

TESIS DOCTORAL
Ana Sanchis Gandia

Estudio funcional del receptor de glucocorticoides en desarrollo y reparación epitelial



Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA. 2013



Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Estudio funcional del receptor de glucocorticoides en desarrollo y reparación epitelial

Trabajo original presentado para optar al título de doctora por la Universidad de Valencia en el programa de bioquímica y biomedicina.

Valencia, 2013

Firmado: ANA SANCHIS GANDÍA

La Dra. Paloma Pérez Sánchez, directora de la presente memoria de investigación, autoriza su presentación en el organismo competente para su admisión previa a trámite de su lectura y defensa.

Firmado: PALOMA PÉREZ SÁNCHEZ

Este trabajo ha sido realizado con el apoyo económico de los proyectos de investigación que se enumeran a continuación:

SAF2008-00540 (Ministerio de Ciencia y Tecnología)

ACOMP/2011/127 (Generalitat Valenciana)

Fundación Ramón Areces (050507070007)

Este estudio se ha desarrollado en el Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV-CSIC), bajo la dirección de la Dra. Paloma Pérez Sánchez

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Han pasado muchos años desde que comenzó esta historia, durante todo este tiempo me he cruzado con gente maravillosa que, de un modo u otro, han compartido momentos importantes en mi vida.

En primer lugar, me gustaría darle las gracias a la directora de esta tesis, la Dr. Paloma Pérez. GRACIAS Paloma por abrirme las puertas de tu laboratorio, desde el principio confiaste en mí, esta tesis no se hubiese forjado si tú no me hubieses animado e involucrado en este mundo, donde, sin duda, eres un ejemplo a seguir como científica y como persona. Gracias por tu integridad, por tus sabios consejos, tanto de ciencia como del mundo real, por ser exigente cuando es necesario y comprensiva en los malos momentos, porque tu “gente del labo” siempre es lo primero, aunque tengas una pila de facturas que revisar o mil proyectos que escribir. Es un placer formar parte de tu equipo...

Gracias al Dr. Guy Haegeman (LEGEST- University Gent, Belgium) por facilitarnos el compuesto A (CpdA).

He tenido la suerte de formar parte de un laboratorio donde prima el compañerismo y el buen rollo. En los comienzos con Eva, nuestra “sensei”, poseedora de una paciencia infinita, y Hugo, el Dr. Leis, tan didáctico. Aprendí mucho con vosotros. Entonces conocí a una de mis mejores amigas, formamos un buen equipo dentro y fuera del labo... GRACIAS Pilar, porque mi camino en la ciencia no hubiese sido el mismo si no hubiese estado acompañado del tuyo. GRACIAS, por aguantarme tantos cabreos y por recoger mis lágrimas tantas veces... Por esas tardes de “remember the music”,

acompañadas de torcis, aunque nunca nos tocara el Euromillones. Espero que seas muy feliz en esta nueva etapa que estás viviendo con tus chicos en Alemania...

GRACIAS a la gente del “FLIPE” (CIPF, oficialmente) con la que compartimos los primeros años: a los Pulis y al I-16 con quien compartimos laboratorio, risas y música. GRACIAS a las chicas de la mesa camilla: Mara, Isabel, Yasmina, Imelda, por tantas comidas divertidas y tantos sobres de azúcar.

Después aterrizamos en el IBV, donde nos re-encontramos con viejos amigos y donde también conocimos gente nueva, como los compis del master. En fin, MUCHAS GRACIAS a todos por hacer fácil el día a día. Fátima, Silvia's, Roser... todas me habéis aportado algo bueno. Luego llegó Lisa, que me ha enseñado mucho inglés y también me ha contagiado un poquito de su calma y saber estar, una máquina en cultivos de la que he aprendido mucho, THANK YOU SO MUCH! Después ocurrió un flechazo en el laboratorio, Víctor y Jose se conocieron, GRACIAS por todos los momentos tan divertidos que he compartido con vosotros, por lo que me habéis enseñado sobre guitarras y objetivos, por esas comidas en el Foster y por siempre estar dispuestos a echar una mano. GRACIAS Jose por tu entusiasmo en el trabajo, siempre ahí cuando se te necesita, la labor que realizas como técnico en el laboratorio no tiene precio...

MUCHAS GRACIAS a todos los amigos con los que me he cruzado en este camino: A los compis de tren, con quien he compartido tantos madrugones en el regional. A mis “ex -amigas”, a los de la “F+F1” de los domingos, a los que “de pont a pont” hemos

disfrutado de algún viaje que otro. A los “scouts”, que me han enseñado a formar en círculo (como está mandao) y a la Pebrella por tantos momentos divertidos, tenéis todos un corazón enorme...

En cuanto a los que siento más cerca, quiero dar las GRACIAS a Julia, por ser madre de todos, aunque no seamos tus hijos. A Rafael, por esas paellas a las que ponemos el punto de sal y por la botella de Möet que nos tomaremos para celebrar esta tesis. GRACIAS a mis cuñados y cuñadas por esas tardes de patchwork y de parchís, siempre de buen humor. A mis sobrinos, con los que he compartido cines, McDonalds, árboles de Navidad y eventos falleros, a los que he visto crecer y a los que veré... GRACIAS también a Mari Carmen y a Cristina, otros dos ángeles. Todos vosotros sois la mejor familia que uno podría encontrarse sin ser la suya propia.

A mi abuela Elvira, matriarca de la familia, portadora del gen “Castillo” a veces virtud, a veces defecto. GRACIAS por tu energía, por afrontar las adversidades más crueles de la vida y seguir con una sonrisa y por tus increíbles tortillas de patatas. A mi hermana Orli y A David: espero compartir muchos más roscones de reyes y gin-tonics con vosotros! Al más sonriente y sociable de la familia, Daniel, un beso muy fuerte!

Especialmente he de dar las GRACIAS a mi padre, el abuelo Pepe, la persona de la que aprendo a ser mejor cada día, sin malicia, sin rencor, eres demasiado bueno, nunca sabes decir “no”. Junto con mamá me diste todo lo que alguien pudiera desear, cuando podíais y cuando no, por vuestro trabajo y por vosotros estoy aquí. GRACIAS por ser el mejor abuelo-abuela que mis hijos podrían tener.

En este punto llega lo triste de esta historia, la persona que más orgullosa se sentiría de mí en este momento, se fue hace tiempo, aunque, de algún modo, siempre la siento cerca. GRACIAS Orlanda por ser madre, la mejor, pero también amiga y consejera. Por inculcarme tu amor a la cultura y al estudio, por protegerme, por cuidarme, por quererme. Por todos los abrazos que me diste y todos los que me faltó darte. Cada día te echo de menos...

Y ahora, aunque en último lugar, llega la mejor parte: Juan Carlos, mi amigo, mi hogar, mi amor. GRACIAS por ser mi apoyo, el que nunca falla. Juntos hemos reído y llorado (casi siempre yo), siempre confiaste en mí, también yo confío en ti, en tu honestidad, tu inteligencia, tu optimismo, tu serenidad, eres capaz de todo lo que te propongas. *Es clar i evident que t'estime.*

Juntos hemos tenido la suerte de crear dos nuevos soles en el universo. A ellos quiero, en primer lugar, pedirles perdón, por el tiempo que les he robado para que esta tesis fuera realidad, de algún modo os lo compensaré... GRACIAS Joan, por ser el beso más dulce, el abrazo más tierno, la sonrisa más sincera. Por nuestras conversaciones, tan divertidas, tú me devolviste la alegría que perdí una vez... Y a ti, Arnau, la mirada más inocente de la casa, eres la paz, contigo he tenido la oportunidad de disfrutar de tus primeros pasos con una tranquilidad que no tuve en otro momento. GRACIAS por ser tan bueno y dejarme escribir la tesis.

Os quiero muchísimo a los tres, pase lo que pase, no lo olvidéis nunca. Sois el mejor regalo que la vida me ha dado y con vosotros quiero despedir esta historia...



ABREVIATURAS

ACTH	<i>Adrenocorticotropine hormone</i>	Hormona adrenocorticotropina
AF-1, -2	<i>Activation function 1, -2</i>	Función de activación 1, -2
AKT/PKB	<i>Protein kinase B</i>	Proteína quinasa B
AP-1	<i>Activator protein-1</i>	Proteína activadora-1
ATF	<i>Activating Transcription Factor</i>	Factor activador de la transcripción
bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i>	Factor de crecimiento fibroblástico básico
BrdU	<i>5-bromo-2'-deoxyuridine</i>	5-Bromo-2'-deoxiuridina
CpdA	<i>Compound A</i>	Compuesto A
CRH	<i>Corticotropin-releasing hormone</i>	Hormona liberadora de corticotropina
CTD	<i>C-terminal domain</i>	Dominio C-terminal
CTGF	<i>Connective tissue growth factor</i>	Factor de crecimiento de tejido conectivo
CYP11B1	<i>Cytochrome P450, family 11, subfamily B, polypeptide 1</i>	Citocromo P450, familia 11, subfamilia B, polipéptido 1
DBD	<i>DNA binding domain</i>	Dominio de unión a DNA
Dex	<i>Dexamethasone</i>	Dexametasona
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>	Ácido desoxirribonucleico
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EOB	<i>Eyelid open at birth</i>	Ojo abierto al nacer

ERK	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>	Quinasa regulada por señales extracelulares
GCs	<i>Glucocorticoids</i>	Glucocorticoides
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>	Factor de colonias de granulocitos macrófagos
GR	<i>Glucocorticoid receptor</i>	Receptor de glucocorticoides
GREs	<i>Glucocorticoid Response Elements</i>	Elementos de respuesta a glucocorticoides
H-E	<i>Hematoxylin-eosin</i>	Hematoxilina-eosina
HPA	<i>Hypothalamic-pituitary-adrenal axis</i>	Eje hipotálamo-pituitario-adrenal
HSD11β1	<i>Hydroxysteroid 11-beta dehydrogenases 1</i>	11 β-hidroxiesteroide deshidrogenasa 1
HSD11β2	<i>Hydroxysteroid 11-beta dehydrogenases 2</i>	11 β-hidroxiesteroide deshidrogenasa 2
HSP	<i>Heat shock proteins</i>	Proteínas de choque térmico
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>	Factor de crecimiento de tipo insulina 1
IκB	<i>Inhibitor Kappa-B</i>	Inhibidor de kappa-B
IκK	<i>Inhibitor of kappa-B Kinase</i>	Quinasa del inhibidor de kappa-B
IL	<i>Interleukin</i>	Interleuquina
IRnGREs	<i>Negative palindromic GC-response elements</i>	Elementos de respuesta negativa
JNK	<i>Jun N-terminal kinase</i>	c-Jun N-terminal quinasa

KGF	<i>Keratinocyte Growth Factor</i>	Factor de crecimiento de los queratinocitos
LBD	<i>Ligand Binding Domain</i>	Dominio de unión al ligando
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>	Proteína quinasa activada por mitógenos
MEKK	<i>MAPK/extracellular signal-regulated kinase kinase</i>	MAPK quinasa quinasa
MPKs	<i>Mouse primary keratinocytes</i>	Queratinocitos primarios de ratón
MR	<i>Mineralocorticoid receptor</i>	Receptor de mineralocorticoides
mRNA	<i>messenger RNA</i>	RNA mensajero
NF-κB	<i>Nuclear Factor kappa B</i>	Factor nuclear kappa B
nGREs	<i>Negative glucocorticoid response elements</i>	Elementos negativos de respuesta a glucocorticoides
NTD	<i>N-Terminal Transactivation Domain</i>	Dominio de transactivación
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PI3k	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>	Fosfatidil-inositol-3-quinasa
PKAc	<i>cyclic AMP-dependent protein kinase</i>	Proteína quinasa dependiente de AMP cíclico
PMA	<i>Phorbol 12-Myristate 13-Acetate</i>	Forbol 12-miristato 13-acetato
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>	Ácido ribonucleico

RT	<i>Room temperature</i>	Temperatura ambiente
RT-QPCR	<i>Reverse transcriptase quantitative PCR</i>	Transcripción reversa cuantitativa de la PCR
SD	<i>Standard deviation</i>	Desviación estandar
SEGRAs	<i>Selective GR agonists</i>	Agonistas selectivos de GR
TA	<i>Transactivation function</i>	Función de transactivación
TAD	<i>Transactivation domain</i>	Dominio de transactivación
TFs	<i>Transcription factors</i>	Factores de transcripción
TGF-β	<i>Transforming growth factor-beta</i>	Factor de crecimiento transformante beta
TGF-α	<i>Transforming growth factor-alpha</i>	Factor de crecimiento transformante alpha
TNF-α	<i>Tumoral Necrosis Factor-alpha</i>	Factor de necrosis tumoral alpha
TR	<i>Transrepression function</i>	Función de transrepresión
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>	Factor de crecimiento del endotelio vascular
WT	<i>Wild type</i>	cepa silvestre

ÍNDICE GENERAL

1. Introducción	1
1.1. Las hormonas glucocorticoides (GCs) y su receptor	3
1.1.1. Las hormonas GCs: síntesis y secreción	3
1.1.2. Uso terapéutico de los GCs	8
1.2. El receptor de glucocorticoides (GR)	9
1.2.1. Estructura de GR	9
1.2.2. Heterogeneidad de GR	11
1.3. Mecanismos moleculares de acción de GR	12
1.3.1. Mecanismos dependientes de unión a DNA	12
1.3.2. Mecanismos independientes de unión a DNA	14
1.3.2.1. Antagonismo entre GR y NF-κB	19
1.3.2.2. Antagonismo entre GR y MAPK/AP-1	22
1.3.3. Acciones no genómicas de GR	26
1.4. La piel como sistema modelo	27
1.5. Desarrollo, daño y reparación de la epidermis y otros epitelios estratificados	31
1.5.1. Desarrollo epitelial: la formación del párpado	31
1.5.2. Daño y reparación epitelial: la cicatrización cutánea	35
1.5.3. Papel de MAPK/AP-1 en la homeostasis de la piel	44
1.5.4. Factores de crecimiento y citoquinas pro-inflamatorias que regulan el proceso de cicatrización	46
1.6. Modelos animales para el estudio funcional de GR en epidermis y otros epitelios estratificados	51
1.6.1. Estudio de la función de GR mediante modelos Murinos transgénicos	51
1.6.2. Aproximaciones al estudio funcional de GR <i>in vivo</i> mediante la utilización de fármacos	55

2. Objetivos	59
3. Materiales y Métodos	63
3.1. Experimentación animal	65
3.1.1. Generación de las colonias de ratones transgénicos	65
3.1.2. Ensayos de cicatrización <i>in vivo</i>	67
3.1.3. Tratamientos tópicos	68
3.2. Identificación de ratones transgénicos	69
3.2.1. Obtención de DNA genómico	69
3.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	69
3.3. Análisis histológico/ inmunohistoquímico	71
3.3.1. Recolección de muestras para las determinaciones histopatológicas	71
3.3.2. Desparafinación e hidratación/deshidratación de las muestras	73
3.3.3. Tinción con Hematoxilina-Eosina	73
3.3.4. Análisis inmunohistoquímico	73
3.3.5. Inmunohistoquímica anti-BrdU	75
3.3.6. Medida de la formación del párpado	78
3.4. Análisis de la apoptosis en tejido	79
3.5. Aislamiento y cultivo de queratinocitos primarios de ratón	79
3.5.1. Ensayos de cicatrización <i>in vitro</i>	81
3.6. Análisis de expresión génica	83
3.6.1. Recolección de muestras y procesamiento para la obtención del RNA	83
3.6.2. Determinación de los niveles relativos de mRNA	84
3.7. Extracción e inmunodetección de proteínas	86

3.7.1. Obtención de extractos totales de proteínas	86
3.7.2. Inmunodetección de proteínas: Western Blot	87
3.7.2.1. Electroforesis en geles de SDS-Poliacrilamida y transferencia a membrana	87
3.7.2.2. Bloqueo, incubación con los anticuerpos y revelado	88
3.7.2.3. Normalización y cuantificación de la expresión	88
4. Resultados	91
4.1. Análisis del fenotipo ocular de los embriones GR ^{null/null}	93
4.1.1. Análisis histopatológico del cierre de párpado	93
4.1.2. Proliferación <i>in vivo</i> en el epitelio del párpado de los ratones GR ^{null/null}	97
4.1.3. Análisis de la apoptosis en el párpado de los ratones GR ^{null/null}	99
4.1.4. Estimación de parámetros para medir la progresión de la formación del párpado de los ratones GR ^{null/null}	100
4.2. Señalización mediada por GR y su interacción con EGFR durante el desarrollo del párpado	102
4.3. GR, EGFR y la migración de queratinocitos en cultivo	104
4.4. Análisis del proceso de cicatrización cutánea <i>in vivo</i> en ratones K5-GR y K5-GR-TR	107
4.4.1. Análisis histopatológico del cierre de herida de los ratones K5-GR y K5-GR-TR	107
4.4.2. Estudio de marcadores de proliferación, migración y diferenciación en el proceso de cicatrización cutánea en ratones K5-GR, K5-GR-TR y WT	113

4.4.3. Regulación del proceso inflamatorio en la cicatrización cutánea de ratones K5-GR, K5-GR-TR y WT	118
4.4.4. Papel de factores de crecimiento y citoquinas en el proceso de cicatrización	118
4.4.5. Vías de señalización implicadas en el proceso de cicatrización.....	121
4.4.5.1. Papel de la vía de señalización ERK/AP-1	121
4.4.5.2. Contribución de β -catenina al proceso de cicatrización.....	123
4.4.6. Análisis de la contribución específica de GR y GR-TR en queratinocitos durante el proceso de cicatrización mediante ensayos <i>in vitro</i>	125
4.5. Efectos de la aplicación tópica del CpdA en piel de ratón.....	129
5. Discusión	135
5.1. Análisis funcional de GR en la formación del párpado.....	137
5.2. Análisis de la función de GR en la cicatrización de heridas	141
5.2.1. La sobre-expresión <i>in vivo</i> de GR y GR-TR en Queratinocitos produce un retraso en el proceso de cicatrización cutánea con cinéticas diferentes en la reparación.....	141
5.2.2. El patrón de expresión génica de la respuesta inflamatoria en las heridas de los transgénicos K5-GR y K5-GR-TR está alterado	145
5.2.3. Interacción GR/EGFR/ β -catenina en el proceso de cicatrización cutánea.....	148

5.2.4. Interacción GR/MAPK/AP-1 en el proceso de cicatrización cutánea: Papel de ERK.....	150
5.2.5. Utilización de agonistas selectivos de GR o SEGRAs en patologías cutáneas.....	152
6. Conclusiones	155
7. Apéndices	159
8. Bibliografía	163

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Las hormonas glucocorticoides (GCs) y su receptor

1.1.1. Las hormonas GCs: síntesis y secreción

Los GCs son una clase importante de hormonas esteroides que median diversos efectos fisiológicos en los vertebrados, desde los peces hasta el hombre. Aunque son conocidos por su papel de mantenimiento en la homeostasis de la glucosa, los GCs son también muy importantes en la regulación del desarrollo, el metabolismo, la neurobiología y la muerte celular programada. Además, los GCs son fundamentales para la maduración de órganos como el pulmón, corazón, riñón y epidermis, entre otros (Barnes, 2011; Nicolaidis *et al.*, 2010; Oakley y Cidlowski, 2011; Pérez *et al.*, 2011; Silverman y Sternberg, 2012).

Los principales GCs endógenos son la cortisona y el cortisol en humanos, y la corticosterona y el desoxicorticosterona en roedores. En condiciones fisiológicas normales, el cortisol se secreta en pulsos discretos, siguiendo el ritmo circadiano, con un pico en las primeras horas de la mañana, una rápida disminución durante las siguientes horas y otra disminución menos pronunciada hasta alcanzar niveles muy bajos al anochecer. Por el contrario, en roedores, el pico máximo de secreción de corticosterona es diurno (Walker *et al.*, 2012).

Los GCs se sintetizan y secretan en la corteza adrenal, sus niveles circulantes están regulados por el eje hipotálamo-pituitaria-

adrenales (HPA) (Mormede *et al.*, 2011). Dicho eje constituye un sistema neuroendocrino (Figura 1.1) donde el hipotálamo secreta la hormona liberadora de corticotropina (CRH), que estimula la síntesis y liberación de la hormona adrenocorticotropina (ACTH) en la glándula pituitaria anterior, que a su vez, estimula la síntesis y liberación de cortisol en el córtex adrenal. El cortisol circulante se une con alta afinidad a globulinas específicas de unión a cortisol, que facilitan su transporte por la sangre. El cortisol ejerce su acción uniéndose a dos tipos de receptores intracelulares con alta afinidad: el receptor de glucocorticoides (GR) y el de mineralocorticoides (MR). Además, GR regula la síntesis de su propio ligando mediante un mecanismo de retroalimentación negativo a nivel del hipotálamo y de la glándula pituitaria (Figura 1.1).

Las respuestas endocrinas no sólo se encuentran bajo el control del sistema nervioso central, también pueden darse a nivel del tejido periférico fuera del eje clásico HPA. La ubicación estratégica de la piel como barrera entre el entorno y el medio interno determina su función crítica en la conservación de la homeostasis corporal. La piel está continuamente expuesta a muchos factores ambientales hostiles (químicos, biológicos, térmicos o mecánicos). Cuando se produce algún tipo de daño epitelial, se desencadenan diferentes mecanismos para preservar la función e integridad de la piel. Estos mecanismos tienen lugar en la epidermis y en sus estructuras anexas, como los folículos pilosos y las glándulas sebáceas y sudoríparas (revisado en Slominski *et al.*, 2012). Estas funciones de la piel cuentan con la participación de los sistemas

inmunitario y pigmentario, así como de los componentes vasculares y mesenquimáticos de la dermis, y además están en comunicación continua con ellos y con el sistema nervioso central (Slominski *et al.*, 2012). Durante este proceso, las respuestas sistémicas a nivel global y local se coordinan de una manera precisa (Figura 1.2).

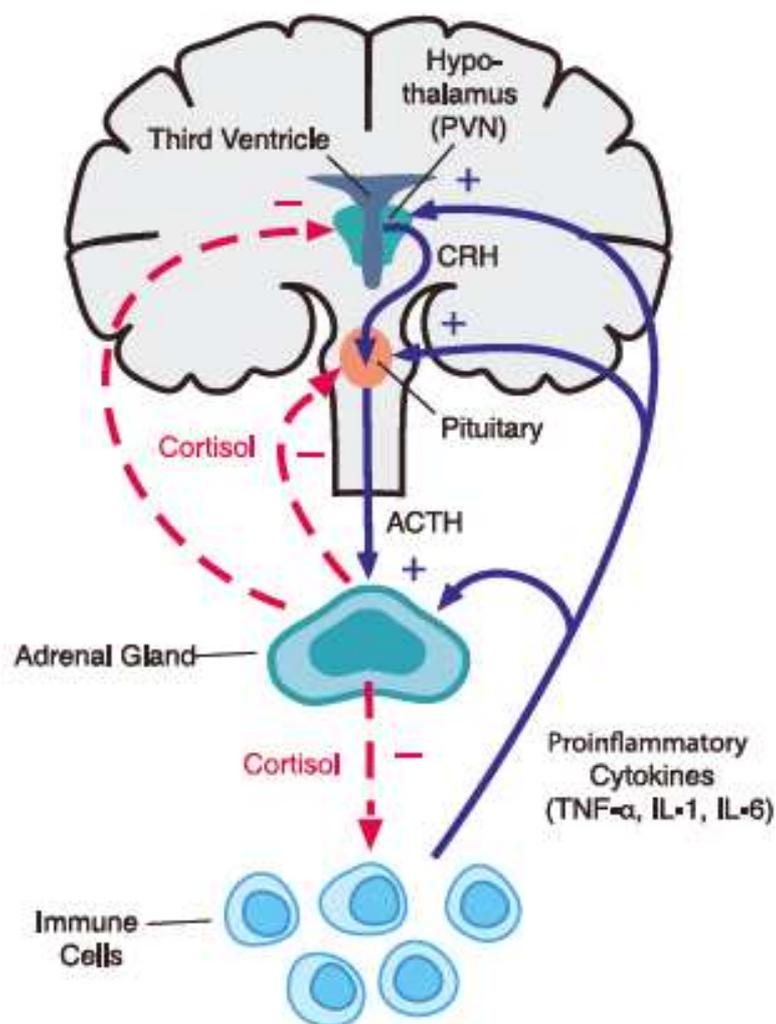


Figura 1.1: Esquema del eje HPA. Tomada de Silverman and Sternberg, 2012.

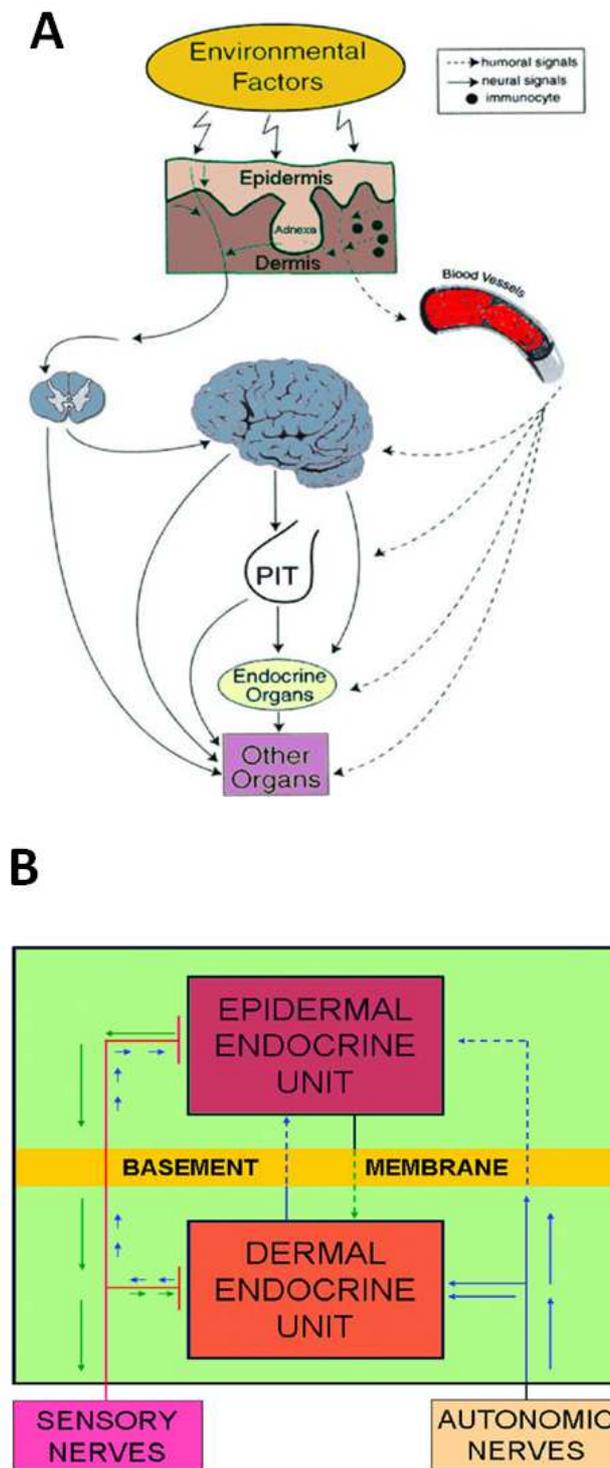
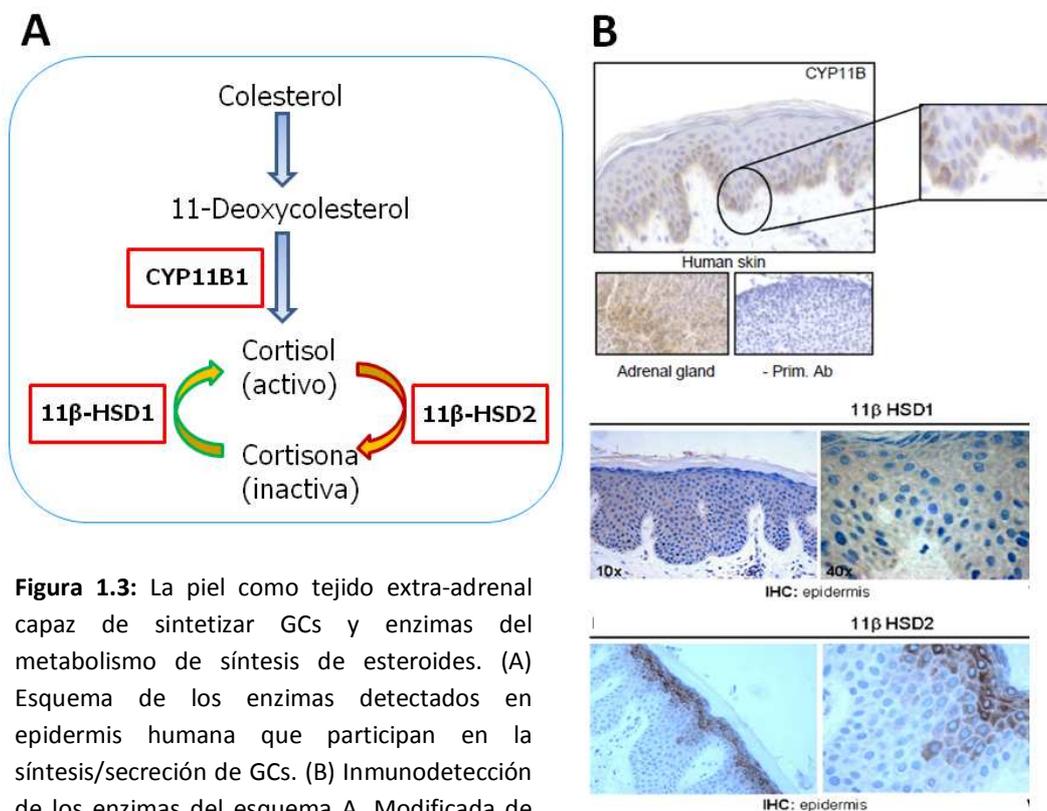


Figura 1.2: Esquema del sistema neuroendocrino cutáneo a nivel global(A) y local (B). Tomada de Slominski *et al.*, 2012.

La piel humana expresa los elementos del eje HPA incluyendo proopiomelanocortina (POMC) y CRH. Además, estudios recientes han demostrado que la epidermis representa un sitio extra-adrenal de síntesis de GCs (Vukelic *et al.*, 2011; Cirillo y Prime, 2011). Tanto la epidermis como los queratinocitos son capaces de sintetizar GCs de manera endógena. En los queratinocitos se expresan enzimas esenciales para la síntesis de cortisol como el citocromo P450 (CYP11B1), y para la regulación de su actividad, como los enzimas 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (HSD11 β 1 y HSD11 β 2), encargados de la interconversión de las formas activa e inactiva del cortisol (Figura 1.3). La expresión de estos enzimas y hormonas está estructurada en una organización funcional que se regula mediante bucles, imitando la jerarquía estructural de señalización del eje HPA.



1.1.2. Uso terapéutico de los GCs

Además de las funciones fisiológicas descritas, los corticosteroides constituyen el principal tratamiento de elección en numerosas enfermedades inflamatorias agudas y crónicas (Schäcke *et al.*, 2002). Los beneficios farmacológicos de los GCs se basan en sus propiedades anti-inflamatorias, anti-proliferativas e inmunosupresoras. También se encuentra generalizado su uso en protocolos de quimioterapia, principalmente en pacientes con leucemias y linfomas, debido a su papel crítico en la inducción de la apoptosis.

Sin embargo, y a pesar de su enorme efectividad, el uso prolongado de los GCs conlleva numerosos efectos secundarios no deseados (Schäcke *et al.*, 2002), como diabetes, hipertensión, hipercolesterolemia, osteoporosis, alteraciones del estado de ánimo, glaucoma, cataratas o desórdenes metabólicos. La severidad de estos efectos secundarios depende de la naturaleza química del fármaco, del vehículo y del tipo de aplicación del mismo. En piel, los efectos secundarios más frecuentes tras un tratamiento prolongado y/o altas dosis de corticoides son la atrofia cutánea, dermatitis y acné. Además, estos tratamientos inducen un retraso en la cicatrización y alteraciones en la pigmentación de la piel (Hengge *et al.*, 2006). Un aumento o disminución en los niveles circulantes de GCs produce un cuadro patológico con alteraciones metabólicas, como el síndrome de Cushing (exceso de ACTH y cortisol, OMIM: 219080) o la enfermedad de Addison (deficiencia de cortisol, OMIM: 240200). En ambos casos, estas patologías tienen manifestaciones cutáneas:

atrofia epidérmica en los enfermos de Cushing e hiperpigmentación en los de Addison (Nieman y Chanco, 2006; Davidovici *et al.*, 2008; Patel *et al.*, 2011)

Por lo tanto, el estudio de los mecanismos de acción de los GCs es fundamental desde el punto de vista de la investigación aplicada con fines terapéuticos, para contribuir al desarrollo de nuevos fármacos igualmente eficientes pero que posean una mayor especificidad y no produzcan los efectos secundarios no deseados. La identificación de dianas transcripcionales de los GCs en queratinocitos puede contribuir al diseño de fármacos optimizados para el tratamiento de patologías, como psoriasis, heridas o cáncer.

1.2. El receptor de glucocorticoides (GR)

1.2.1. Estructura de GR

GR es un miembro de la superfamilia de los receptores nucleares de factores de transcripción (TFs), que incluye a otros receptores como MR y a los receptores de progesterona, andrógenos y estrógenos. GR consta de tres dominios funcionales (Figura 1.4):

- Dominio de transactivación (*N-Terminal Transactivation Domain*, NTD): contiene la región de función de activación-1 (AF-1, independiente de la hormona), importante para la actividad de transcripción y la unión a la maquinaria transcripcional del receptor.

- Dominio de unión a DNA (*DNA Binding Domain, DBD*): El dominio central de unión a DNA está altamente conservado entre los receptores nucleares, es importante para entender la flexibilidad en la regulación de la transcripción mediada por GR y otros receptores nucleares relacionados. Consiste en dos dedos de zinc que son críticos para la dimerización del receptor y la unión a DNA. El primero de ellos se localiza en la caja-P proximal y es responsable de la unión a secuencias específicas de DNA en genes diana conocidos, como los elementos de respuesta a GCs (GREs). El segundo dedo de zinc se sitúa en la caja-D distal y contiene secuencias importantes para la dimerización del receptor y la translocación nuclear del mismo.
- Dominio de unión al ligando (*Ligand Binding Domain, LBD*): El dominio C-terminal contiene la región AF-2, responsable de la unión al ligando y que también sirve como sitio de unión a proteínas de choque térmico (*heat shock proteins, HSP*) y moléculas coactivadoras.
- Entre el DBD y el LBD existe una región bisagra (*hinge, H*) que confiere al receptor flexibilidad estructural, permitiendo la interacción de dímeros del receptor con múltiples GREs. También contiene señales de localización nuclear.

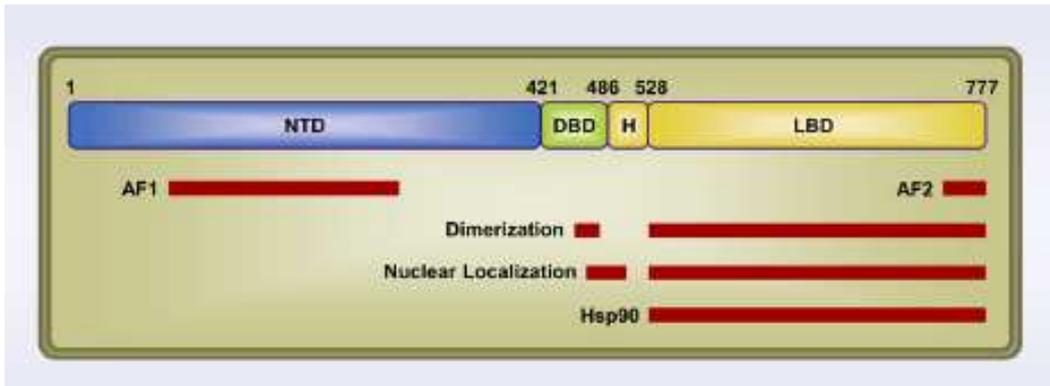


Figura 1.4: Organización estructural de la proteína hGR α . Tomada de Oakley y Cidlowski, 2011.

1.2.2. Heterogeneidad de GR

GR se expresa de forma ubicua y es necesario para la viabilidad post-natal (Cole *et al.*, 1995). A día de hoy se conoce un gen único (*Nr3c1*) que codifica para GR, localizado en el cromosoma 5q31-32 en humanos y en el cromosoma 18 B3 en roedores. Recientemente se ha descubierto la existencia de hasta ocho isoformas diferentes de GR, que se originan a partir de las dos isoformas mayoritarias y tradicionalmente estudiadas, GR α y GR β (Lu y Cidlowski, 2006) (Figura 1.5). En humanos, GR α contiene 777 aminoácidos y es la forma del receptor capaz de unir hormona, activando los genes de respuesta a GCs. Por el contrario, GR β solo contiene 742 residuos, difiere de GR α en su extremo C-terminal y no une ligando. Su función no está clara, pero podría actuar como un regulador dominante negativo de la transactivación mediada por GR α y posiblemente media la resistencia a GCs durante la respuesta inflamatoria. GR α se expresa en todos los tipos celulares de mamíferos (Smoak y Cidlowski, 2004). GR β se expresa en muchas

células y tejidos a muy bajos niveles en comparación con GR α . La sensibilidad y especificidad de la respuesta de los GCs da lugar a la existencia de diferentes patrones de expresión de isoformas de GR específicas de cada tejido. La heterogeneidad molecular de GR es un mecanismo para la generación de diversidad en la señalización mediada por GCs (Oakley y Cidlowski, 2011). Hasta el momento no se ha descrito el patrón de expresión de las distintas isoformas de GR en piel.

1.3. Mecanismos moleculares de acción de GR

GR inactivo se encuentra en el citoplasma formando complejos con proteínas chaperonas: las proteínas de choque térmico hsp90, hsp70, hsp56, hsp40, una proteína de bajo peso molecular (p23) y varias inmunofilinas (Grad y Picard, 2007). Cuando es activado por la unión al ligando, sufre distintas modificaciones post-traduccionales, incluida la fosforilación, disociándose entonces del complejo multimérico de proteínas, exponiendo sus señales de localización nuclear y translocándose al núcleo. La función de GR tiene lugar a través de mecanismos dependientes e independientes de la unión a DNA (Figura 1.6).

1.3.1. Mecanismos dependientes de unión a DNA

El mecanismo clásico de GR requiere la formación de homodímeros a través del dominio DBD, como condición necesaria

para interactuar con GREs, que están presentes en los genes diana. Tradicionalmente, este mecanismo de acción de GR como TF clásico se ha denominado *función de transactivación* (TA). Los GREs se definen como una secuencia palindrómica compuesta de dos mitades hexaméricas separadas por tres nucleótidos variables: AGAACAnnnTGTTCT, situada en la región reguladora de los genes diana. La unión de GR a los GREs produce un cambio conformacional del receptor que induce la formación del complejo transcripcional y el reclutamiento de distintos coactivadores al complejo GR-DNA. El complejo ligando-receptor puede estimular o inhibir respuestas transcripcionales mediante su unión a GREs. Es importante señalar que GR también puede ejercer una inhibición transcripcional de determinados genes a través de secuencias denominadas GREs negativos (nGREs), para lo cual no es imprescindible la formación de homodímeros de GR (Figura 1.6).

El receptor interactúa sólo brevemente con los genes diana, el rápido ciclo de encendido y apagado del GRE cada pocos segundos, permite que GR abarque un gran número de posibles sitios de unión e interacciones con diferentes proteínas (Stavreva *et al.*, 2004)

Recientemente se ha descrito que GR modula negativamente la expresión de genes a través de una unión directa de GR a elementos de respuesta negativa (IRnGREs), que no guardan relación con las secuencias GREs descritas previamente. Dichas secuencias IRnGRE se han detectado en numerosos genes reprimidos por GCs, como *Tslp*, *K5*, *CycD1*, *Tgf β -1* o *Ctnnb-1* (Surjit *et al.*, 2011) (Figura 1.6).

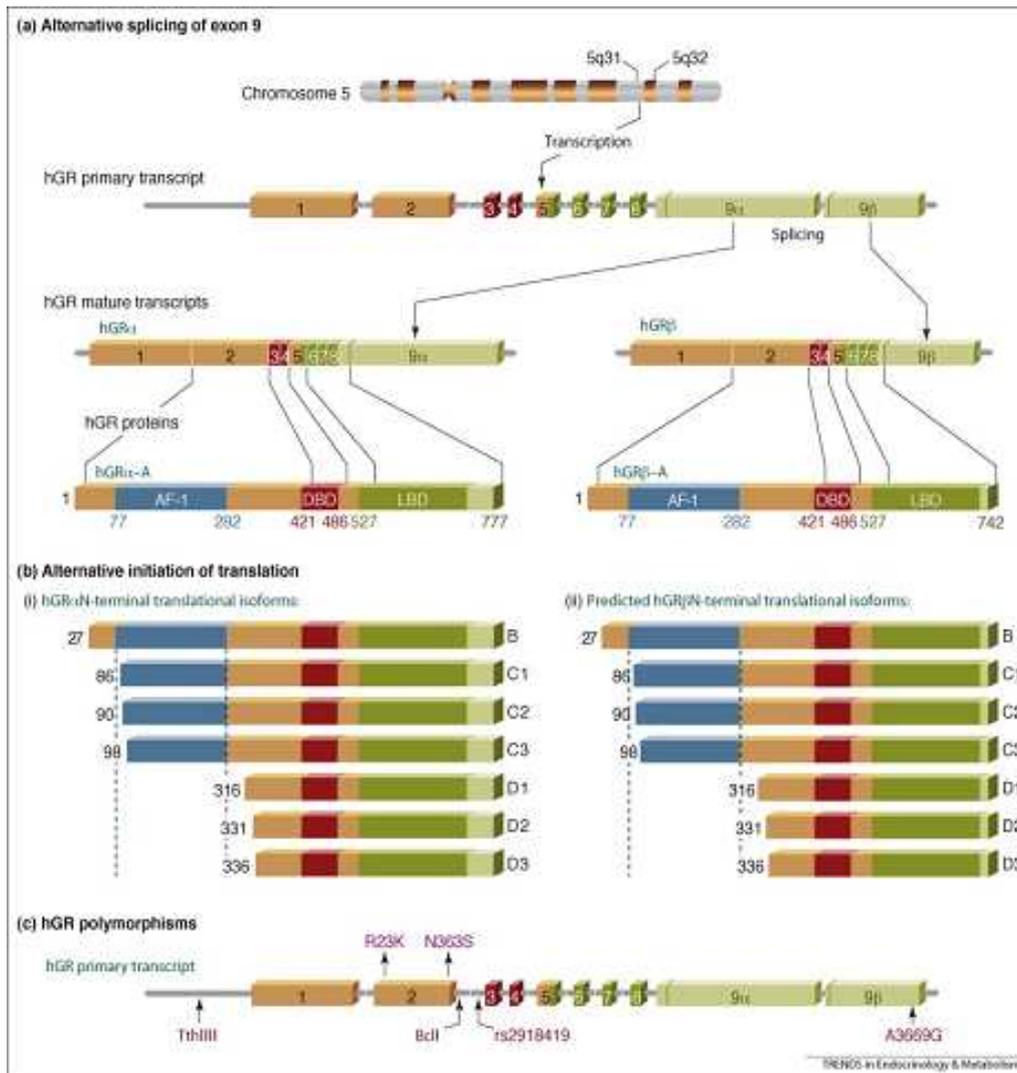


Figura 1.5: Heterogeneidad molecular de GR. GR humano da lugar a dos isoformas que difieren sólo en su extremo C-terminal, GR α y GR β mediante splicing alternativo. La iniciación de la traducción en los codones AUG internos da lugar al resto de isoformas derivadas de cada una de las mismas. (Tomada de Gross y Cidlowski, 2008).

1.3.2. Mecanismos independientes de unión a DNA

GR, en su forma monomérica, también es capaz de interferir con otros TFs mediante interacciones proteína-proteína, como ocurre con nuclear factor-kappa B (NF- κ B) o la proteína activadora-1 (AP-1),

conocidos activadores de la transcripción de genes pro-inflamatorios. Este mecanismo de acción de GR independiente de su unión a DNA se denomina *función de transrepresión* (TR). De hecho, el potencial anti-inflamatorio de los GCs se explica en gran medida por el antagonismo funcional entre GR y las vías de señalización I κ B quinasa (IKK)/NF- κ B y proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK)/AP-1. Gran parte de los efectos de los GCs en la regulación de la inflamación y de la proliferación se basan en la inhibición de genes pro-inflamatorios, como *Il-6* o *Tnf- α* . Dichos genes no contienen en sus promotores GRE sino sitios de unión para los TFs NF- κ B y AP-1, entre otros (De Bosscher y Haegeman, 2009).

Los tratamientos con GCs se asocian con un perfil de efectos secundarios perjudiciales en los que la terapia prolongada y la dosis son factores centrales de riesgo. Durante mucho tiempo se ha postulado que, mecanísticamente, estos efectos secundarios no deseados, están asociados con la función de TA de GR, mientras que los efectos anti-inflamatorios se asocian con la función de TR. En la actualidad existen evidencias de que ambas funciones pueden contribuir tanto a los efectos perjudiciales como a los efectos anti-inflamatorios, dependiendo del contexto en el que se encuentren los genes cuya expresión está regulada por estas funciones (Clark *et al.*, 2007; Newton y Holden, 2007; De Bosscher y Haegeman, 2009; Beck *et al.*, 2011; Vandevyver *et al.*, 2013). Por ejemplo, la activación transcripcional de *Mkp-1* mediante dímeros de GR inhibe la fosforilación/activación de la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) en el citoplasma, bloqueando la vía de

señalización de MAPK (Newton y Holden, 2007; Vandevyver *et al.*, 2013). También se induce la transcripción de otros genes mediada por dímeros de GR, como *IkB α* , donde, como consecuencia del aumento de los niveles de este inhibidor, se mantiene a NF- κ B inactivo en el citoplasma (Clark *et al.*, 2007; Vandevyver *et al.*, 2013).

Se han desarrollado numerosos estudios encaminados a la generación de fármacos disociados que sean capaces de inducir de forma diferencial la función de TR, pero no la de TA de GR. No obstante, se ha demostrado la importancia que tienen los mecanismos de acción post-transcripcionales en las acciones anti-inflamatorias de los GCs, en particular, la desestabilización del mRNA de algunas citoquinas y mediadores de la inflamación. La inhibición de TNF- α y otras citoquinas pro-inflamatorias a través de la inducción de la síntesis de tristetraprolina (TTP, que promueve la deacetilación y desestabilización del mRNA de *Tnf- α*) mediada por GCs (Smoak y Cidlowski, 2006; Vandevyver *et al.*, 2013), puede tener amplias implicaciones clínicas. De esta manera, las formas de expresión génica inducidas por GCs y que son críticas para el desarrollo de efectos anti-inflamatorios, se dan a múltiples niveles, y deben de ser consideradas a la hora de sintetizar nuevos fármacos (Newton y Holden, 2007).

Muchos de los datos que se conocen respecto a la función TA vs. TR vienen del análisis de dos modelos transgénicos: GR^{null/null}, donde GR ha sido funcionalmente inactivado (Cole *et al.*, 1995) y GR^{dim/dim}, que portan una mutación puntual (A458T) en el DBD de GR que impide la dimerización del receptor, por lo que, de forma general,

inhabilita sus funciones transcripcionales dependientes de unión de GR a DNA (Reichardt *et al.*, 1998 y 2001). Los ratones GR^{null/null} mueren perinatalmente por fallo respiratorio, lo que subraya la importancia de los GCs en la maduración pulmonar (Cole *et al.*, 1995), sin embargo los ratones GR^{dim/dim} son viables (Reichardt *et al.*, 1998).

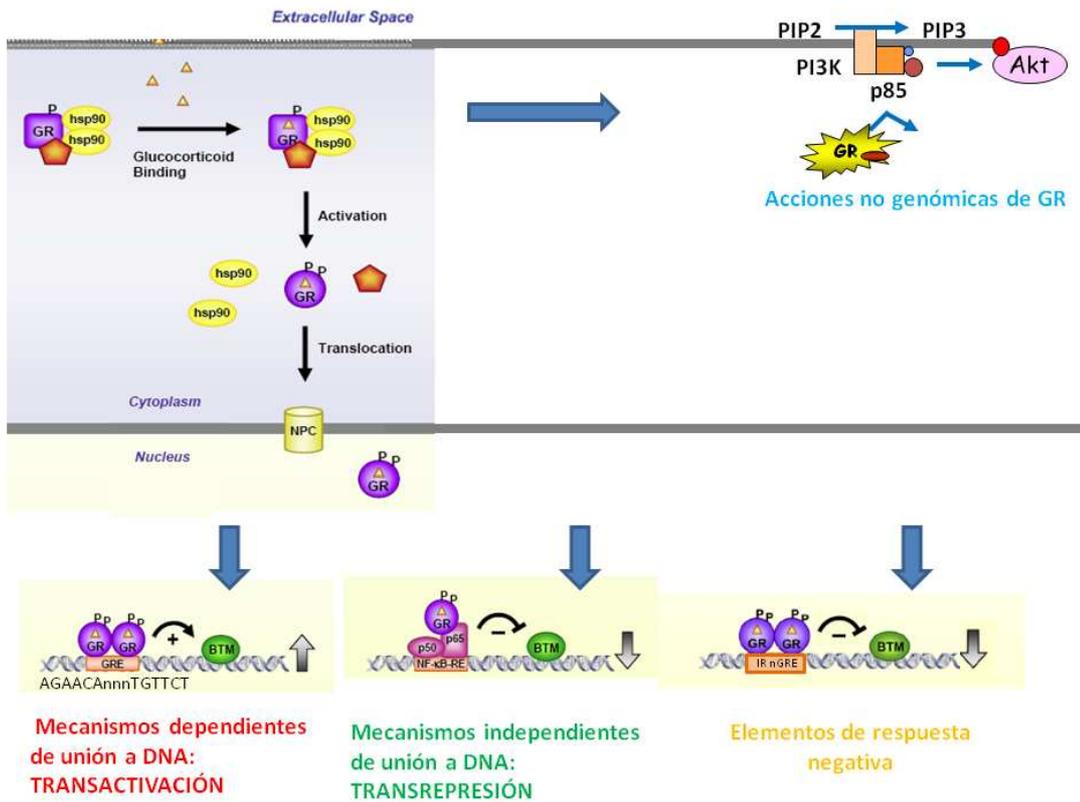


Figura 1.6: Mecanismos moleculares de acción de GR. Como respuesta al ligando, GR sufre modificaciones post-traduccionales (fosforilación), disociándose de las chaperonas HSP y translocando al núcleo donde ejerce su función como factor de transcripción a través de diferentes mecanismos de regulación de la expresión génica. La regulación mediada por GR puede ocurrir mediante mecanismos dependientes de su unión al DNA a través de secuencias GRE (función de TA clásica), o bien a través de mecanismos independientes de su unión al DNA, interfiriendo con otros TFs (función de TR). Además, GR puede reprimir genes mediante unión directa a secuencias denominadas IRnGRE. Por otro lado, GR citoplásmico puede unirse a la subunidad p85α de PI3K, modulando la vía de señalización PI3K/AKT. Adaptada de Oakley y Cidlowski, 2011.

Es importante señalar que la mutación presente en los ratones $GR^{dim/dim}$ no implica una pérdida completa en la actividad transcripcional de GR mediante mecanismos de unión al DNA, puesto que se han descrito varios genes inducidos por GR monomérico, por ejemplo el de la feniletanolamina N-metiltransferasa (*Pnmt*) (Adams *et al.*, 2003).

Mientras que los ratones $GR^{null/null}$ tienen defectos en el desarrollo epidérmico puesto que exhiben una barrera epidérmica deficiente, alteraciones en la apoptosis, proliferación y diferenciación terminal de queratinocitos, los ratones recién nacidos $GR^{dim/dim}$ no presentan fenotipo cutáneo (Bayo *et al.*, 2008).

Los ratones $GR^{dim/dim}$ adultos se han utilizado para analizar si la función de TR del receptor (en presencia del ligando sintético de GCs dexametasona, Dex) es suficiente para inhibir los efectos del éster de forbol PMA, conocido activador de AP-1 (Tuckermann *et al.*, 1999). En estos experimentos, se utilizaron ratones control (*wild type*, WT) y $GR^{dim/dim}$ para analizar la respuesta cutánea a PMA o Dex+PMA, utilizando como parámetro de referencia la inducción transcripcional de genes diana de AP-1, como las metalopeptidasas de matriz *Mmp-3* y *Mmp-13*. Los resultados mostraron que Dex inhibe los efectos del PMA tanto en ratones WT como $GR^{dim/dim}$, indicando que, efectivamente, GR es capaz de mediar la represión de genes diana de AP-1 en la piel mediante su función de TR (Tuckermann *et al.*, 1999). También se ha demostrado que, en experimentos de cicatrización, los animales adultos $GR^{dim/dim}$ exhiben mayor área de tejido de granulación y mayor densidad de fibroblastos, aunque no

presentan diferencias en la re-epitelización respecto a los animales WT (Grose *et al.*, 2002).

1.3.2.1. Antagonismo entre GR y NF- κ B

NF- κ B juega un papel determinante en muchos procesos biológicos, como la proliferación, diferenciación y apoptosis (Lawrence y Fong, 2010). En la piel, interviene en el desarrollo y diferenciación de la epidermis y apéndices cutáneos, y en los procesos proliferativos, inflamatorios y tumorales, por lo que alteraciones en la función de NF- κ B están asociadas a numerosas patologías cutáneas (Wullaert *et al.*, 2011).

Se han descrito cinco miembros de la familia de proteínas NF- κ B en mamíferos: p65 (RelA), RelB, c-Rel, NF- κ B1 (p50 y su precursor p105), NF- κ B2 (p52 y su precursor p100). En general, los factores NF- κ B pueden homo- y hetero-dimerizar, formando combinaciones múltiples para unirse a secuencias consenso denominadas κ B en los promotores de los genes regulados, aunque el dímero prototípico es el formado por p65 y p50 (Vallabhapurapu y Karin, 2009).

En ausencia de estímulos, los dímeros NF- κ B se encuentran retenidos en el citoplasma mediante su unión a proteínas inhibitoras de la actividad NF- κ B (I κ B), lo que impide su translocación eficaz al núcleo.

Una amplia variedad de estímulos como citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento, productos víricos o

bacterianos, radiación ultravioleta o radicales libres pueden activar la vía NF- κ B a través de diversas cascadas de señalización. La mayoría de ellas convergen en la activación del complejo I κ B quinasa (IKK). De este modo I κ B es fosforilado, ubiquitinizado, y posteriormente degradado por el proteosoma (Vallabhapurapu y Karin, 2009). Este proceso libera los dímeros NF- κ B de I κ B, permitiendo su traslocación al núcleo y la unión a elementos de respuesta κ B, lo que determina la activación transcripcional de genes diana, como aquellos que codifican para la síntesis de citoquinas, factores de crecimiento, moléculas de adhesión, proteínas de respuesta de fase aguda, reguladores de apoptosis celular y otros TFs (Vallabhapurapu y Karin, 2009). La actividad transcripcional NF- κ B se controla, adicionalmente, mediante modificaciones post-traduccionales, tales como fosforilación y acetilación.

GR y NF- κ B ejercen un antagonismo recíproco, siendo cada uno capaz de inhibir la actividad transcripcional del otro (Smoak y Cidlowski, 2004). Se han postulado diversos mecanismos de interacción entre estos dos TFs (Figura 1.7), que incluyen entre otros:

- 1) En el citoplasma, GR interfiere con la vía fosfatidil-inositol-3-quinasa (PI3K)/AKT (*thymoma viral proto-oncogene 1*, también llamada proteína quinasa B, PKB), que es capaz de modular la actividad IKK y, por tanto, la actividad NF- κ B (Leis *et al.*, 2004). Además, GR y p65 compiten por la subunidad catalítica citoplásmica de la proteína quinasa A (PKAc), que juega un papel importante en la inhibición de NF- κ B mediada por GR, y en la inhibición de GR mediada por p65 (McKay y Cidlowski, 2000) (Figura 1.7.1).

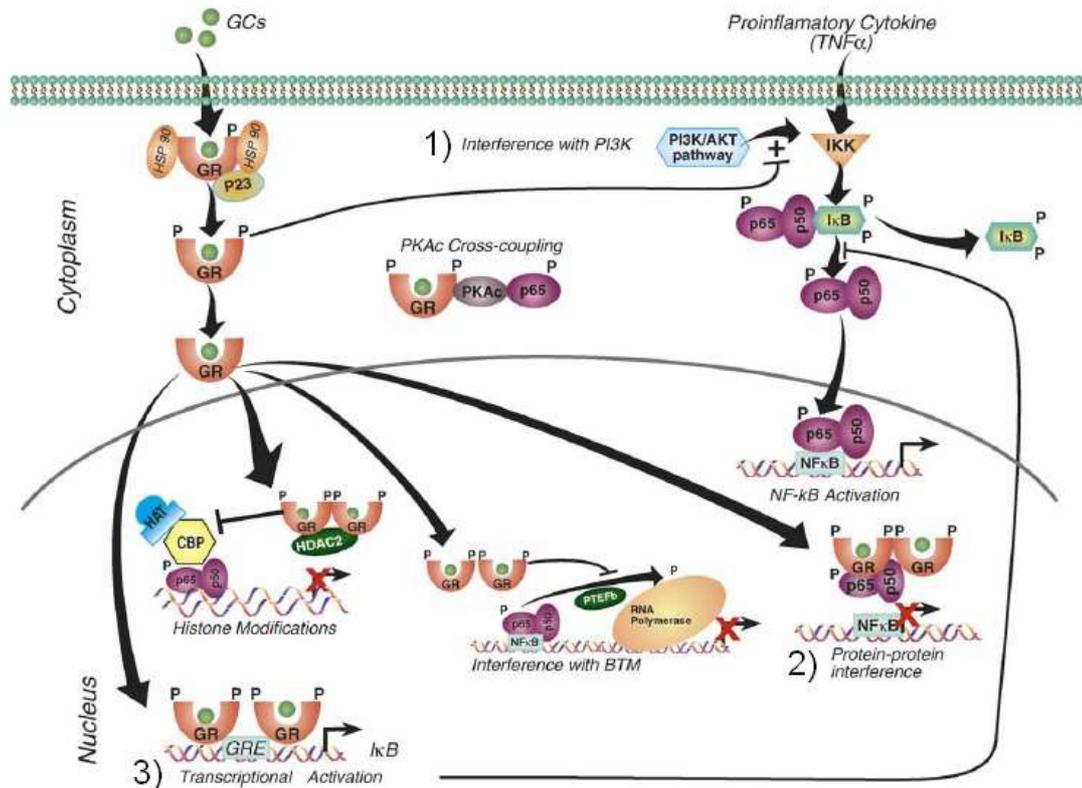


Figura 1.7: Antagonismo GR/Nf-κB. Diferentes mecanismos mediante los cuales GR puede reprimir la activación de la transcripción de genes inflamatorios κB-dependientes. Tomada de Smoak y Cidlowski, 2004

2) En el núcleo, GR puede reprimir la transcripción mediada por NF-κB a través de interacciones proteína-proteína con p65, lo que impide la unión de NF-κB a sus secuencias reguladoras (Figura 1.7.2).

3) Otro mecanismo propuesto es la inducción transcripcional de IκBα a través de GR. El aumento de los niveles de este inhibidor retendría a NF-κB inactivo en el citoplasma. Sin embargo, esta regulación es específica de tipo celular y no parece ocurrir en

queratinocitos (Pérez *et al.*, 2001; De Bosscher *et al.*, 2003) (Figura 1.7.3).

4) En algunos tipos celulares, NF- κ B es capaz de estimular la expresión de la isoforma β , GR β , la cual se comporta como un inhibidor endógeno de GR α (Webster *et al.*, 2001).

1.3.2.2. Antagonismo entre GR y MAPK/AP-1

Cada grupo de MAPK es estimulado por una cascada separada de quinasas de proteínas, que incluye la activación secuencial de una quinasa de la quinasa MAPK (MPKKK) y una quinasa de MAPK (MAPKK), que fosforila y activa las MAPKs al final de la vía (Kyriakis y Avruch, 2012). Las MAPKs fosforilan muchos TFs en su dominio de transactivación (TAD), aumentando su actividad transcripcional. Los miembros de la superfamilia de MAPKs se pueden dividir en 6 grupos en función de la similitud de su secuencia: quinasas activadas por señales extracelulares (ERK1 y ERK2), c-Jun N-terminal quinasa (JNK1, JNK2, JNK3), p38s (p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ), ERK5 (ERK5), ERK3s (ERK3, p97 MAPK, ERK4) y ERK7s (ERK7, ERK8).

JNK está implicada en numerosos procesos fisiológicos, que incluyen apoptosis, proliferación y diferenciación (Wagner y Nebreda, 2009). Se conocen tres genes que codifican para tres isoformas de *Jnk*: *Jnk1*, *Jnk2* y *Jnk3*. Los dos primeros tienen una expresión ubicua, mientras que *Jnk3* se expresan sólo en algunos tejidos.

La vía clásica Ras/ERK MAPK tiene un importante papel en homeostasis y cáncer. ERK transmite señales extracelulares al núcleo, afectando a procesos como diferenciación, respuestas a luz UV, migración, señalización por factores de crecimiento e integrinas (Khavari y Rinn, 2007);

La familia de MAPKs p38 consta de cuatro isoformas (α , β , γ , σ). p38 α y β se expresan de forma ubicua, y en queratinocitos se activan por estrés oxidativo, luz UV, citoquinas proinflamatorias e inmunomoduladoras, así como en psoriasis o en cicatrización (Chen y Bowden, 2000).

El factor de transcripción AP-1 está codificado por proto-oncogenes y regula diferentes aspectos de la proliferación y diferenciación celular. Está compuesto por homodímeros o heterodímeros de las familias de Jun (c-Jun, v-Jun, Jun-B y Jun-D), Fos (c-Fos, Fos-B, Fra-1 y Fra-2), ATF (ATF-2, ATF-3/LRF-1, B-ATF, JDP-1, JDP-2) o Maf (v-Maf, c-Maf, Maf-A/B/F/G/K, Nrl) (De Bosscher *et al.*, 2003)

Varios estímulos pueden inducir la actividad AP-1, incluyendo factores de crecimiento, mitógenos, hormonas polipeptídicas, interacciones con la matriz celular, citoquinas inflamatorias, infecciones bacterianas y virales, compuestos farmacológicos (anisomicina, ésteres de forbol), estrés celular (radiaciones UV), estrés hiperosmótico y estrés por metales pesados. Estos estímulos activan cascadas de MAPKs, que coordinan la transmisión de señales al núcleo, fosforilando TFs específicos y modulando la expresión génica (Yang *et al.*, 2013). Dicha cascada incluye la activación de AP-1

a través de una cascada que involucra la activación de las MAPKs MKK4 o MKK7, y la subsiguiente fosforilación de JNK y del sustrato c-Jun (Figura 2.7). c-Jun dimeriza con c-Fos y se une a los sitios AP-1 de los promotores de los genes diana. La activación transcripcional mediada por AP-1 es compleja y varía dependiendo de la composición de subunidades que forman el dímero, presentando distinta especificidad a la hora de unirse al DNA. Aunque ERK no fosforila a c-Jun en su TAD, puede estimular la expresión de *c-fos* y activarlo, actuando así de manera sinérgica con JNK para aumentar la actividad AP-1. JNK también fosforila otras proteínas AP-1, como JunD y ATF2 (Davis RJ, 2000). Las JNKs se activan en la piel en respuesta a luz UV y otras señales extracelulares (Adachi *et al.*, 2003).

Los GCs son capaces de reprimir la actividad de las MAPKs. Se han postulado diversos mecanismos de inhibición de la actividad AP-1 por GR (Figura 1.8):

1) GR interacciona con c-Jun evitando la unión de AP-1 a sus elementos de respuesta específicos en el núcleo (Beck *et al.*, 2009), o bien reclutando correpresores a complejos AP-1 unidos a DNA (Rogatsky *et al.*, 2003), reprimiendo así la transcripción de genes AP-1 dependientes, como ocurre con el gen de la colagenasa (Figura 1.8.1).

2) En algunos tipos celulares, los GCs inducen transcripcionalmente a *Mkp-1*, que a su vez inhibe la fosforilación/activación de JNK, ERK y p38 en el citoplasma (De Bosscher *et al.*, 2003; Ayroldi *et al.*, 2012). Estas 3 quinasas son importantes para las respuestas inmunes e inflamatorias, y la

represión de p38 mediante GCs vía *Mkp-1* se ha visto que desestabiliza el ARNm de citoquinas proinflamatorias como COX-2 (Smoak y Cidlowski, 2004) (Figura 1.8.2).

3) En algunos tipos celulares, se ha descrito que los GCs regulan negativamente AP-1 a través de la inhibición de la fosforilación mediada por JNK (Caelles *et al.*, 1997), y que este mecanismo está mediado por una interacción directa entre GR y JNK que impide su fosforilación/activación por MKK7 (Bruna *et al.*, 2003).

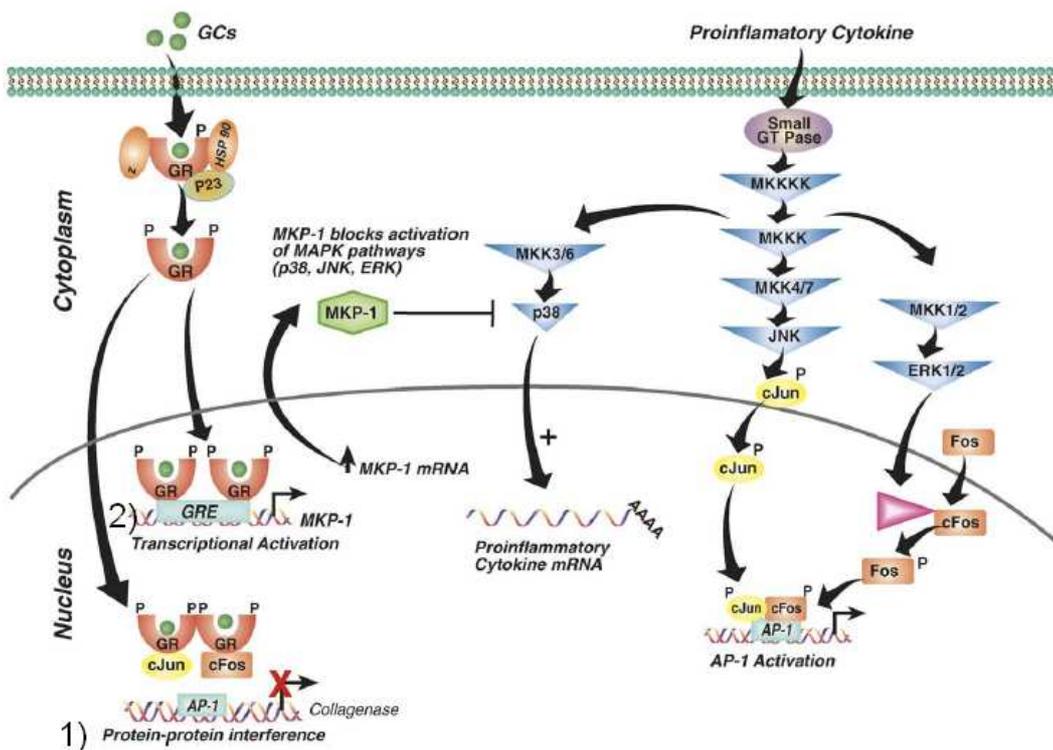


Figura 1.8: Antagonismo GR/MAPK/AP-1. Esquema de los distintos mecanismos de la represión de la vía MAPK/AP-1 mediada por GR. Tomada de Smoak y Cidlowski, 2004

1.3.3. Acciones no genómicas de GR

Algunas acciones de los GCs ocurren en unos pocos minutos o segundos, lo que no puede explicarse por medio de las funciones de TA o TR del receptor. Los mecanismos no genómicos son los responsables de este tipo de acciones hormonales.

Se sabe que en algunos tejidos, parte de los efectos anti-inflamatorios rápidos de los GCs se llevan a cabo a través de la interferencia de GR con la vía de señalización PI3K/AKT (Figura 1.6) mediante mecanismos independientes de la unión del receptor a DNA. Este mecanismo también se ha descrito para otros receptores nucleares hormonales, incluyendo el receptor de estrógenos (ER), el receptor de ácido retinoico (RAR) o el receptor de vitamina D (VDR) (Falkenstein y Wehling, 2000). AKT consta de las isoformas AKT1 (PKB α), AKT2 (PKB β) y AKT3 (PKB γ) en humanos. Su actividad se induce por PI3K, que está formada por una subunidad reguladora de 85 kDa (p85) y una subunidad catalítica de 110 kDa (p110). GR interacciona físicamente con la subunidad p85 α /PI3K en diversos tipos celulares, incluidos los queratinocitos, modulando la actividad PI3K/AKT. Se ha descrito que los GCs también pueden activar la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) de una manera no genómica mediada por la fosforilación de PI3K y AKT (Lösel y Wehling, 2003).

Datos de nuestro grupo demuestran que la interacción GR/PI3K en queratinocitos en cultivo y piel de ratón da como resultado un efecto inhibitorio de la vía PI3K/AKT. En queratinocitos, la activación de GR por Dex reduce la actividad PI3K/AKT en pocos minutos, mientras que un antagonista del receptor, bloquea dicho

efecto. Al igual que en otros tipos celulares, la regulación de la actividad PI3K/AKT mediada por GR es independiente de la unión del receptor a DNA. Nuestros datos demuestran la importancia de estas interacciones en la carcinogénesis de piel de ratón, puesto que mediante ensayos de tumorigénesis *in vivo*, se ha observado que la sobre-expresión de GR inhibe el crecimiento de tumores inducidos por AKT, disminuyendo la actividad PI3K/AKT, que además contribuye a la disminución de la actividad IKK/NF- κ B (Leis *et al.*, 2004).

1.4. La piel como sistema modelo

La piel es el órgano más extenso de nuestro organismo y constituye la barrera externa entre el organismo y el medio ambiente. Entre sus principales funciones, está la protección ante agresiones físicas, químicas y biológicas (infecciones, radiación UV, traumas mecánicos, quemaduras, heridas...). Asimismo, la piel ejerce otras funciones como la termorregulación, evitar la deshidratación corporal, participar en la sensibilidad a través de receptores cutáneos de presión, dolor y temperatura, así como almacenar energía en forma de triglicéridos y sintetizar la vitamina D.

La piel está formada por tres capas: la hipodermis, la dermis y la epidermis, cada una de ellas con estructura y función diferentes (Fuchs y Raghavan, 2002; figura 1.9). La hipodermis deriva del mesénquima y está formada principalmente por tejido adiposo. Tiene una función de reserva nutricional y energética, protege contra la presión y los traumatismos, y aísla del frío. Es el soporte de los vasos

sanguíneos y nervios que pasan desde los tejidos subyacentes hacia la dermis. La dermis es la zona intermedia que deriva, al igual que la hipodermis, del mesénquima y constituye el sostén biológico de la epidermis. Está formada por tejido conectivo fibroelástico denso muy vascularizado, constituido mayoritariamente por fibroblastos embebidos en una matriz de colágeno, elastina, glicosaminoglicanos y proteoglicanos, junto con vasos sanguíneos, canales linfáticos y receptores sensitivos.

La epidermis es un epitelio pluriestratificado queratinizado de origen ectodérmico, que descansa sobre una lámina basal, que la separa de la dermis subyacente. Esta lámina basal también separa la dermis de los apéndices cutáneos: una serie de estructuras anexas que se originan durante el desarrollo embrionario por un proceso de invaginación del epitelio epidérmico hacia el interior de la dermis e hipodermis: los folículos pilosos, las glándulas sudoríparas y las glándulas sebáceas.

La epidermis está formada por varias capas o estratos:

1. Estrato basal o germinativo: separado de la dermis por la membrana basal, una fuerte lámina de colágeno sobre la que se anclan los queratinocitos (Fuchs y Raghavan, 2002). En este estrato se localizan las células con capacidad proliferativa de la epidermis, formando una capa simple de queratinocitos mitóticamente activos. Se unen fuertemente a la membrana basal mediante hemidesmosomas y, a las células que les rodean, mediante desmosomas. Estas células expresan específicamente la pareja de queratinas K14 y K5 (Ramírez *et al.*, 1994; Koch y Roop, 2004), así

como receptores de superficie de la familia de las integrinas y cadherinas (Fuchs y Raghavan, 2002; Dusek *et al.*, 2006). Cuando los queratinocitos de la capa basal reciben las señales apropiadas, comienzan a migrar hacia la superficie en un proceso de diferenciación espacialmente ordenado.

2. Estrato espinoso: consta de 2 a 5 capas de células poligonales en humanos, unidas entre sí por un gran número de desmosomas (“espinas”) que contribuyen a la integridad del tejido y a las propiedades de barrera de la epidermis (Fuchs y Raghavan, 2002). Los queratinocitos de este estrato, aunque no han perdido totalmente la capacidad mitótica, normalmente no se dividen. Estas células expresan la pareja de queratinas K1 y K10 (Koch y Roop, 2004), que son usadas como marcadores clásicos de diferenciación temprana, aunque en situaciones de hiperproliferación o hiperplasia su expresión disminuye, siendo reemplazadas por las queratinas K6 y K16.

3. Estrato granuloso: compuesto de 1 a 3 capas de células aplanadas en humanos, llenas de numerosos gránulos de queratohialina que le confieren un aspecto característico. En estos gránulos se encuentra el precursor de la filagrina (pro-filagrina), que actúa como cementante de los filamentos de queratina. También se expresan otras proteínas estructurales, como la loricrina o la involucrina, que forman parte de la envuelta celular (Candi *et al.*, 2005). La filagrina, loricrina e involucrina son consideradas marcadores de diferenciación terminal. En la zona externa de este

estrato, los queratinocitos mueren, dando paso al proceso final de queratinización.

4. Estrato córneo: está formado por varias capas de células anucleadas, aplanadas, diferenciadas terminalmente y muertas. Estas células contienen queratina madura y están recubiertas de una matriz lipídica que le confiere la impermeabilidad a la epidermis y en cuya formación intervienen otras moléculas, como la involucrina y la loricrina (Candi *et al.*, 2005).

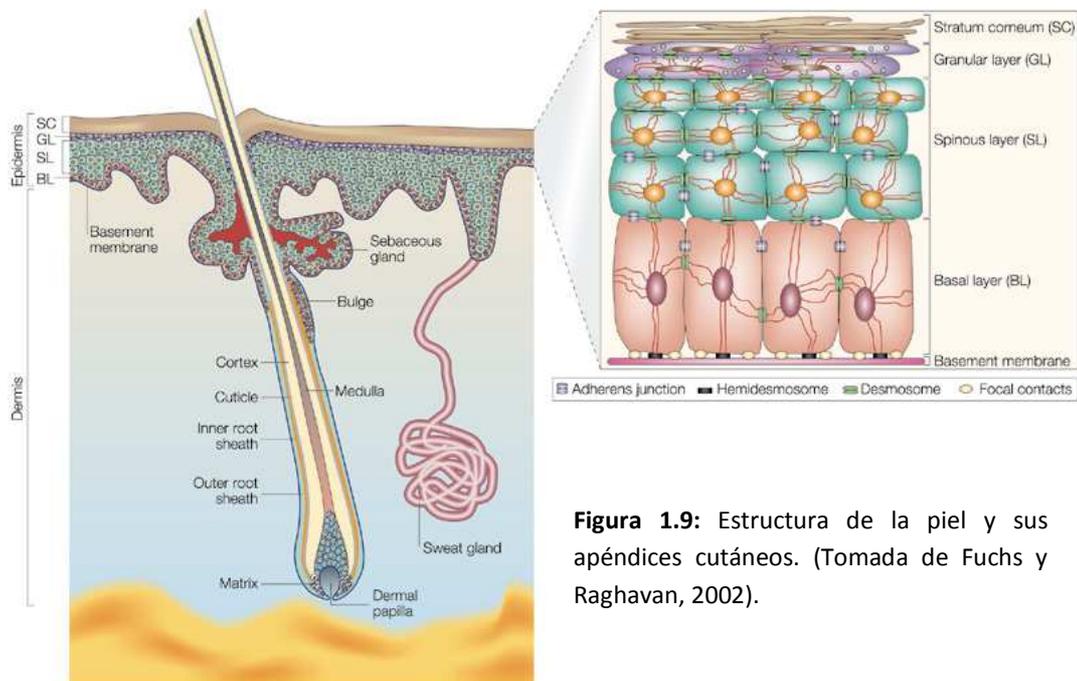


Figura 1.9: Estructura de la piel y sus apéndices cutáneos. (Tomada de Fuchs y Raghavan, 2002).

Los queratinocitos son las células epidérmicas mayoritarias (Fuchs y Raghavan, 2002). Los únicos queratinocitos con capacidad proliferativa se encuentran en la capa basal, mientras que en las capas suprabasales adquieren, de forma progresiva, distintos marcadores de diferenciación. Las capas suprabasales están formada

por queratinocitos muertos anucleados que han ido aplanándose conforme migran hacia el exterior hasta desprenderse (Figura 1.9), produciéndose así el fenómeno de descamación y renovación epidérmica que tiene lugar a lo largo de toda nuestra vida. Esta compartimentalización nos ofrece tremendas ventajas a la hora de abordar el estudio de la piel, ya que en cada capa se expresan marcadores característicos de las mismas, por lo que una expresión anormal o ectópica de dichos marcadores puede ser sintomático de algún tipo de alteración o patología cutánea.

1.5. Desarrollo, daño y reparación de la epidermis y otros epitelios estratificados

1.5.1. Desarrollo epitelial: la formación del párpado

Además de la epidermis, existen otros epitelios estratificados de origen ectodérmico y que, por tanto, siguen el mismo patrón de desarrollo, como los epitelios oculares: párpado, corneal y conjuntival. Una parte de este trabajo la hemos dedicado a analizar el desarrollo del epitelio del párpado, que tiene la misma estructura y compartimentalización que la epidermis (Figura 1.10). Los párpados están formados por una parte externa cutánea y una parte interna conjuntival. La primera está formada por dermis y epidermis, bajo la cual subyace el músculo estriado de los párpados. La fusión de los párpados protege a los componentes del ojo de la exposición a sustancias dañinas presentes del líquido amniótico (Addison y How,

1999). Por esta razón los ratones nacen con los párpados fusionados, que posteriormente se abrirán hacia el día 8-12 del desarrollo post-natal, dependiendo de la cepa.

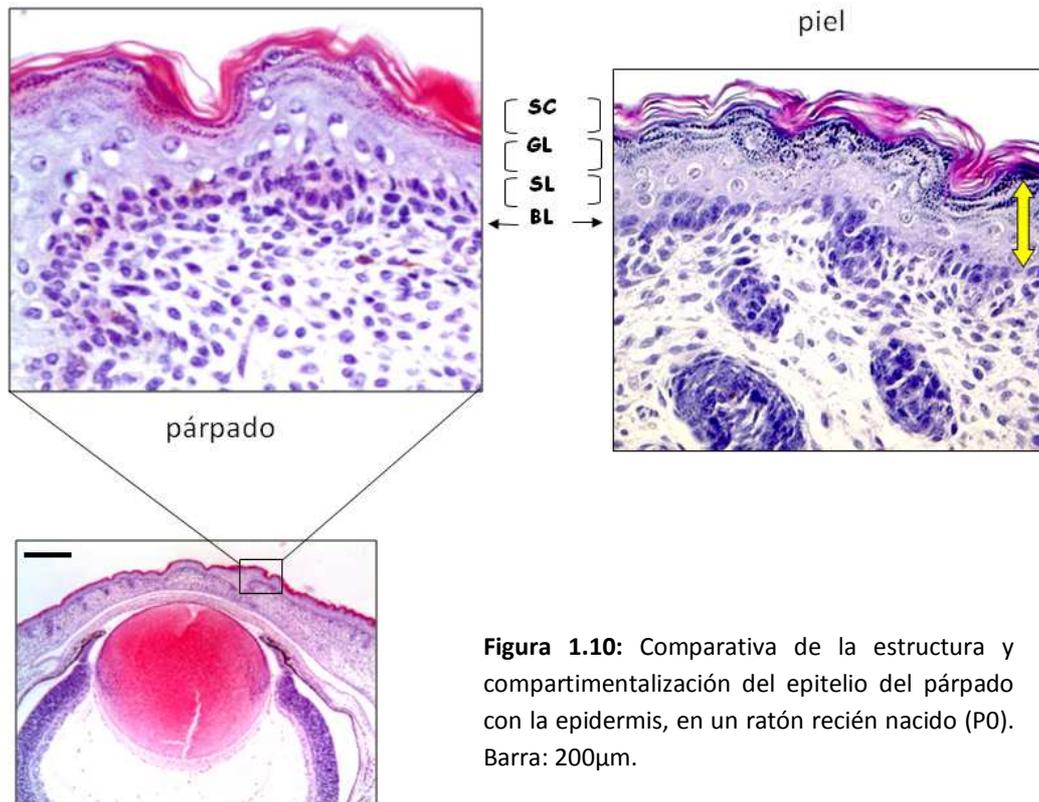


Figura 1.10: Comparativa de la estructura y compartimentalización del epitelio del párpado con la epidermis, en un ratón recién nacido (P0). Barra: 200 μ m.

La formación del párpado representa un modelo muy útil para el estudio del desarrollo epitelial, puesto que este proceso biológico requiere una coordinación espacio-temporal de la proliferación, migración, diferenciación y apoptosis celular (Figura 1.11). En el embrión de ratón, la formación del párpado comienza a la mitad de la gestación, cuando pequeñas invaginaciones de la superficie ectodérmica crecen (E12.5), convirtiéndose en bordes protuberantes (E14.5-E15.5) que, gradualmente cubren la superficie

corneal hasta que se fusionan a día E16.5 de la gestación. A día E18.5, los párpados están cerrados y comienzan a separarse a día P3-P5 del periodo postnatal, hasta su reapertura aproximadamente a día P12 (Kaufman y Bard, 1999).



Figura 1.11: Desarrollo del párpado durante la etapa de la gestación que abarca desde E14.5 hasta E16.5. Adaptada de Mine et al. 2005.

Existen al menos dos vías de señalización que desempeñan un papel fundamental en el proceso de cierre del párpado (revisado en Xia y Karin, 2004). En la primera, la señal producida por el factor de crecimiento transformante β (TGF β)/activina es transducida por MAPK quinasa quinasa 1 (MEKK1), conduciendo a la activación de JNK, fosforilación de c-Jun e inducción de la expresión de genes implicados en la migración de células epiteliales, que conducen al desarrollo y fusión de los párpados (Figura 1.12). Por otra parte, TGF α /receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) activan ERK a través de una vía independiente de MEKK1, induciendo la migración celular y el cierre de los párpados (Figura 1.12). Estas dos vías podrían estar conectadas a través de c-Jun, ya que éste controla

la expresión de EGFR y de su ligando HB-EGF, resultando además en la activación de ERK (Mine *et al.*, 2005).

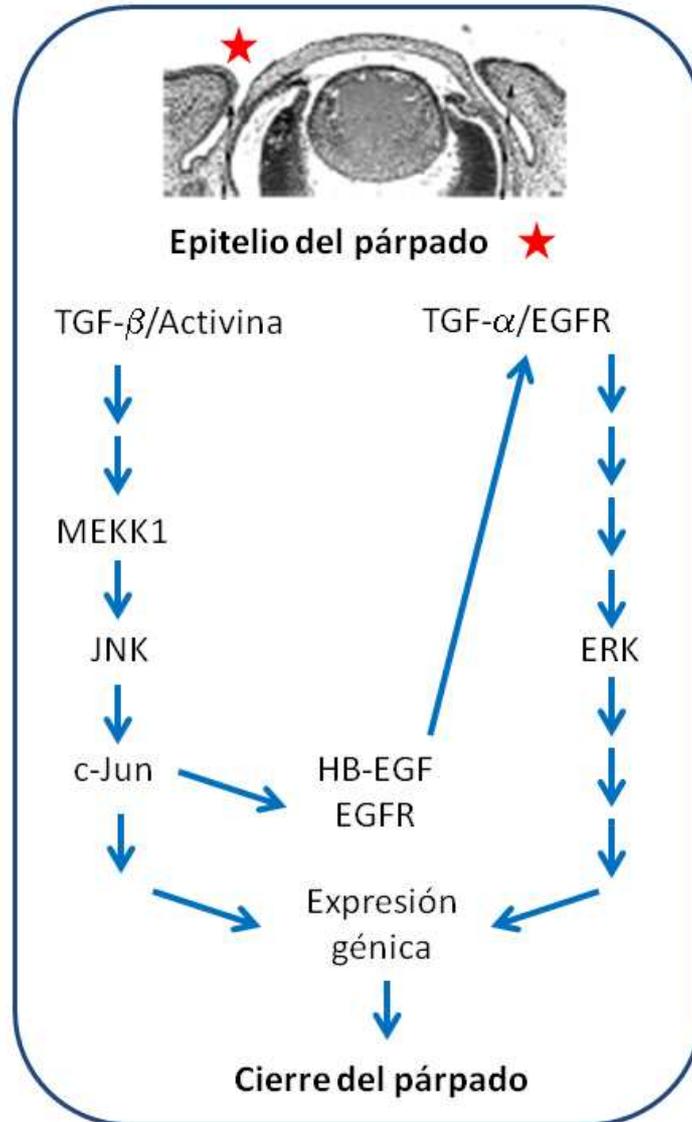


Figura 1.12: Vías de señalización esenciales implicadas en el control del cierre de los párpados en embriones de ratón. Adaptada de Xia y Karin, 2004.

Entre los modelos transgénicos en los que se han descrito alteraciones en la fusión de los párpados, destacan los de la vía de señalización de JNK/c-Jun (Zenz et al., 2003; Li et al., 2003; Weston et al., 2004), debido básicamente a una señalización deficiente en EGFR. Se sabe que la señalización dependiente de EGFR es crítica para el desarrollo del párpado, así pues, ratones defectivos en TGF α y/o de su receptor EGFR, muestran fenotipo EOB (*Eyelid Open at Birth*, ojo abierto al nacer) (Zenz et al., 2003; Sibilía et al., 2007). También se ha descrito que la señalización mediada por BMP es necesaria para el cierre del párpado (Huang et al., 2009).

Resultados previos de nuestro grupo han demostrado que la sobre-expresión ectópica de la forma WT de GR y de la de un mutante defectivo en transcripción pero eficiente en transrepresión (GR-TR: P493R, A494S) en epitelios estratificados (ratones K5-GR y K5-GR-TR), causan también alteraciones oculares, incluyendo el fenotipo EOB (Cascallana et al., 2003; Donet et al., 2008). Además también se han descrito alteraciones equivalentes en transgénicos de sobre-expresión de MR, que utilizan el mismo promotor, K5 (Sainte Marie et al., 2007).

1.5.2. Daño y reparación epitelial: la cicatrización cutánea

La cicatrización cutánea es un proceso complejo, que comienza después de una lesión y pretende la reparación del tejido dañado y la restauración de la homeostasis de la piel. Consta de tres fases (Figura 1.13):

1. Inflamación:

La respuesta inicial de los tejidos al traumatismo es la hemostasia. Se desencadena la agregación de las plaquetas, la cascada de la coagulación y una vasoconstricción inicial. Las plaquetas activadas liberan lisosomas y cuerpos densos de proteínas tales como la trombospondina, la fibronectina, el factor plaquetario 4, proteasas y metabolitos del ácido araquidónico. La extravasación sanguínea aporta otro grupo numerosos de proteínas, como son el fibrinógeno, la fibronectina, la trombospondina, la vitronectina, la trombina y el factor de Von Willebrand, que dan lugar a la formación de coágulos de fibrina. De esta manera se forma una barrera inicial o coágulo para impedir la contaminación bacteriana y la pérdida de fluidos. La liberación de enzimas intracelulares provoca una posterior vasodilatación y aumento de la permeabilidad capilar.

Además de garantizar la hemostasia, el coágulo inicial sirve de matriz provisional que permite la migración de las células inflamatorias y de las células dérmicas y epidérmicas sobre la herida, gracias a la presencia de fibronectina, trombina y trombospondina. Además, dentro de esta red de fibrina-fibronectina existe una reserva de otros numerosos factores de crecimiento que se liberan en la herida: el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) y TGF- α y β son los responsables de la migración y la activación de los leucocitos polimorfonucleares y de los macrófagos.

Los leucocitos polimorfonucleares migran hacia los tejidos dañados donde fagocitan bacterias, cuerpos extraños y tejido

desvitalizado. Amplifican la respuesta inflamatoria al actuar como sustancias quimiotácticas que atraen a otras células. La cantidad de leucocitos en ausencia de infección es máxima a las 24 horas tras la agresión, y luego desciende a medida que aumentan los monocitos.

Los monocitos actúan amplificando y controlando la respuesta inflamatoria. Tan pronto como los monocitos circulantes entran en la herida, se activan y se convierten en macrófagos. Los macrófagos continúan destruyendo bacterias, desbridando la herida, y son fuente esencial de citoquinas pro-inflamatorias como interleuquina 1 (IL-1), TNF- α y de factores de crecimiento como el factor de crecimiento de tipo insulina 1 (IGF-1), TGF- β y PDGF. Estas proteínas amplifican la respuesta inflamatoria y estimulan la proliferación de los fibroblastos, la producción de colágeno y, desde una perspectiva más general, la formación de tejido de granulación. La IL-1 y el TNF- α producidos por los neutrófilos y los macrófagos estimulan la síntesis de óxido nítrico (NO) que contribuye a la actividad anti-infecciosa en la herida (Barrientos et al., 2008; Werner y Grose, 2003).

Por tanto, los macrófagos modulan la acción de los queratinocitos para la re-epitelización, de los fibroblastos para la formación de matriz celular y de las células musculares lisas y células endoteliales para la angiogénesis. Otras células inflamatorias implicadas en la cicatrización son los linfocitos, células plasmáticas y mastocitos.

2. Re-epitelización:

El número de macrófagos desciende y otras células como los fibroblastos, células endoteliales y queratinocitos comienzan a sintetizar factores de crecimiento. Estos factores estimulan la proliferación, la síntesis de proteínas de la matriz extracelular y la angiogénesis.

Durante la fase de reparación, la matriz celular provisional (compuesta por fibrina, fibronectina y proteoglicanos) comienza a ser degradada y sustituida por una matriz más permanente formada por colágeno. Este proceso se denomina fibroplasia. Los fibroblastos y en menor grado las células musculares y epiteliales son los encargados de sintetizar el colágeno necesario para la reparación cutánea. La migración y la proliferación de los fibroblastos dependen de las citoquinas producidas por las plaquetas y los macrófagos, en especial la IGF-1, EGF, TNF- α , TGF- β y PDGF, así como por los propios fibroblastos (estimulación autocrina). Los TGF- β (1, 2 y 3) pueden estimular el depósito de matriz extracelular mediante mecanismos que comprenden un aumento de la síntesis de matriz y una disminución de su degradación. La actividad de las tres isoformas del TGF- β es compleja e implica la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 3$ y de las proteínas SMAD intracelulares, sustratos de receptores de serina/treonina quinasas de la membrana (revisado en Werner y Grose, 2003).

En la cicatrización normal hay un equilibrio entre la producción de colágeno y su degradación. Las colagenasas producidas por leucocitos y macrófagos se encargan de la destrucción del colágeno.

La síntesis de colágeno se produce en exceso en fases iniciales y, aunque luego se degrada, siempre permanece en cantidades superiores a la de la piel normal. A lo largo del proceso de cicatrización predominan diferentes tipos de colágeno. En fases iniciales se sintetiza y deposita colágeno tipo III; pero es rápidamente reemplazado por tipo I, el predominante en la piel. El colágeno proporciona la fuerza tensora de la cicatriz. También participan en la remodelación de la matriz a través de la producción de enzimas proteolíticas, entre las cuales las metaloproteinasas (colagenasa o MMP-1, gelatinasa o MMP-2, estromelisina o MMP-3) también favorecen la migración celular en la matriz.

Durante la re-epitelización los queratinocitos migran desde áreas vecinas y proliferan restaurando así el epitelio. Los restos de tejido, la fibrina y los leucocitos forman una costra por debajo de la cual ocurre este proceso. Durante la fase de migración los queratinocitos dejan de expresar determinadas integrinas como $\alpha 6\beta 4$ que permiten su fijación a la laminina 5 de la membrana basal, y en su lugar expresan receptores de integrinas de los componentes de la matriz provisional como $\alpha 2\beta 1$ y $\alpha 5\beta 1$, receptores de colágeno I y fibronectina. Estos complejos de adherencia se conectan al citoesqueleto de actina de los queratinocitos, lo que permite su migración. El NO y los factores de crecimiento de la familia del EGF, el factor de crecimiento de los queratinocitos (KGF) y los TGF- α y β son los estímulos más importantes durante la fase de epitelización, es decir, de la adherencia y migración de los queratinocitos así como de la reconstrucción de la unión dermo-epidérmica.

Las células endoteliales promueven la angiogénesis, necesaria para abastecer de oxígeno y nutrientes la zona de cicatrización. La migración de las células endoteliales se lleva a cabo mediante colagenasas específicas que abren camino a través del tejido. Simultáneamente se crea la luz de los túbulos y las conexiones vasculares con capilares neoformados vecinos. Una vez establecido el flujo vascular unos capilares desaparecen tras la remodelación y otros se diferencian en arterias y venas. Las citoquinas más angiogénicas durante la cicatrización son el bFGF, sintetizado por fibroblastos, macrófagos y células endoteliales, el TGF- β , las angiopoyetinas y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). La expresión en las células endoteliales de receptores de la familia de las integrinas, en especial el $\alpha 5\beta 3$, receptor para la fibrina y la fibronectina, es indispensable para la angiogénesis. La hipoxia tisular también estimula la angiogénesis (Barrientos *et al.*, 2008; Werner y Grose, 2003).

3. Remodelación:

La estratificación comienza cuando ya se ha cubierto toda el área abierta de la herida. Los queratinocitos estratifican y diferencian para re-establecer la barrera epidérmica. Se reemplaza el tejido de granulación por proteínas de la matriz extracelular. La fibronectina y el ácido hialurónico, inicialmente necesarios para la emigración y la proliferación celular, sufren una lisis progresiva y son sustituidos por colágeno, fibras elásticas y glucosaminoglucanos (dermatán sulfato, condroitina 4 sulfato) que forman una matriz que posee mayor resistencia a las fuerzas de tracción. El aumento en el diámetro de las

fibras se asocia al aumento de la fuerza tensora. Las uniones entre las fibras de colágeno son las responsables de este cambio morfológico.

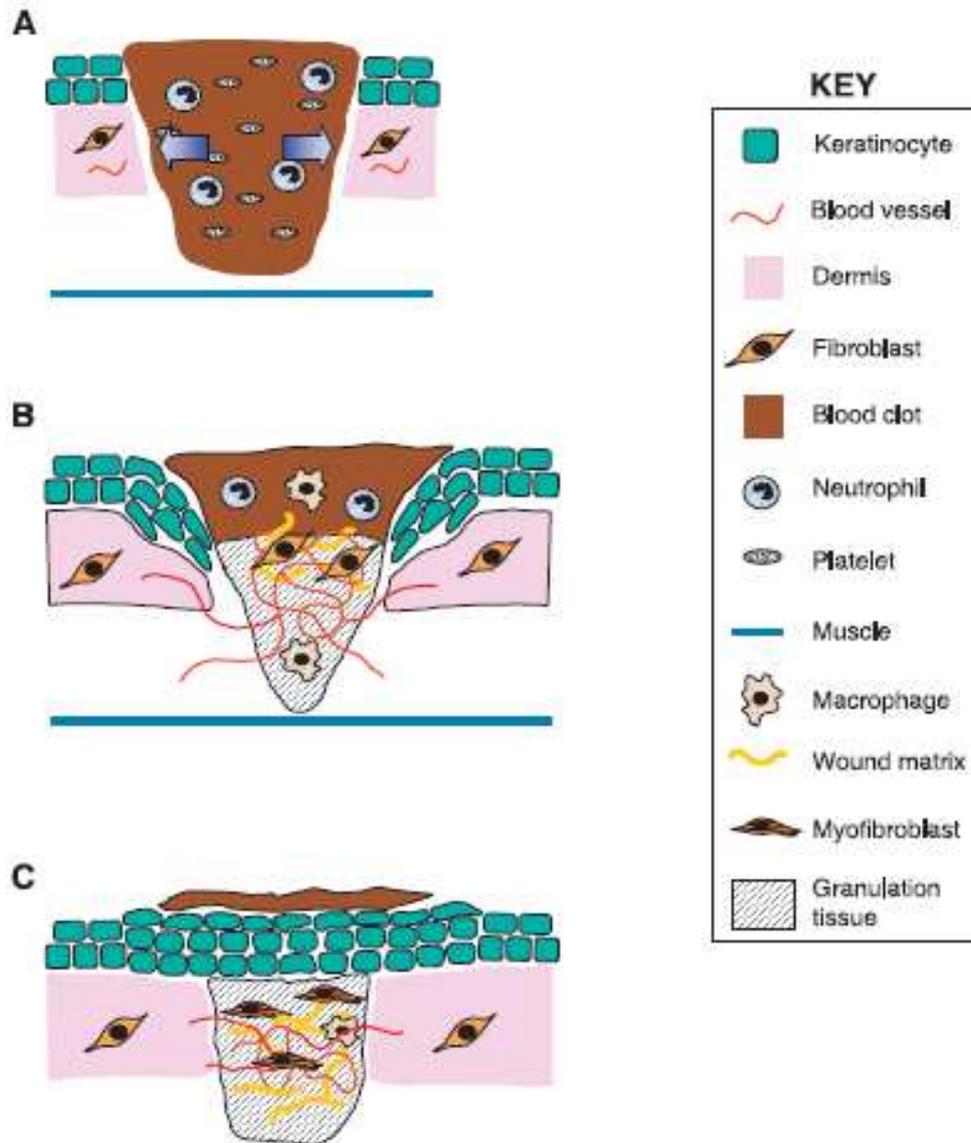


Figura 1.13: Esquema de las principales fases del proceso de cicatrización. (A)Inflamación; (B)Re-epitelización; (C)Remodelación. Tomada de Werner and Grose, 2003)

A medida que avanza la remodelación las uniones se hacen más complejas creando moléculas con más fuerza y estabilidad. Las colagenasas (MMP-1 y 8) y las gelatinasas (MMP-2 y 9) y sus

inhibidores (inhibidores tisulares de las metaloproteinasas, TIMP), las proteasas sintetizadas por los fibroblastos, los polimorfonucleares y sobre todo los macrófagos tienen una intervención importante en los fenómenos de remodelación de la matriz, favoreciendo la lisis y la síntesis de nuevas moléculas de la matriz, mejor orientadas. Por último se produce la formación de estructuras anejas, como la formación de folículos *de novo* (Barrientos *et al.*, 2008; Werner y Grose, 2003).

A continuación mostramos un esquema en el que se señalan las partes principales en una herida a nivel histológico en un ratón adulto WT sometido a un protocolo de herida. En una tinción con hematoxilina-eosina (H-E) realizada en secciones de la herida a día 4 (d4) y día 8 (d8), tiempos de recogida de muestras en este trabajo, distinguimos (Figura 1.14):

- A d4 tanto los bordes de la herida inicial como el frente de migración son claramente identificables (Figura 1.14: flecha gruesa y fina respectivamente). En la zona próxima al borde de la herida la epidermis está proliferando activamente (Figura 1.14: estrella), mientras que en el frente de migración o lengua de re-epitelización, los queratinocitos avanzan para cubrir la herida. En la parte central de la imagen distinguimos la herida abierta o costra, que es la zona de la herida cubierta por un tejido temporal, formado por plaquetas mayoritariamente, que sirve como protección

mientras se restaura la barrera epidérmica (Figura 1.14: círculo).

- A d8 la herida está cerrada por completo, el proceso de reparación está en fase de remodelación y diferenciación. En este momento ya puede observarse la formación de folículos *de novo*.

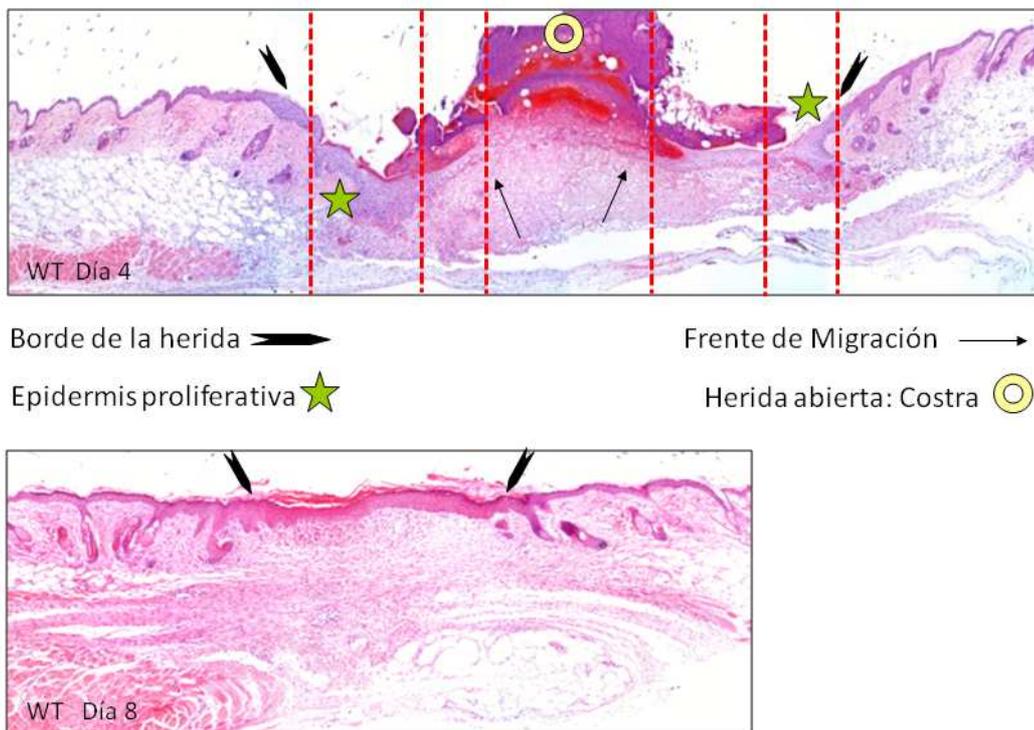


Figura 1.14: Esquema de las partes de una herida a nivel histológico en un ratón adulto WT, en una tinción con H-E a distintos tiempos del proceso de cicatrización.

La cicatrización es un proceso fuertemente regulado espacio-temporalmente. Cambios en cualquiera de los componentes del proceso pueden ser perjudiciales, conducir a lesiones en los tejidos o deteriorar la curación de los mismos. El retraso del proceso

de cicatrización es uno de los principales efectos secundarios en humanos descritos en la clínica como consecuencia del uso prolongado de GCs. (Schäcke *et al.*, 2002; Hengge *et al.*, 2006). Aunque los GCs son muy útiles para controlar las señales pro-inflamatorias iniciales del proceso de reparación, su presencia prolongada provoca que se ralentice o inhiba la cicatrización.

1.5.3. Papel de MAPK/AP-1 en la homeostasis de la piel

La vía clásica Ras/ERK MAPK tiene un importante papel en homeostasis y cáncer y también se activa en psoriasis. ERK juega un papel central en la proliferación sostenida y la viabilidad de la epidermis de mamíferos, además, ERK ejerce potentes efectos pro-tumorigénicos. Así, esta vía juega un doble papel, ya que es necesaria para supervivencia y autorrenovación de la epidermis, pero si está sobre-activada, puede causar transformación celular que conduce a cáncer (Khavari y Rinn, 2007). Además está descrito que la migración celular implica la activación de ERK en cultivos de queratinocitos primarios (Turchi *et al.*, 2002). Por tanto, ERK es un componente clave de señalización para la promoción de la migración de células epiteliales (Mine *et al.*, 2005).

En queratinocitos en cultivo, se ha visto que JNK es capaz de inhibir la diferenciación terminal, ya que su bloqueo con inhibidores específicos induce todos los aspectos de la diferenciación epidérmica *in vivo*: transcripción de marcadores de cornificación, inhibición de la

movilidad, parada del ciclo celular, estratificación y formación de estrato córneo (Gazel *et al.*, 2006).

El papel pro-inflamatorio de p38 es muy importante en la patogénesis del pénfigo vulgar, una enfermedad autoinmune con afección cutánea (Berkowitz *et al.*, 2006), mediando la migración de queratinocitos en respuesta a factores de crecimiento (Li *et al.*, 2004).

AP-1 juega importantes funciones en la homeostasis en la piel y participa en los procesos de diferenciación, cicatrización y carcinogénesis. Entre los genes regulados por AP-1 se encuentran diferentes miembros de la familia de las citoqueratinas, como K5/K14, K6/K16, así como proteínas estructurales de la epidermis, como involucrina, loricrina y filagrina (Angel *et al.*, 2001).

Mediante la generación de ratones modificados genéticamente, se sabe que algunos componentes como *c-Fos*, *FosB* y *JunD* no son necesarios para la supervivencia, mientras que otros como *c-Jun*, *JunB*, *Fra-1* y *Fra-2* son esenciales durante el desarrollo embrionario y/o la edad adulta (Jochum *et al.*, 2001).

Los ratones transgénicos con una delección condicional en *c-jun* en epidermis muestran un fenotipo de EOB y exhiben alteraciones en la cicatrización cutánea. Los queratinocitos de estos transgénicos no son capaces de migrar en ensayos de cicatrización *in-vitro*. El análisis histológico tanto *in vivo* como *in vitro* de estos ratones demostró su incapacidad para activar EGFR en el borde de las heridas. Por tanto, la falta de *c-Jun* conllevaría una disminución de la

expresión de EGFR, indicando que c-Jun actúa regulando la transcripción EGFR (Li *et al.*, 2003).

JunB puede inhibir la proliferación de queratinocitos. La deleción específica de JunB en la epidermis parece afectar a distintos órganos, incluyendo la médula ósea y los huesos, lo que apoya la idea de que la piel cumple una función endocrina en nuestro organismo (Zenz *et al.*, 2005). Los animales que carecen de JunB en la piel exhiben hiperproliferación epidérmica, alteraciones en la diferenciación e inflamación prolongada tras practicarles una herida, además de retrasos en el proceso de reorganización epitelial (Florin *et al.*, 2006). Se ha visto además, que los ratones dobles mutantes para JunB^{-/-}/c-Jun^{-/-} exhiben alteraciones cutáneas como pérdida de pelo y piel escamosa, similares a las de los pacientes con psoriasis (OMIM: 177900). Además, en estos ratones se observa una piel engrosada con hiperqueratosis (capas superiores de la epidermis altamente queratinizadas y engrosadas), un aumento en la vascularización subepidérmica y lesiones artríticas (Zenz *et al.*, 2006).

1.5.4. Factores de crecimiento y citoquinas proinflamatorias que regulan el proceso de cicatrización

La cicatrización cutánea es un proceso complejo que implica la coagulación de la sangre, inflamación, formación de tejido y finalmente la remodelación del mismo. Está ampliamente descrito en la literatura a nivel histológico, pero los genes que regulan la reparación de la piel sólo han sido parcialmente identificados.

Muchos estudios experimentales y clínicos han demostrado que los efectos de factores de crecimiento añadidos de manera exógena con fines terapéuticos durante el proceso de reparación cutánea son variados, pero beneficiosos en la mayoría de los casos. Sin embargo, el papel desempeñado por los factores de crecimiento endógenos sigue sin estar del todo claro.

Para abordar esta cuestión, que se centra en el análisis de la expresión de varios factores de crecimiento, citoquinas y sus receptores, se han utilizado diferentes modelos de heridas. Durante los últimos años, la disponibilidad de ratones modificados genéticamente ha permitido dilucidar la función de varios genes en el proceso de curación, y estos estudios han arrojado luz sobre el papel de los factores de crecimiento, citoquinas, y sus efectores *downstream* en la reparación de heridas. Cabe destacar la importancia en este proceso de EGF, del factor TGF- β , de VEGF, del factor de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), del factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), de la familia de las interleuquinas (IL) y de TNF (Werner y Grose, 2003; Barrientos *et al.*, 2008; Müller *et al.*, 2012).

Cualquier daño en la piel iniciará una cascada de eventos, que incluye inflamación, formación de nuevo tejido y remodelación de la matriz, que en conjunto, pretenden la reconstrucción y restauración del tejido dañado. Se sabe que los GCs, a través de su receptor, regulan la expresión de muchos de estos factores, que regulan la expresión de genes que intervienen en la zona de la herida

y cuya regulación va a ser clave para el buen funcionamiento del proceso de cicatrización. Conocer la interacción a diferentes niveles entre las señales intracelulares producidas por citoquinas y el papel de GR en ellas, es esencial para la regulación de la respuesta inmune, lo que incluye la regulación y expresión de citoquinas, la relación entre GR y los TFs que activan la señalización mediada por ellas y la interacción con otras vías de señalización, así como las modificaciones post-traduccionales de todos ellos (Lieberman *et al.*, 2007).

TABLE I
GLUCOCORTICOID-REGULATED GENE EXPRESSION IN NORMAL
AND WOUNDED MOUSE SKIN

Gene	Normal skin	Wounded skin	Reference
IL-1 α	No regulation	Downregulated	Hübner <i>et al.</i> , 1996
IL-1 β	Not detectable	Downregulated	Hübner <i>et al.</i> , 1996
TNF- α	Not detectable	Downregulated	Hübner <i>et al.</i> , 1996
KGF	Downregulated	Downregulated	Brauchle <i>et al.</i> , 1995
Tenascin-C	Not detectable	Downregulated	Fässler <i>et al.</i> , 1996
PDGF-A	Downregulated	Downregulated	Beer <i>et al.</i> , 1997
PDGF-B	Not regulated	Downregulated	Beer <i>et al.</i> , 1997
PDGF-RA	Downregulated	Downregulated	Beer <i>et al.</i> , 1997
TGF- β 1	Downregulated	Downregulated	Frank <i>et al.</i> , 1996
TGF- β 2	Downregulated	Downregulated	Frank <i>et al.</i> , 1996
TGF- β 3	Upregulated	Upregulated	Frank <i>et al.</i> , 1996
TGF- β RI	Upregulated	Upregulated	Frank <i>et al.</i> , 1998
TGF- β RII	Downregulated	Downregulated	Frank <i>et al.</i> , 1996
MME	Downregulated	Downregulated	Madlener <i>et al.</i> , 1998
ST-2	Upregulated	Upregulated	Madlener <i>et al.</i> , 1996
iNOS	Not detectable	Downregulated	Frank <i>et al.</i> , 1998
GTP-CHI	Downregulated	Downregulated	Frank <i>et al.</i> , 1998

Tabla 1.1: Influencia de los GCs en la regulación de la expresión génica durante el proceso de cicatrización. (Tomada de Beer *et al.*, 2000)

Tanto los GCs endógenos como exógenos ejercen un potente efecto inhibitorio sobre la expresión de citoquinas y factores de crecimiento (Tabla 1.1) durante el proceso de cicatrización a través

de su acción antiinflamatoria e inmunosupresora. Por tanto, los GCs ejercen un efecto negativo sobre el proceso de reparación a través de su influencia sobre estos TFs y citoquinas (Beer *et al.*, 2000; Liberman *et al.*, 2007).

EGFR desempeña un papel importante en la regulación del desarrollo de la epidermis y sus apéndices, además existen datos que muestran la importancia de la interacción de EGFR con GR en queratinocitos (Lee *et al.*, 2005; Stojadinovic *et al.*, 2005). En la piel, EGFR se expresa más en la membrana de los queratinocitos de la capa basal de la epidermis y en los de la vaina radicular externa de los folículos pilosos, donde residen las células con capacidad proliferativa. La expresión de EGFR disminuye tan pronto como los queratinocitos se diferencian y migran hacia las capas suprabasales epidérmicas (Sibilia y Wagner, 1995). La experimentación en ratones modificados genéticamente ha confirmado que la señalización de EGFR es de relevancia fisiológica durante el desarrollo epitelial normal. El cierre del párpado y la cicatrización cutánea representan modelos típicos utilizados para el estudio de la migración celular epidérmica y han demostrado que la señalización mediada por EGFR es esencial en estos procesos (Xia y Karin, 2004; Mine *et al.*, 2005; Müller *et al.*, 2012).

En las primeras etapas de la cicatrización, la expresión de la K6 y K16 es uno de los marcadores de la migración de queratinocitos. EGFR induce la expresión de K6/K16 a nivel transcripcional a través de sitios AP-1 presentes en sus promotores (Lee *et al.*, 2005). En cultivos de queratinocitos epidérmicos humanos, los GCs retrasan la

cicatrización *in vitro*, en parte a través de la represión de k6/k16 (Lee *et al.*, 2005; Stojadinovic *et al.*, 2005 y 2007).

Se ha descrito una interacción entre las vías de señalización mediadas por GR y β -catenina en la respuesta a herida, dando lugar a una disminución de la expresión de la K6, que se traduce en la inhibición de la migración de queratinocitos (Lee *et al.*, 2005). La activación de β -catenina por GCs implica, por un lado, su movilización desde la membrana celular al citoplasma, donde se asocia con GR y CARM-1 formando un complejo encargado de reprimir la expresión de k6/k16 (Stojadinovic *et al.*, 2005). Por otro lado, implica la posterior translocación de β -catenina al núcleo, donde ejerce su función activando/reprimiendo otros genes como *CycD1* o *c-myc* (Stojadinovic *et al.*, 2005), lo que contribuye a la inhibición de la migración de queratinocitos, causando alteraciones en la regulación del crecimiento y diferenciación, alterándose de este modo la red del citoesqueleto y contribuyendo al retraso de la cicatrización. (Stojadinovic *et al.*, 2005 y 2007; Lee *et al.*, 2005).

1.6. Modelos animales para el estudio funcional de GR en epidermis y otros epitelios estratificados

1.6.1. Estudio de la función de GR mediante modelos murinos transgénicos

Nuestro grupo desarrolla su investigación mayoritariamente en modelos murinos transgénicos. El uso del ratón como sistema modelo reviste numerosas ventajas, que incluyen su fácil estabulación, su vida media relativamente corta (1.5 años), el período corto de gestación (20.5 días) y sobre todo, la disponibilidad de numerosas técnicas para su manipulación genética. En conjunto, estos elementos hacen factible el desarrollo de modelos animales para el estudio de enfermedades humanas, lo cual implica un tremendo potencial en el estudio biomédico.

Dado que los efectos de los GCs están mediados a través de su receptor, el estudio del impacto de la ganancia y pérdida de función de GR en el desarrollo y función de la piel a través de modelos modificados genéticamente, nos aporta beneficios desde el punto de vista básico y clínico. En los últimos años, nuestro grupo ha demostrado que GR tiene un papel clave en el desarrollo epitelial, analizando modelos de ratones modificados genéticamente de ganancia y pérdida de función (Pérez *et al.*, 2001; Bayo *et al.*, 2008; Donet *et al.* 2008; Pérez *et al.*, 2011; Sevilla *et al.* 2013):

- Por un lado, hemos generado y analizado dos modelos transgénicos que sobre-expresan la forma WT de GR o el mutante GR-TR en queratinocitos epidérmicos, bajo el control de secuencias reguladoras de la queratina 5 (K5) (Pérez *et al.*, 2001; Donet *et al.* 2008). Este promotor dirige la expresión del transgén a las células basales proliferativas de la epidermis, folículos pilosos y otros epitelios estratificados (Pérez *et al.*, 2001; Ramírez *et al.* 1994).

Los ratones **K5-GR** (expresan la forma WT de GR), presentan una menor tasa de proliferación de queratinocitos basales, lo que se traduce en un desarrollo anómalo de la piel, con lesiones que van desde la hipoplasia epidérmica hasta la ausencia total de tejido (Pérez *et al.*, 2001). Además, se han detectado graves alteraciones en otros derivados ectodérmicos como en el desarrollo del folículo piloso de estos transgénicos. También se encontraron otros defectos epiteliales que incluyen alteraciones en epitelio oral, glándulas exocrinas y epitelios oculares, incluyendo defectos epidérmicos en la apertura del párpado el nacer (EOB) (Pérez *et al.*, 2001; Cascallana *et al.*, 2003 y 2005). En edad adulta, estos transgénicos son resistentes a agentes que inducen proliferación e inflamación como el PMA. También se ha demostrado mediante experimentos de tumorigénesis cutánea, que la sobreexpresión de GR en los transgénicos K5-GR ejerce un potente efecto antitumoral, a través de la inhibición parcial de la actividad NF- κ B y de la vía de señalización PI3K/Akt (Budunova *et al.*, 2003; Leis *et al.*, 2004). Cabe destacar que todos estos rasgos que caracterizan a los ratones K5-GR están de acuerdo con los efectos de los GCs descritos en piel. La severidad

fenotípica encontrada se correlaciona con el nivel de expresión del transgén.

Los ratones **K5-GR-TR** expresan un receptor con una doble mutación en los residuos P493R y A494S, eficientes en TR pero deficientes en TA (Donet *et al.*, 2008). Esta mutación no impide la inducción transcripcional de algunos genes como *Pnmt*. Estos ratones muestran un fenotipo EOB idéntico al de los ratones K5-GR, indicando que la función de TR de GR es suficiente para causar estas anomalías epiteliales oculares. En la edad adulta, los ratones K5-GR-TR son viables, con defectos leves en piel y una inhibición de la hiperproliferación e inflamación inducidas por un tratamiento tópico con PMA, respecto a los ratones control (Donet *et al.*, 2008).

Los niveles de expresión relativos y la localización subcelular de los transgenes GR y GR-TR es equivalente en ambas líneas, lo que nos permite realizar un estudio comparativo *in vivo* de los efectos de GR. Es importante resaltar que los efectos anti-proliferativos de los transgénicos K5-GR-TR son de la misma magnitud que los encontrados en K5-GR, mientras que los efectos anti-inflamatorios asociados a la expresión del transgén GR-TR son menores que los asociados a la forma WT de GR. Por tanto, la generación y caracterización funcional de los ratones K5-GR-TR realizada en el grupo, ha demostrado que los efectos anti-proliferativos de GR son mediados a través de su función de TR, mientras que las acciones anti-inflamatorias de GR son mediadas por ambas funciones, TR y TA (Donet *et al.*, 2008).

- Por otro lado, hemos analizado un modelo de pérdida de función de GR, los ratones *knock-out* de *gr* (**GR**^{null/null}, Cole *et al.*, 1995; Tronche *et al.*, 1999), donde GR ha sido funcionalmente inactivado. El exón 2 del gen Nr3c1 (*gr*) de ratón fue eliminado en células madre embrionarias utilizando un vector de sustitución (Cole *et al.* 1995). Los ratones **GR**^{null/null} mueren perinatalmente, dentro de las primeras horas posteriores a su nacimiento, por problemas en la surfactación pulmonar, lo que confirma la importancia de GR en la maduración de órganos como el pulmón. Los ratones **GR**^{null/null} tienen defectos en el desarrollo epidérmico puesto que exhiben una barrera epidérmica deficiente, alteraciones en la apoptosis, proliferación y diferenciación terminal de queratinocitos (Bayo *et al.*, 2008). Los cambios histopatológicos observados en los ratones **GR**^{null/null} están relacionados con alteraciones en la expresión de genes relevantes para la diferenciación epidérmica y para la formación de la barrera epidérmica, como *Elf5*, *Krt77* o *Cdsn*, así como de genes implicados en la apoptosis y el metabolismo lipídico, según hemos descrito mediante análisis de microarrays de piel de estos animales (Sevilla *et al.*, 2010).

Desde el punto de vista metodológico, la muerte temprana de los ratones **GR**^{null/null} nos obliga a analizar muestras de embriones tardíos, practicando cesáreas programadas, e impide el estudio de la progresión de su fenotipo en la edad adulta.

Recientemente el grupo ha generado y analizado el fenotipo de ratones transgénicos *knock-out* condicionales con inactivación de GR específica de epidermis (GR epidermal knock out o **GR**^{eko}) (Sevilla

et al., 2013). Estos ratones son viables, aunque muestran defectos en el desarrollo epidérmico, que incluyen una mayor proliferación de queratinocitos y fallos en diferenciación, que resultan en una formación deficiente de la barrera epidérmica. Un análisis transcriptómico de estos ratones ha demostrado que existe una expresión anormalmente elevada de determinados genes relevantes para la maduración del estrato córneo, que incluyen genes del complejo de diferenciación epidérmica, proteasas e inhibidores de proteasas, y genes de respuesta inmune. Es importante señalar que muchos de estos genes tienen una expresión anormal en pacientes con patologías cutáneas inflamatorias asociadas con defectos en la formación de barrera epidérmica, incluyendo la dermatitis atópica y psoriasis (Elias y Wakefield, 2011). Sin embargo, los ratones GR^{eko} adultos presentan un fenotipo leve con respecto al que presentan en etapas tempranas del desarrollo. Por otro lado, estos transgénicos son más susceptibles a tratamientos con agentes que inducen efectos proliferativos e inflamatorios, como el PMA o el detergente SDS.

1.6.2. Aproximaciones al estudio funcional de GR *in vivo* mediante la utilización de fármacos

GR interfiere, positiva o negativamente, con la actividad transcripcional de numerosos TFs, y, a la inversa, estos TFs interfieren con la actividad transcripcional de GR. No existe un mecanismo molecular único que lidere estas interacciones, aunque sí existen varios rasgos comunes entre ellas. La mayor parte de nuestro

conocimiento sobre el *crosstalk* entre los GR y otros TFs proviene de estudios *in vitro*. Pese a la relevancia *in vivo* de estos mecanismos de acción de GR, siguen siendo en gran medida desconocidos (Kassel y Herrlich, 2007).

Muchos de los esfuerzos llevados a cabo en la clínica actualmente, se dirigen a la posibilidad de desarrollar nuevos agonistas terapéuticos de GR que mejoren la práctica médica, disminuyendo en número y magnitud los efectos secundarios no deseados debidos al uso prolongado de GCs, consiguiendo como resultado una mejor proporción riesgo-beneficio para la salud de los pacientes, en comparación con el uso de GCs exógenos convencionales.

Los llamados compuestos disociativos o agonistas selectivos de GR (*selective GR agonists*, SEGRAs,) inducen la función de TR de GR de forma específica, sin activar su función de TA. La eficacia de estos compuestos en modelos de inflamación y cáncer (Schäcke *et al.*, 2006; Lesovaya *et al.*, 2011) sugiere que la represión de AP-1 y NFκB mediada por GR está relacionada con los efectos anti-inflamatorios beneficiosos de los GCs. Sin embargo, la habilidad de estos compuestos para modular la interacción de GR con otros TFs, no se ha abordado en su totalidad.

Estos nuevos ligandos sintéticos de GR no esteroideos, tienen un potencial clínico de aplicación alternativa al uso de GCs exógenos muy prometedor. Cabe destacar el Compuesto A (CpdA), un producto natural derivado de un tubérculo, que activa exclusivamente la función de TR de GR (Figura 1.15).

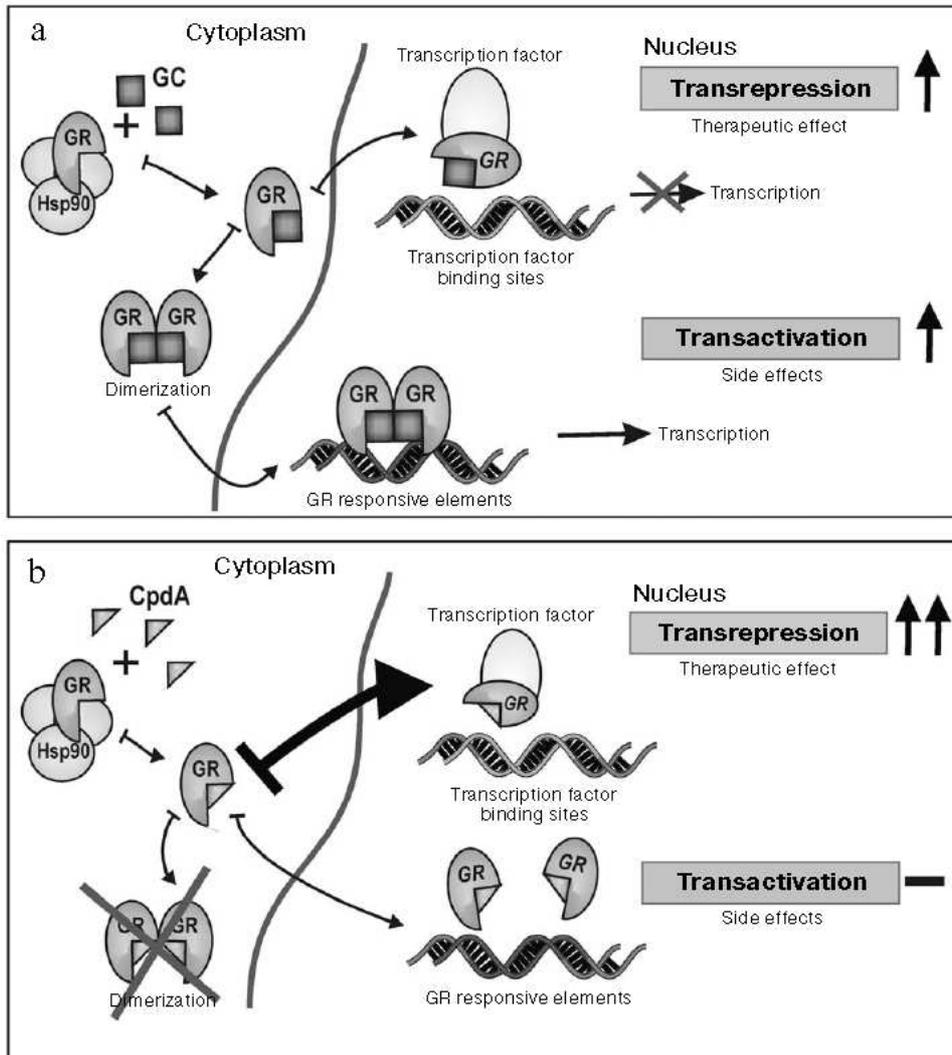


Figura 1.15: Mecanismos de acción de GR, cuando se une a GC (a) y cuando se une a CpdA (b) (Tomada de Lesovaya *et al.*, 2011)

2. OBJETIVOS

1. Estudio del papel de GR en el desarrollo de epitelios oculares:
 - 1.1. Estudio fenotípico del desarrollo epitelial ocular en ratones con inactivación funcional global de GR durante el desarrollo embrionario (ratones knock-out GR^{null/null}).
 - 1.2. Estudio de los mecanismos moleculares implicados en el fenotipo de ojo abierto al nacer de los ratones GR^{null/null}.
 - 1.3. Análisis del papel de GR en la migración celular epitelial durante el proceso de cierre de párpado.

2. Análisis funcional de GR en el proceso de cicatrización cutánea:
 - 2.1. Consecuencias de la expresión constitutiva en queratinocitos de los transgenes GR y GR-TR en el proceso de cicatrización cutánea.
 - 2.2. Evaluación de la contribución específica de los queratinocitos K5-GR y K5-GR-TR en la migración celular epitelial mediante ensayos de cicatrización *in vitro* en cultivos de queratinocitos primarios epidérmicos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Experimentación animal

3.1.1. Generación de las colonias de ratones transgénicos

La experimentación animal se realizó en el estabulario del *Instituto de Biomedicina* (46250-32-A, IBV-CSIC, Valencia) de acuerdo con la normativa vigente y respetando los procedimientos de manejo y sacrificio recomendados por las legislaciones española y europea (Real Decreto 1201/2005, B.O.E. 252, 10 de Octubre de 2005 y el Convenio Europeo: Directiva 2010/63/EU, Noviembre del 2010). Los procedimientos de experimentación fueron acordes con los Principios del Cuidado de Animales de Laboratorio (*National Institutes of Health*, NIH; ISBN-10: 0-309-15400-6, revisado en Junio del 2010).

Para realizar los experimentos con ratones transgénicos se realizaron cruces programados entre:

- individuos heterocigotos $GR^{null/+}$ para obtener individuos control $GR^{+/+}$ o *wild type* (WT), heterocigotos $GR^{+/-}$ y homocigotos $GR^{null/null}$.
- machos transgénicos K5-GR y hembras *wild type* (WT) de la cepa híbrida B6D2F1.
- machos transgénicos K5-GR-TR y hembras *wild type* (WT) de la cepa híbrida B6D2F1.

A las tres semanas se recogieron biopsias de cola para extraer el DNA genómico, y se procedió a su destete, separando machos y

hembras. A las 6 semanas los ratones son fértiles y pueden ser cruzados.

Los embriones $GR^{null/null}$ se obtuvieron mediante la realización de cesáreas programadas a día 15.5, 16.5 y 18.5 días del desarrollo embrionario (E15.5, E16.5 y E18.5, respectivamente). Para poder determinar la edad embrionaria se tomó como referencia el momento de la aparición de tapón vaginal en las hembras, que corresponde al día 0.5 después de la concepción.

Para la evaluación histopatológica del párpado durante el desarrollo embrionario, se analizaron 43 embriones $GR^{+/+}$, $GR^{+/-}$ y $GR^{null/null}$, a día E15.5, E16.5, E18.5, así como individuos recién nacidos (P0).

Para la preparación de cultivos de queratinocitos primarios (*mouse primary keratinocytes*, MPKs) y los ensayos de cicatrización *in vitro*, obtuvimos piel dorsal de 169 E18.5 K5-GR, K5-GR-TR y sus respectivos hermanos de camada WT utilizados como control, que fue procesada según se indica más adelante.

Para los experimentos de cicatrización cutánea en transgénicos K5-GR, K5-GR-TR y WT se analizaron, al menos, 12 hembras de 12 semanas de edad, para cada tiempo analizado y de todos los genotipos indicados, utilizando hermanas de camada como controles.

3.1.2. Ensayos de cicatrización *in vivo*

Previo afeitado de los animales 48h antes, la técnica utilizada para hacer este tipo de experimentos de cicatrización en piel es la siguiente: se utiliza un bisturí circular o *punch*, con el que obtenemos una biopsia de piel dorsal, mediante una incisión de 6mm de diámetro (Figura 3.1.A). A continuación, se documentan las heridas fotográficamente y se imprimen en un papel de acetato, para tomar medidas durante todo el proceso de cierre. Una vez concluido el cierre de la herida o tras la recogida de las muestras a diferentes tiempos del proceso, se calcula el área de la herida y se grafica (Figura 3.1.B). Se utilizó un test ANOVA estadístico, considerando la diferencia significativa cuando $p \leq 0,05$.

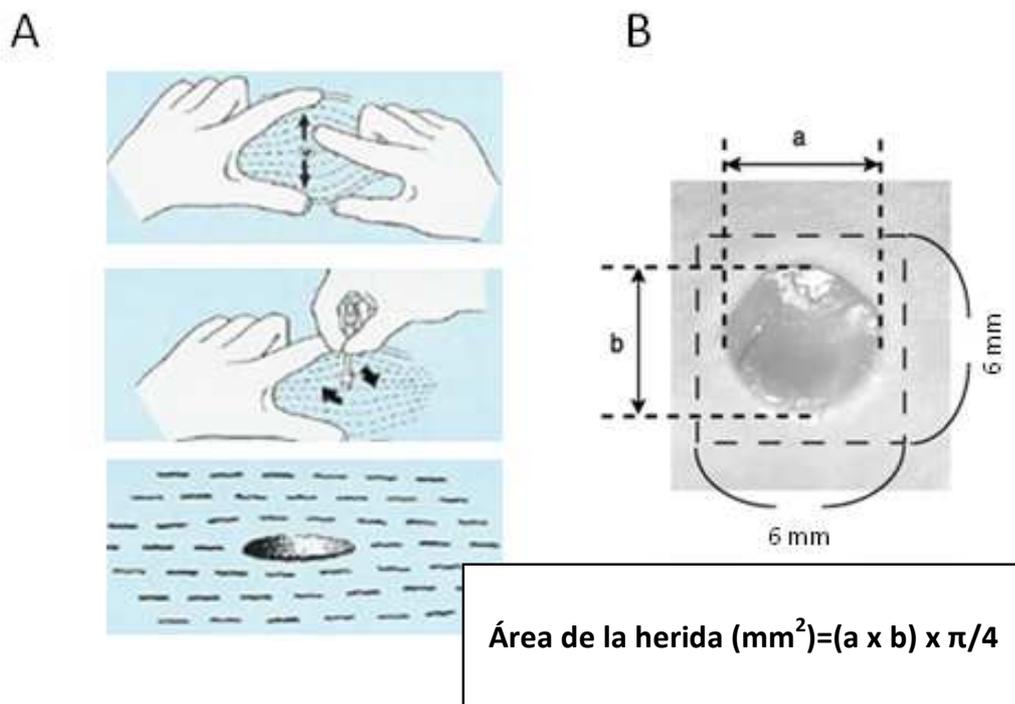


Figura 3.1: Descripción de la técnica utilizada en la toma de muestras para los ensayos de cicatrización *in vivo*. Realización de la biopsia de piel dorsal de 6mm (A) y toma de medidas para calcular el área (B).

Para comparar la histopatología de las heridas (como se describe en Lai *et al.*, 2009), se calculó el porcentaje del ancho de la herida (la distancia entre los bordes opuestos de la herida) cubierta por epitelio. Las distancias fueron medidas utilizando fotografías de las secciones de las heridas y el Adobe Acrobat 8 Professional. Calculamos el radio de re-epitelización según la siguiente fórmula:

$$\text{Re-epitelización} = \left(\frac{\text{[distancia entre bordes opuestos de la lesión - distancia entre bordes opuestos epiteliales]} }{\text{distancia entre bordes opuestos de la lesión}} \right) \times 100\%.$$

3.1.3. Tratamientos tópicos

Se afeitó el lomo de los ratones (4 hembras WT de la cepa híbrida B6D2F1) y a las 48h, se trataron los laterales del animal con Dex (8 µg) o CpdA (300 µg, De Bosscher *et al.*, 2005), disueltos en 200 µl de acetona, durante 7 días, aplicando el tratamiento días alternos. Tomamos la piel cercana a la cola como control. A d8, se sacrificaron los animales para la recogida de muestras, previa inyección con BrdU (130 µg/g peso) 1h antes.

En otro grupo de 4 hembras WT de la cepa híbrida B6D2F1, se realizó un pre-tratamiento con Dex (8 µg) o CpdA (300 µg) durante 24h, transcurridas las cuales se aplicó PMA (8 µg) durante 48h. Los animales se sacrificaron para la recogida de muestras, tras ser inyectados con BrdU (130 µg/g peso) 1h antes.

3.2. Identificación de los ratones transgénicos

3.2.1. Obtención de DNA genómico

Para identificar los ratones pertenecientes a cada genotipo se analizó el DNA genómico de biopsias de cola mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las biopsias fueron obtenidas al tiempo del destete (transcurridos 21 días desde el nacimiento) o, en el caso de los embriones, inmediatamente después de realizada la cesárea. Una vez obtenidas, las colas se digirieron en un volumen de 30 μ l de Proteinasa K (10mg/ml; Roche) y 170 μ l de tampón de digestión (50mM Tris pH=8.3, 100mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.8% SDS) durante 6h a 55°C. Se añadieron 200 μ l de fenol:cloroformo:isoamílico (Sigma) y se centrifugó a 12000 r.p.m. durante 2 min. Se recogió el sobrenadante al que se le añadieron 200 μ l de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1, Merck) y se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones. El sobrenadante resultante contenía el DNA, que se precipitó con etanol 100% y se lavó con etanol 70% (Merck). Finalmente el DNA fue resuspendido en un volumen de 150 μ l de H₂O milliQ estéril y se congeló para su almacenamiento.

3.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Una vez obtenido el DNA genómico se amplificó un fragmento específico mediante la técnica de PCR. Para ello se utilizaron oligonucleótidos específicos para cada transgén, cuya secuencia,

condiciones de amplificación y tamaño de las bandas de los productos obtenidos se detallan en la tabla 3.1 que se muestra a continuación. Para desencadenar la reacción se utilizó un termociclador (Eppendorf). Las condiciones de la reacción fueron:

- Para GR^{null/null} fueron: 2 μ l de DNA genómico, tampón de reacción libre de MgCl₂ 1x (Biotools), 2mM de MgCl₂ (Biotools), 0.4mM de dNTPs Mix (Fermentas), 5pmol de cada oligonucleótido (TIB MOLBIOL Roche) y 0.5 unidades de Taq polimerasa (Biotools) en un volumen final de 25 μ l.
- Las condiciones de la reacción para K5-GR, K5-GR-TR y fueron: 2 μ l de DNA genómico, 1.5mM de MgCl₂ 1x (Biotools), 0.25mM de dNTPs Mix (Fermentas), 12.5ng/ μ l de cada oligonucleótido (TIB MOLBIOL Roche) y 0.5 unidades de Taq polimerasa (Biotools) en un volumen final de 20 μ l.

Los productos de PCR se resolvieron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% conteniendo 0.5mg/ml de bromuro de etidio (Amresco) en tampón TAE (40mM de Tris-acetato pH 8.3, EDTA 1mM) durante 40 min a 85 voltios constantes. Para el visionado y fotografiado de los geles se utilizó un transiluminador de luz ultravioleta Biorad Gel Doc XR System.

GEN	OLIGONUCLEÓTIDOS	TAMAÑO DE BANDA	CONDICIONES AMPLIFICACIÓN
GR ^{null/null}	GR1- GGCATGCACATTACTGGCCTTCT	225 pb	95°C 1' 95°C 30" *
	GR4- GTGTAGCAGCCAGCTTACAGGA	275 pb	65°C 1' * (*) x 40 ciclos
	GR8- CCTTCTCATTCCATGTCAGCATGT	390 pb	72°C 1' * 72°C 5'
K5-GR K5-GR-TR	GR380- GTAGCCAAGTCATTCCCATC β-globina- TGCATATAAATTCTGGCTGGCG	640 pb	94°C 2' 94°C 1' * 55°C 1' * (*) x 30 ciclos 72°C 1' * 72°C 5'

Tabla 3.1: Genes amplificados mediante PCR. Se detallan las secuencias de todos los oligonucleótidos empleados, las condiciones de amplificación y los tamaños de las bandas obtenidas para cada gen.

3.3. Análisis histológico/inmunohistoquímico

3.3.1. Recolección de muestras para las determinaciones histopatológicas

Para realizar el análisis histológico del párpado, se obtuvieron biopsias de piel de cabeza de ratones GR^{null/null} y WT a distintos estadios del desarrollo (E15.5, E16.5, E18.5 y P0). Las muestras se fijaron en etanol 70% (Scharlab) o PFA 4% (Merck) para su posterior análisis inmunohistoquímico.

Para el análisis histológico de las heridas, se obtuvieron biopsias de la piel dorsal dañada de los ratones K5-GR, K5-GR-TR y WT a d4 y a d8 del proceso de cicatrización. Las muestras recogidas se congelaron en N₂ líquido para extraer tanto RNA como proteínas, o se fijaron rápidamente en etanol 70% para realizar análisis inmunohistoquímicos.

Para realizar el análisis histológico de los ratones utilizados en el estudio del CpdA, obtuvimos muestras de piel de lomo tratada y/o sin tratar con los distintos fármacos, de cada individuo, en los tiempos indicados en el estudio. Las muestras recogidas se congelaron en N₂ líquido para extraer tanto RNA como proteínas, o se fijaron rápidamente en etanol 70% para realizar análisis inmunohistoquímicos.

Tras la fijación, las muestras fueron incluidas en parafina (Panreac) previa deshidratación en sucesivos pases por concentraciones crecientes de etanol y por xileno (Merck), en un centro de inclusión EC-350 Myr (Microm) (ver tabla 3.2). Posteriormente se realizaron cortes seriados de 4 μm con un microtomo de rotación HM-340E (Microm) y fueron adheridas a portaobjetos tratados con poli-L-lisina (BDH).

3.3.2. Desparafinación e hidratación/deshidratación de las muestras

Previamente a realizar las tinciones e inmunodetecciones, los cortes de parafina que contenían las muestras fueron desparafinados mediante pases sucesivos por xilol, e hidratados en sucesivos pases por etanoles a concentraciones decrecientes (100 %, 90 %, 70 %, 50% y H₂O). Tras la tinción/inmunodetección se procedió a su deshidratación pasándolos por etanoles crecientes (50 %, 70 %, 90 %, 100 %) y Xilol.

3.3.3. Tinción con Hematoxilina-Eosina

Tras la hidratación, los cortes se sumergieron en soluciones de hematoxilina de Harris (Panreac), reactivo *bluing* (Shandon) y eosina amarilla (Panreac). Una vez teñidas se deshidrataron y se montaron con una resina sintética (De-Pex, BDH). Las preparaciones fueron analizadas y fotografiadas mediante un microscopio de campo claro (Leica DM6000B).

3.3.4. Análisis inmunohistoquímico

Para la realización del análisis inmunohistoquímico se desparafinaron las muestras con xileno (I y II) y se pasaron a etanol 100% (I y II) un tiempo mínimo de 10 min por pase. A continuación fueron sumergidas durante 20min en una solución de Metanol:H₂O₂ (29:1). Con este paso se bloqueó la actividad peroxidasa endógena.

Las muestras fijadas en PFA 4% fueron incubadas durante 10 min en Citrato 10mM (pH=6) al baño maría, ayudándonos de un microondas.

A continuación, y para poder reducir el marcaje inespecífico, se incubaron las muestras al menos 20min en una solución 5% FBS/PBS. Seguidamente se procedió a la incubación con el anticuerpo primario correspondiente (tabla 3.3), un tiempo mínimo de 3h a temperatura ambiente (*room temperature*, RT) o durante 18h a 4°C. Los anticuerpos se diluyeron en todos los casos en 0.1% PBS/BSA. Transcurrido el tiempo adecuado se lavaron las muestras con PBS (10 min por lavado) y se incubaron a RT durante 45 min con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con biotina (tabla 3.3), diluido en 0.1% PBS/BSA. A continuación se lavaron las muestras tres veces en PBS (10 min por lavado) y se incubaron durante 30min, a RT con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC, Vectastain Elite, Vector Laboratories).

Para revelar la reacción se utilizó un kit de diaminobenzidina como sustrato cromogénico para la peroxidasa (DAB, Vector Laboratories), siguiendo las recomendaciones del proveedor. La reacción química se paró con agua visualizando las preparaciones en un microscopio óptico para determinar el tiempo adecuado de revelado. Para poder contrastar la señal se realizó una tinción suave con hematoxilina. Las muestras se deshidrataron y se montaron según lo anteriormente descrito. En cada determinación se realizó un control negativo, utilizando sólo el anticuerpo secundario correspondiente.

REACTIVO	TIEMPO (h)
Etanol 70%	1
Etanol 95% I	3
Etanol 95% II	1.5
Etanol 100% I	2
Etanol 100% II	6
Xileno I	1.5
Xileno II	2.5
Parafina I	2.5
Parafina II	2

Tabla 3.2: Programa de Inclusión de las muestras en parafina con el centro de inclusión EC-350 Myr.

3.3.5. Inmunohistoquímica anti-BrdU

Para poder analizar el índice de proliferación celular *in vivo* se inyectó de forma intraperitoneal a los animales (o a las hembras antes de practicarles la cesárea) 5-Bromo-2'-deoxiuridina (BrdU, Sigma), un análogo de la timidina que se incorpora al DNA durante el proceso de síntesis. En la inyección se administraron 130µg/g peso disueltos en 0.9% NaCl, 1h antes del sacrificio/cesárea.

ANTICUERPO PRIMARIO	DILUCIÓN	FABRICANTE	FIJACIÓN DEL TEJIDO
K5 (PRB-160P)	1:5000	Covance	etanol 70%
K6 (PRB-169P)	1:1000	Covance	etanol 70%
K10 (PRB-159P)	1:1000	Covance	etanol 70%
loricrina (PRB-145P)	1:1000	Covance	etanol 70%
p63 (sc-404)	1:100	Santa Cruz, CA	PFA 4%
p-c-jun (KM-1) (sc-822)	1:100	Santa Cruz, CA	PFA 4%
EGFR (sc-03)	1:300	Santa Cruz, CA	PFA 4%
p-JNK (Thr183/Tyr185) (# 9251)	1:100	Cell Signaling	PFA 4%
p-ERK (Thr202/Tyr204) (# 4376)	1:100	Cell Signaling	PFA 4%
p-EGFR (53A5)(#4407)	1:100	Cell Signaling	PFA 4%
BrdU (11-170-376-001)	1:100	Roche	etanol 70%
β -catenina (sc-7199)	1/500	Santa Cruz, CA	etanol 70%
Ly6G (551459)	1/100	BD Pharmingen	etanol 70%
F4/80 (MCA497GA)	1/100	AbD Serotec	etanol 70%
TNF- α (559064)	1/100	Calbiochem	etanol 70%

ANTICUERPO SECUNDARIO	DILUCIÓN	FABRICANTE
Anti-conejo biotinilado	1:1000	Jackson ImmunoResearch
Anti-ratón biotinilado	1:1000	Jackson ImmunoResearch
Anti-rata biotinilado	1:1000	Jackson ImmunoResearch
Anti-conejo TXR AlexaFluor®568 (A21069)	1:1000	Invitrogen

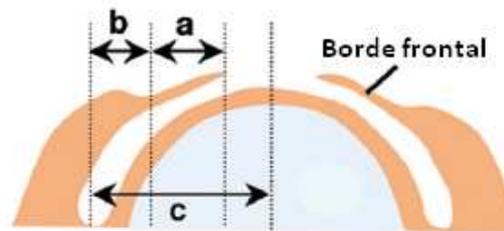
Tabla 3.3: Anticuerpos utilizados en inmunohistoquímica.

Las muestras de tejido de los ratones que habían sido previamente inyectados, tras el bloqueo con Metanol:H₂O₂, se incubaron las muestras en HCl 1N (Merck) durante 40 min a 37°C, lo que favorecía la desnaturalización del DNA. A continuación se realizaron 5 lavados de 10 min con PBS y se procedió tal y como ha sido descrito en el apartado anterior.

Para el análisis de proliferación se realizó un recuento del número de núcleos BrdU positivos de queratinocitos basales interfoliculares respecto al número total de núcleos basales. Los experimentos se realizaron al menos en cinco individuos de cada genotipo y las diferencias se analizaron utilizando el test t-Student, con significación estadística cuando $p \leq 0.05$.

3.3.6. Medida de la formación del párpado

Para cuantificar las diferencias en la formación del párpado de los E15.5 GR^{null/null} vs. WT hermanos de camada, utilizamos cortes teñidos con anti-K6, con el fin de delimitar la migración de las células epiteliales (Mine et al., 2005). La distancia de migración definida por las células K6-positivas se consideró como parámetro a ; la distancia que delimita el eje entre el saco conjuntival y la primera célula K6-positiva se denominó b ; la distancia que delimita el eje entre el saco conjuntival y el centro de la córnea se denominó c . Los porcentajes de las medidas se calcularon según las fórmulas indicadas en la Figura 3.2. Los cálculos fueron realizados en 5 individuos para cada genotipo. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p \leq 0,05$.



$[a/c] \times 100 =$ Formación del borde frontal (%)
$[b/c] \times 100 =$ Formación de la raíz (%)
$[(a+b)/c] \times 100 =$ Formación del párpado (%)

Figura 3.2: Estimación de parámetros para medir la progresión de la formación del párpado. (Adaptada de Mine et al., 2005).

3.4. Análisis de la apoptosis en tejido

Analizamos el porcentaje de células apoptóticas en secciones de tejido (piel de lomo y cabeza) incluido en parafina realizando un ensayo TUNEL con el kit *In Situ Cell Death Detection* (Roche). Los cortes de tejido en parafina se sumergieron en una solución de Citrato 10mM (pH 6) al baño maría, ayudándonos de un microondas. Tras lavarlos con PBS se añadió mezcla de reacción TUNEL siguiendo las recomendaciones del fabricante, 1 h a 37°C y en oscuridad. Los portaobjetos que contenían las muestras se montaron con medio de montaje para inmunofluorescencia y con DAPI y se visualizaron y fotografiaron en un microscopio de fluorescencia Leica DM RXA2, para determinar el porcentaje de núcleos apoptóticos. Para expresar el número de células apoptóticas se calculó el valor medio \pm la desviación estándar (SD) de los valores obtenidos del recuento de al menos tres experimentos independientes (tres réplicas por cada condición experimental). Las diferencias se analizaron utilizando el test t-Student, con significación estadística cuando $p \leq 0.05$.

3.5. Aislamiento y cultivo de queratinocitos primarios de ratón

Tras practicar las cesáreas programadas a las hembras gestantes, se recogieron los embriones de E18.5 y se sacrificaron. Guardamos una biopsia de cola para su posterior genotipado (ver apartados 3.2 y 3.3). Los cuerpos se sumergieron en PBS y en etanol

70 % para limpiar los posibles restos. Se separaron las extremidades y se practicó un corte longitudinal que nos permitió extraer la piel del animal. Se depositó la piel, con la dermis hacia abajo, en una placa de cultivo con 1 ml de 0,25 % tripsina estéril durante 18h y a 4 °C. A continuación, separamos la epidermis de la dermis y se homogeneizó con ayuda de material quirúrgico en medio mínimo esencial estéril EMEM (BioWhittaker, Inc., Walkersville, MD). Transferido a un tubo, agitamos vigorosamente a 4 °C durante 10 min para permitir que se desprendieran las células. Posteriormente se filtró y se centrifugó para recoger todos los queratinocitos en suspensión. Estos fueron resuspendidos en medio de cultivo completo con bajo calcio (ver tabla 3.4).

Se sembraron 1×10^6 queratinocitos por placa p35 (BD Biosciences) tapizada con colágeno I (BD Biosciences). Cuando así fue requerido, y para alcanzar un mínimo establecido de células por placa en la siembra, se realizó un pool de 2 embriones del mismo genotipo. Transcurridas 24h, retiramos el medio y lo sustituimos por un medio completo con alto calcio (ver tabla 3.4). El medio de cultivo se reemplazó cada dos días. Las células se dejaron crecer hasta alcanzar confluencia. A partir de los cultivos las células fueron destinadas a ensayos de cicatrización *in vitro*.

3.5.1. Ensayos de cicatrización *in vitro*

Cuando las células alcanzaron confluencia, se incubaron con EMEM/1% FBS durante la noche. A primera hora de la mañana, se trataron con Mitomicina C (10µg/ml, Sigma) durante 1h, para parar la proliferación celular. Transcurrido este tiempo se retiró el tratamiento, renovando el medio EMEM/1% FBS y se realizó la herida con una punta amarilla estéril. Seguidamente añadimos al medio Dex 100nM (Sigma), EGF 25ng/ml (Sigma) o vehículo. Hicimos un seguimiento de la migración celular durante las siguientes 8-24h y documentamos el proceso de migración celular fotográficamente. Las imágenes de contraste de fases de los cultivos se realizaron mediante microscopio (Leica DM-IL). Los experimentos se realizaron por triplicado.

Por cada experimento, el área de la superficie no cubierta por las células, para cada tiempo y cada condición, se cuantificó con Adobe Acrobat 8 Professional. Las medidas se expresaron como el porcentaje de la distancia cubierta por el movimiento de las células en el área de la herida, a 8-24h. Analizamos seis imágenes por tiempo y condición, calculando promedios y desviaciones estándar. Se utilizó un test ANOVA estadístico, considerando la diferencia significativa cuando $p \leq 0,05$.

MEDIO DE SIEMBRA	
REACTIVO	FABRICANTE
Medio EMEM	BioWhittaker, Inc., Walkersville, MD
4 % FBS-CHELEX	BioWhittaker, Sigma
Penicilina/estreptomicina	GIBCO
Anfotericina	BioWhittaker, Sigma
0,6 mM CaCl ₂	Sigma
MEDIO DE CRECIMIENTO	
REACTIVO	FABRICANTE
Medio EMEM	BioWhittaker, Inc., Walkersville, MD
4 % FBS-CHELEX	BioWhittaker, Sigma
Penicilina/estreptomicina	GIBCO
Anfotericina	BioWhittaker, Sigma
0,05 mM CaCl ₂	Sigma
10 ng/ml EGF	Sigma

Tabla 3.4: Composición de los medios de siembra y de crecimiento para el cultivo de queratinocitos primarios de ratón. Al suero bovino fetal (FBS) se le eliminaron los cationes divalentes mediante tratamiento con resina CHELEX.

3.6. Análisis de expresión génica

3.6.1. Recolección de muestras y procesamiento para la obtención del RNA

Se recogieron muestras de piel (dorsal de embriones GR^{null/null} y WT, así como heridas de ratones adultos K5-GR, K5-GR-TR y WT) que se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. Las muestras (50-100mg) se homogeneizaron en 1ml de Trizol (Invitrogen), con un polytron PT 1600 E (KINEMATICA AG, Suiza) a máxima potencia, siempre en hielo y se centrifugaron a 10.000 r.p.m. durante 10 min a 4°C y se recogió el sobrenadante. Transcurridos 4 min, en los que las muestras se mantuvieron a RT, se añadió 0,2ml de cloroformo (Merck). Se agitó vigorosamente durante unos segundos y se dejaron las muestras de nuevo durante 5 min a RT. A continuación se centrifugó a 13.200 r.p.m. durante 15 min a 4 °C. La fase acuosa fue transferida a nuevos tubos que contenían 0,5 ml de Isopropanol (Merck). Transcurridos 4 min a RT se centrifugó a 13.200 r.p.m. durante 10 min a 4 °C. Se desechó el sobrenadante y se añadió al pellet 1ml de etanol 75 % en agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC, Sigma) para eliminar las RNAsas y se centrifugó a 6.000 r.p.m. durante 5 min a 4 °C. Se retiró el etanol y se dejó secar el pellet aproximadamente 10 min en hielo, resuspendiéndolo en 25 µl de H₂O DEPC.

3.6.2. Determinación de los niveles relativos de mRNA

Para realizar la retrotranscripción se incubó 1 µg de RNA con 1 µl de Oligo (dT)18 100 µM (Fermentas) y H₂O DEPC hasta completar un volumen total de 12.5 µl, durante 5 min a 70 °C. Seguidamente se añadió, siempre en hielo, 4 µl de tampón de reacción 5X (Fermentas), 2 µl 10mM dNTP Mix (Fermentas) y 20 U de inhibidor de ribonucleasas (Fermentas). Se incubó a 37°C durante 5 min y se pasó a 4°C. Se añadieron a continuación 200 unidades de transcriptasa inversa (Fermentas). Se incubó durante 60min a 42°C y finalmente se realizó una segunda incubación a 70°C durante 10 min para parar la reacción (volumen final de la reacción =20µl).

Los niveles relativos del transcrito se determinaron por PCR cuantitativa (RT-QPCR, Applied Biosystems 7500 Fast real time PCR system), utilizando oligonucleótidos específicos para cada gen (que se detalla en la tabla 3.5) y FastStart Universal SYBR Green Master ROX (Roche), bajo las siguientes condiciones de amplificación: 95°C, 20 seg; 40 ciclos de: 95°C, 30 seg seguido por 60°C 30 seg.

Se realizaron triplicados biológicos y técnicos, calculando los valores promedio \pm SD. Se utilizó un test ANOVA estadístico, considerando los cambios estadísticamente significativos cuando $p \leq 0,05$.

Gen	Oligonucleótidos
<i>Egfr</i>	forward, 5'-CAA AGT GAT GTC TGG AGC TAT-3` reverse, 5'-CTT GCT GGG ATT CCA TCA TAA G-3`
<i>Tnf-α</i>	forward, 5'-ATG AGC ACA GAA AGC ATG ATC CGC-3` reverse, 5'-TAC AGG CTT GTC ACT CGA ATT-3`
<i>Il1-β</i>	forward, 5'-ATG GCA ACT GTT CCT GAA CTC ACC T-3` reverse, 5'-CAG GAC AGG TAT AGA TTC TTT CCT TT-3`
<i>Tgfβ-1</i>	forward, 5' CTT CAG CTC CAC AGA GAA GAA CTG-3` reverse, 5'-CAC GAT CAT GTT GCA CAC TGC TCC-3`
<i>Tgfβ-3</i>	forward, 5' TGG CGG AGC ACA ATG AAC TGG-3` reverse, 3' CCT TTG AAT TTG ATT TCC ATC-3`
<i>Kgf</i>	forward: 5'-TGC AGC AAC TGG CCT TGT CAC-3` Reverse: 5'-TCC AAC TGC CAC GGT CCT GAT-3`
<i>Hprt1</i>	forward, 5'-CAG GAC TGA AAG ACT TGC TCG AGA T-3` reverse, 5'-CAG CAG GTC AGC AAA GAA CTT ATA GC-3`

Tabla 3.5: Genes amplificados mediante RT-QPCR. Se detallan las secuencias del par de oligonucleótidos empleados para la amplificación de cada gen.

3.7. Extracción e inmunodetección de proteínas

3.7.1. Obtención de extractos totales de proteínas

Se recogieron muestras de tejido fresco (piel dorsal de embriones GR^{null/null} y WT, así como heridas de ratones adultos K5-GR, K5-GR-TR y WT) y se pulverizaron en un mortero con nitrógeno líquido. Para la extracción de proteínas de células en cultivo, estas fueron recogidas en PBS 1x.

Para obtener extractos totales de proteínas, tanto las muestras de piel como las de células, se lisaron con tampón C (20mM HEPES pH 7.9, 0.4M NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA y 25% Glicerol) que contiene inhibidores de proteasas (1mM DTT, 100µM PMSF, 3µg/ml aprotinina, 3µmg/ml leupeptina) y de fosfatasas (20mM ortovanadato sódico, 10mM NaF). Se produjo la rotura mecánica de las células mediante tres ciclos de de congelación (nitrógeno líquido) y descongelación (a 37°C). A continuación se añadió detergente NP40 a una concentración final de 1%. Después se incubaron las muestras durante 15 min a 4°C y se centrifugaron 20min a 10.000rpm. Se recogió el sobrenadante y se determinó la concentración de proteína mediante un kit Protein Assay (Biorad) a una absorbancia de 590nm, usando como referencia la absorbancia a 690nm, en un lector de placas Victor (Perkin Elmer) empleando BSA (albúmina sérica bovina) para realizar la recta patrón.

Para las extracciones de proteína que incluían la fracción de proteínas de membrana, se añadió el tampón RIPA (50mM Tris pH 8.0, 150mM NaCl, SDS 1%, NaDodSO₄ 0.5% y NP40 1%), que contiene inhibidores de proteasas (1mM DTT, 100μM PMSF, 3μg/ml aprotinina, 3μg/ml leupeptina) y de fosfatasas (20mM ortovanadato sódico, 10mM NaF). A continuación, se produjo la rotura mecánica de las células como en el apartado anterior. Tras la incubación de las muestras durante 15 min a 4°C, se centrifugaron 15 min a 13.200rpm y se recogió el sobrenadante. Se determinó la concentración de proteína mediante el Kit DC Protein Assay (Biorad) a una absorbancia de 750nm en un lector de placas Victor (Perkin Elmer) empleando BSA para realizar la recta patrón.

3.7.2. Inmunodetección de proteínas: Western Blot

3.7.2.1. Electroforesis en geles de SDS-Poliacrilamida y transferencia a membrana

Se tomaron 30μg de proteína de cada muestra en tampón de carga (375 mM Tris pH 6.8, 50% Glycerol, 0.03% Bromo Blue, 6% SDS y 1% β-Mercaptoetanol) y se incubaron a 95°C durante 10 min para la desnaturalización de las proteínas. Las muestras se cargaron en un gel de separación SDS-poliacrilamida al 10% para el extracto total de proteína y al 7% para el extracto total que incluye a las proteínas de membrana (Tabla 3.6). Se utilizó un marcador proteico de pesos moleculares (RAINBOW, GE Healthcare Life Sciences). Los geles

corrieron a 12mA durante 2.5h, utilizando una fuente Power Pac 3000 de Biorad.

3.7.2.2. Bloqueo, incubación con los anticuerpos y revelado

Las membranas se bloquearon con tampón PBS/0.1% Tween 20 (Sigma) y un 5% de leche desnatada en polvo, en agitación y a RT un tiempo mínimo de 2h. Tras el bloqueo, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente en cada caso, diluido en la solución de bloqueo, a las concentraciones adecuadas (que se especifican en la Tabla 3.7), durante 18h a 4°C. Tras la incubación, se realizaron tres lavados de 10 min con PBS/0.1% Tween 20 y se hibridaron las membranas con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, durante 1h a RT y en agitación. Tras otros tres lavados de 10 min con PBS/0.1% Tween 20, se procedió a revelar. Para la detección de la señal se empleó el sistema Enhanced ChemiLuminescence (ECL, GE Healthcare Life Sciences) o ECL plus (GE Healthcare Life Sciences), siguiendo las recomendaciones del fabricante (Tabla 3.7). Las membranas se expusieron con películas Hyperfilm (GE Healthcare Life Sciences) y se revelaron en una reveladora AGFA Curix 60.

3.7.2.3. Normalización y cuantificación de la expresión

Las bandas obtenidas se cuantificaron en el software ImageJ (National Institutes of Health). Los valores de expresión obtenidos tras la cuantificación fueron normalizados asignando a la muestra

control el valor arbitrario 1. Los posibles errores de carga se corrigieron haciendo referencia a los valores obtenidos para una hibridación con β -actina. Las diferencias se analizaron mediante el método estadístico ANOVA, considerando como significativo estadísticamente un valor con $p \leq 0,05$.

GEL DE SEPARACIÓN			GEL DE CONCENTRACIÓN	
	7 %	10 %		5 %
H ₂ O _{MQ-E}	5.55 ml	4.8 ml	H ₂ O _{MQ-E}	1.8 ml
acrilamide 40%	1.75 ml	2.5 ml	acrilamide 40%	250 μ l
Tris-HCl 1.5M pH=8.8	2.5 ml	2.5 ml	Tris-HCl 1.5M pH=6.8	250 μ l
SDS 10%	100 μ l	100 μ l	SDS 10%	20 μ l
APS 10%	100 μ l	100 μ l	APS 10%	20 μ l
TEMED	6 μ l	4 μ l	TEMED	2 μ l
TAMPÓN DE ELECTROFORESIS			TAMPÓN DE TRANSFERENCIA	
Tris base	30.3 g		Tris base	0.75 g
Glicina	144 g		Glicina	3.6 g
SDS 10%	100 ml		MetOH	50 ml
H ₂ O _{MQ-E}	Hasta 1 L		H ₂ O _{MQ-E}	Hasta 250mL

Tabla 3.6: Preparación de los geles de separación y concentración, tampón de electroforesis y de transferencia.

ANTICUERPO PRIMARIO	DILUCIÓN	FABRICANTE	REVELADO
EGFR (sc-03)	1:300	Santa Cruz, CA	ECL plus
p-EGFR (53A5)(#4407)	1:100	Cell Signaling	ECL plus
ERK (2)(sc-154)	1:1000	Santa Cruz, CA	ECL
p-ERK (Thr202/Tyr204)(#4376)	1:500	Cell Signaling	ECL plus
cFos (sc-52)	1:1000	Santa Cruz, CA	ECL plus
CD1 (RB212-P0)	1:500	Neomarkers	ECL plus
AKT (1/2)(N-19)(sc-1619)	1:1000	Santa Cruz, CA	ECL
p-AKT (Ser473)(#9271)	1:500	Cell Signaling	ECL plus
β -catenina (sc-7199)	1/500	Santa Cruz, CA	ECL
Actina (A-2066)	1/1000	Sigma	ECL
ANTICUERPO SECUNDARIO	DILUCIÓN	FABRICANTE	
Anti-conejo HRP	1:1000	Jackson ImmunoResearch	
Anti-ratón HRP	1:1000	Jackson ImmunoResearch	

Tabla 3.7: Anticuerpo y condiciones utilizados en Western Blot.

4. RESULTADOS

4.1. Análisis del fenotipo ocular de los embriones $GR^{null/null}$

4.1.1. Análisis histopatológico del cierre de párpado

Hemos analizado el cierre de párpado en los embriones $GR^{null/null}$ con objeto de abordar el impacto de la pérdida de función de GR en la morfogénesis epitelial *in vivo*. Macroscópicamente, los embriones $GR^{null/null}$ muestran párpados abiertos a día E16.5 y E18.5. Un detallado análisis histopatológico de hermanos de camada WT y $GR^{null/null}$ a distintos tiempos, muestra anomalías severas en la formación del párpado de los ratones deficientes en GR durante todo su desarrollo (Figura 4.1: a-d). En el desarrollo de un ratón WT, el cierre del párpado se completa normalmente en 24h, coincidiendo con la transición de E15.5 a E16.5. Por el contrario, los embriones $GR^{null/null}$ presentan párpados no fusionados a E16.5 y/o E18.5, junto con un estroma corneal anormal e incremento de la celularidad (Figura 4.1: a'-d'). Los párpados de los ratones recién nacidos $GR^{null/null}$ estaban cerrados, pero la histología muestra anomalías en el cierre, con un epitelio palpebral hiperplásico e indiferenciado. La penetrancia de este fenotipo ocular en los ratones $GR^{null/null}$ fue del 89% (n=43), con uno o los dos ojos afectados (54.55% y 45.45%, respectivamente).

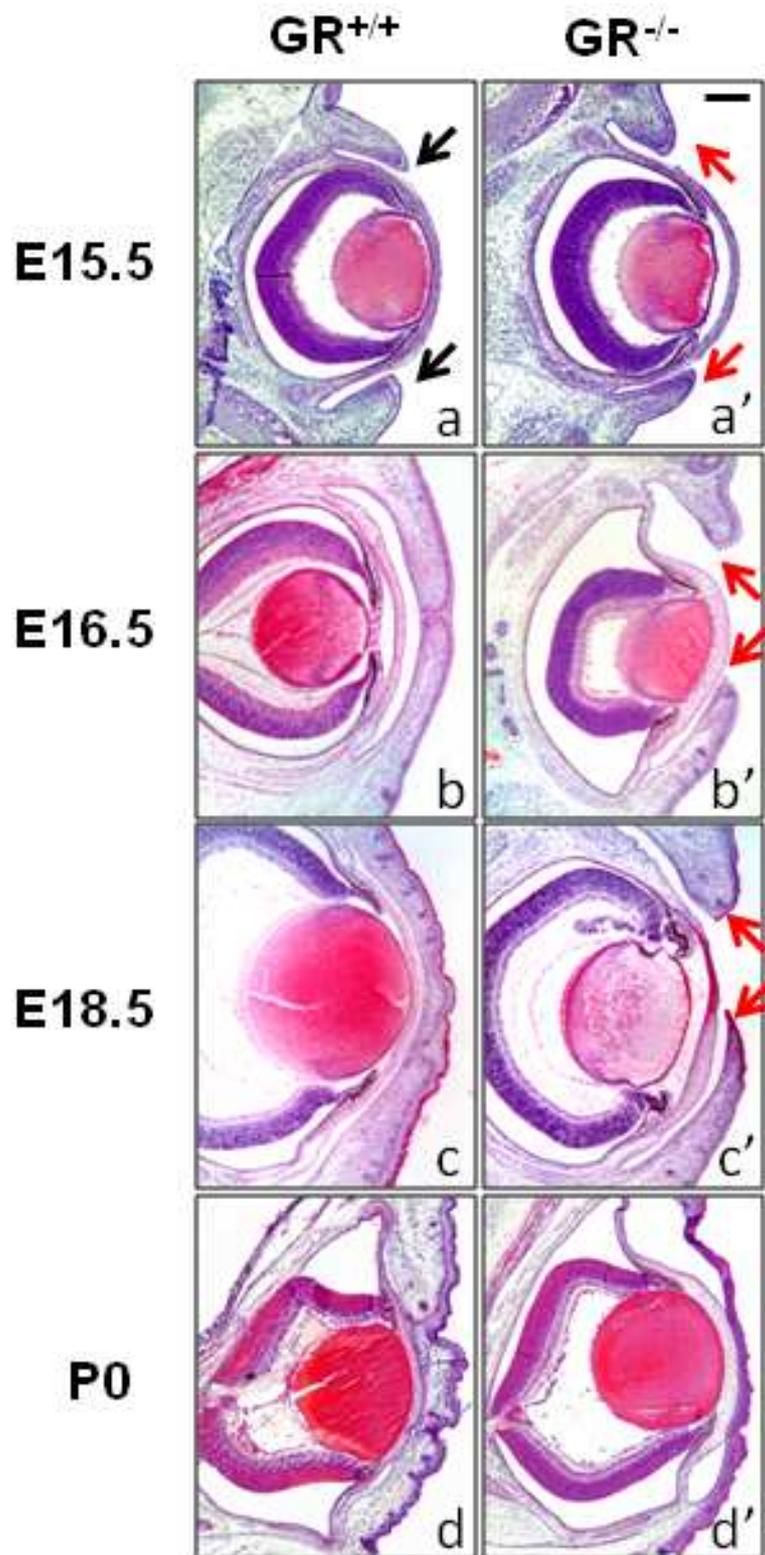


Figura 4.1: Retraso y deterioro del cierre del párpado en ratones deficientes en GR. Análisis histopatológico de embriones WT y GR^{null/null} a diferentes tiempos del desarrollo embrionario. Barra: 200 μ m

En embriones WT, la expresión de K5 es evidente en todas las células basales epiteliales del párpado, córnea y conjuntiva. En los hermanos de camada $GR^{null/null}$, la tinción es similar, aunque también detectamos expresión de K5 suprabasal en el epitelio palpebral. El marcador epitelial específico p63 se detectó en queratinocitos de los párpados y córnea de embriones WT y $GR^{null/null}$. Sin embargo, esta tinción en el borde frontal del epitelio del párpado de los embriones, tanto tardíos como tempranos, es más suprabasal, comparando con la tinción de p63 en los párpados WT (Figura 4.2).

En embriones WT E15.5, K6 está fuertemente expresada en la punta del párpado, definiendo las células que migran en el borde en formación de este epitelio. A E18.5, donde la migración celular ya no se requiere, debido a que los párpados ya están fusionados, la expresión de K6 está restringida a las capas suprabasales de la zona del cierre (Figura 4.2). Por el contrario, los embriones $GR^{null/null}$ tiñen débilmente para K6 en el borde del párpado a E15.5, mientras que detectamos una señal anormalmente fuerte de K6 a E18.5 en el borde de los párpados todavía sin fusionar. Esta expresión de K6 que se observa, indica un retraso en el desarrollo del epitelio ocular de los ratones $GR^{null/null}$ (Figura 4.2)

Está descrito en la literatura que la fusión de los párpados precede a la diferenciación epitelial, puesto que la expresión de queratina 10 (K10) en las células epiteliales de los embriones WT se detecta sólo después del cierre del párpado (Zhang *et al.* 2005). Por tanto, examinamos la expresión de K10 y loricrina, observando que, en los embriones E15.5 WT, ambos marcadores están presentes en el

capas suprabasales del epitelio del párpado y ausentes en el borde en formación. En los WT E18.5, sólo las células suprabasales de los párpados fusionados tiñen positivamente para ambos marcadores.

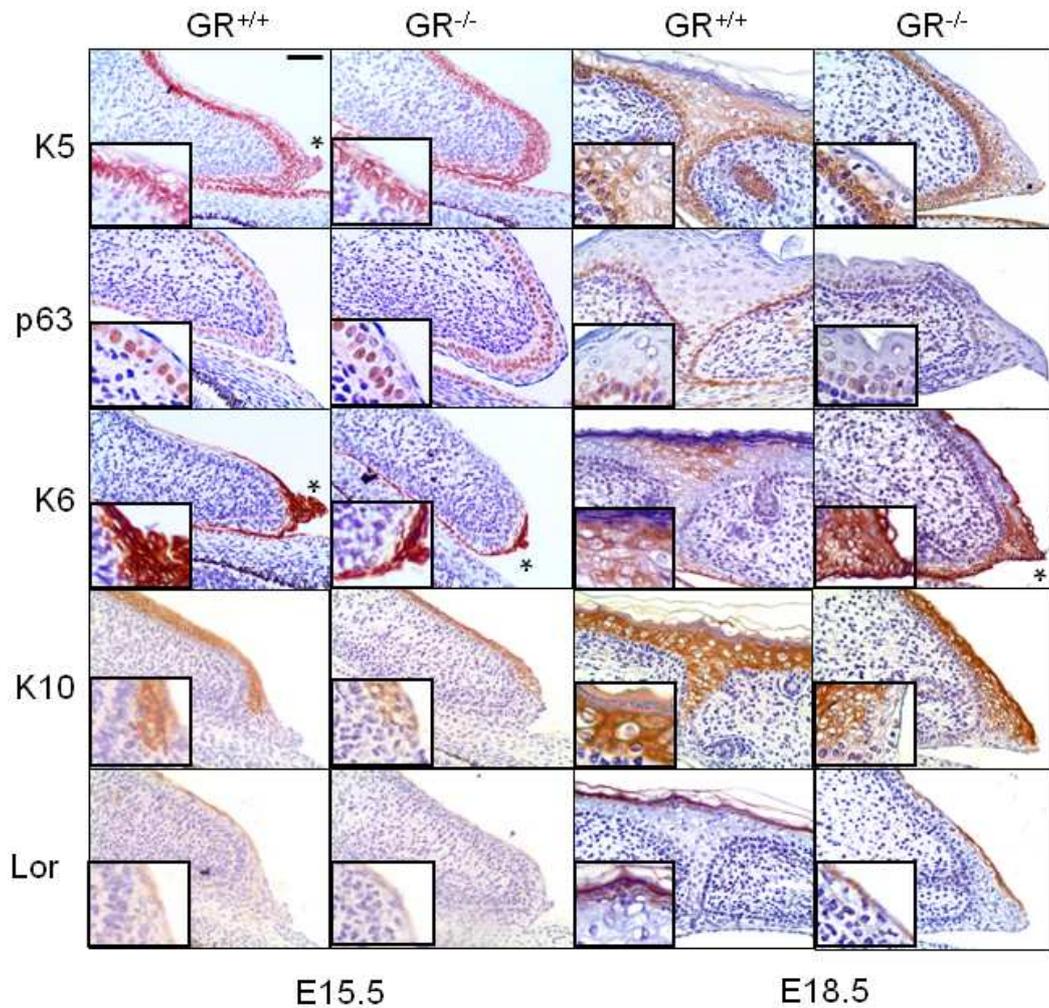


Figura 4.2: Morfogénesis anormal en las células epiteliales del párpado de embriones $GR^{null/null}$ E15.5 y E18.5. La expresión de marcadores de proliferación, migración y diferenciación de queratinocitos en el epitelio del párpado, en embriones tempranos (E15.5) y tardíos (E18.5) WT y $GR^{null/null}$ fue analizado mediante inmunohistoquímica, utilizando anticuerpos específicos. Barra: 100 μ m.

Por el contrario, la epidermis del párpado de embriones tempranos GR^{null/null}, presenta una tinción reducida de K10 y loricrina, mientras que la expresión anormal de estas dos proteínas persiste en los párpados no fusionados de los embriones E18.5 GR^{null/null}.

4.1.2. Proliferación *in vivo* en el epitelio del párpado de los ratones GR^{null/null}

Como se comentó en la introducción, la diferenciación de la epidermis sigue un patrón altamente regulado, mediante el cual las células proliferativas de la capa basal sufren un cambio al migrar hacia las capas suprabasales, dejando de proliferar e iniciando su programa de diferenciación. Valoramos la alteración en la proliferación de las células epiteliales del párpado de GR^{null/null}, mediante medidas *in vivo* de la incorporación de BrdU en embriones GR^{null/null} vs WT a día E15.5 de la gestación, encontrando diferencias cualitativas y cuantitativas entre ellos (Figura 4.3.A). En los embriones WT, se detectan queratinocitos positivos para BrdU en la capa basal del epitelio del párpado, mientras que en los ratones knock out detectamos un aumento en la proliferación en las células tanto basales como suprabasales de los párpados GR^{null/null} (Figura 4.3).

Además, si comparamos la proliferación de las células basales del párpado de embriones GR^{null/null} y WT, las diferencias son estadísticamente significativas (Figura 4.3.B, 38.1% vs 28% respectivamente, $p \leq 0.05$). En embriones E18.5 no detectamos incremento de la proliferación en los queratinocitos basales del

párpado del $GR^{null/null}$ vs WT (datos no mostrados). Sin embargo, sí encontramos núcleos suprabasales positivos para BrdU en los párpados de los embriones $GR^{null/null}$ E18.5, como también ocurría en embriones E15.5 deficientes en GR (Figura 4.3).

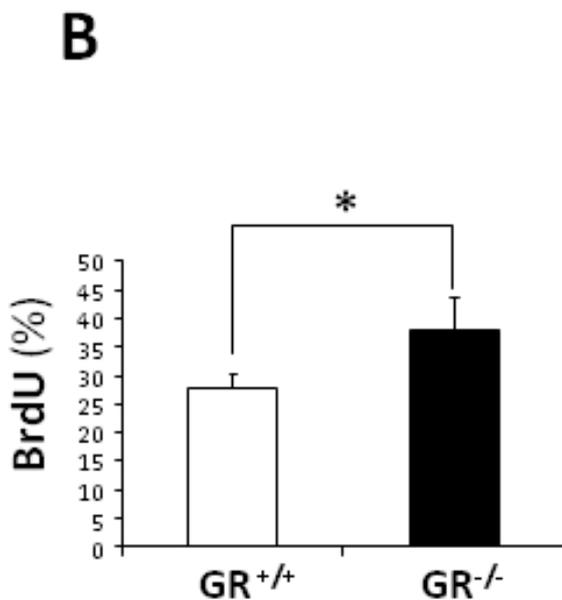
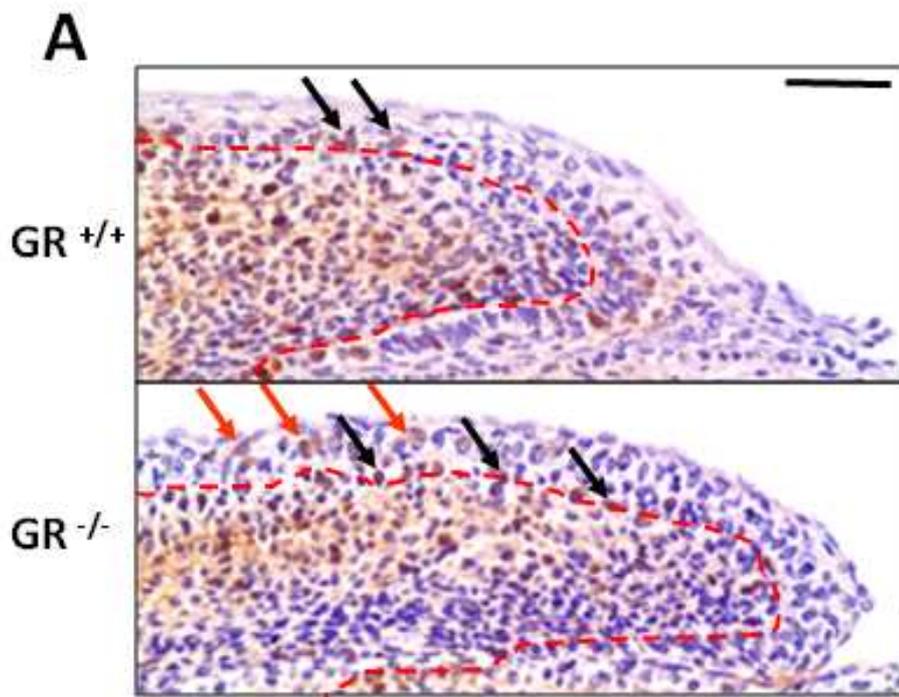


Figura 4.3: Proliferación in vivo en epitelio del párpado de los embriones E15.5 $GR^{null/null}$ y WT. (A) El marcaje con BrdU *in vivo* muestra un aumento en la proliferación epitelial de los E15.5 $GR^{null/null}$ relativo a los WT. Cabe destacar que el aumento en la proliferación de los queratinocitos se detecta tanto en células basales (flechas en negro) como en suprabasales (flechas en rojo. Barra: 100 μ m). (B) Las diferencias en la proliferación son estadísticamente significativas, $p < 0.05$.

4.1.3. Análisis de la apoptosis en el párpado de los ratones

GR^{null/null}

Como se observó en el análisis histológico, el epitelio del párpado de los ratones GR parecía mostrar mayor cantidad de núcleos con características apoptóticas (ver figura 4.1). Para abordar con mayor detenimiento el estudio de esta anomalía, realizamos un ensayo TUNEL, donde detectamos un aumento de la apoptosis en todas las capas epiteliales del párpado de los embriones E15.5 deficientes en GR (Figura 4.4, flechas). Por el contrario se observan escasas células apoptóticas en los WT hermanos de camada.

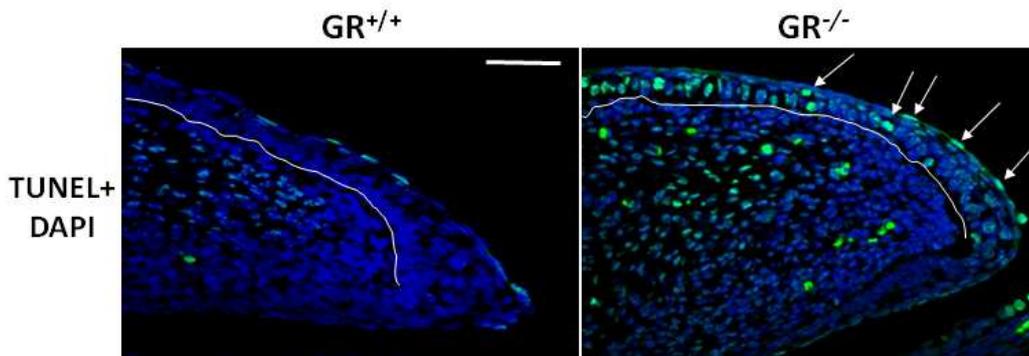


Figura 4.4: Detección de queratinocitos apoptóticos mediante TUNEL, en embriones E15.5 WT vs GR^{null/null}. Las flechas indican las células TUNEL-positivas y la línea delimita la membrana basal en el epitelio del párpado. Barra: 100µm.

En conjunto, nuestros resultados demuestran que GR se requiere para una correcta proliferación, migración, apoptosis y diferenciación de las células epiteliales del párpado de los embriones GR^{null/null}.

4.1.4. Estimación de parámetros para medir la progresión de la formación del párpado de los ratones $GR^{null/null}$

Para caracterizar las alteraciones en el cierre de párpado de $GR^{null/null}$, cuantificamos diversos parámetros que estiman el porcentaje de formación del párpado, el borde frontal en formación y la raíz, siguiendo la metodología descrita por Mine y colaboradores (Mine *et al.* 2005). Para estas medidas, realizamos una inmunotinción con K6 para comparar el cierre de párpado a E15.5, en hermanos de camada $GR^{null/null}$ y WT, utilizando las células K6 positivas para definir la migración de células epiteliales (Figura 4.5.A).

En los embriones WT, la extensión de los dos bordes y la raíz era evidente a día E15.5, con porcentajes estimados de formación de 14.5% y 45% respectivamente. Por el contrario, el borde frontal de los ratones $GR^{null/null}$ no se ha formado en esta etapa y no se evidencia hasta E18.5. Además, la formación de la raíz se reduce al menos dos veces, comparando con los embriones WT. Estas determinaciones nos permiten cuantificar la formación total del párpado $GR^{null/null}$ a E15.5 como del 28%, relativo a un 60% en WT (Figura 4.5.B).

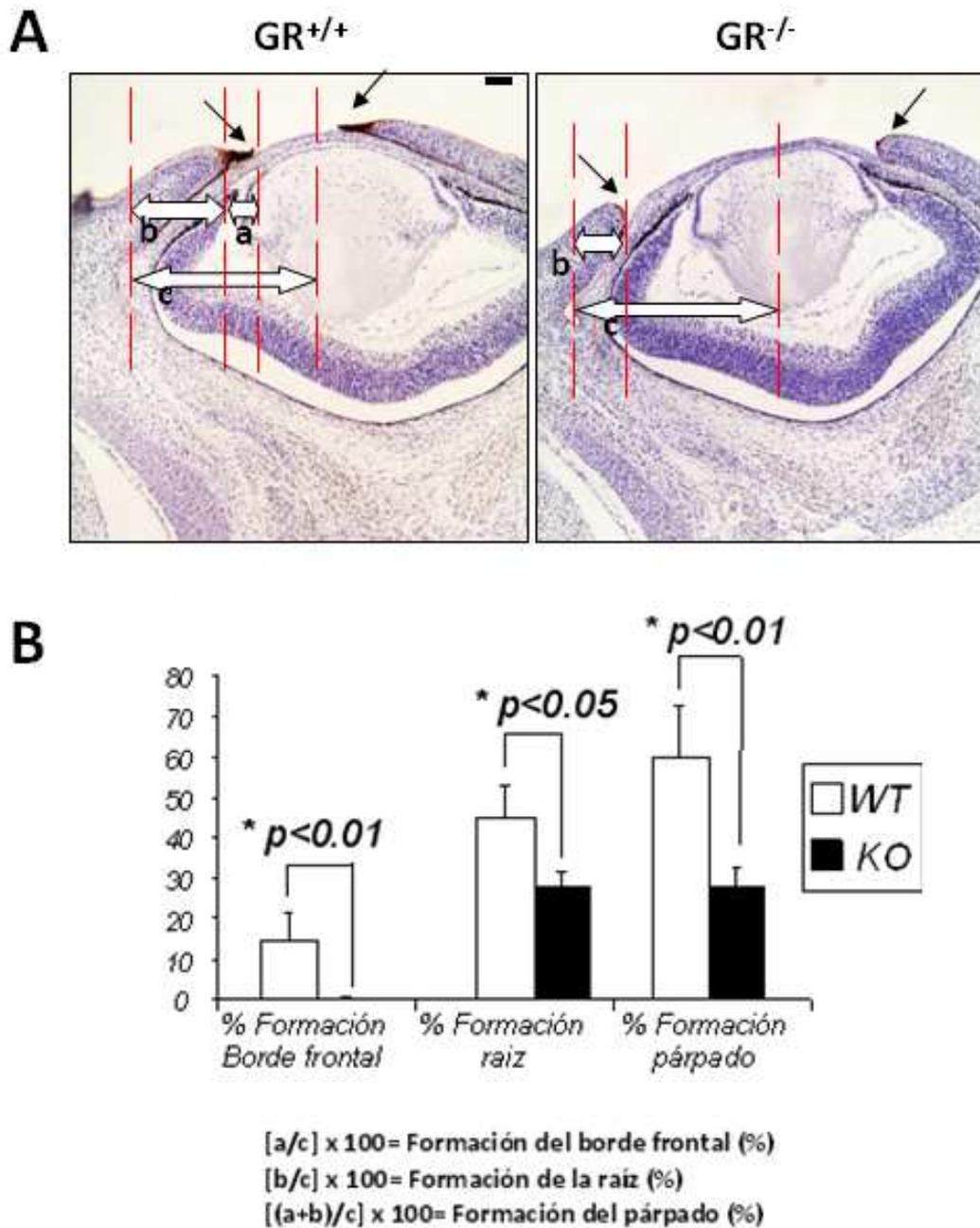


Figura 4.5: Alteraciones de la formación del párpado en ratones GR^{null/null}. Cuantificación de parámetros para estimar el proceso de formación del párpado en E15.5 hermanos de camada GR^{null/null} vs. WT. Las medidas fueron realizadas como se resume en Material y Métodos. Barra: 100µm

4.2. Señalización mediada por GR y su interacción con EGFR durante el desarrollo del párpado

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) y su receptor (EGFR) juegan un papel crucial en el desarrollo epitelial (Zenz et al. 2003; Xia y Karin, 2004). El antagonismo entre la señalización mediada por GR y EGFR ha sido demostrado en diferentes procesos fisiopatológicos. Sin embargo, no existen datos relativos a la interacción entre GR y EGFR, y su posible repercusión en el proceso de formación del párpado. En embriones WT, detectamos EGFR en las células de la punta del epitelio del párpado en E15.5 y esta expresión decrece a E18.5 cuando el cierre ya se ha completado. Por el contrario, la expresión de EGFR en los embriones GR^{null/null} se mantiene anormalmente alta hasta E18.5 (Figura 4.6.A, EGFR). Los niveles observados de EGFR total en los E18.5 GR^{null/null} respecto a los WT, se correlacionan con un aumento de la fosforilación, como observamos en la tinción para p-EGFR (Figura 4.6.A, p-EGFR).

Para investigar si GR podría regular EGFR a nivel transcripcional, analizamos los niveles relativos del mRNA de *Egfr* en la piel de embriones E18.5 GR^{null/null} vs WT por RT-QPCR (Figura 4.6.B). Nuestros datos muestran un aumento en los niveles de mRNA para *Egfr* en los embriones GR^{null/null}, indicando así, mecanismos adicionales del antagonismo biológico entre GR/EGFR. Además quisimos examinar si el aumento de la actividad de EGFR podría estimular, a su vez, un aumento de la actividad de ERK durante el

desarrollo del párpado de los embriones $GR^{null/null}$ (Figura 4.6A). Aunque los niveles totales de ERK no variaban entre los embriones $GR^{null/null}$ y WT, detectamos p-ERK a E15.5 sólo en los párpados de los ratones deficientes en GR. En embriones WT E18.5, la expresión de p-ERK se restringe a la capa granular de los párpados ya cerrados, mientras que seguimos detectando una expresión relativamente elevada de p-ERK en el borde del párpado $GR^{null/null}$, todavía no fusionado.

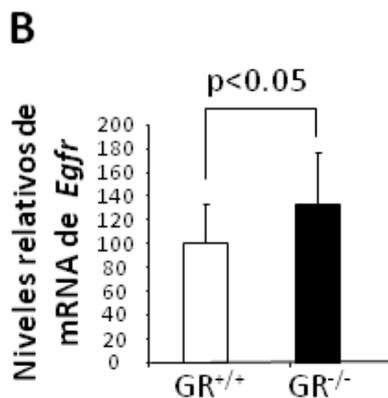
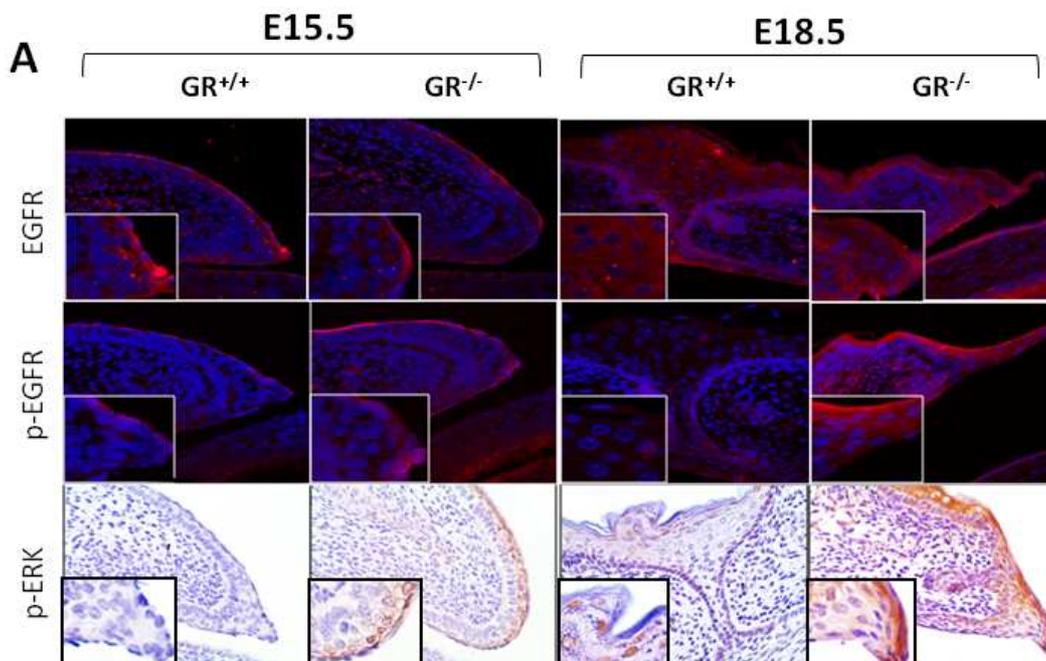


Figura 4.6: GR altera la expresión/actividad de EGFR durante el desarrollo del párpado. (A) Detección mediante inmunofluorescencia de EGFR y p-EGFR, en embriones $GR^{null/null}$ vs WT. Inmunohistoquímica para p-ERK. Barra: 100 μ m. (B) Niveles del transcrito de *Egfr* en piel de embriones E18.5 $GR^{null/null}$ vs WT mediante RT-QPCR.

En conjunto, nuestros datos sugieren que GR modula la expresión y actividad de EGFR y de sus efectores *downstream*, como ERK y K6, para que tenga lugar un desarrollo epitelial ocular normal. Una activación constitutiva anormal de la expresión de estas proteínas, como ocurre en los embriones deficientes en GR, contribuye a alterar el proceso de cierre de párpado.

4.3. GR, EGFR y la migración de queratinocitos en cultivo

La formación del párpado de ratón durante la embriogénesis es un proceso similar a la cicatrización de heridas, ambos requieren de una proliferación coordinada, migración y diferenciación de queratinocitos (revisado en Martin y Parkhurst, 2004). Así pues, examinamos el papel de GR y su interferencia con la función de EGFR en la migración de células epiteliales, mediante ensayos de cicatrización *in vitro*, utilizando cultivos de queratinocitos primarios (MPKs).

Debido a que, para la realización de estos ensayos es imprescindible la confluencia celular en los cultivos, y dado que los MPKs GR^{null/null} muestran una alta tasa de apoptosis (Bayo *et al.*, 2008), utilizamos MPKs aislados de ratones transgénicos K5-GR, donde GR está constitutivamente activado (Pérez *et al.*, 2001). Este sistema nos permite evaluar el papel de GR en la migración de

queratinocitos sin añadir ligando exógeno, el cual podría ejercer diferentes acciones, dependiendo de la dosis y la cinética aplicadas.

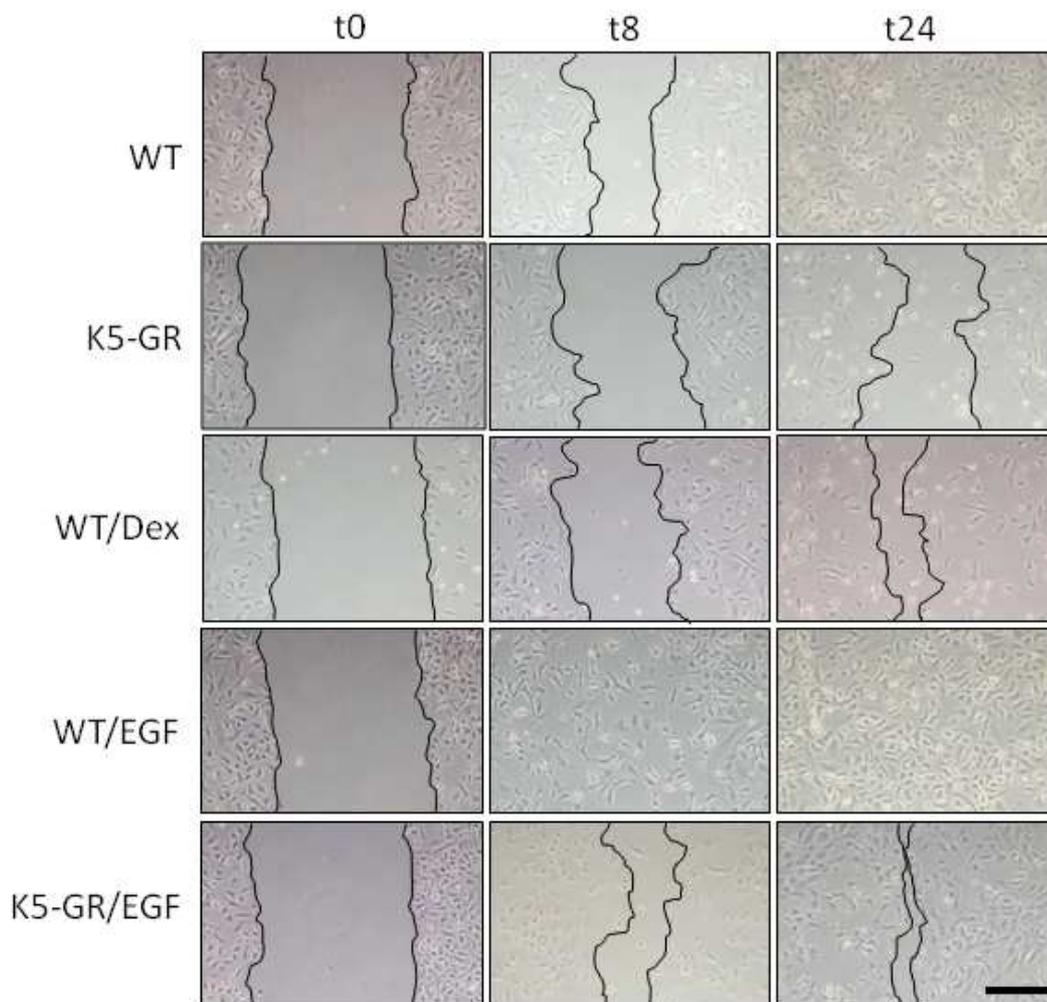


Figura 4.7: GR retrasa la migración de queratinocitos en ensayos de herida *in vitro*. Los experimentos de herida fueron realizados utilizando MPKs de ratones K5-GR y WT y el cierre fue evaluado a t8 y a t24. Las células fueron tratadas con vehículo, Dex (100nM) o EGF (25ng/ml), como se indica. Las fotografías son representativas de tres experimentos independientes. Barra: 100µm.

A efectos comparativos, evaluamos la migración de los MPKs tratados con Dex o EGF (Figuras 4.7 y 4.8). Dex retrasa y EGF acelera la migración en queratinocitos WT a t8h (Figura 4.8.b, 35.2% y 100%, respectivamente). A t24, el retraso en la migración de queratinocitos tratados con Dex es aproximadamente del 83.6% (Figura 4.8.c). Cabe destacar que el retraso producido por la activación constitutiva de GR en los MPKs aislados de K5-GR, produce un efecto similar al del tratamiento con Dex en células WT (Figura 4.8.d). Los queratinocitos K5-GR también responden a EGF aunque con una cinética retrasada, en comparación a las células WT (64.7% y 97.3% a t8 y a t24, respectivamente) (Figura 4.8.e).

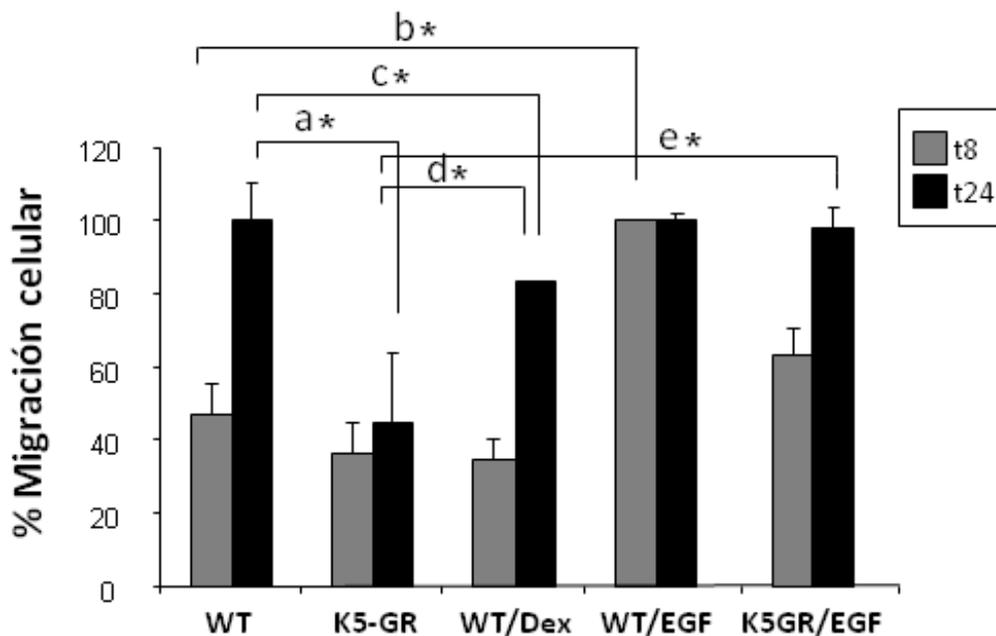


Figura 4.8: Cuantificación de la tasa de migración en MPKs, según se indica en la figura 4.7. El gráfico muestra el promedio de tres experimentos independientes. El porcentaje fue estimado como se indica en Material y métodos. Los asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas, determinadas por un test ANOVA, considerando la diferencia significativa cuando $p \leq 0,05$ (*).

En nuestros ensayos vimos que, en células WT, la migración de los queratinocitos fue de 43.7% a 8h de la herida (t8), completándose a las 24h (t24). Por el contrario, los MPKs procedentes de K5-GR muestran una migración a t8h del 33.5%, denotando un retraso importante a t24 (44.2%) (Figura 4.7 y 4.8.a).

4.4. Análisis del proceso de cicatrización cutánea *in vivo* en ratones K5-GR y K5-GR-TR

4.4.1. Análisis histopatológico del cierre de herida de los ratones K5-GR y K5-GR-TR

El retraso en la cicatrización de heridas es uno de los efectos secundarios más comunes asociados al uso terapéutico de los GCs. Por tanto, es importante determinar si existen mecanismos de acción del receptor hormonal GR que pueden asociarse con dichos efectos no deseados. Durante mucho tiempo, se ha postulado que las acciones de GR independientes de su unión directa al DNA son responsables de los efectos terapéuticos de estos compuestos mientras que la unión de GR al DNA produce los efectos secundarios de los GCs. Por tanto, decidimos utilizar dos modelos transgénicos generados en el grupo, que expresan las formas WT y mutante de GR específicamente en queratinocitos. Como se ha comentado en la introducción, el mutante GR-TR es defectivo en TA, pero capaz de

interaccionar con otros factores de transcripción como AP-1 y NF- κ B (Helmberg *et al.*, 1995; Donet *et al.*, 2008)

Quisimos comprobar por Western Blot que los niveles de expresión relativos de la forma WT de GR y la forma mutante GR-TR son similares en ambas líneas de transgénicos, como mostramos en la cuantificación de la figura 4.9.A (Pérez *et al.*, 2001; Donet *et al.*, 2008). Esto nos permite comparar los resultados obtenidos en ambos modelos transgénicos.

En la figura 4.9.B se muestra la localización de GR en la piel dorsal de los ratones transgénicos K5-GR, K5-GR-TR y WT tras la herida, mediante inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo específico α -GR. La tinción muestra que GR endógeno se localiza mayoritariamente en el citoplasma de todas las capas epidérmicas y en folículo, tanto de WT como de transgénicos (Figura 4.9.B, flecha roja). También detectamos la expresión de GR en algunos núcleos de la epidermis basal y suprabasal de ratones WT (Figura 4.9.B, WT flechas negras). En cambio, en ambos transgénicos se observa una sobreexpresión constitutiva y nuclear de GR en los queratinocitos de la capa basal (Figura 4.9.B, K5-GR y K5-GR-TR, flechas negras), de acuerdo con nuestros datos previos (Pérez *et al.*, 2001, Donet *et al.*, 2008).

A continuación, realizamos un protocolo de herida en ratones transgénicos y WT (según se indica en el apartado Material y Métodos) y analizamos la cinética de cierre de herida a nivel macroscópico (Figura 4.10.A). En un WT, el cierre de herida está casi completo a día 8 (d8), en cambio, en las dos líneas de transgénicos,

dicho cierre presenta un retraso frente a los WT, que ya se observa a día 4 (d4) (un 17% menos para K5-GR y el 8% menos en el caso de K5-GR-TR, como se muestra en la cuantificación de la figura 4.10.B). Sin embargo a d8, sólo existe un retraso en los K5-GR mientras que el aspecto macroscópico de las heridas de los ratones K5-GR-TR es similares al que presentan los ratones WT.

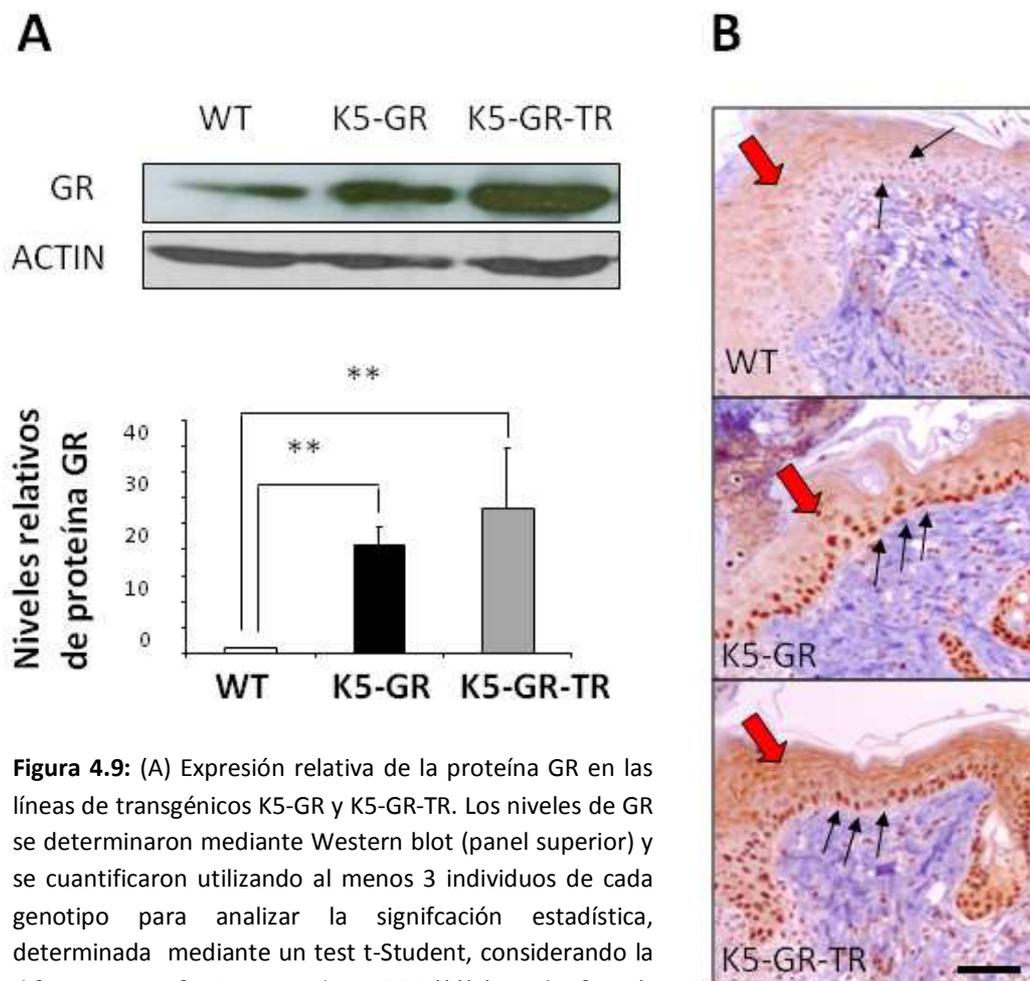


Figura 4.9: (A) Expresión relativa de la proteína GR en las líneas de transgénicos K5-GR y K5-GR-TR. Los niveles de GR se determinaron mediante Western blot (panel superior) y se cuantificaron utilizando al menos 3 individuos de cada genotipo para analizar la significación estadística, determinada mediante un test t-Student, considerando la diferencia significativa cuando $p \leq 0,01$ (**). (B) Localización de GR endógeno y transgén en heridas de ratones WT, K5-GR y K5-GR-TR. Barra: 50 μ m.

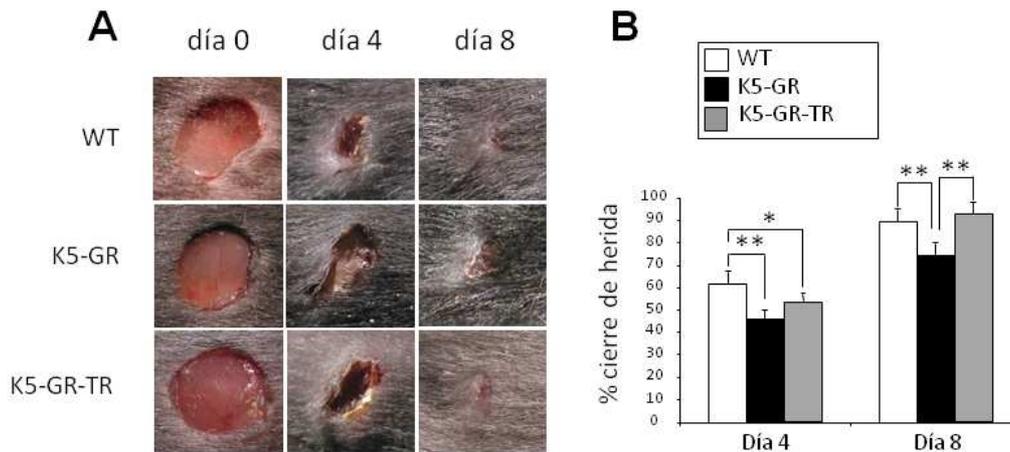


Figura 4.10: (A) Cinética de cierre de las heridas *in vivo* en los ratones WT, K5-GR y K5-GR-TR a nivel macroscópico. (B) Cuantificación del porcentaje del área de cierre de herida para cada tiempo de la cinética, relativo al área de herida original. La toma de medidas se realizó según se detalla en Material y Métodos. Los asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas, determinadas por un test ANOVA estadístico, considerando la diferencia significativa cuando $p \leq 0,05$ (*) y/o $p \leq 0,01$ (**).

Para evaluar la re-epitelización en las heridas a nivel histológico utilizamos una tinción con H-E, tomando medidas desde los bordes donde comienzan las heridas (Figura 4.11.A, puntas de flechas) y comparándolas con la medida original de la herida en esta tinción (Figura 4.11.A, flecha). En ella observamos que, a d4, la lengua de re-epitelización está perfectamente formada en los WT, mientras que dicha lengua es muy incipiente en los transgénicos. A d8 en los ratones WT, la herida ya ha cerrado y se da paso a la siguiente fase del proceso, que implica la resolución de la hiperplasia epidérmica y la formación de folículos *de novo*. A d8, la evolución de la herida en los ratones K5-GR-TR es similar a la de los ratones WT, sin embargo,

Puesto que el colágeno es importante en la fase de remodelación, como ya hemos comentado en la introducción, realizamos una tinción con el tricrómico de Masson a d8 del proceso, donde se observa que el contenido de colágeno del tejido de granulación en el K5-GR, está mucho más reducido respecto al de K5-GR-TR y al WT (Figura 4.12, óvalos).

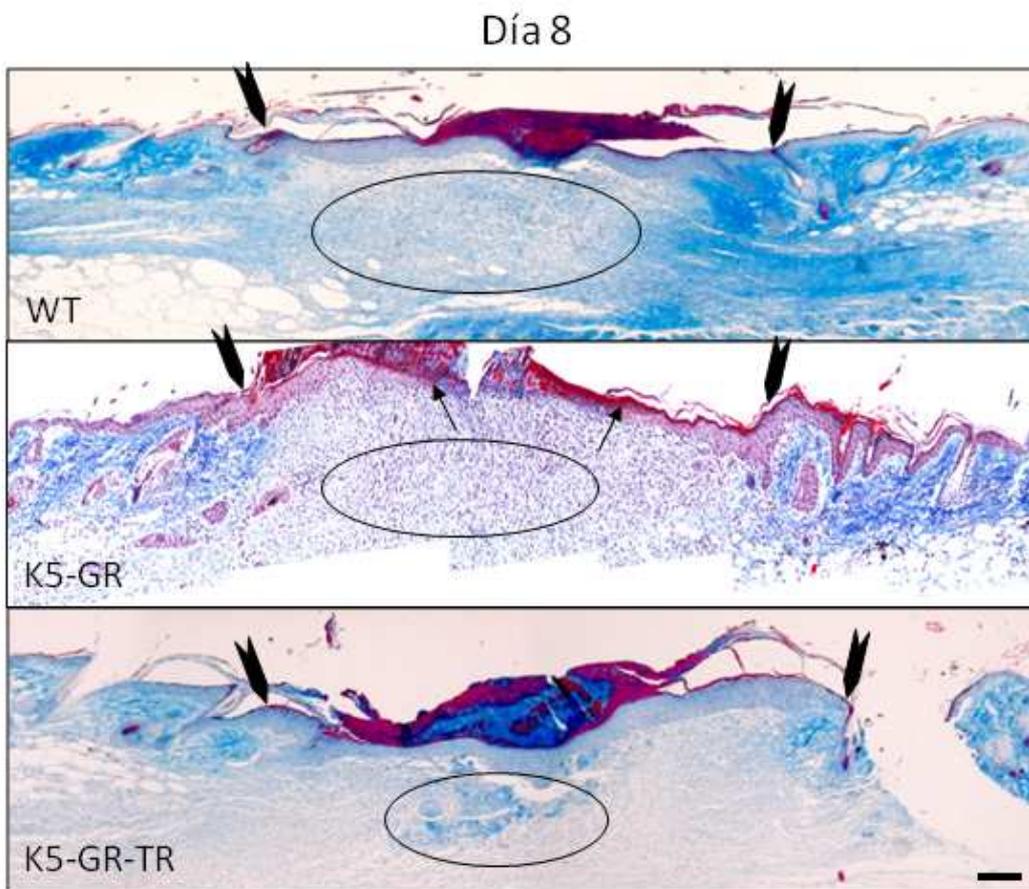


Figura 4.12: Deposición de colágeno durante la fase de remodelación tras la herida (d8) en ratones K5-GR, K5-GR-TR y WT. Las puntas de flecha indican los bordes de la herida original y las flechas el avance de la lengua de re-epitelización. Barra: 100 μ m

Todos estos datos indican que la sobreexpresión de GR y GR-TR en queratinocitos es suficiente para reprimir la re-epitelización en etapas tempranas del proceso de cicatrización. En cambio, sólo GR es capaz de reducir la deposición de colágeno en etapas más tardías.

4.4.2. Estudio de marcadores de proliferación, migración y diferenciación en el proceso de cicatrización cutánea en ratones K5-GR, K5-GR-TR y WT

Como la re-epitelización depende de la proliferación, migración y la diferenciación de los queratinocitos, hemos examinado estos procesos en los dos modelos transgénicos de sobreexpresión de GR y en ratones WT.

En la parte más distal de la herida, el primer proceso que ocurre tras el daño es la proliferación. Para valorar la tasa de proliferación de los queratinocitos de la capa basal epidérmica, realizamos medidas *in vivo* de la incorporación de BrdU, desde el frente de migración hasta el borde de la herida, donde el índice de incorporación de BrdU es del 5% (Lai *et al.*, 2009) a d4 y d8 del proceso de cicatrización. A d4, se observa que existen una reducción significativa del crecimiento de los queratinocitos basales más próximos al borde de la herida en los transgénicos: K5GR y K5-GR-TR, relativo al WT (Figura 4.13.A y B; 23%, 15% y 37%, respectivamente, como se muestra en la cuantificación).

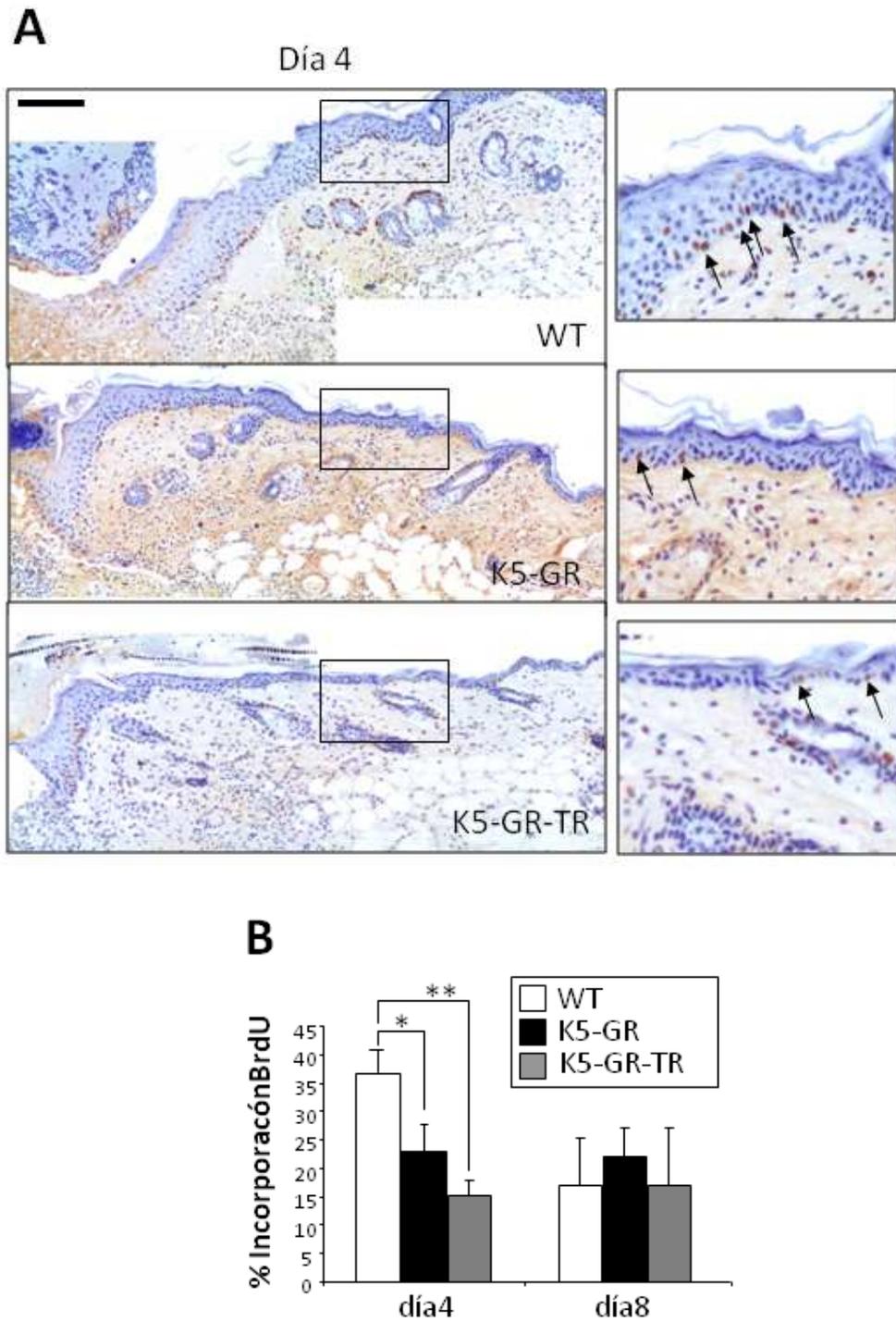


Figura 4.13: (A) Tasa de proliferación epidérmica en ratones K5-GR, K5-GR-TR y WT a d4 y d8 después de la herida. Se muestran ejemplos representativos de la incorporación *in vivo* de BrdU. Barra: 100 μ m. (B) La cuantificación se realizó en al menos 4 individuos por genotipo y tiempo. La gráfica representa valores promedio y los asteriscos muestran la significación estadística realizada mediante un test t-Student, considerando la diferencia significativa cuando $p \leq 0.05$ (*) $p \leq 0.01$ (**).

También observamos diferencias en la hiperplasia epidérmica en esta misma zona de la epidermis que se encuentra en proliferación, siendo el grosor epidérmico mucho más pronunciada en los WT que en los transgénicos. A d8 del proceso, la tasa de proliferación de los queratinocitos es equivalente para todos los genotipos.

Luego, examinamos migración y diferenciación mediante la expresión de marcadores para estos procesos en secciones seriadas de las heridas, mediante inmunolocalización con anticuerpos específicos (Figura 4.14). En los ratones WT, la lengua de re-epitelización es claramente visible (Fig. 4.14, barra roja), y dicho frente de migración es positivo para la queratina K6 (marcador clásico de migración en queratinocitos) y negativo para K10 (marcador de diferenciación). A medida que nos alejamos de los bordes de la herida, disminuye la expresión de K6, aumentando la de K10.

En las dos líneas de transgénicos, la lengua de re-epitelización es incipiente a d4 (Figura 4.14, asterisco). Los cambios histológicos correlacionan con una expresión más restringida de K6 en toda la herida y una expresión anómala de K10 en queratinocitos en el borde de migración, donde no debería detectarse que están diferenciando.

Por el contrario, a d8, sólo la sobreexpresión de GR en queratinocitos interfiere en la migración, como vemos por la expresión discontinua de K6 en las heridas de los ratones k5-GR. Además en estos ratones la expresión de K10 sigue siendo

discontinua, lo que nos indica que no se ha completado la restauración de la barrera epidérmica en los ratones K5-GR.

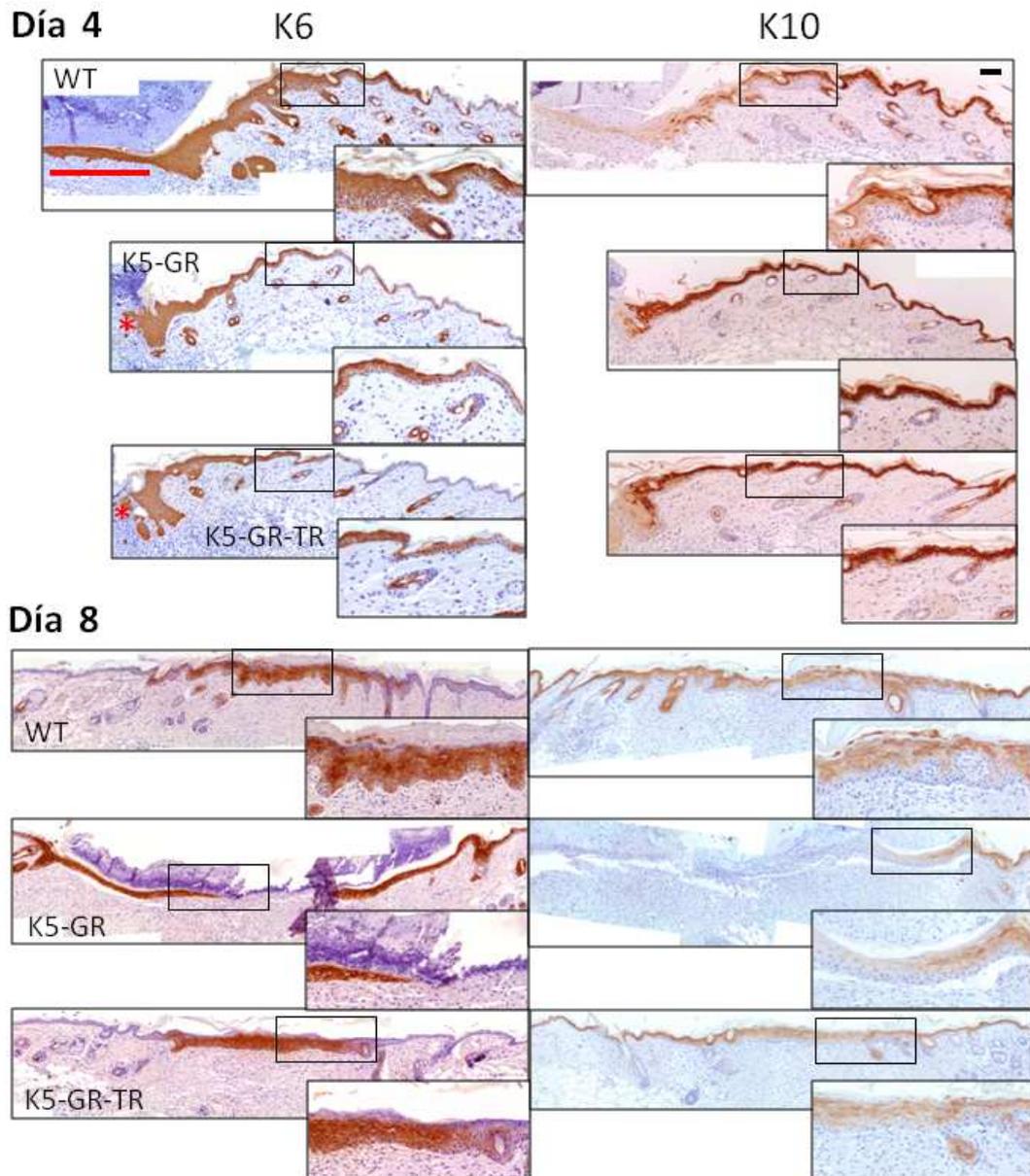


Figura 4.14: Evaluación de marcadores de migración (K6) y diferenciación (K10) de queratinocitos en ratones WT, K5-GR y K5-GR-TR, a d4 y d8 después de la herida. Se muestran inmunohistoquímica para K6 y K10 utilizando anticuerpos específicos. Los insertos del cuadro inferior presentan un mayor aumento. Barra: 100 μ m.

A continuación, quisimos evaluar el grado de retraso en la cicatrización de ratones WT tratados con Dex en comparación al observado en ratones K5-GR. Para ello, tratamos ratones WT con Dex (1 mg/kg/d) durante 9d, realizamos un protocolo de herida análogo al descrito, y evaluamos las heridas a nivel macroscópico e histopatológico (Fig. 4.14). Los cambios en la expresión de K6 y K10 en ratones WT tratados con Dex respecto a WT sin tratar fueron análogos a los observados en los ratones K5-GR (Figura 4.14). Por tanto, la sobreexpresión de GR en queratinocitos es suficiente para inducir un retraso en la cicatrización de heridas *in vivo* similar al que produce un tratamiento sistémico con Dex en animales WT.

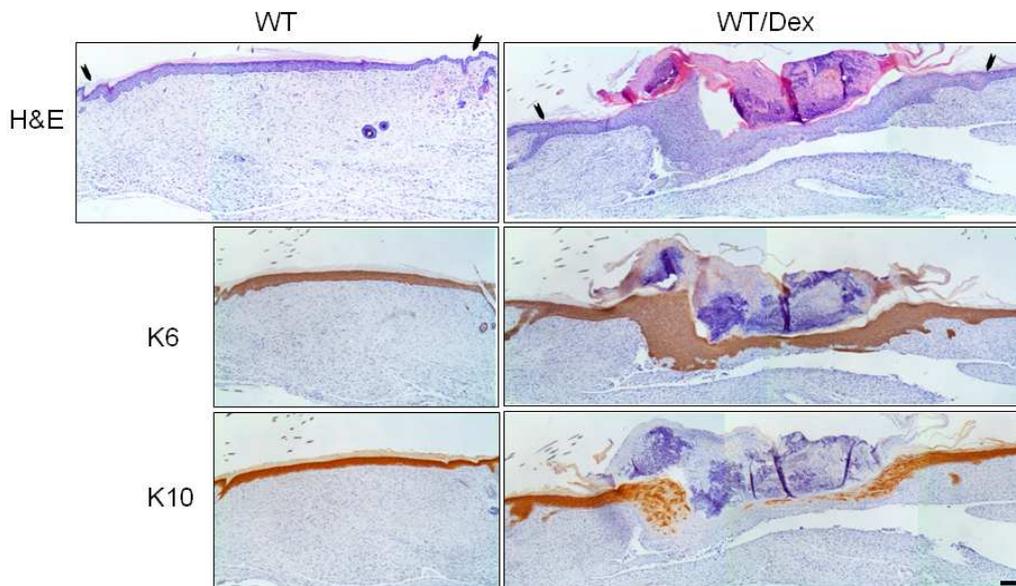


Figura 4.15: Análisis histológico de la re-epitelización de las heridas en ratones WT sin tratar y tratados con Dex. Se muestran inmunohistoquímicas para K6 y K10, realizadas utilizando anticuerpos específicos. Barra: 100 μ m.

4.4.3. Regulación del proceso inflamatorio en la cicatrización cutánea de ratones K5-GR, K5-GR-TR y WT

Los efectos anti-inflamatorios de los GCs son sobradamente conocidos y durante mucho tiempo se ha postulado que la función de TR de GR es mayoritariamente responsable de las acciones terapéuticas de estos compuestos (Clark *et al.*, 2007; Tuckermann *et al.*, 2007). Por tanto, examinamos el infiltrado inflamatorio en ratones transgénicos y WT tras el protocolo de herida a d4 y d8, con objeto de identificar diferencias entre genotipos.

Por un lado, examinamos la composición del infiltrado inflamatorio mediante inmunohistoquímica, utilizando anticuerpos específicos para granulocitos (Ly6G) y macrófagos (F4/80). Nuestros datos muestran que hay un menor reclutamiento de ambos tipos celulares en los transgénicos durante todo el proceso (Figura 4.16). Además, observamos que los niveles de la citoquina pro-inflamatoria TNF- α estaban muy reducidos en ambos transgénicos respecto al WT a d4 (Figura 4.16).

4.4.4. Papel de factores de crecimiento y citoquinas en el proceso de cicatrización

Puesto que las citoquinas y factores de crecimiento tienen un papel muy importante en el proceso de cicatrización y dado que muchas de ellas se reprimen por GCs (Werner and Grose, 2003; Barrientos *et al.*, 2008; Beer *et al.*, 2000), hemos querido determinar los niveles relativos de algunos de estos genes mediante RT-QPCR, en

piel normal y en heridas de ratones transgénicos y WT (Figura 4.17). Los genes analizados incluyen las citoquinas pro-inflamatorias *Tnf- α* e *IL1- β* , así como los factores de crecimiento *Kgf*, *Tgf- β 1* y *Tgf- β 3*.

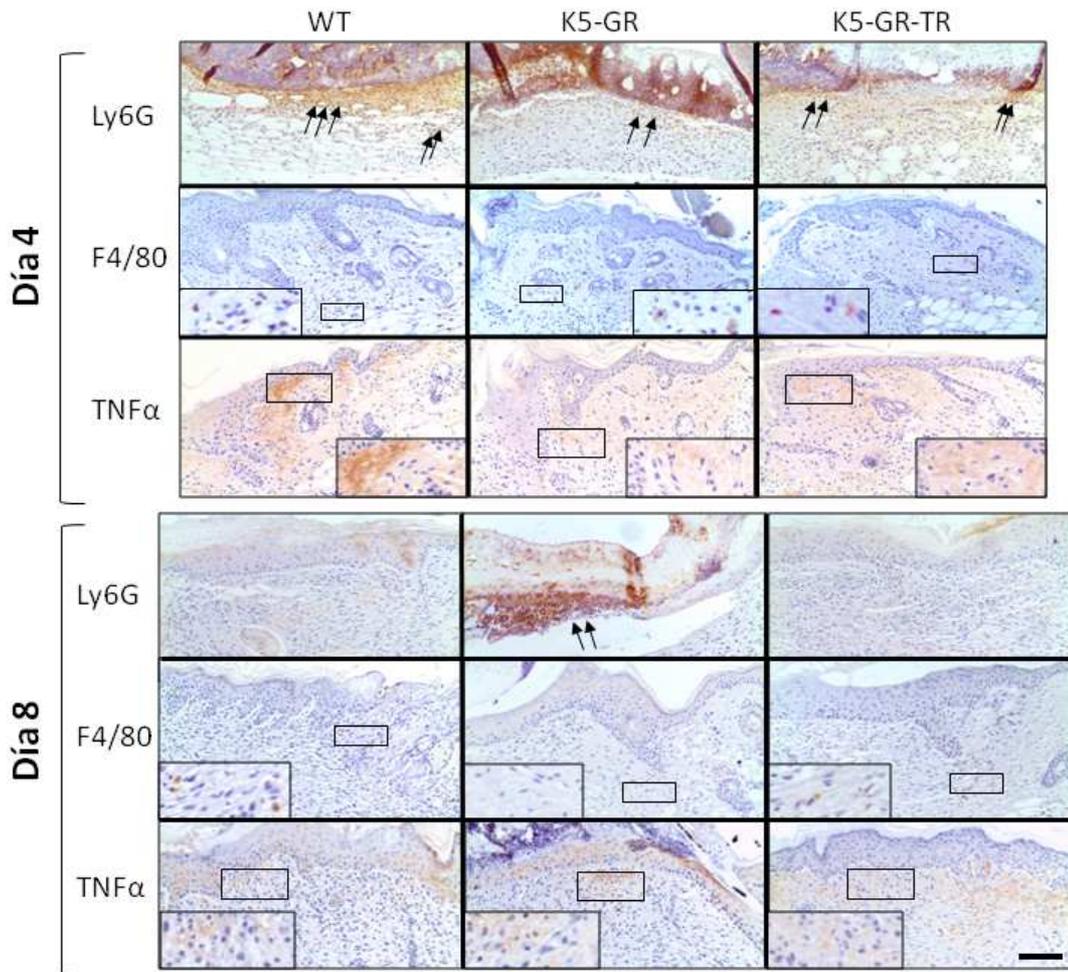


Figura 4.16: Estudio del Infiltrado inflamatorio en heridas (d4 y d8) de ratones WT, K5-GR y K5-GR-TR mediante inmunohistoquímica con anticuerpos específicos para granulocitos (Ly6G), macrófagos (F4/80) y la citoquina pro.inflamatoria TNF- α . Barra: 50 μ m.

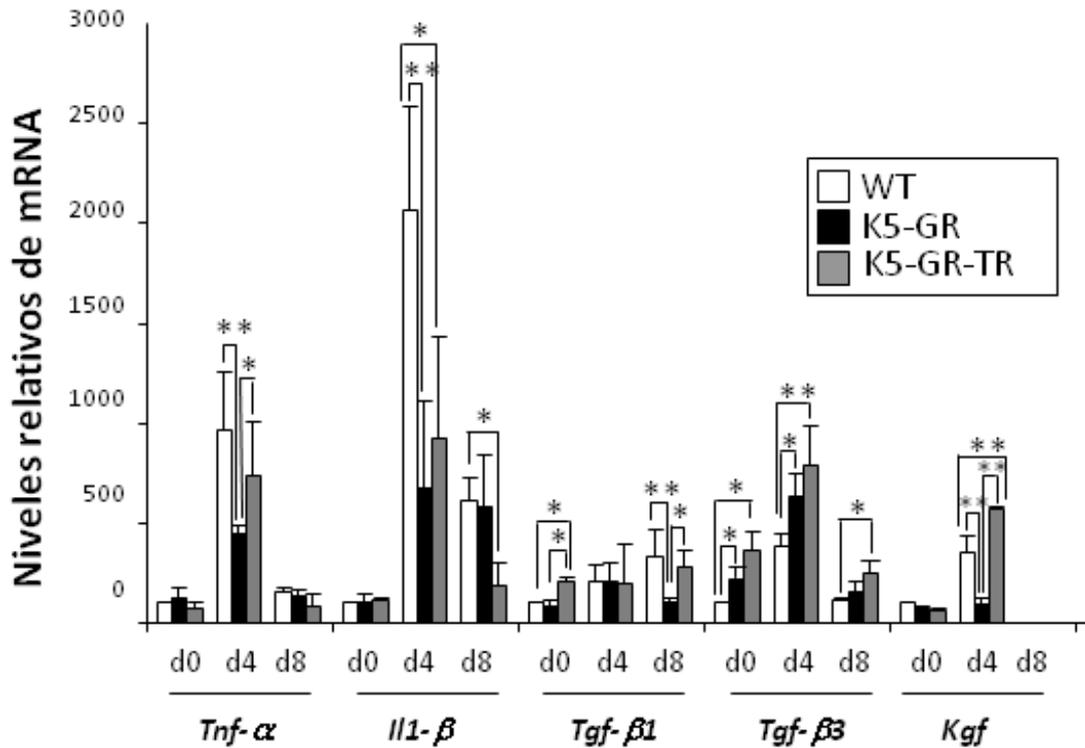


Figura 4.17: Análisis de la expresión génica en las heridas de los ratones WT, K5-GR y K5-GR-TR durante todo el proceso de cicatrización. Los niveles de transcrito fueron determinados mediante RT-QPCR. Los asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas, determinadas por un test ANOVA, considerando la diferencia significativa cuando $p \leq 0,05$ (*) y/o $p \leq 0,01$ (**).

A nivel basal, no se detectaron cambios en la expresión relativa de los genes analizados, con la excepción de *Tgf-β3*, cuya expresión está aumentada en los dos transgénicos respecto al WT. A d4 después de la herida, se mantiene la inducción de *Tgf-β3* en ambas líneas de transgénicos con respecto a los WT. Además, detectamos una disminución en los niveles de mRNA de *Tnf-α*, *IL1-β*, Y *Kgf* en el transgénico K5-GR. En cambio, en los ratones K5-GR-TR solo detectamos una represión significativa de *IL1-β*, aunque en

menor medida respecto al K5-GR. Sin embargo, a d8 sólo detectamos represión de *IL1-β* en los ratones K5-GR-TR y no en K5-GR. Por el contrario, *Tgf-β1* se reprime específicamente a d8 en K5-GR y no en K5-GR-TR.

4.4.5. Vías de señalización implicadas en el proceso de cicatrización

4.4.5.1. Papel de la vía de señalización ERK/AP-1

Muchos de los genes que codifican para citoquinas pro-inflamatorias y factores de crecimiento son dianas de AP-1 y es conocido el antagonismo entre la señalización mediada por GR y la vía de señalización ERK/AP-1 en diferentes procesos fisiopatológicos y tipos celulares, incluyendo procesos inflamatorios de la piel (De Bosscher *et al.*, 2009; Lai *et al.*, 2009; Bayo *et al.*, 2008). Por tanto, quisimos analizar mediante Western Blot, la expresión y actividad de ERK en el proceso de reparación cutánea en los modelos transgénicos de sobreexpresión de GR, en relación a ratones WT (Figura 4.18.A y B).

Por un lado, en WT no detectamos cambios en la actividad ERK (p-ERK) a d4, así como tampoco detectamos cambios en los niveles de c-Fos (componente del heterodímero c-Fos/c-Jun del complejo AP-1), ni de ciclina D1 (CycD1) después de la herida en este tiempo del estudio. Sin embargo, a d8 después de la herida, detectamos una inducción de la actividad ERK cuantificada por el

ratio p-ERK/ERK), así como de los niveles de c-Fos y CycD1 en ratones WT (Figura 4.18).

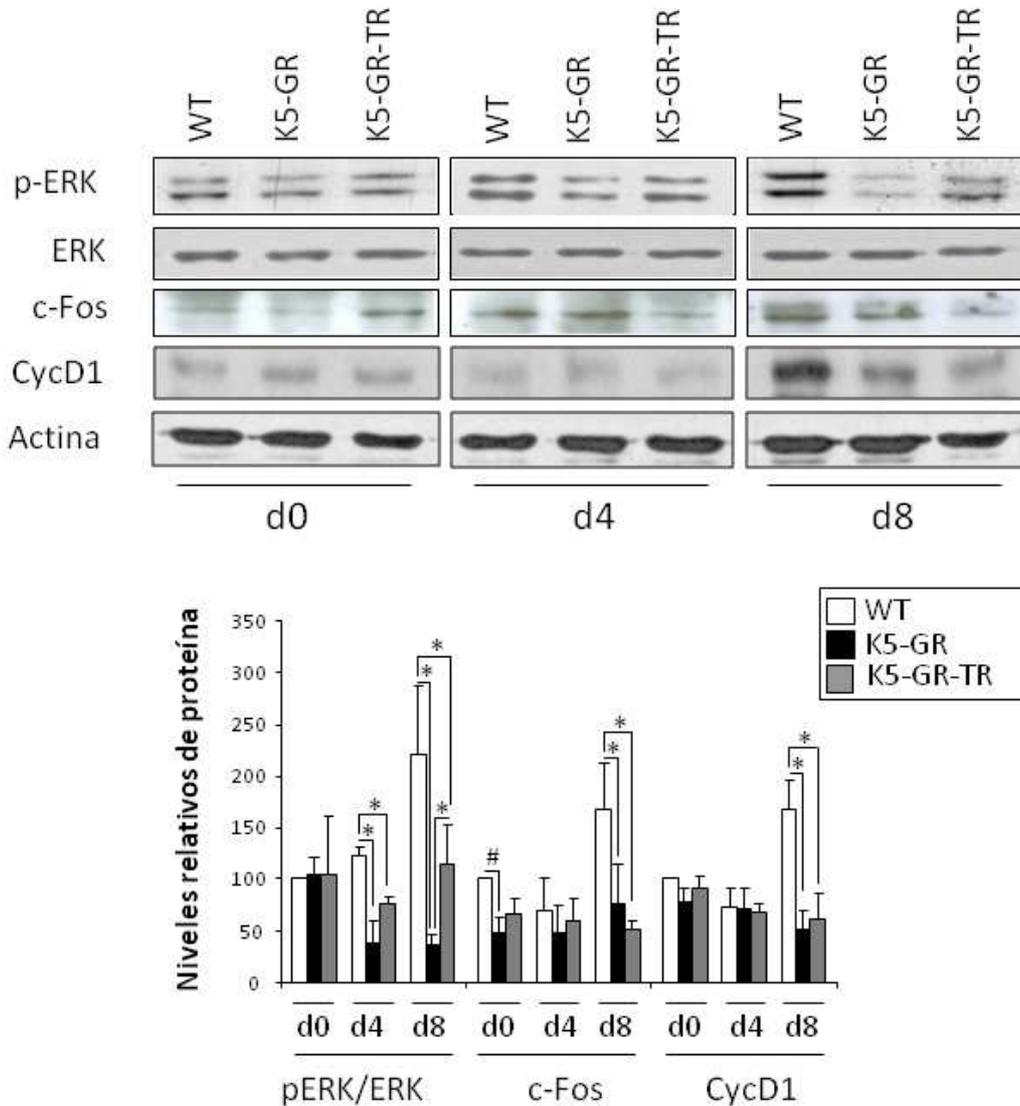


Figura 4.18: Cambios en la expresión de proteínas antes (d0) y después (d4 y d8) de la herida en ratones WT, K5-GR y K5-GR-TR. Los niveles relativos de proteína se determinaron mediante inmunodetección con anticuerpos específicos. Se cuantificaron los niveles de expresión de proteínas, que fueron normalizados a la expresión de actina, tomando como 100 los niveles de proteína del WT d0 y relativizando el resto a este nivel basal. Los asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas, determinadas por un test ANOVA, considerando la diferencia significativa cuando $p \leq 0,05$.

Es importante señalar que se observa una disminución estadísticamente significativa de la actividad ERK en ambos transgénicos, tanto a d4 como a d8 (Figura 4.18). Sin embargo, en ambos tiempos, los niveles de p-ERK disminuyeron más en K5-GR que en K5-GR-TR, siendo esta reducción estadísticamente significativa a d8 (Figura 4.18). Además, la expresión de c-Fos y la de CycD1, disminuyó en ambos transgénicos respecto al WT a d8 después de la herida, también de forma estadísticamente significativa.

4.4.5.2. Contribución de β -catenina al proceso de cicatrización

Existen antecedentes de la implicación de β -catenina en el proceso de cicatrización (Lee *et al.*, 2005; Stojadinovic *et al.*, 2005). Por tanto, hemos querido analizar por inmunohistoquímica la expresión y localización de β -catenina (Figura 4.19). Por un lado, observamos que en la herida de un WT a d4, β -catenina se localiza en el citoplasma de los queratinocitos más cercanos a la capa basal y, también, en la membrana de los queratinocitos más suprabasales (Figura 4.19). Sin embargo, en los transgénicos a d4, existe una expresión anómala citoplásmica en las capas suprabasales de la epidermis, así como algunos núcleos teñidos de los queratinocitos (Figura 4.19), lo que reproduce la translocación nuclear de GR descrita como consecuencia del tratamiento tópico con GCs (Stojadinovic *et al.*, 2005). A d8, no se observan diferencias en cuanto a la expresión o localización de β -catenina. Por tanto, la sobreexpresión de β -catenina en una etapa de cicatrización

temprana, podría inhibir la migración de queratinocitos, causando una alteración en el proceso de reparación epitelial.

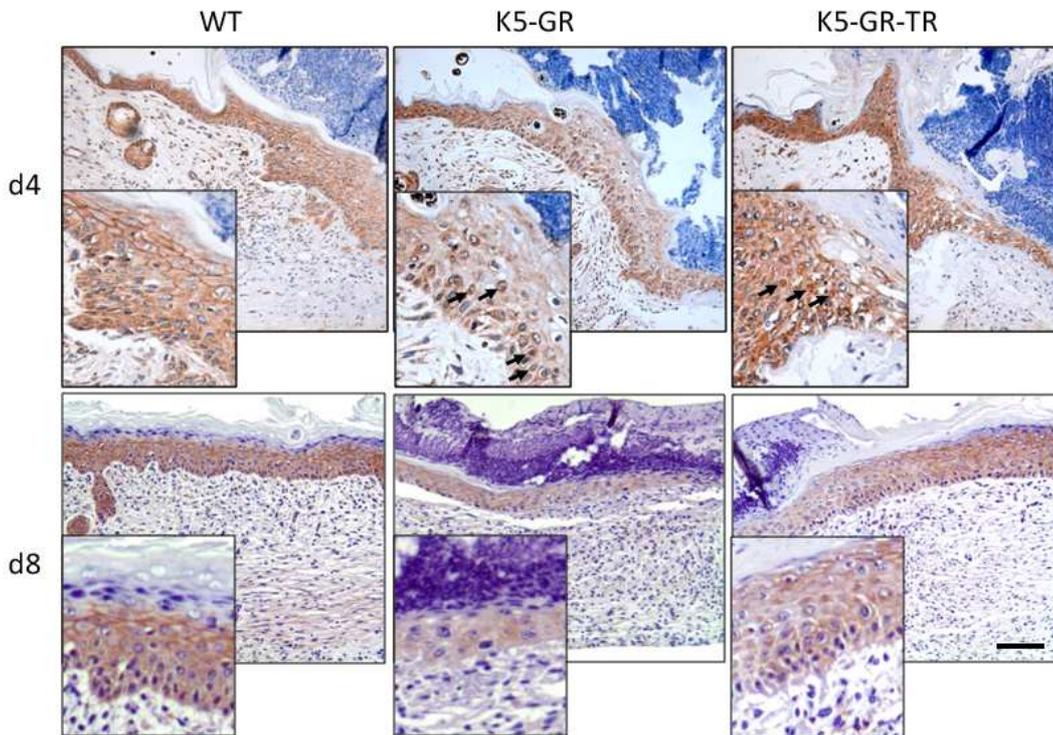


Figura 4.19: Inmunohistoquímica para β -catenina realizada en secciones de las heridas de ratones WT, K5-GR y K5-GR-TR, a d4 y d8 del proceso de cicatrización, realizada utilizando un anticuerpo específico. Las flechas marcan la localización nuclear de β -catenina en los queratinocitos de los transgénicos K5-GR y K5-GR-TR. Barra: 50 μ m.

Considerando el antagonismo GR/EGFR (Lee *et al.*, 2005; Stojadinovic *et al.*, 2005), hemos analizado la expresión y actividad de EGFR en la piel procedente de ratones K5-GR, K5-GR-TR y WT mediante Western Blot. En un WT a d4, detectamos el aumento de la actividad de EGFR (p-EGFR). Sin embargo no detectamos cambios en los niveles de expresión de dicha actividad en ninguno de los dos

transgénicos, en este tiempo del proceso de reparación cutánea (datos no mostrados).

4.4.6. Análisis de la contribución específica de GR y GR-TR en queratinocitos durante el proceso de cicatrización mediante ensayos *in vitro*

La sobre-expresión constitutiva de GR y GR-TR en queratinocitos, da como resultado un aumento de la localización nuclear del receptor, incluso sin añadir ligando (Figura 4.21), de acuerdo con la localización nuclear de GR *in vivo* (Figura 4.9.B). Esta sobre-expresión del transgen en el núcleo se traduce en un aumento de la actividad de GR, como demuestra el aumento de los niveles de GR fosforilado (p-GR), que conlleva a una disminución de la actividad de ERK y un aumento de la localización nuclear de β -catenina en los MPKs (Figura 4.20).

Para evaluar la contribución específica de GR y GR-TR en queratinocitos en la reparación cutánea, hicimos ensayos de cicatrización *in vitro* utilizando cultivos de queratinocitos primarios que provienen de los ratones K5-GR, K5-GR-TR y WT (Figura 4.21.A y B). Los ensayos de migración celular realizados previamente en MPKs de ratones WT y K5-GR, que se muestran en la figura 4.7, son coincidentes con estos resultados

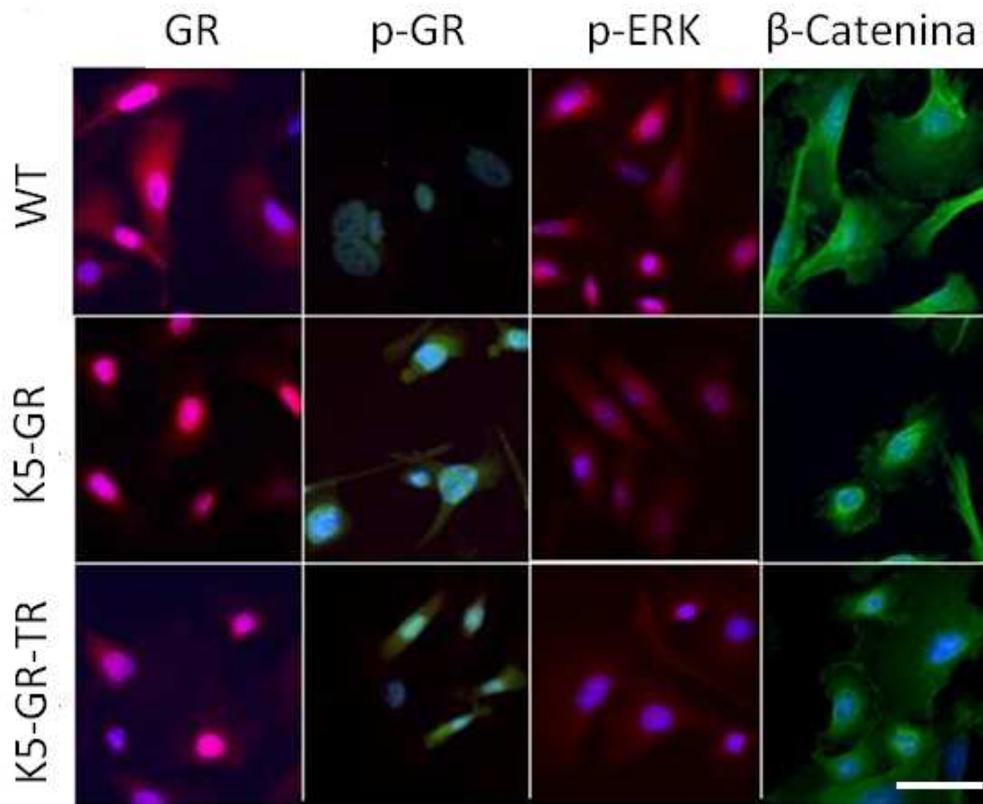


Figura 4.20: Inmunofluorescencias realizadas en MPKs, obtenidos de ratones WT, K5-GR y K5-GR-TR antes de ser sometidos al protocolo de cicatrización *in vitro*. Se ha utilizado un anticuerpo específico para detectar la expresión de cada marcador. Barra: 50 μ m.

A las 8h de practicar las heridas *in vitro*, se observa que la migración en los queratinocitos de K5-GR es significativamente menor (20% respecto al 55% del WT) y que el cierre no está completo a las 24h. En los transgénicos K5-GR-TR, también se observa un retraso en la migración de queratinocitos a 8h (35% respecto al 55% del WT), pero este retraso no se mantiene a las 24h.

Puesto que las diferencias *in vitro* reproducen las cinéticas obtenidas *in vivo*, en estos cultivos también hemos analizado la

actividad de ERK y AKT mediante Western Blot, antes (t0) y después (t1) de realizar las heridas *in vitro* (Figura 4.22).

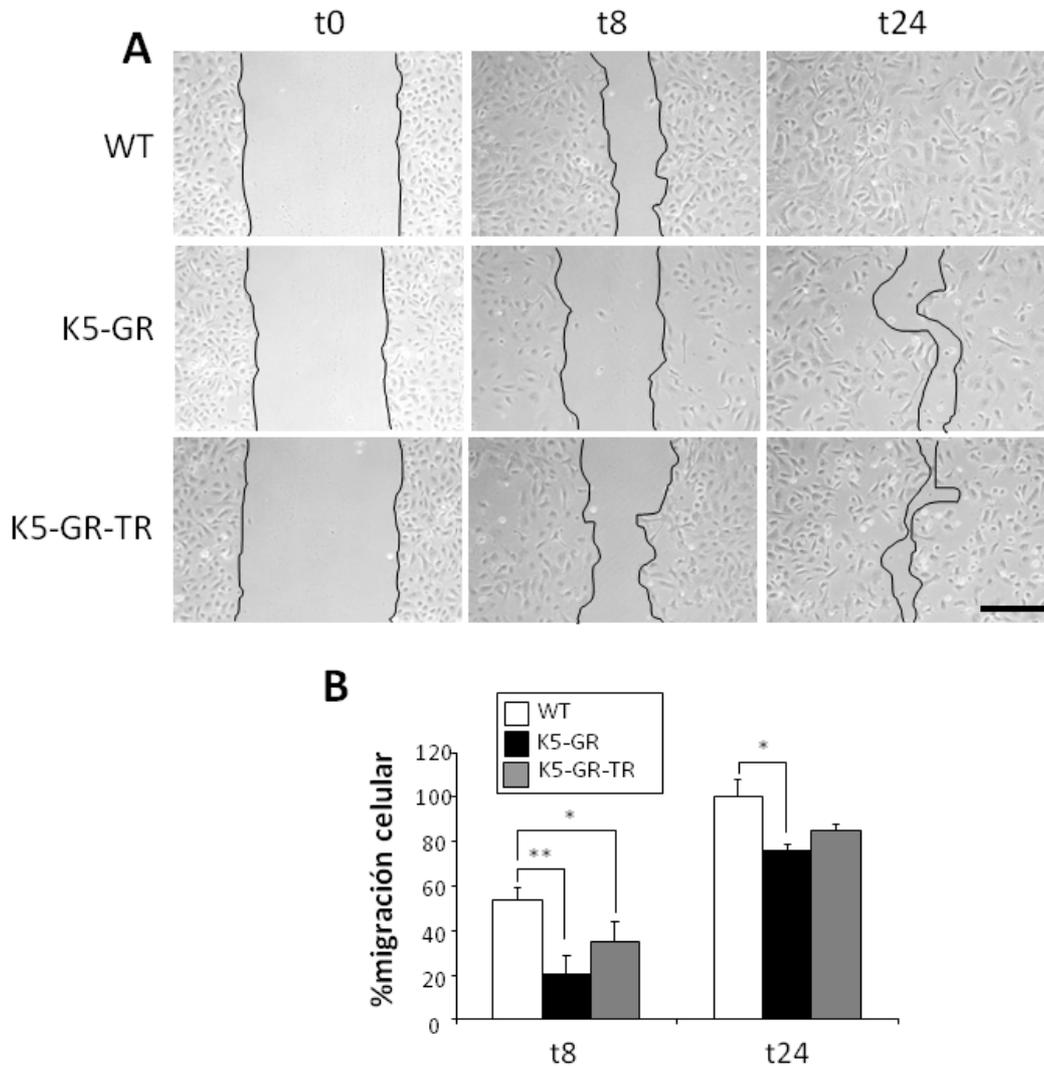


Figura 4.21: (A) GR retrasa la migración de queratinocitos en ensayos de herida *in vitro*. Los experimentos de herida fueron realizados utilizando MPKs de ratones WT, K5-GR y K5-GR-TR. El cierre fue evaluado a t8 y a t24, según se documenta en las fotografías de contraste de fase. Barra: 100 μ m. (B) Cuantificación de la tasa de migración celular. El porcentaje fue estimado como se indica en Material y métodos. Los asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas, determinadas por un test ANOVA, considerando la diferencia significativa cuando $p \leq 0,05$ (*) y/o $p \leq 0,01$ (**).

Observamos que incluso antes de realizar las heridas, hay una disminución del ratio p-ERK/ERK en los MPKs procedentes de ratones K5-GR respecto a los WT. A t1, detectamos la disminución del ratio p-ERK/ERK en los MPKs de los dos transgénicos.

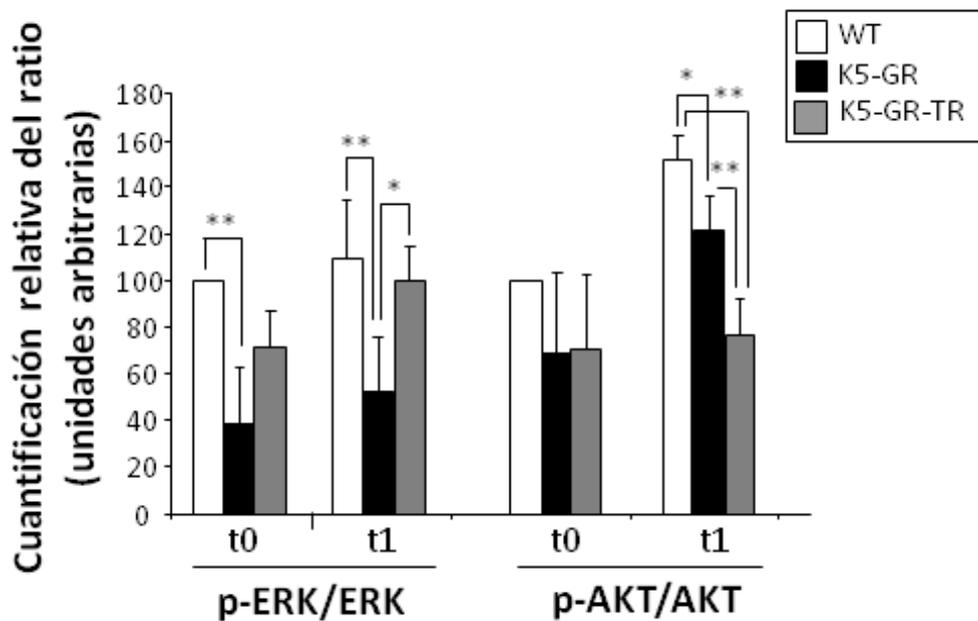


Figura 4.22: Cambios en la expresión de proteínas después de la herida *in vitro* en ratones WT, K5-GR y K5-GR-TR, a t0 y t1 del ensayo de migración celular. Los niveles relativos de proteína fueron determinados mediante inmunodetección con anticuerpos específicos. Los asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas, determinadas por un test ANOVA, considerando la diferencia significativa cuando $p \leq 0,05$ (*) y/o $p \leq 0,01$ (**).

Por otro lado, y dado que previamente hemos descrito que GR interfiere con la actividad AKT en queratinocitos, evaluamos la expresión de AKT total y fosforilada (p-AKT), para determinar el ratio p-AKT/AKT como indicativo de su actividad. Los datos muestran un

aumento de dicha actividad AKT en queratinocitos WT a t1 después de la herida y una disminución significativa en dicha activación en las dos líneas de ratones transgénicos (Figura 4.22).

4.5. Efectos de la aplicación tópica del CpdA en piel de ratón

En estos experimentos, hemos utilizado el CpdA, un compuesto natural que disocia las funciones TA y TR de GR, para evaluar sus efectos en piel de ratón. En primer lugar quisimos ver cuál es la respuesta de ratones adultos WT a un tratamiento tópico agudo con CpdA (300µg), comparándolo con un tratamiento tópico agudo con Dex (8µg). En la tinción con H-E observamos que, a los 7 días después del tratamiento con Dex, la piel presenta atrofia epidérmica, de acuerdo con resultados previos (Donet *et al.*, 2008; Sevilla *et al.*, 2013; Figura 4.23.A). Sin embargo, el tratamiento con CpdA, no produce esta atrofia, sino que, por el contrario, da lugar a una hiperplasia epidérmica en algunas zonas (corchete). Además, hay que resaltar la presencia de infiltrado dérmico (asteriscos) y de folículos en fase activa de crecimiento (señalados con flechas) (Figura 4.23.B).

Para estudiar si la presencia del ligando sintético de GR o de su agonista selectivo podrían modular diferencialmente el efecto de GR en un protocolo agudo de PMA, realizamos pre-tratamientos con estos compuestos (Dex, 8µg; CpdA,300µg) 24 horas antes de

utilizarlos conjuntamente con PMA ($8\mu\text{g}$), en grupos experimentales de ratones WT (Figura 4.24). El tratamiento conjunto Dex+PMA inhibe la hiperplasia producida por el PMA (Figura 4.24.A, señalado con corchetes). En los ratones pre-tratados con CpdA, no se produjo la reversión de la hiperplasia producida por el PMA (Figura 4.24.B, señalado con corchetes).

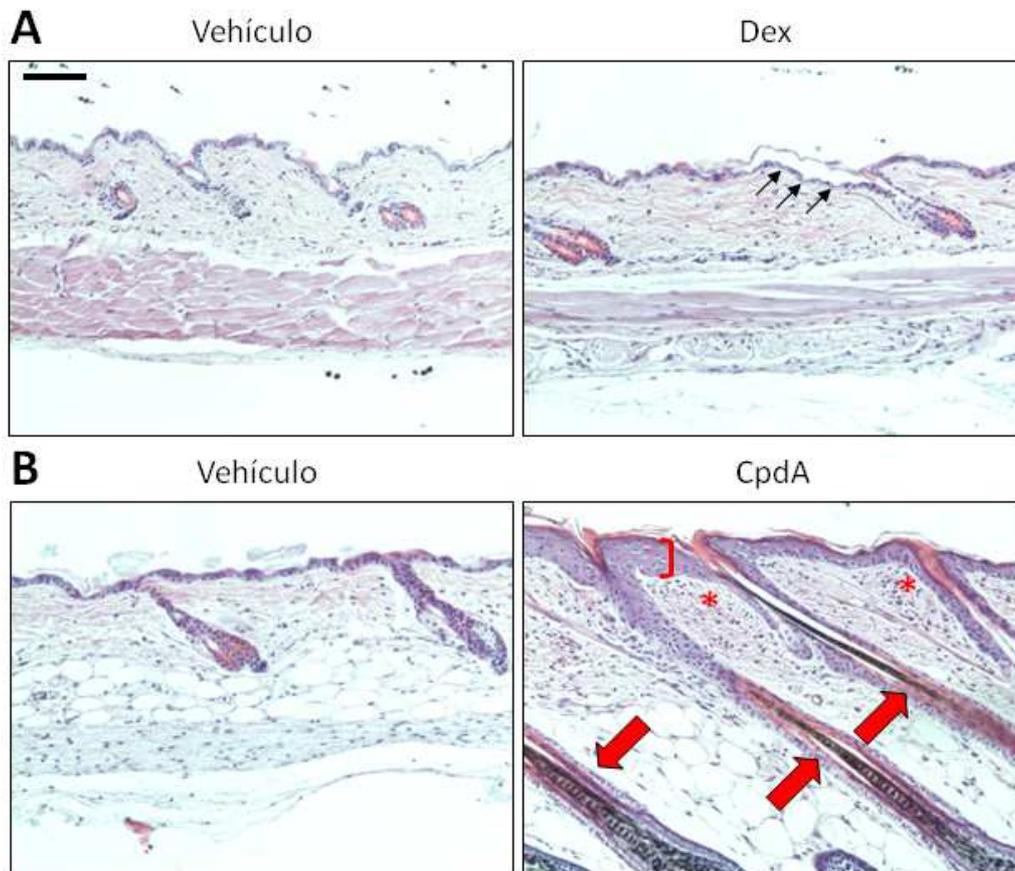


Figura 4.23: Evaluación histológica mediante tinción con Hematoxilina-Eosina del efecto del tratamiento tópico agudo con Dex ($8\mu\text{g}$, A) o CpdA ($300\mu\text{g}$, B) en piel de lomo de ratones WT adultos. Barra: $100\mu\text{m}$.

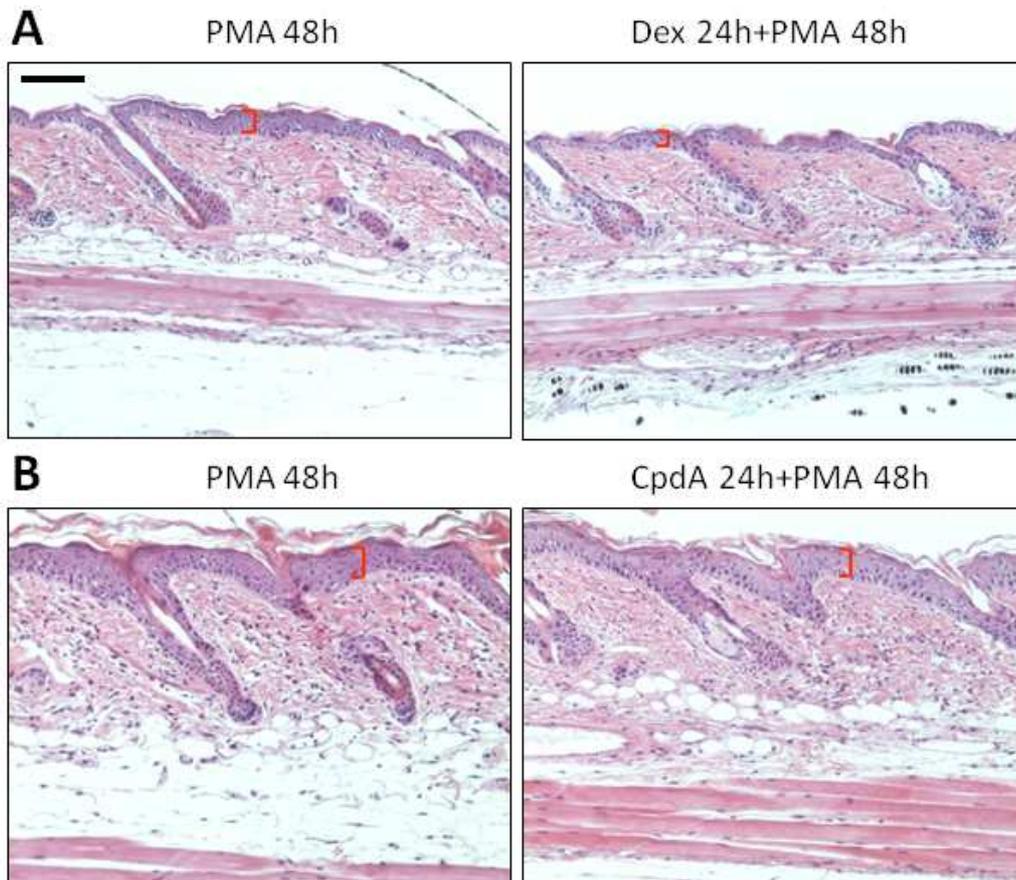


Figura 4.24: Efecto de los ligandos CpdA y Dex en la hiperplasia epidérmica inducida por PMA. Tinción con H-E de secciones de piel de lomo de ratones WT adultos, tratados tópicamente con PMA (8 μ g) durante 48h y pretratados con Dex (8 μ g, A) o CpdA (300 μ g, B) 24h antes de la aplicación del PMA. Los corchetes señalan la hiperplasia epidérmica. Barra: 100 μ m

Cuando determinamos la proliferación de queratinocitos *in vivo* como resultado de estos tratamientos, cuantificamos el ligero efecto inhibitorio de Dex respecto a pieles no tratadas (Figura 4.25.A; tasa de proliferación del 1% vs. 1.9%). En contraste, el tratamiento tópico con CpdA produjo un aumento en la proliferación de los queratinocitos (Figura 4.25.A; 3.2%).

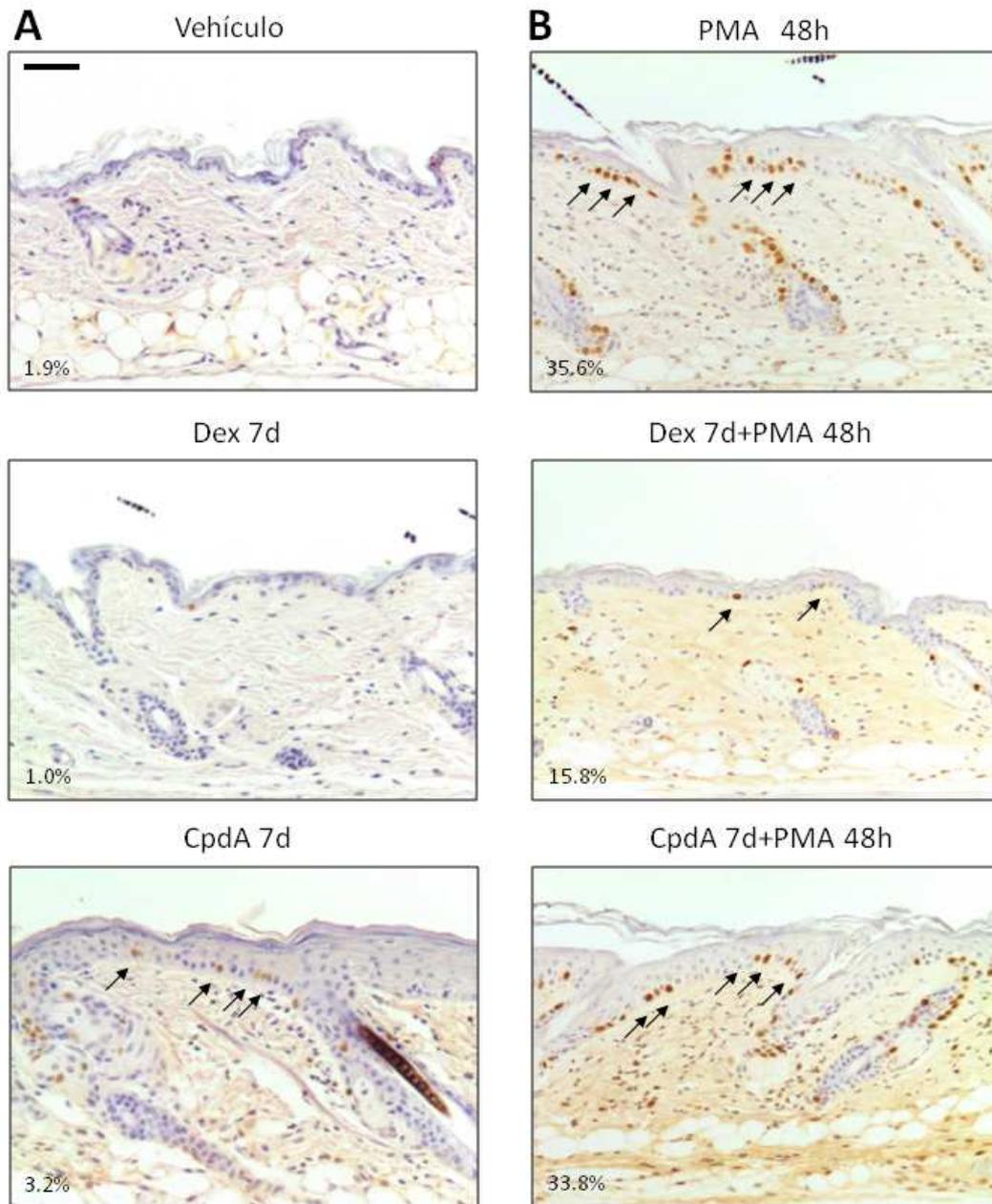


Figura 4.25: Proliferación celular inducida por tratamiento agudo con PMA en piel de lomo. Se realizaron tratamientos tópicos en piel de lomo 3 veces por semana con vehículo, Dex oCpdA. Durante las últimas 48h, los grupos de animales se trataron con vehículo (A) o PMA (B), según se indica, mediante inmunohistoquímica con un anticuerpo específico frente a BrdU. Las flechas señalan núcleos interfoliculares positivos para BrdU. Barra: 50 μ m.

El tratamiento con PMA incrementó la tasa de proliferación de queratinocitos epidérmicos de ratones WT hasta un 35.6% (Figura 4.25.B). La proliferación inducida por PMA se redujo notablemente (hasta un 15.8%) en el grupo de ratones pre-tratados con Dex, pero sin embargo, no se observa esta reducción en los pre-tratados con CpdA (Figura 4.25.B).

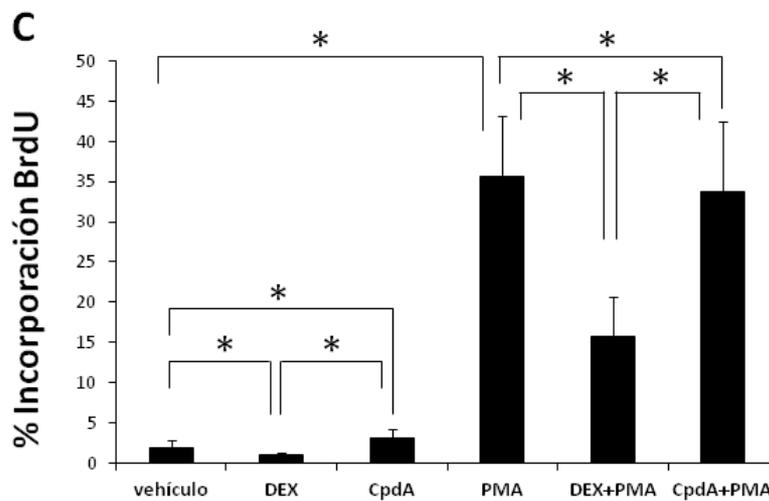


Figura 4.26: Cuantificación del porcentaje de incorporación de BrdU. Los asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas, determinadas por un test ANOVA, considerando la diferencia significativa cuando $p \leq 0,05$.

5. DISCUSIÓN

5.1. Análisis funcional de GR en la formación del párpado

Durante la embriogénesis de mamíferos, la superficie ectodérmica da lugar a los epitelios corneal, conjuntival, y palpebral. La formación del párpado, que ocurre entre los días E15.5 y E16.5, requiere la proliferación y migración de células epiteliales para cubrir la superficie ocular, que actúa como barrera protectora en el desarrollo normal del ojo (Xia y Karin, 2004). Este proceso es similar a la formación de la epidermis, que da como resultado la adquisición de una barrera competente, necesaria para la protección del organismo frente a daños medioambientales (Segre *et al.*, 2006). Nuestro trabajo reciente ha mostrado que GR se requiere para la formación de la epidermis, siendo su ausencia causante de una barrera epidérmica inmadura (Bayo *et al.*, 2008). La inactivación funcional completa de GR produce un aumento de la apoptosis y de la proliferación de queratinocitos epidérmicos, así como la falta de diferenciación terminal en queratinocitos GR^{null/null} (Bayo *et al.*, 2008). La evaluación histológica de los embriones GR^{null/null} muestra un deterioro y un retraso en el cierre del párpado, que necesita alrededor de 72-96h para completarse, en lugar de las 24h requeridas en un ratón WT (Figura 4.1). El hecho de que GR module la proliferación y apoptosis de las células epiteliales del párpado (Figura 4.3 y 4.4), es una razón más, añadida a nuestros hallazgos previos en epidermis, que demuestra que este receptor regula la morfogénesis epitelial de una manera autónoma-celular.

Nuestros datos también muestran que la regulación que ejerce GR sobre el desarrollo epitelial necesita ser coordinada en el tiempo para completar la correcta formación del párpado. Encontramos un incremento en la expresión de marcadores de proliferación en queratinocitos (Figura 4.2: K5, p63) en las células epiteliales del párpado de los embriones $GR^{null/null}$, relativo al WT, en un tiempo en el que estos marcadores deberían estar restringidos a las células de la capa basal y algunas células suprabasales en el sitio de fusión. También observamos una diferenciación incompleta de las células epiteliales oculares de los embriones $GR^{null/null}$ (Figura 4.2: K10, loricrina), probablemente debido a la ausencia de fusión del párpado, que debería finalizar con la diferenciación terminal del epitelio palpebral (Zhang *et al.*, 2005).

Estudios previos en nuestro laboratorio muestran que el fenotipo EOB en los embriones K5-GR y K5-GR-TR es el defecto epitelial más consistente encontrado en ambos modelos transgénicos (Cascallana *et al.*, 2003; Donet *et al.*, 2008). Además, nuestros datos demuestran que la función de transrepresión de GR es suficiente para causar estas anomalías epiteliales (Donet *et al.*, 2008). Es sorprendente encontrar párpados abiertos en modelos de ratón tanto de ganancia como de pérdida de función de GR, aunque este hecho aún apoya más la idea de que este factor de transcripción tiene un papel clave en la morfogénesis epitelial ocular. Los embriones $GR^{null/null}$ muestran un aumento en los niveles de corticosterona debido a la falta del mecanismo de retroalimentación que ejerce normalmente GR sobre el eje HPA, y por tanto, sobre el

control en la producción de GCs (Cole *et al.*, 1995 y nuestros datos no mostrados). Dada la alta afinidad de los GCs endógenos por el receptor MR, es posible que estos elevados niveles de corticosterona actúen a través de MR en las células epiteliales oculares de los embriones GR^{null/null}, mimetizando así los efectos de los GCs a través de MR, aún en ausencia de GR. Apoyando esta hipótesis, se ha descrito que los ratones que sobre-expresan MR en queratinocitos (K5-MR) muestran fenotipo EOB, virtualmente idéntico al de los embriones K5-GR o K5-GR-TR (Saint Marie *et al.*, 2007). Las similitudes entre los transgénicos K5-GR y K5-MR se extienden hasta los defectos epidérmicos, incluyendo la formación anormal del folículo piloso y una epidermis hipoplásica (Saint Marie *et al.*, 2007). GR y MR reconocen el mismo GRE, por lo que podrían transactivar los mismos promotores génicos (Kumar y Litwack, 2009). Así pues, resulta coherente pensar que ambos receptores nucleares podrían regular un mismo sub-grupo de genes específicos en diversos epitelios estratificados. En este sentido, sería clarificador identificar genes regulados en común por GR y MR en queratinocitos. Nuestros datos previos, sin embargo, apuntan a una mayor complejidad en la regulación transcripcional ejercida por estos receptores puesto que, por ejemplo, GR reprime la transcripción de *Egfr* en piel (Figura 4.6.B), mientras que MR induce *Egfr* en queratinocitos y otros tipos celulares (Grossman *et al.*, 2007; datos no mostrados).

El cierre de párpado es un modelo típico para el estudio del desarrollo epidérmico. Principalmente, se han descrito dos vías implicadas en la formación del párpado: la vía MEKK1/JNK/c-Jun, que

transduce señales inducidas por TGF- β y activina, y la vía TGF- α /EGFR/ERK; ambas resultan en la activación de AP-1 (revisado en Xia y Karin, 2004). EGFR juega un papel importante en la morfogénesis del ojo y, en consecuencia, la inactivación de *Egfr* da como resultado un fenotipo EOB y el desarrollo inmaduro de las células epiteliales de la piel, dientes, pulmón y tracto intestinal (revisado en Sibia *et al.*, 2007). Aunque se sabe que la vía TGF- β /activina es esencial durante todo el proceso de cierre y fusión del párpado, la señalización mediada por EGFR se requiere en este proceso sólo durante la migración celular (Mine *et al.*, 2005)

En este trabajo, hemos analizado posibles alteraciones en la expresión y/o actividad de EGFR y su efector *downstream* ERK en los epitelios oculares de embriones GR^{null/null}. El patrón de expresión de p-EGFR y p-ERK muestra una activación sostenida en los embriones E18.5 GR^{null/null}, en un momento de su desarrollo en el cual estas proteínas deberían estar restringidas a las células epiteliales más diferenciadas del párpado ya cerrado (Figura 4.6A). Estos datos son consistentes con la expresión sostenida de ERK y K6 en el párpado de los ratones E18.5 GR^{null/null}, puesto que la señalización mediada por EGF/ERK puede inducir la expresión de K6 a través de sitios AP-1 en su promotor, acorde con lo descrito en la literatura (Lee *et al.*, 2005).

Hasta el momento, no se había investigado la interrelación *in vivo* entre GR/EGFR en la formación del párpado. Nuestros datos muestran que GR es un regulador necesario para el control espacio-temporal de la señalización de EGFR/ERK/AP-1 en los queratinocitos del borde frontal del párpado, y sugieren que la

interacción entre estas vías de señalización es necesaria para el desarrollo normal del mismo. En este trabajo también hemos abordado el análisis funcional de GR en el proceso de cicatrización cutánea *in vivo*, utilizando modelos transgénicos, dado que este proceso tiene muchos paralelismos con el proceso fisiológico de cierre de párpado. En ambos casos, se requiere de la proliferación y migración para completar la re-epitelización a través de la herida (revisado en Martin y Parkhurst, 2004; Barrientos *et al.*, 2008). La similitud entre estos procesos también se refleja en la implicación de las mismas vías de señalización, como muestra la relación inversa entre GR y la actividad EGFR/ERK/AP-1 (Figuras 4.6 y 4.18)

5.2. Análisis de la función de GR en la cicatrización de heridas

5.2.1. La sobre-expresión *in vivo* de GR y GR-TR en queratinocitos produce un retraso en el proceso de cicatrización cutánea con cinéticas diferentes en la reparación

Las terapias prolongadas con GCs en pacientes humanos dan como resultado reacciones adversas, que incluyen la atrofia cutánea, y el retraso en la cicatrización de heridas (Schäcke *et al.*, 2007). Se han realizado muchos esfuerzos para identificar cuáles son los mecanismos responsables de estos efectos secundarios nocivos que son producidos por los GCs sintéticos en el proceso de reparación

cutánea, tanto *in vivo* como *in vitro*. En este trabajo también hemos querido investigar los efectos mediados por GR específicamente en queratinocitos, utilizando dos transgenes que representan la forma WT del receptor (GR) y una forma mutante (GR-TR) que, en principio, discrimina entre las funciones de TR y TA del receptor, para evaluar el proceso de cicatrización cutánea. En ambos modelos, la sobre-expresión de GR o GR-TR en queratinocitos se traduce en una localización nuclear de los transgenes (Figura 4.9.B). El fenotipo que resulta de dicha sobre-expresión en ambos transgénicos, reproduce los efectos observados en las terapias prolongadas con análogos sintéticos de GCs en pacientes humanos, como atrofia cutánea o alopecia esporádica (Pérez *et al.*, 2001; Schäcke *et al.*, 2002; Cascallana *et al.*, 2005). Estas alteraciones son debidas exclusivamente a los efectos producidos por los transgenes en queratinocitos, ya que los niveles circulantes de GCs en plasma no cambian en los transgénicos K5-GR y K5-GR-TR en comparación con los WT (datos no mostrados).

El análisis comparativo de los transgénicos K5-GR y K5-GR-TR para evaluar la respuesta a herida ha tenido por objeto discriminar la contribución relativa de las funciones de TA y TR del receptor hormonal. Sin embargo, es importante señalar que las aproximaciones basadas en el uso de mutantes no permiten una separación total de estas funciones; es decir, la mayoría de los mutantes de GR utilizados en modelos animales, incluyendo GR^{dim/dim} (mGR A458T) y los transgénicos K5-GR-TR (rGR P493R y A494S) no son completamente deficientes en TA, puesto que los monómeros

GR son capaces de inducir la transcripción génica (Adams *et al.*, 2003; Donet *et al.*, 2008; Vandevyver *et al.*, 2013). Esto no inhabilita estas aproximaciones pero se hace necesario considerar las limitaciones inherentes en la interpretación de datos. En este contexto, nuestros datos muestran que la sobre-expresión de GR tiene consecuencias más negativas sobre el proceso de cicatrización que las producidas por GR-TR. En ese sentido, podemos afirmar que la función TA de GR está vinculada a los efectos secundarios no deseados asociados con este receptor.

En este trabajo hemos mostrado que existe un retraso estadísticamente significativo en el cierre de las heridas de ambos transgénicos K5-GR y K5-GR-TR respecto al WT en estadios tempranos del proceso de reparación cutánea. De hecho, este retraso en la cicatrización es similar al que se produce después de un tratamiento a largo plazo con GCs sintéticos como Dex (Figura 4.15). Esto implica que, al menos alguno de los efectos secundarios asociados al uso de GCs, como el retraso en la cicatrización cutánea, es debido en gran parte a las acciones de GR en el queratinocito de una manera autónoma-celular.

En un estadio temprano del proceso de cicatrización, el ratio de re-epitelización está reducido en ambos transgénicos respecto al WT, como consecuencia de la inhibición de la proliferación y de la migración (como se muestra en la figura 4.14). Además, los queratinocitos de ambos transgenes GR y GR-TR son capaces de inhibir la migración en cultivo en un tiempo corto (Figura 4.22), del mismo modo que ocurre con cultivos de queratinocitos WT tratados

con Dex (Figura 4.7; Lee *et al.*, 2005), si bien es cierto que los MPKs del transgénico K5-GR-TR producen un retraso menor que los de K5-GR. Estos resultados nos sugieren que discriminar entre los efectos producidos por la función de TA y de TR es necesario para reducir este retraso en la migración celular, donde la función de TR de GR tendría un papel predominante sobre la función de TA. Nuestros datos son compatibles con experimentos de cicatrización de heridas *in vitro* realizados en cultivos de fibroblastos de los transgénicos GR^{dim/dim}, donde se observa un aumento en la proliferación y migración relativo al WT (Grose *et al.*, 2002).

Por otro lado, GR y GR-TR causan efectos diferentes sobre la remodelación del tejido dañado ya en una fase más tardía de la cicatrización, puesto que sólo observamos una reducción de la deposición de colágeno a d8 del proceso en el K5-GR, lo que, de nuevo, es compatible con lo que ocurre después de un tratamiento a largo plazo con GCs sintéticos como Dex (Beer *et al.*, 2000). Estos resultados concuerdan con los datos que se muestran en los experimentos de cicatrización de heridas en los ratones GR^{dim/dim}, donde no se observan cambios en la deposición de colágeno en una etapa tardía del proceso (Grose *et al.*, 2002).

5.2.2. El patrón de expresión génica de la respuesta inflamatoria en las heridas de los transgénicos K5-GR y K5-GR-TR está alterado

La curación de heridas es un proceso complejo altamente conservado en la evolución que, en la piel, tiene por objeto la restauración de la barrera epidérmica. Una lesión en las células epiteliales inicia una serie de cambios en la expresión de genes que median los eventos que se requieren para la reparación de tejidos, incluyendo la proliferación celular, la migración, y la remodelación de la matriz extracelular (revisado en Martin y Parkhurst, 2004; Barrientos *et al.*, 2008). Todo esto requiere la coordinación de varios tipos celulares, incluyendo a los queratinocitos, fibroblastos, células endoteliales, macrófagos y plaquetas. Así pues, este proceso es ejecutado y regulado por una red igualmente compleja de señalización, que involucra a factores de crecimiento y citoquinas, así como las interacciones entre ellas y la matriz extracelular. El patrón de las señales moleculares que orquestan todos estos procesos en la piel no se ha esclarecido por completo.

Varias citoquinas pro-inflamatorias, como IL-1 α , IL1- β , IL-6 y TNF- α , se inducen de forma transitoria durante la fase inflamatoria de la cicatrización, lo que es parte del proceso normal y contribuye a la reparación (Werner y Grose, 2003; Barrientos *et al.*, 2008). Posteriormente, la expresión de estas citoquinas disminuye, dando paso a la siguiente fase del proceso. Por tanto, la coordinación espacio-temporal es muy importante para la correcta reparación del tejido lesionado (Barrientos *et al.*, 2008). La expresión de IL1- β y

TNF- α está inducida a d4 en los ratones WT de acuerdo con lo descrito en la literatura. En cambio, los niveles de transcrito de *Tnf- α* disminuyen en la herida de ratones K5-GR a d4 con respecto a los WT y los K5-GR-TR. También se observa una menor inducción de los niveles de *Il1- β* en ambos transgénicos respecto al WT en este tiempo del proceso. Sin embargo, sólo se mantiene esta reducción en la inducción de *Il1- β* a d8 en el K5-GR-TR. Estos cambios son acordes con la inhibición transcripcional de las citoquinas pro-inflamatorias mediada por GR en estos transgénicos, después de un tratamiento tópico con PMA, así como en ratones pre-tratados con Dex antes de la aplicación del PMA, como se muestra en trabajos previos del grupo (Pérez *et al.*, 2001; Donet *et al.*, 2008). Nuestros datos muestran una notable reducción del infiltrado dérmico en ambos transgénicos durante todo el proceso de cicatrización (Figura 4.16), lo que sugiere que tanto TA como TR contribuyen a la represión de IL1- β . Puesto que macrófagos y neutrófilos son las principales fuentes productoras de IL1- β , el menor número de macrófagos en los transgénicos podría explicar la reducción de los niveles de esta citoquina. Este dato está de acuerdo con el trabajo previo realizado en los transgénicos GR^{dim/dim}, donde se muestra que el retraso producido por los GCs endógenos en la fase temprana de la cicatrización, debido a la reducción de la inflamación, es mucho menor al que se produce por el uso de GCs exógenos. En estos experimentos se muestra que los ratones GR^{dim/dim} tienen una mayor expresión de IL1- β en la fase inflamatoria del proceso de reparación (Grose *et al.*, 2002). En este sentido, nuestros resultados en los transgénicos K5-GR y K5GR-TR se

asemejan más a los obtenidos a consecuencia del uso de GCs exógenos.

Además, es muy importante tener en cuenta que la piel representa un sitio extra-adrenal de producción de GCs (Slominski *et al.*, 2007), como ya hemos comentado en la introducción. Se ha demostrado en trabajos recientes que los queratinocitos son capaces de sintetizar cortisol *de novo* y otros enzimas metabólicos que intervienen en esta síntesis, así como enzimas clave en la regulación de este proceso como CYP11B1, HSD11 β 1 o HSD11 β 2, que catalizan la interconversión de las formas activa (cortisol/corticosterona) e inactiva (cortisona/deoxi-corticosterona) de los GCs y regulan por tanto, la disponibilidad de ligando activo (Cirillo y Prime, 2011; Vukelic *et al.*, 2011). Recientemente, se ha descrito la importancia de la producción local de GCs en la cicatrización utilizando cultivos de queratinocitos humanos (Vukelic *et al.*, 2011). Estos autores describen que la síntesis de IL1 β , uno de los primeros eventos que ocurren en los queratinocitos después de un daño o lesión, desencadena la producción local de cortisol. Cuando los niveles de IL1 β son demasiado elevados, la síntesis local de cortisol se inhibe (Vukelic *et al.*, 2011). Esto pone de manifiesto la importancia de la producción a nivel local de cortisol, así como su regulación a través de este mecanismo de retroalimentación, que modula las acciones hormonales y mitiga la respuesta inicial inflamatoria en el proceso de cicatrización.

De acuerdo con la literatura, detectamos la expresión de varios factores de crecimiento, como KGF, TGF- β 1y TGF- β 3, de

manera correcta en cuanto a intensidad y tiempo de aparición durante el proceso de reparación cutánea en un ratón WT (Barrientos *et al.*, 2008). Estudios previos describen cómo diferencias en la expresión de los TGF- β s están asociadas con defectos en la cicatrización de ratones previamente tratados con GCs exógenos como Dex (Beer *et al.*, 2000). En nuestro trabajo detectamos una represión de *Kgf* y *Tgf- β 1* en los transgénicos K5-GR pero no en los K5-GR-TR. En cambio, observamos una inducción de *Tgf- β 3* en ambos transgénicos respecto al WT, incluso a nivel basal. Todos estos datos sugieren que las diferencias en la cinética de inducción transcripcional de citoquinas y factores de crecimiento en los transgénicos K5-GR y K5-GR-TR tienen un impacto en el retraso observado durante el proceso de cicatrización.

5.2.3. Interacción GR/EGFR/ β -catenina en el proceso de cicatrización cutánea

Está descrito en la literatura que las queratinas K6 y K16 tienen un papel clave en la migración de queratinocitos. Se sabe que la expresión de estas queratinas se reprime por GR a través de diferentes mecanismos (Ramot *et al.*, 2009). Estos incluyen la interferencia de GR con la vía de señalización de las MAPKs, como previamente mostramos en ratones transgénicos de pérdida de función de GR (Bayo *et al.*, 2008). La expresión de la proteína K6, asociada a la migración, aumenta durante la cicatrización en piel de adulto. En ratones WT, el mRNA de la K6 se induce después de una

herida al aumentar la actividad AP-1, que regula positivamente este gen mediante unión directa a secuencias AP-1 en su promotor. GR es capaz de reprimir la transcripción de esta queratina por interferencia negativa con AP-1, así como a través de unión directa de 4 monómeros de GR con un sitio nGRE en el promotor de la K6, es decir, la activación de GR puede inhibir la expresión específica de queratinas a través de mecanismos transcripcionales y no transcripcionales (Radoja *et al.*, 2000).

Durante el proceso de cierre de herida, la represión de K6/K16 mediada por GR juega un papel importante, puesto que la migración celular (células K6-positivas) cesa cuando los bordes de la herida se fusionan y la epidermis cubre la herida (Beer *et al.*, 2000; Stojadinovic *et al.*, 2005). En queratinocitos humanos, se ha descrito que este mecanismo ocurre a través del antagonismo GR/EGFR e implica a la activación de β -catenina y c-myc (Stojadinovic *et al.*, 2005). β -catenina es una proteína multifuncional que juega un papel importante durante el desarrollo embrionario y la neoplasia como mediador de la vía de señalización WNT. La localización nuclear/citoplásmica de β -catenina tras la activación de GR, contribuye al retraso en la cicatrización, inhibiendo también la migración y alterando la diferenciación de los queratinocitos, a través del bloqueo de los efectos de EGF mediante la formación de un complejo que consiste en cuatro monómeros de GR, β -catenina y el coactivador asociado a arginina metiltransferasa1 (CARM-1) (Lee *et al.*, 2005; Stojadinovic *et al.*, 2005). Consecuentemente, en nuestro trabajo detectamos localización nuclear de β -catenina en los

queratinocitos de los ratones K5-GR y K5-GR-TR, en un estadio temprano del proceso de cicatrización cutánea (Figura 4.19). El posible papel central de β -catenina como mediador de los efectos de los GCs sobre la migración de queratinocitos, hace que se convierta en una posible diana terapéutica para el desarrollo de nuevos fármacos que promuevan la cicatrización de heridas. La interacción entre GR/EGFR/ β -catenina podría indicar que la vía de señalización mediada por WNT tiene un papel relevante en las acciones terapéuticas debidas al uso de GCs.

5.2.4. Interacción GR/MAPK/AP-1 en el proceso de cicatrización cutánea: Papel de ERK

La vía de señalización MAPK/AP-1 juega un papel clave en la biología de queratinocitos. Distintos miembros de estas familias participan en la regulación de la proliferación, migración, diferenciación y median la respuesta a estrés. Además participan en la expresión de citoquinas, receptores de membrana y proteasas, importantes en el proceso de reparación cutánea. La activación de ERK desempeña un papel importante en la mediación de la proliferación celular en respuesta a factores de crecimiento. Además, la fosforilación de ERK induce la expresión de CycD1, dando como resultado una inducción de la proliferación celular (Turchi *et al.*, 2002). En otros tipos celulares se ha descrito que la activación de GR a través de su unión a ligando suprime la fosforilación de ERK y la expresión de CycD1, lo que se traduce en la inhibición del

crecimiento celular. Nuestros resultados, son consistentes con estos datos, mostrando que la sobreexpresión de GR y GR-TR disminuye la actividad ERK y reprime la expresión de c-Fos y CycD1 (Figura. 4.18). Estas alteraciones contribuyen a una cicatrización deficiente en los ratones K5-GR y K5-GR-TR. La disminución de los niveles de transcrito de varios genes dianas de AP-1, como *Tnf- α* , *Il-1 β* , *Tgf β -1* o *Tgf β -3*, sugiere que AP-1 tiene un papel clave en este proceso, de manera que la disminución de su actividad correlaciona con un retraso en la cicatrización de heridas.

En resumen, podemos decir que, a través del estudio de los modelos animales K5-GR y K5-GR-TR, hemos mostrado que la función de TR de GR es suficiente para inhibir la cicatrización en estadíos tempranos, probablemente a través de la inhibición de la vía de señalización de las MAPK y de la transcripción dependiente de AP-1. Sin embargo, la función de TA de GR es necesaria para retrasar el cierre de herida en estadíos más tardíos del proceso, probablemente debido a la supresión de la fase de remodelación del tejido. La inhibición diferencial de la actividad de ERK entre las dos líneas de transgénicos, podría explicar las diferencias que se observan en su cinética de cierre.

Así pues, nuestros datos sugieren que las vías de GR, WNT/ β -catenina y TGF β estarían interconectadas y existiría un cruce de comunicaciones entre ellas para regular la reparación cutánea en respuesta a GCs. El equilibrio entre la activación de una o más de estas vías y la duración del período de activación de las mismas,

serían puntos críticos en la determinación de los genes activados *downstream*, que modularían todo el proceso.

5.2.5. Utilización de agonistas selectivos de GR o SEGRAs para analizar el proceso de cicatrización cutánea en modelos animales.

Los efectos terapéuticos de GR se han asociado durante décadas a la función de TR, mientras que los efectos secundarios no deseados se asocian con la función de TA. Dado el impacto del uso de GCs en el área de la salud y el coste económico asociado, muchas compañías farmacéuticas trabajan en el diseño de nuevos compuestos que permitan disociar las funciones de TR y TA de GR, los denominados SEGRAs. Hasta el momento, los SEGRAs testados han funcionado *in vitro*, mostrando una mejor ratio beneficio/riesgo, pero su uso en ensayos clínicos no ha resultado óptimo (Schoepe *et al.*, 2011). Hace unos años se identificó un compuesto natural derivado de una planta, denominado CpdA, que actuaba como un ligando de GR que activaba selectivamente la función TR y no la función TA del receptor (De Bosscher *et al.*, 2005).

Diversos trabajos han mostrado la eficiencia de CpdA en inhibir la inflamación en distintas patologías, pero reduciendo los efectos secundarios no deseados (Reuter *et al.*, 2012; Kowalczyk *et al.*, 2012; Lesovaya *et al.*, 2011). El uso de GCs sintéticos para el tratamiento de patologías como la enfermedad inflamatoria de Bowel en el intestino, sigue conllevando riesgos debido a la aparición

de efectos secundarios no deseados, como el deterioro de la reparación epitelial en el intestino (Reuter *et al.*, 2012). Ensayos de migración *in vitro* realizados en cultivos de células epiteliales intestinales, muestran el retraso en la migración celular producido por el uso de un GC convencional como Dex, sin embargo no se observa dicho retraso cuando se utiliza un SEGRA como el CpdA (Reuter *et al.*, 2012). En este trabajo, donde utilizan Dex y CpdA como agonistas de GR, se ha visto como el CpdA inhibe de forma efectiva la actividad de NF- κ B y la secreción de IL-8, disminuyendo significativamente el potencial de TA. Además, mientras que Dex provoca la inhibición de la vía EGF/ERK/MAPK, importante para la curación de heridas epiteliales intestinales mediante la inducción de *Mkp-1* y *Anx-1*, CpdA no afecta a la expresión de esta vía de señalización.

Muy recientemente, se ha descrito que la aplicación tópica de CpdA en piel de ratón es capaz activar de manera selectiva la función de TR, inhibiendo la activación de NF- κ B sin afectar a la actividad de AP-1 (Kowalczyk *et al.*, 2012). Estos resultados coinciden con los datos presentados en las figuras 4.24-26, en las que describimos que la aplicación tópica de CpdA no produce atrofia cutánea como ocurre con Dex, sino hiperplasia epidérmica y un aumento de la inflamación.

Aunque en principio, estos datos son prometedores, es necesario evaluar la posible toxicidad del compuesto, que se aplica en dosis muy elevadas, y también cómo evoluciona la hiperplasia epidérmica y el aumento de inflamación producidos a medio/largo

plazo. En conjunto, nuestros resultados indican que el uso del CpdA como terapia alternativa a los GCs convencionales, evitaría la aparición de efectos secundarios no deseados o disminuiría su intensidad, como la atrofia cutánea. En cuanto a los efectos producidos en la cicatrización debidos al uso del CpdA, podríamos especular que el retraso en el proceso sería menor, puesto que, por un lado, la disminución de la fase inflamatoria sería menos pronunciada debido a la menor represión de citoquinas pro-inflamatorias, permitiendo la continuidad del proceso de reparación a la siguiente fase. Por otro lado, la utilización del CpdA no afectaría a la actividad de AP-1, con lo que la fase de re-epitelización no se vería afectada. De cualquier modo, para el uso futuro del CpdA en terapias farmacológicas se necesitarían más estudios que permitan concluir si el balance beneficio/perjuicio de su uso es o no positivo.

6. CONCLUSIONES

1. La inactivación total de GR en los ratones $GR^{null/null}$ da lugar al retraso y deterioro del cierre del párpado durante el desarrollo. Las células epiteliales del párpado de los ratones $GR^{null/null}$ muestran un aumento en la proliferación y apoptosis junto con alteraciones en su diferenciación.
2. Los defectos observados en el cierre del párpado se deben, en parte, a la falta del antagonismo entre la señalización de GR y EGFR, causante de la activación sostenida de la vía ERK/AP-1 y la inducción de la expresión de la queratina K6.
3. La expresión constitutiva de GR y GR-TR restringida a queratinocitos en los modelos transgénicos K5-GR Y K5-GR-TR produce un retraso en el proceso de cicatrización de heridas, de manera similar al producido por el tratamiento con GCs exógenos.
4. Los defectos en cicatrización observados en ratones K5-GR correlacionan con una disminución en la inflamación tisular, la re-epitelización y la formación del tejido de granulación, a lo largo de todo el proceso de reparación cutánea.

5. Los defectos en cicatrización observados en ratones K5-GR-TR, menos pronunciados respecto a K5-GR, correlacionan con menores efectos anti-inflamatorios y un re-establecimiento en la re-epitelización y formación del tejido de granulación en etapas tardías del proceso.
6. Los efectos inhibitorios de GR sobre la migración de queratinocitos están mediados por la función de TR, tanto *in vivo* como *in vitro*. GR modula este proceso, en parte, a través de la interferencia con la vía de señalización ERK/AP-1 y/o mediante la interacción GR/EGFR/ β -catenina, tanto *in vivo* como *in vitro*.
7. En conjunto, tanto la función de TA como la de TR del receptor contribuyen al retraso observado, si bien son importantes en distintas etapas del proceso: la función TR es suficiente para inhibir las etapas tempranas y la función TA se necesita para producir un retraso en etapas tardías de la cicatrización.

7. APÉNDICES

Apéndice I: Publicaciones

Latorre V, Sevilla LM, **Sanchis A**, Pérez P (2013). Selective ablation of glucocorticoid receptor in mouse keratinocytes increases susceptibility to skin tumorigenesis. *J Invest Dermatol.* (aceptado).

Sevilla LM, Latorre V, **Sanchis A**, Pérez P (2013). Epidermal Inactivation of the Glucocorticoid Receptor Triggers Skin Barrier Defects and Cutaneous Inflammation. *J Invest Dermatol.* Feb; 133 (2):361-70.

Sanchis A, Alba L, Latorre V, Sevilla LM, Pérez P (2012). Keratinocyte-targeted overexpression of the glucocorticoid receptor delays cutaneous wound healing. *Plos One.* 7(1):e29701.

Sevilla LM, Bayo P, Latorre V, **Sanchis A**, Pérez P (2010). Glucocorticoid receptor regulates overlapping and differential gene subsets in developing and adult skin. *Mol Endocrinology.* Nov; 24(11):2166-78.

Sanchis A, Bayo P, Sevilla LM, Pérez P (2010). Glucocorticoid receptor antagonized EGFR function to regulate eyelid development. *Int. J. Dev. Biol.* 54(10):1473-80.

Bayo P, **Sanchis A**, Bravo A, Cascallana JL, Buder K, Tuckermann J, Schütz G, Pérez P (2008). Glucocorticoid receptor is required for skin barrier competence. *Endocrinology*. 149(3), 1377-1388.

Donet E, Bosch P, **Sanchis A**, Bayo P, Ramírez A, Cascallana JL, Bravo A, Pérez P (2008). Transrepression function of the glucocorticoid receptor regulates eyelid development and keratinocyte proliferation but is not sufficient to prevent skin chronic inflammation. *Mol Endocrinology*. 22(4), 799-812.

8. BIBLIOGRAFÍA

Adachi M, Gazel A, Pintucci G, Shuck A, Shifteh S, Ginsburg D, Rao LS, Kaneko T, Freedberg IM, Tamaki K, Blumenberg M. (2003). Specificity in stress response: epidermal keratinocytes exhibit specialized UV-responsive signal transduction pathways. *DNA Cell Biol*; 22(10):665-77.

Adams M, Meijer OC, Wang J, Bhargava A, Pearce D. (2003). Homodimerization of the glucocorticoid receptor is not essential for response element binding: activation of the phenylethanolamine *N*-methyltransferase gene by dimerization-defective mutants. *Mol Endocrinology*. 17: 2583-2592.

Addison WH, How HW. (1999). The development of the eyelids of the albino rat, until the completion of disjunction. *Am J Anat*. 29:1-31.

Angel P, Szabowski A, Schorpp-Kistner M. (2001). Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology. *Oncogene*. Apr 30; 20(19):2413-23.

Ayroldi E, Cannarile L, Migliorati G, Nocentini G, Delfino DV, Riccardi C. (2012). Mechanisms of the anti-inflammatory effects of glucocorticoids: genomic and nongenomic interference with MAPK signaling pathways. *FASEB J*. Dec; 26(12):4805-20.

Barnes PJ. (2011) Glucocorticosteroids: current and future directions. *Br J Pharmacol*. May; 163(1):29-43.

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

Bayo P, Sanchis A, Bravo A, Cascallana JL, Buder K, Tuckermann J, Schütz G, Pérez P. (2008). Glucocorticoid receptor is required for skin barrier competence. *Endocrinology*. 149: 1377-1388.

Beck IM, Vanden Berghe W, Vermeulen L, Yamamoto KR, Haegeman G, De Bosscher K. (2009). Crosstalk in inflammation: the interplay of glucocorticoid receptor-based mechanisms and kinases and phosphatases. *Endocr Rev*. Dec; 30(7):830-82.

Beck IM, De Bosscher K, Haegeman G. (2011). Glucocorticoid receptor mutants: man-made tools for functional research. *Trends Endocrinol Metab*. Aug; 22(8):295-310.

Beer HD, Gassmann MG, Munz B, Steiling H, Engelhardt F, Bleuel K, Werner S. (2000). Expression and function of keratinocyte growth factor and activin in skin morphogenesis and cutaneous wound repair. *J Invest Dermatol Symp Proc*. 5(1):34-9.

Berkowitz P, Hu P, Warren S, Liu Z, Diaz LA, Rubenstein DS. (2006). p38MAPK inhibition prevents disease in pemphigus vulgaris mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(34):12855-60.

Bruna A, Nicolàs M, Muñoz A, Kyriakis JM, Caelles C. (2003). Glucocorticoid receptor-JNK interaction mediates inhibition of the JNK pathway by glucocorticoids. *EMBO J*. 17; 22(22):6035-44.

Budunova IV, Kowalczyk D, Pérez P, Yao YJ, Jorcano JL, Slaga TJ. (2003). Glucocorticoid receptor functions as a potent suppressor of mouse skin carcinogenesis. *Oncogene*. 22:3279-3287.

Caelles C, González-Sancho JM, Muñoz A. (1997). Nuclear hormone receptor antagonism with AP-1 by inhibition of the JNK pathway. *Genes Dev.* 15;11(24):3351-64.

Candi E, Schmidt R, Melino G. (2005). The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6(4):328-40.

Cascallana JL, Bravo A, Page A, Budunova I, Slaga TJ, Jorcano JL, Pérez P. (2003). Disruption of eyelid and cornea development by targeted overexpression of the glucocorticoid receptor. *Int J Dev Biol.* 47: 59-64.

Cascallana JL, Bravo A, Donet E, Leis H, Jorcano JL, Pérez P. (2005). Ectoderm-targeted overexpression of the glucocorticoid receptor induces hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Endocrinology.* 146: 2629-2638.

Chen W, Bowden GT. (2000). Role of p38 mitogen-activated protein kinases in ultraviolet-B irradiation-induced activator protein 1 activation in human keratinocytes. *Mol Carcinog.* 28(4):196-202.

Cirillo N, Prime SS. (2011) Keratinocytes synthesize and activate cortisol. *J Cell Biochem.* Jun; 112(6):1499-505.

Clark AR. (2007) Anti-inflammatory functions of glucocorticoid-induced genes. *Mol Cell Endocrinol.* Sep 15;275(1-2):79-97.

Cole TJ, Blendy AP, Monaghan K, Schmid W, Aguzzi A, Fantuzzi G, Hummler E, Unsicker K, Schütz G. (1995). Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes Dev.* 9: 1608-1621.

Davidovici BB, Orion E, Wolf R. (2008). Cutaneous manifestations of pituitary gland diseases. *Clin Dermatol.* May-Jun; 26(3):288-95.

De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G. (2003). The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr Rev.* Aug; 24(4):488-522.

De Bosscher K, Vanden Berghe W, Beck IM, Van Molle W, Hennuyer N, Hapgood J, Libert C, Staels B, Louw A, Haegeman G. (2005). A fully dissociated compound of plant origin for inflammatory gene repression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Nov 1;102(44):15827-32.

De Bosscher K, Haegeman G. (2009). Minireview: latest perspectives on antiinflammatory actions of glucocorticoids. *Mol Endocrinol.* 23: 281-289.

Donet E, Bosch P, Sanchis A, Bayo P, Ramírez A, Cascallana JL, Bravo A, Pérez P. (2008). Transrepression function of the glucocorticoid receptor regulates eyelid development and keratinocyte proliferation but is not sufficient to prevent skin chronic inflammation. *Mol Endocrinology.* 22: 799- 812.

Dusek RL, Getsios S, Chen F, Park JK, Amargo EV, Cryns VL, Green KJ. (2006). The differentiation-dependent desmosomal cadherin desmoglein 1 is a novel caspase-3 target that regulates apoptosis in keratinocytes. *J Biol Chem*. Feb 10; 281(6):3614-24.

Elias PM, Wakefield JS. (2011). Therapeutic implications of a barrier-based pathogenesis of atopic dermatitis. *Clin Rev Allergy Immunol*. Dec; 41(3):282-95.

Falkenstein E, Wehling M. (2000). Nongenomically initiated steroid actions. *Eur J Clin Invest*. Dec; 30 Suppl 3:51-4.

Florin L, Knebel J, Zigrino P, Vonderstrass B, Mauch C, Schorpp-Kistner M, Szabowski A, Angel P. (2006). Delayed wound healing and epidermal hyperproliferation in mice lacking JunB in the skin. *J Invest Dermatol*. Apr; 126(4):902-11.

Fuchs E, Raghavan S. (2002). Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Genet*. Mar; 3(3):199-209.

Gazel A, Banno T, Walsh R, Blumenberg M. (2006). Inhibition of JNK promotes differentiation of epidermal keratinocytes. *J Biol Chem*. 281:20530–20541.

Grad I, Picard D. (2007). The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. *Mol Cell Endocrinol*. 15;275(1-2):2-12.

Gross K, Cidlowski JA. (2008) Tissue-specific glucocorticoid action: a family affair. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. Vol.19 No.9: 331-339.

Grossmann C, Krug AW, Freudinger R, Mildenerger S, Voelker K, Gekle M. (2007). Aldosterone-induced EGFR expression: interaction between the human mineralocorticoid receptor and the human EGFR promoter. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 292: 1790-1800.

Grose R, Werner S, Kessler D, Tuckermann J, Huggel K, Durka S, Reichardt HM, Werner S. (2002). A role for endogenous glucocorticoids in wound repair. *EMBO Rep.* Jun; 3(6):575-82.

Helmberg A, Auphan N, Caelles C, Karin M. (1995). Glucocorticoid-induced apoptosis of human leukemic cells is caused by the repressive function of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 14 (3): 452-460.

Hengge UR, Ruzicka T, Schwartz RA, Cork MJ. (2006). Adverse effects of topical glucocorticosteroids. *J Am Acad Dermatol.* 54(1):1-15; quiz 16-8.

Huang J, Dattilo LK, Rajagopal R, Liu Y, Kaartinen V, Mishina Y, Deng CX, Umans L, Zwijsen A, Roberts AB, Beebe DC. (2009). FGF-regulated BMP signaling is required for eyelid closure and to specify conjunctival epithelial cell fate. *Development.* May; 136(10):1741-50.

Jochum W, Passequé E, Wagner EF. (2001). AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene.* 20(19):2401-12.

Kassel O, Herrlich P. (2007) Crosstalk between the glucocorticoid receptor and other transcriptions factors: Molecular aspects. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 275: 13-29.

Kaufman MH, Bard JBL. (1999). The anatomical basis of mouse development. *San Diego, Academic Press.*

Khavari TA, Rinn J. (2007). Ras/Erk MAPK signaling in epidermal homeostasis and neoplasia. *Cell Cycle*. Dec 1; 6(23):2928-31.

Koch PJ, Roop DR. (2004). The role of keratins in epidermal development and homeostasis-going beyond the obvious. *J Invest Dermatol*. 123 (5): 973-981.

Kowalczyk P, Kowalczyk MC, Junco JJ, Tolstykh O, Kinjo T, Truong H, Walaszek Z, Hanausek M, Slaga TJ. (2012). The possible separation of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced skin inflammation and hyperplasia by compound A. *Mol Carcinog*. Feb 21.

Kumar R, Litwack G. (2009). Structural and functional relationships of the steroid hormone receptors' N-terminal transactivation domain. *Steroids*. 74: 877-883.

Kyriakis JM, Avruch J. (2012). Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. *Physiol Rev*. Apr; 92(2):689-737.

Lai JJ, Lai KP, Chuang KH, Chang P, Yu IC, Lin WJ, Chang C. (2009). Monocyte/macrophage androgen receptor suppresses cutaneous wound healing in mice by enhancing local TNF-alpha expression. *J Clin Invest*. Dec; 119(12):3739-51.

Lawrence T, Fong C. (2010). The resolution of inflammation: anti-inflammatory roles for NF-kappaB. *Int J Biochem Cell Biol*. Apr; 42(4):519-23.

Lee B, Vouthounis C, Stojadinovic O, Brem H, Im M, Tomic-Canic M. (2005). From an Enhanceosome to a Repressosome: Molecular Antagonism between Glucocorticoids and EGF Leads to inhibition of Wound Healing. *J Mol Biol.* 345: 1083-1097.

Leis H, Page A, Ramírez A, Bravo A, Segrelles C, Paramio J, Baretino D, Jorcano JL, Pérez P. (2004). Glucocorticoid Receptor counteracts tumorigenic activity of Akt in skin through interference with the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) signaling pathway. *Mol Endocrinol.* 18(2):303-311.

Lesovaya EA, Yemelyanov AY, Kirsanov KI, Yakubovskaya MG, Budunova IV. (2011). Antitumor effect of non-steroid glucocorticoid receptor ligand CpdA on leukemia cell lines CEM and K562. *Biochemistry (Mosc).* Nov; 76(11):1242-52.

Li W, Fan J, Chen M, Woodley DT. (2004). Mechanisms of human skin cell motility. *Histol Histopathol.* 19(4):1311-24.

Li G, Gustafson-Brown C, Hanks SK, Nason K, Arbeit JM, Pogliano K, Wisdom RM, Johnson RS. (2003). c-Jun is essential for organization of the epidermal leading edge. *Dev Cell.* 4(6):865-77.

Lieberman AC, Druker J, Perone MJ, Arzt E. (2007). Glucocorticoids in the regulation of transcription factors that control cytokine synthesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* Feb-Apr; 18(1-2):45-56.

Lösel R, Wehling M. Nongenomic actions of steroid hormones. (2003). *Nat Rev Mol Cell Biol.* Jan; 4(1):46-56.

Lu NZ, Cidlowski JA. (2006). Glucocorticoid receptor isoforms generate transcription specificity. *Trends Cell Biol.* Jun; 16(6):301-7.

Martin P, Parkhurst SM. (2004). Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis. *Development.* 131: 3021-3034.

McKay LI, Cidlowski JA. (2000). CBP (CREB binding protein) integrates NF-kappaB (nuclear factor-kappaB) and glucocorticoid receptor physical interactions and antagonism. *Mol Endocrinol.* Aug; 14(8):1222-34.

Mine N, Iwamoto R, Mekada E. (2005). HB-EGF promotes epithelial cell migration in eyelid development. *Development.* 132: 4317-4326.

Mormede P, Foury A, Barat P, Corcuff JB, Terenina E, Marissal-Arvy N, Moisan MP. (2011). Molecular genetics of hypothalamic–pituitary–adrenal axis activity and function. *Ann N Y Acad Sci.* Mar; 1220:127-36.

Müller AK, Meyer M, Werner S. (2012). The roles of receptor tyrosine kinases and their ligands in the wound repair process. *Semin Cell Dev Biol.* Dec; 23(9):963-70.

Newton R, Holden NS. (2007). Separating transrepression and transactivation: a distressing divorce for the glucocorticoid receptor? *Mol Pharmacol.* Oct; 72(4):799-809.

Nicolaides NC, Galata Z, Kino T, Chrousos GP, Charmandari E. (2010). The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function. *Steroids.* Jan; 75(1):1-12.

Nieman LK, Chanco Turner ML. (2006). Addison's disease. *Clin Dermatol.* 24(4):276-80.

Oakley RH, Cidlowski JA. (2011). Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. *J Biol Chem.* Feb 4; 286(5):3177-84.

Patel LM, Lambert PJ, Gagna CE, Maghari A, Lambert WC. (2011). Cutaneous signs of systemic disease. *Clin Dermatol.* Sep-Oct;29(5):511-22.

Pérez P, Page A, Bravo A, Del Río M, Giménez-Conti I, Budunova I, Slaga TJ, Jorcano, JL. (2001). Altered skin development and impaired proliferative and inflammatory responses in transgenic mice overexpressing the glucocorticoid receptor. *FASEB J.* 15: 2030-2032.

Pérez P. (2011). Glucocorticoid receptors, epidermal homeostasis and hair follicle differentiation. *Dermatoendocrinol.* Jul; 3(3):166-74.

Radoja N, Komine M, Jho SH, Blumenberg M, Tomic-Canic M. (2000). Novel mechanism of steroid action in skin through glucocorticoid receptor monomers. *Mol Cell Biol.* 20: 4328-4339.

Ramírez A, Bravo A, Jorcano J, Vidal M. (1994). Sequences 5' of the bovine keratin 5 gene direct tissue- and cell-type specific expression of a *lacZ* gene in the adult and during development. *Differentiation.* 58 (1): 53-64.

Ramot Y, Paus R, Tiede S, Zlotogorski A. (2009). Endocrine controls of keratin expression. *Bioessays.* Apr; 31(4):389-99.

Reichardt HM, Tuckermann JP, Göttlicher M, Vujic M, Weih F, Angel P, Herrlich P, Schütz G. (2001). Repression of inflammatory responses in the absence of DNA binding by the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 20(24):7168-73.

Reichardt HM, Kaestner KH, Tuckermann J, Kretz O, Wessely O, Bock R, Gass P, Schmid W, Herrlich P, Angel P, Schütz G. (1998). DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell.* 93: 531-541.

Reuter KC, Loitsch SM, Dignass AU, Steinhilber D, Stein J. (2012). Selective non-steroidal glucocorticoid receptor agonists attenuate inflammation but do not impair intestinal epithelial cell restitution *in vitro*. *PLoS One.* 7(1):e29756.

Rogatsky I, Wang JC, Derynck MK, Nonaka DF, Khodabakhsh DB, Hagg CM, Darimont BD, Garabedian MJ, Yamamoto KR. (2003). Target-specific utilization of transcriptional regulatory surfaces by the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100: 13845-13850.

Sainte Marie Y, Toulon A, Paus R, Maubec E, Cherfa A, Grossin M, Descamps V, Clemessy M, Gasc JM, Peuchmaur M, Glick A, Farman N, Jaisser F. (2007). Targeted skin overexpression of the mineralocorticoid receptor in mice causes epidermal atrophy, premature skin barrier formation, eye abnormalities, and alopecia. *Am J Pathol.* 171: 846-860.

Schäcke H, Döcke WD, Asadullah K. (2002). Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther.* Oct; 96(1):23-43.

Schäcke H, Rehwinkel H, Asadullah K, Cato AC. (2006). Insight into the molecular mechanisms of glucocorticoid receptor action promotes identification of novel ligands with an improved therapeutic index. *Exp Dermatol*. Aug; 15(8):565-73.

Schäcke H, Berger M, Rehwinkel H, Asadullah K. (2007). Selective glucocorticoid receptor agonists (SEGRAs): novel ligands with an improved therapeutic index. *Mol Cell Endocrinol*. Sep 15; 275(1-2):109-17.

Schoepe S, Schäcke H, Asadullah K. (2011). Test systems for the determination of glucocorticoid receptor ligand induced skin atrophy. *Dermatoendocrinol*. Jul; 3(3):175-9.

Sevilla LM, Bayo P, Latorre V, Sanchis A, Pérez P. (2010). Glucocorticoid receptor regulates overlapping and differential gene subsets in developing and adult skin. *Mol Endocrinology*. Nov; 24(11):2166-78.

Sevilla LM, Latorre V, Sanchis A, Pérez P. (2013). Epidermal inactivation of the glucocorticoid receptor triggers skin barrier defects and cutaneous inflammation. *J Invest Dermatol*. Feb;133(2):361-70.

Sibilia M, Wagner EF. (1995). Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor. *Science*. Jul 14;269(5221):234-8.

Sibilia M, Kroismayr R, Lichtenberger BM, Natarajan A, Hecking M, Holcman M. (2007). The epidermal growth factor receptor: from development to tumorigenesis. *Differentiation*. 75: 770-787.

Silverman MN, Sternberg EM. (2012). Glucocorticoid regulation of inflammation and its functional correlates: from HPA axis to glucocorticoid receptor dysfunction. *Ann N Y Acad Sci.* Jul; 1261:55-63.

Slominski A, Wortsman J, Tuckey RC, Paus R. (2007). Differential expression of HPA axis homolog in the skin. *Mol Cell Endocrinol.* 265-266:143-9.

Slominski AT, Zmijewski MA, Skobowiat C, Zbytek B, Slominski RM, Steketee JD. (2012). Sensing the environment: regulation of local and global homeostasis by the skin's neuroendocrine system. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 212: v, vii, 1-115.

Smoak KA, Cidlowski, JA. (2004). Mechanisms of glucocorticoid receptor signalling during inflammation. *Mech Ageing Dev.* 125(10-11):697-706.

Smoak KA, Cidlowski JA. (2006). Glucocorticoids regulate tristetraprolin synthesis and posttranscriptionally regulate tumor necrosis factor alpha inflammatory signaling. *Mol Cell Biol.* Dec; 26(23):9126-35.

Stavreva DA, Müller WG, Hager GL, Smith CL, McNally JG. (2004). Rapid glucocorticoid receptor exchange at a promoter is coupled to transcription and regulated by chaperones and proteasomes. *Mol Cell Biol.* Apr; 24(7):2682-97.

Stojadinovic O, Brem H, Vouthounis C, Lee B, Fallon J, Stallcup M, Merchant A, Galiano RD, Tomic-Canic M. (2005). Molecular Pathogenesis of Chronic Wounds. The Role of β -catenin and c-myc in the Inhibition of Epithelialization and Wound Healing. *Am J Pathol.* 167: 59-69.

Stojadinovic O, Lee B, Vouthounis C, Vukelic S, Pastar I, Blumenberg M, Brem H, Tomic-Canic M. (2007). Novel genomic effects of glucocorticoids in epidermal keratinocytes: inhibition of apoptosis, interferon-g pathway, and wound healing along with promotion of terminal differentiation. *J Biol Chem.* 282:4021–4034.

Surjit M, Ganti KP, Mukherji A, Ye T, Hua G, Metzger D, Li M, Chambon P. (2011). Widespread negative response elements mediate direct repression by agonist-liganded glucocorticoid receptor. *Cell.* Apr 15;145(2):224-41.

Tronche F, Kellendonk C, Kretz O, Gass P, Anlag K, Orban PC, Bock R, Klein R, Schütz G. (1999). Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat Genet.* Sep;23(1):99-103.

Tuckermann JP, Reichardt HM, Arribas R, Richter KH, Schütz G, Angel P. (1999). The DNA-binding-independent function of the glucocorticoid receptor mediates repression of AP-1-dependent genes in skin. *J Cell Biol.* 147:1365–1370.

Tuckermann JP, Kleiman A, Moriggl R, Spanbroek R, Neumann A, Illing A, Clausen BE, Stride B, Förster I, Habenicht AJ, Reichardt HM, Tronche F, Schmid W, Schütz G. (2007). Macrophages and neutrophils are the targets for immune suppression by glucocorticoids in contact allergy. *J Clin Invest.* 117(5):1381-90.

Turchi L, Chassot AA, Rezzonico R, Yeow K, Loubat A, Ferrua B, Lenegrata G, Ortonne JP, Ponzio G. (2002). Dynamic characterization of the molecular events during in vitro epidermal wound healing. *J Invest Dermatol.* Jul; 119(1):56-63.

Vallabhapurapu S, Karin M. (2009). Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 27:693-733.

Vandevyver S, Dejager L, Tuckermann J, Libert C. (2013). New insights into the anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids: an emerging role for glucocorticoid-receptor-mediated transactivation. *Endocrinology.* Mar; 154(3):993-1007.

Vukelic S, Stojadinovic O, Pastar I, Rabach M, Krzyzanowska A, Lebrun E, Davis SC, Resnik S, Brem H, Tomic-Canic M. (2011). Cortisol synthesis in epidermis is induced by IL-1 and tissue injury. *J Biol Chem.* Mar 25;286(12):10265-75.

Wagner EF, Nebreda AR. (2009). Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer.* Aug;9(8):537-49.

Walker JJ, Spiga F, Waite E, Zhao Z, Kershaw Y, Terry JR, Lightman SL. (2012). The Origin of Glucocorticoid Hormone Oscillations. *PLoS Biol.* June; 10(6): e1001341.

Webster JC, Oakley RH, Jewell CM, Cidlowski JA. (2001). Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative beta isoform: a mechanism for the generation of glucocorticoid resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 98: 6865-70.

Werner S, Grose R. (2003). Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev.* Jul;83(3):835-70.

Weston CR, Wong A, Hall JP, Goad ME, Flavell RA, Davis RJ. (2004). The c-Jun NH2-terminal kinase is essential for epidermal growth factor expression during epidermal morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(39):14114-9

Wullaert A, Bonnet MC, Pasparakis M. (2011). NF- κ B in the regulation of epithelial homeostasis and inflammation. *Cell Res.* Jan;21(1):146-58.

Xia Y, Karin M. (2004). The control of cell motility and epithelial morphogenesis by Jun kinases. *Trends Cell Biol.* 14: 94-101.

Yang SH, Sharrocks AD, Whitmarsh AJ. (2013). MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation. *Gene.* 2013 Jan 15;513(1):1-13.

Zenz R, Wagner EF. (2006). Jun signalling in the epidermis: From developmental defects to psoriasis and skin tumors. *Int J Biochem Cell Biol.* 38(7):1043-9

Zenz R, Eferl R, Kenner L, Florin L, Hummerich L, Mehic D, Scheuch H, Angel P, Tschachler E, Wagner EF. (2005). Psoriasis-like skin disease and arthritis caused by inducible epidermal deletion of Jun proteins. *Nature.* Sep 15;437(7057):369-75.

Zenz R, Scheuch H, Martin P, Frank C, Eferl R, Kenner L, Sibilía M, Wagner EF. (2003). c-Jun Regulates Eyelid Closure and Skin Tumor Development through EGFR Signaling. *Dev Cell.* 4: 879-889.

Zhang H, Hara M, Seki K, Fukuda K, Nishida T. (2005). Eyelid Fusion and Epithelial Differentiation at the Ocular Surface During Mouse Embryonic Development. *Jpn J Ophthalmol.* 49: 195-204.

