, 2096-2105.
- Liu, J. (1995). Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J Ethnopharmacol* 49, 57-68.
- Liu, J. (2005). Oleanolic acid and ursolic acid: research perspectives. *J Ethnopharmacol* 100, 92-94.
- Liu, X., Hubchak, S.C., Browne, J.A., and Schnaper, H.W. (2014). Epidermal growth factor inhibits transforming growth factor-beta-induced fibrogenic differentiation marker expression through ERK activation. *Cell Signal* 26, 2276-2283.
- Lo, H.W., Hsu, S.C., Xia, W., Cao, X., Shih, J.Y., Wei, Y., Abbruzzese, J.L., Hortobagyi, G.N., and Hung, M.C. (2007). Epidermal growth factor receptor cooperates with signal transducer and activator of transcription 3 to induce epithelial-mesenchymal transition in cancer cells via up-regulation of TWIST gene expression. *Cancer Res* 67, 9066-9076.

- Lopez-Colome, A.M., Lee-Rivera, I., Benavides-Hidalgo, R., and Lopez, E. (2017). Paxillin: a crossroad in pathological cell migration. *J Hematol Oncol* 10, 50.
- Lorenz, H.P., and Longaker, M. (2003). Wounds: Biology, Pathology, and Management. In *Essential Practice of Surgery* (Springer New York), pp. 77-88.
- Lu, Z., Ghosh, S., Wang, Z., and Hunter, T. (2003). Downregulation of caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of beta-catenin, and enhanced tumor cell invasion. *Cancer Cell* 4, 499-515.
- Lucio, K.A., Rocha Gda, G., Moncao-Ribeiro, L.C., Fernandes, J., Takiya, C.M., and Gattass, C.R. (2011). Oleanolic acid initiates apoptosis in non-small cell lung cancer cell lines and reduces metastasis of a B16F10 melanoma model in vivo. *PLoS One* 6, e28596.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., and Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79, 727-747.
- Marinkovich, M.P., Keene, D.R., Rimberg, C.S., and Burgeson, R.E. (1993). Cellular origin of the dermal-epidermal basement membrane. *Dev Dyn* 197, 255-267.
- Martinelli, E., De Palma, R., Orditura, M., De Vita, F., and Ciardiello, F. (2009). Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in cancer therapy. *Clin Exp Immunol* 158, 1-9.
- Massague, J. (1999). Wounding Smad. *Nature cell biology* 1, E117-119.
- Matsuda, H., Li, Y., Murakami, T., Yamahara, J., and Yoshikawa, M. (1998). Protective effects of oleanolic acid oligoglycosides on ethanol- or indomethacin-induced gastric mucosal lesions in rats. *Life Sci* 63, PL245-250.
- Mauviel, A., Chung, K.Y., Agarwal, A., Tamai, K., and Uitto, J. (1996). Cell-specific induction of distinct oncogenes of the Jun family is responsible for differential regulation of collagenase gene expression by transforming growth factor-beta in fibroblasts and keratinocytes. *J Biol Chem* 271, 10917-10923.
- Mayor, R., and Etienne-Manneville, S. (2016). The front and rear of collective cell migration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17, 97-109.

- McCarty, S.M., and Percival, S.L. (2013). Proteases and Delayed Wound Healing. *Advances in wound care* 2, 438-447.
- Mermet, I., Pottier, N., Sainthillier, J.M., Malugani, C., Cairey-Remonnay, S., Maddens, S., Riethmuller, D., Tiberghien, P., Humbert, P., and Aubin, F. (2007). Use of amniotic membrane transplantation in the treatment of venous leg ulcers. *Wound Repair Regen* 15, 459-464.
- Metelmann, H.R., Brandner, J., Schumann, H., Bross, F., Hoffmann, M., and Podmelle, F. (2012). Accelerating the aesthetic benefit of wound healing by triterpene. *J Craniomaxillofac Surg* 40, e150-154.
- Mierke, C.T. (2009). The role of vinculin in the regulation of the mechanical properties of cells. *Cell biochemistry and biophysics* 53, 115-126.
- Miki, T., and Strom, S.C. (2006). Amnion-derived pluripotent/multipotent stem cells. *Stem Cell Rev* 2, 133-142.
- Minden, A., Lin, A., Claret, F.X., Abo, A., and Karin, M. (1995). Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell* 81, 1147-1157.
- Mitra, S.K., Hanson, D.A., and Schlaepfer, D.D. (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 56-68.
- Mohan, R., Chintala, S.K., Jung, J.C., Villar, W.V., McCabe, F., Russo, L.A., Lee, Y., McCarthy, B.E., Wollenberg, K.R., Jester, J.V., *et al.* (2002). Matrix metalloproteinase gelatinase B (MMP-9) coordinates and effects epithelial regeneration. *J Biol Chem* 277, 2065-2072.
- Mori, R., Tanaka, K., de Kerckhove, M., Okamoto, M., Kashiya, K., Kim, S., Kawata, T., Komatsu, T., Park, S., Ikematsu, K., *et al.* (2014). Reduced FOXO1 expression accelerates skin wound healing and attenuates scarring. *Am J Pathol* 184, 2465-2479.
- Morton, K.E., and Dewhurst, C.J. (1986). Human amnion in the treatment of vaginal malformations. *British journal of obstetrics and gynaecology* 93, 50-54.

- Moura-Letts, G., Villegas, L.F., Marçalo, A., Vaisberg, A.J., and Hammond, G.B. (2006). In vivo wound-healing activity of oleanolic acid derived from the acid hydrolysis of *Anredera diffusa*. *Journal of natural products* 69, 978-979.
- Moustakas, A., and Heldin, C.H. (2005). Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci* 118, 3573-3584.
- Mu, Y., Gudey, S.K., and Landstrom, M. (2012). Non-Smad signaling pathways. *Cell Tissue Res* 347, 11-20.
- Nanney, L.B., McKanna, J.A., Stoscheck, C.M., Carpenter, G., and King, L.E. (1984). Visualization of epidermal growth factor receptors in human epidermis. *J Invest Dermatol* 82, 165-169.
- Navarro, C., Nola, S., Audebert, S., Santoni, M.J., Arsanto, J.P., Ginestier, C., Marchetto, S., Jacquemier, J., Isnardon, D., Le Bivic, A., *et al.* (2005). Junctional recruitment of mammalian Scribble relies on E-cadherin engagement. *Oncogene* 24, 4330-4339.
- Nemethova, M., Auinger, S., and Small, J.V. (2008). Building the actin cytoskeleton: filopodia contribute to the construction of contractile bundles in the lamella. *J Cell Biol* 180, 1233-1244.
- Nicolas, F.J., De Bosscher, K., Schmierer, B., and Hill, C.S. (2004). Analysis of Smad nucleocytoplasmic shuttling in living cells. *J Cell Sci* 117, 4113-4125.
- Nicolas, F.J., and Hill, C.S. (2003). Attenuation of the TGF-beta-Smad signaling pathway in pancreatic tumor cells confers resistance to TGF-beta-induced growth arrest. *Oncogene* 22, 3698-3711.
- Normanno, N., Bianco, C., De Luca, A., and Salomon, D.S. (2001). The role of EGF-related peptides in tumor growth. *Front Biosci* 6, D685-707.
- Normanno, N., De Luca, A., Bianco, C., Strizzi, L., Mancino, M., Maiello, M.R., Carotenuto, A., De Feo, G., Caponigro, F., and Salomon, D.S. (2006). Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* 366, 2-16.

- Oktay, M., Wary, K.K., Dans, M., Birge, R.B., and Giancotti, F.G. (1999). Integrin-mediated activation of focal adhesion kinase is required for signaling to Jun NH2-terminal kinase and progression through the G1 phase of the cell cycle. *J Cell Biol* 145, 1461-1469.
- Otto, I.M., Raabe, T., Rennefahrt, U.E., Bork, P., Rapp, U.R., and Kerkhoff, E. (2000). The p150-Spir protein provides a link between c-Jun N-terminal kinase function and actin reorganization. *Curr Biol* 10, 345-348.
- Ovesna, Z., Kozics, K., and Slamenova, D. (2006). Protective effects of ursolic acid and oleanolic acid in leukemic cells. *Mutat Res* 600, 131-137.
- Papakonstantinou, E., Aletras, A.J., Roth, M., Tamm, M., and Karakiulakis, G. (2003). Hypoxia modulates the effects of transforming growth factor-beta isoforms on matrix-formation by primary human lung fibroblasts. *Cytokine* 24, 25-35.
- Parolini, O., Alviano, F., Bagnara, G.P., Bilic, G., Buhning, H.J., Evangelista, M., Hennerbichler, S., Liu, B., Magatti, M., Mao, N., *et al.* (2008). Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells* 26, 300-311.
- Parolini, O., and Soncini, M. (2006). Human Placenta: a Source of Progenitor/Stem Cells? *J Reproduktionsmed Endokrinol* 3.
- Pastar, I., Stojadinovic, O., Yin, N.C., Ramirez, H., Nusbaum, A.G., Sawaya, A., Patel, S.B., Khalid, L., Isseroff, R.R., and Tomic-Canic, M. (2014). Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. *Advances in wound care* 3, 445-464.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K., and Cobb, M.H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22, 153-183.
- Peplow, P.V., and Chatterjee, M.P. (2013). A review of the influence of growth factors and cytokines in in vitro human keratinocyte migration. *Cytokine* 62, 1-21.

- Peus, D., Hamacher, L., and Pittelkow, M.R. (1997). EGF-receptor tyrosine kinase inhibition induces keratinocyte growth arrest and terminal differentiation. *J Invest Dermatol* 109, 751-756.
- Pierreux, C.E., Nicolas, F.J., and Hill, C.S. (2000). Transforming growth factor beta-independent shuttling of Smad4 between the cytoplasm and nucleus. *Mol Cell Biol* 20, 9041-9054.
- Pollard, T.D., and Cooper, J.A. (2009). Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* 326, 1208-1212.
- Pollier, J., and Goossens, A. (2012). Oleanolic acid. *Phytochemistry* 77, 10-15.
- Prasad, S., Yadav, V.R., Sung, B., Reuter, S., Kannappan, R., Deorukhkar, A., Diagaradjane, P., Wei, C., Baladandayuthapani, V., Krishnan, S., *et al.* (2012). Ursolic acid inhibits growth and metastasis of human colorectal cancer in an orthotopic nude mouse model by targeting multiple cell signaling pathways: chemosensitization with capecitabine. *Clin Cancer Res* 18, 4942-4953.
- Rappel, W.J., and Edelstein-Keshet, L. (2017). Mechanisms of Cell Polarization. *Curr Opin Syst Biol* 3, 43-53.
- Redondo, P., Giménez de Azcarate, A., Marqués, L., García-Guzman, M., Andreu, E., and Prósper, F. (2011). Amniotic Membrane as a Scaffold for Melanocyte Transplantation in Patients with Stable Vitiligo. *Dermatology Research and Practice* 2011, 6.
- Reinke, J.M., and Sorg, H. (2012). Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res* 49, 35-43.
- Reisman, S.A., Aleksunes, L.M., and Klaassen, C.D. (2009). Oleanolic acid activates Nrf2 and protects from acetaminophen hepatotoxicity via Nrf2-dependent and Nrf2-independent processes. *Biochem Pharmacol* 77, 1273-1282.
- Ridley, A.J. (2003). Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back. *Science* 302, 1704-1709.
- Ridley, Anne J. (2011). Life at the Leading Edge. *Cell* 145, 1012-1022.

- Rittie, L. (2016). Cellular mechanisms of skin repair in humans and other mammals. *Journal of cell communication and signaling* 10, 103-120.
- Robson, M.C., Steed, D.L., and Franz, M.G. (2001). Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Curr Probl Surg* 38, 72-140.
- Rodriguez, J.A., Astudillo, L., and Schmeda-Hirschmann, G. (2003). Oleanolic acid promotes healing of acetic acid-induced chronic gastric lesions in rats. *Pharmacol Res* 48, 291-294.
- Rosette, C., and Karin, M. (1996). Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science* 274, 1194-1197.
- Sabapathy, K., Hochedlinger, K., Nam, S.Y., Bauer, A., Karin, M., and Wagner, E.F. (2004). Distinct roles for JNK1 and JNK2 in regulating JNK activity and c-Jun-dependent cell proliferation. *Mol Cell* 15, 713-725.
- Sabella, N. (1913). Use of fetal membranes in skin grafting. *Med Records NY* 83, 478-480.
- Samarakoon, R., Higgins, C.E., Higgins, S.P., and Higgins, P.J. (2009). Differential requirement for MEK/ERK and SMAD signaling in PAI-1 and CTGF expression in response to microtubule disruption. *Cellular Signalling* 21, 986-995.
- Sanchez, M., Theoduloz, C., Schmeda-Hirschmann, G., Razmilic, I., Yanez, T., and Rodriguez, J.A. (2006). Gastroprotective and ulcer-healing activity of oleanolic acid derivatives: in vitro-in vivo relationships. *Life Sci* 79, 1349-1356.
- Sangwan, V.S., Matalia, H.P., Vemuganti, G.K., Fatima, A., Ifthekar, G., Singh, S., Nutheti, R., and Rao, G.N. (2006). Clinical outcome of autologous cultivated limbal epithelium transplantation. *Indian journal of ophthalmology* 54, 29-34.
- Santoro, M., and Gaudino, G. (2005). Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. *Experimental Cell Research* 304, 274-286.
- Savagner, P., Kusewitt, D.F., Carver, E.A., Magnino, F., Choi, C., Gridley, T., and Hudson, L.G. (2005). Developmental transcription factor slug is required for

effective re-epithelialization by adult keratinocytes. *Journal of Cellular Physiology* 202, 858-866.

Schelfhout, V.R., Coene, E.D., Delaey, B., Waeytens, A.A., De Rycke, L., Deleu, M., and De Potter, C.R. (2002). The role of heregulin-alpha as a motility factor and amphiregulin as a growth factor in wound healing. *J Pathol* 198, 523-533.

Schlessinger, J. (2014). Receptor tyrosine kinases: legacy of the first two decades. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6.

Schreml, S., Szeimies, R.M., Prantl, L., Karrer, S., Landthaler, M., and Babilas, P. (2010). Oxygen in acute and chronic wound healing. *The British journal of dermatology* 163, 257-268.

Schultz, G., Rotatori, D.S., and Clark, W. (1991). EGF and TGF-alpha in wound healing and repair. *J Cell Biochem* 45, 346-352.

Seeger, M.A., and Paller, A.S. (2015). The Roles of Growth Factors in Keratinocyte Migration. *Advances in wound care* 4, 213-224.

Seeger, R., and Krebs, E.G. (1995). The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 9, 726-735.

Shah, A.P. (2014). Using amniotic membrane allografts in the treatment of neuropathic foot ulcers. *Journal of the American Podiatric Medical Association* 104, 198-202.

Shan, J.Z., Xuan, Y.Y., Ruan, S.Q., and Sun, M. (2011). Proliferation-inhibiting and apoptosis-inducing effects of ursolic acid and oleanolic acid on multi-drug resistance cancer cells in vitro. *Chin J Integr Med* 17, 607-611.

Shan, J.Z., Xuan, Y.Y., Zheng, S., Dong, Q., and Zhang, S.Z. (2009). Ursolic acid inhibits proliferation and induces apoptosis of HT-29 colon cancer cells by inhibiting the EGFR/MAPK pathway. *Journal of Zhejiang University Science B* 10, 668-674.

Shirakata, Y. (2010). Regulation of epidermal keratinocytes by growth factors. *J Dermatol Sci* 59, 73-80.

- Sieg, D.J., Hauck, C.R., Ilic, D., Klingbeil, C.K., Schaefer, E., Damsky, C.H., and Schlaepfer, D.D. (2000). FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol* 2, 249-256.
- Singer, A.J., and Clark, R.A. (1999). Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 341, 738-746.
- Singh, R., Chouhan, U.S., Purohit, S., Gupta, P., Kumar, P., Kumar, A., Chacharkar, M.P., Kachhawa, D., and Ghiya, B.C. (2004). Radiation processed amniotic membranes in the treatment of non-healing ulcers of different etiologies. *Cell Tissue Bank* 5, 129-134.
- Somova, L.I., Shode, F.O., Ramnanan, P., and Nadar, A. (2003a). Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from *Olea europaea*, subspecies *africana* leaves. *J Ethnopharmacol* 84, 299-305.
- Somova, L.O., Nadar, A., Rammanan, P., and Shode, F.O. (2003b). Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension. *Phytomedicine* 10, 115-121.
- Stern, M. (1913). The grafting of preserved amniotic membrane to burned and ulcerated surfaces, substituting skin grafts: A preliminary report. *Journal of the American Medical Association* 60, 973-974.
- Stoll, S.W., Rittie, L., Johnson, J.L., and Elder, J.T. (2012). Heparin-binding EGF-like growth factor promotes epithelial-mesenchymal transition in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 132, 2148-2157.
- Stupack, D.G., Cho, S.Y., and Klemke, R.L. (2000). Molecular Signaling Mechanisms of Cell Migration and Invasion. *Immunologic Research* 21, 83-88.
- Sultana, N., and Ata, A. (2008). Oleanolic acid and related derivatives as medicinally important compounds. *J Enzyme Inhib Med Chem* 23, 739-756.
- Sunada, H., Magun, B.E., Mendelsohn, J., and MacLeod, C.L. (1986). Monoclonal antibody against epidermal growth factor receptor is internalized without stimulating receptor phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 3825-3829.

- Suter, D.M., and Forscher, P. (2000). Substrate-cytoskeletal coupling as a mechanism for the regulation of growth cone motility and guidance. *J Neurobiol* 44, 97-113.
- Takeo, M., Lee, W., and Ito, M. (2015). Wound healing and skin regeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med* 5, a023267.
- Tambe, D.T., Hardin, C.C., Angelini, T.E., Rajendran, K., Park, C.Y., Serra-Picamal, X., Zhou, E.H., Zaman, M.H., Butler, J.P., Weitz, D.A., *et al.* (2011). Collective cell guidance by cooperative intercellular forces. *Nat Mater* 10, 469-475.
- Tanaka, T., Zhou, Y., Ozawa, T., Okizono, R., Banba, A., Yamamura, T., Oga, E., Muraguchi, A., and Sakurai, H. (2018). Ligand-activated epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling governs endocytic trafficking of unliganded receptor monomers by non-canonical phosphorylation. *J Biol Chem* 293, 2288-2301.
- Telgenhoff, D., and Shroot, B. (2005). Cellular senescence mechanisms in chronic wound healing. *Cell death and differentiation* 12, 695-698.
- Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y., and Nieto, M.A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871-890.
- Thiery, J.P., and Sleeman, J.P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 131-142.
- Tolhurst, D.E., and van der Helm, T.W. (1991). The treatment of vaginal atresia. *Surg Gynecol Obstet* 172, 407-414.
- Tonnesen, M.G., Feng, X., and Clark, R.A. (2000). Angiogenesis in wound healing. The journal of investigative dermatology Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc [and] European Society for Dermatological Research 5, 40-46.
- Trengove, N.J., Bielefeldt-Ohmann, H., and Stacey, M.C. (2000). Mitogenic activity and cytokine levels in non-healing and healing chronic leg ulcers. *Wound Repair Regen* 8, 13-25.
- Trepat, X., and Fredberg, J.J. (2011). Plithotaxis and emergent dynamics in collective cellular migration. *Trends Cell Biol* 21, 638-646.

- Troensegaard-Hansen, E. (1950). AMNIOTIC GRAFTS IN CHRONIC SKIN ULCERATION. *The Lancet* 255, 859-860.
- Turner, C.E. (2000). Paxillin and focal adhesion signalling. *Nat Cell Biol* 2, E231-236.
- Van Waes, C. (2007). Nuclear factor-kappaB in development, prevention, and therapy of cancer. *Clin Cancer Res* 13, 1076-1082.
- Ventre, M., Causa, F., and Netti, P.A. (2012). Determinants of cell-material crosstalk at the interface: towards engineering of cell instructive materials. *J R Soc Interface* 9, 2017-2032.
- Wall, I.B., Moseley, R., Baird, D.M., Kipling, D., Giles, P., Laffafian, I., Price, P.E., Thomas, D.W., and Stephens, P. (2008). Fibroblast dysfunction is a key factor in the non-healing of chronic venous leg ulcers. *J Invest Dermatol* 128, 2526-2540.
- Wang, X., Ye, X.L., Liu, R., Chen, H.L., Bai, H., Liang, X., Zhang, X.D., Wang, Z., Li, W.L., and Hai, C.X. (2010). Antioxidant activities of oleanolic acid in vitro: possible role of Nrf2 and MAP kinases. *Chem Biol Interact* 184, 328-337.
- Wang, Z., Gao, Z., Shi, Y., Sun, Y., Lin, Z., Jiang, H., Hou, T., Wang, Q., Yuan, X., Zhu, X., *et al.* (2007). Inhibition of Smad3 expression decreases collagen synthesis in keloid disease fibroblasts. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS* 60, 1193-1199.
- Ward, D.J., and Bennett, J.P. (1984). The long-term results of the use of human amnion in the treatment of leg ulcers. *British Journal of Plastic Surgery* 37, 191-193.
- Ward, D.J., Bennett, J.P., Burgos, H., and Fabre, J. (1989). The healing of chronic venous leg ulcers with prepared human amnion. *British Journal of Plastic Surgery* 42, 463-467.
- Waskiewicz, A.J., Flynn, A., Proud, C.G., and Cooper, J.A. (1997). Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *EMBO J* 16, 1909-1920.
- Watanabe, Y., Itoh, S., Goto, T., Ohnishi, E., Inamitsu, M., Itoh, F., Satoh, K., Wiercinska, E., Yang, W., Shi, L., *et al.* (2010). TMEPAI, a transmembrane TGF-

- beta-inducible protein, sequesters Smad proteins from active participation in TGF-beta signaling. *Mol Cell* 37, 123-134.
- Webb, D.J., Parsons, J.T., and Horwitz, A.F. (2002). Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells -- over and over and over again. *Nat Cell Biol* 4, E97-100.
- Webb, D.J., Schroeder, M.J., Brame, C.J., Whitmore, L., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and Horwitz, A.R. (2005). Paxillin phosphorylation sites mapped by mass spectrometry. *J Cell Sci* 118, 4925-4929.
- Wei, J., Liu, M., Liu, H., Wang, H., Wang, F., Zhang, Y., Han, L., and Lin, X. (2013). Oleanolic acid arrests cell cycle and induces apoptosis via ROS-mediated mitochondrial depolarization and lysosomal membrane permeabilization in human pancreatic cancer cells. *J Appl Toxicol* 33, 756-765.
- Weijer, C.J. (2009). Collective cell migration in development. *J Cell Sci* 122, 3215-3223.
- Welch, M.P., Odland, G.F., and Clark, R.A. (1990). Temporal relationships of F-actin bundle formation, collagen and fibronectin matrix assembly, and fibronectin receptor expression to wound contraction. *J Cell Biol* 110, 133-145.
- Wells, A. (1999). EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 31, 637-643.
- Werner, S., and Grose, R. (2003). Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 83, 835-870.
- White, L.A., Mitchell, T.I., and Brinckerhoff, C.E. (2000). Transforming growth factor beta inhibitory element in the rabbit matrix metalloproteinase-1 (collagenase-1) gene functions as a repressor of constitutive transcription. *Biochim Biophys Acta* 1490, 259-268.
- Wilshaw, S.P., Kearney, J.N., Fisher, J., and Ingham, E. (2006). Production of an acellular amniotic membrane matrix for use in tissue engineering. *Tissue Eng* 12, 2117-2129.
- Wojciak-Kosior, M., Paduch, R., Matysik-Wozniak, A., Niedziela, P., and Donica, H. (2011). The effect of ursolic and oleanolic acids on human skin fibroblast cells. *Folia Histochem Cytobiol* 49, 664-669.

- Wolcott, R.D., Rhoads, D.D., and Dowd, S.E. (2008). Biofilms and chronic wound inflammation. *Journal of wound care* 17, 333-341.
- Woodley, D.T. (1996). Reepithelialization. In *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*, R.A.F. Clark, ed. (New York, Plenum Press), pp. 339-350.
- Xia, Y., Makris, C., Su, B., Li, E., Yang, J., Nemerow, G.R., and Karin, M. (2000). MEK kinase 1 is critically required for c-Jun N-terminal kinase activation by proinflammatory stimuli and growth factor-induced cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5243-5248.
- Xu, W., Coll, J.L., and Adamson, E.D. (1998). Rescue of the mutant phenotype by reexpression of full-length vinculin in null F9 cells; effects on cell locomotion by domain deleted vinculin. *J Cell Sci* 111 (Pt 11), 1535-1544.
- Yahata, Y., Shirakata, Y., Tokumaru, S., Yang, L., Dai, X., Tohyama, M., Tsuda, T., Sayama, K., Iwai, M., Horiuchi, M., *et al.* (2006). A novel function of angiotensin II in skin wound healing. Induction of fibroblast and keratinocyte migration by angiotensin II via heparin-binding epidermal growth factor (EGF)-like growth factor-mediated EGF receptor transactivation. *J Biol Chem* 281, 13209-13216.
- Yang, L., Shirakata, Y., Shudou, M., Dai, X., Tokumaru, S., Hirakawa, S., Sayama, K., Hamuro, J., and Hashimoto, K. (2006). New skin-equivalent model from de-epithelialized amnion membrane. *Cell Tissue Res* 326, 69-77.
- Yates, S., and Rayner, T.E. (2002). Transcription factor activation in response to cutaneous injury: role of AP-1 in reepithelialization. *Wound Repair Regen* 10, 5-15.
- Yilmaz, M., and Christofori, G. (2009). EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev* 28, 15-33.
- Yujiri, T. (2000). MEK kinase 1 gene disruption alters cell migration and c-Jun NH2-terminal kinase regulation but does not cause a measurable defect in NF-kappa B activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 7272-7277.

- Zelen, C.M. (2013). An evaluation of dehydrated human amniotic membrane allografts in patients with DFUs. *Journal of wound care* 22, 347-348, 350-341.
- Zelen, C.M., Serena, T.E., and Snyder, R.J. (2014). A prospective, randomised comparative study of weekly versus biweekly application of dehydrated human amnion/chorion membrane allograft in the management of diabetic foot ulcers. *Int Wound J* 11, 122-128.
- Zelen, C.M., Snyder, R.J., Serena, T.E., and Li, W.W. (2015). The use of human amnion/chorion membrane in the clinical setting for lower extremity repair: a review. *Clinics in podiatric medicine and surgery* 32, 135-146.
- Zeng, G., McCue, H.M., Mastrangelo, L., and Millis, A.J. (1996). Endogenous TGF-beta activity is modified during cellular aging: effects on metalloproteinase and TIMP-1 expression. *Exp Cell Res* 228, 271-276.
- Zhang, L., Wang, W., Hayashi, Y., Jester, J.V., Birk, D.E., Gao, M., Liu, C.Y., Kao, W.W., Karin, M., and Xia, Y. (2003). A role for MEK kinase 1 in TGF-beta/activin-induced epithelium movement and embryonic eyelid closure. *EMBO J* 22, 4443-4454.
- Zhang, W., and Liu, H.T. (2002). MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res* 12, 9-18.
- Zhu, Y.Y., Huang, H.Y., and Wu, Y.L. (2015). Anticancer and apoptotic activities of oleanolic acid are mediated through cell cycle arrest and disruption of mitochondrial membrane potential in HepG2 human hepatocellular carcinoma cells. *Mol Med Rep* 12, 5012-5018.
- Zohar, Y., Talmi, Y.P., Finkelstein, Y., Shvili, Y., Sadov, R., and Laurian, N. (1987). Use of human amniotic membrane in otolaryngologic practice. *The Laryngoscope* 97, 978-980.