

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN

1. Los glucocorticoides (GCs)	3
1.1 Producción adrenal de los GCs	3
1.2 Producción extra-adrenal de los GCs	4
1.3 Regulación de la biodisponibilidad de los GCs.	6
1.4 Los GCs como agentes terapéuticos	8
2. Los receptores de GCs	8
2.1 El receptor de glucocorticoides (GR)	9
2.2 El receptor de mineralocorticoides (MR)	10
2.3 Estructura modular de GR y MR	11
2.4 Mecanismos de regulación de la expresión génica	13
2.5 Acciones no genómicas de GR y MR	17
2.6 Formación de homodímeros y heterodímeros GR/MR	20
3. La piel: estructura, función, y patologías	21
3.1 El papel de los GCs en la fisiopatología de la piel	23
3.1.1 Los GCs en el desarrollo de la piel	23
3.1.2 Los GCs en el envejecimiento cutáneo cronológico	26
3.1.3 Efectos adversos del uso farmacológico de los GCs en la piel	28
3.2 Patologías inflamatorias	29
3.2.1 La psoriasis	30
3.2.1.1 Modelos murinos para el estudio de la psoriasis	33
3.2.1.2 Los tratamientos para la psoriasis	35
3.2.2 La dermatitis atópica (AD)	35

4. Modelos animales para el estudio funcional de GR y MR en piel	37
4.1. Ratones con sobreexpresión de GR o MR específica de epidermis: K5-GR y K5-MR	37
4.2 Ratones con inactivación de GR específica de epidermis (GR epidermal knock-out, GR ^{EKO})	39
4.3 Ratones con inactivación de MR específica de epidermis (MR epidermal knock-out, MR ^{EKO})	40
OBJETIVOS	45
MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Experimentación animal	49
1.1 Generación de las colonias de ratones transgénicos	49
1.2 Identificación de los ratones transgénicos	51
1.2.1 Obtención del ADN genómico	51
1.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa	52
1.3 Tratamientos tópicos	54
1.4 Recogida de muestras	55
1.4.1 Separación de epidermis, dermis y tejido adiposo	56
1.5. Medición de los niveles de corticosterona endógenos a partir de explantes de piel.	56
2. Análisis histológico y técnicas de inmunodetección	57
2.1 Procesamiento de las muestras	57
2.2 Desparafinación e hidratación/deshidratación de las muestras	57
2.3 Tinción con Hematoxilina-Eosina (H&E)	58
2.4 Tinción con tricrómico de Masson	58
2.5 Tinción azul de toluidina	59
2.6 Análisis inmunohistoquímico	59

2.7 Inmunohistoquímica anti-BrdU	61
2.8 Inmunofluorescencia	61
2.9 Análisis morfométrico	62
3. Generación y caracterización de las líneas de queratinocitos inmortalizados	63
3.1 Generación y mantenimiento de la línea de queratinocitos DKO	63
3.2 Citometría de flujo	66
3.3 Ensayo de proliferación	66
3.4 Tratamientos de los queratinocitos en cultivo	66
3.5 Plásmidos, transfecciones y ensayos luciferasa	67
3.6 Inmunofluorescencia de células en cultivo	68
3.7 <i>Proximity ligation assay</i> (PLA)	69
4. Cultivo de fibroblastos 3T3-L1, ensayo de diferenciación y tinción Oil Red O	71
5. Expresión e inmunodetección de proteínas	72
5.1 Extracción de proteínas a partir de tejido	72
5.2 Extracción de proteínas a partir de células	72
5.3 <i>Western Blot</i> (WB)	73
5.3.1 Electroforesis SDS-PAGE y transferencia a membrana	73
5.3.2 Bloqueo, incubación con los anticuerpos y revelado	74
5.3.3 Cuantificación y normalización de la expresión	75
5.3.4 Reutilización de la membrana	76
6. Análisis de expresión génica	76
6.1 Procesamiento de las muestras y extracción de ARN	76

6.2 Síntesis de ADN complementario (cADN)	77
6.3 PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)	77
6.4 Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)	79
7. Análisis estadístico	81
 RESULTADOS	
1. Generación y caracterización de ratones con inactivación combinada de GR y MR específica de la epidermis (GR/MR epidermal knock-out o Double Knock-Out/DKO)	85
1.1. Generación de ratones <i>GR/MR epidermal knock-out</i> o <i>Double Knock-Out/DKO</i>	85
1.2. Análisis histopatológico y molecular de los ratones DKO durante el desarrollo. Estudio comparativo de ratones DKO, GR ^{EKO} y MR ^{EKO}	85
1.3. Caracterización fenotípica de los ratones DKO en la edad adulta	90
2. Estudio de susceptibilidad a inflamación cutánea de ratones adultos DKO.	92
2.1 Respuesta de los ratones DKO a un tratamiento tópico con PMA. Estudio comparativo de ratones DKO, GR ^{EKO} y MR ^{EKO}	92
2.2 Análisis de los efectos terapéuticos de los GCs en ratones DKO tratados tópicamente con PMA	96
2.3 Susceptibilidad de los ratones DKO a un protocolo de psoriasis inducida por imiquimod (IMQ). Análisis comparativo con los KO individuales	98
3. Generación y caracterización de queratinocitos inmortalizados con inactivación combinada de GR y MR (DKO).	103
3.1. Generación de queratinocitos inmortalizados DKO	103
3.2 Análisis de las vías de señalización MAPK/MKP en las líneas de queratinocitos inmortalizados	106

3.3 Estudio de las rutas pro-inflamatorias NF- κ B y AP-1 en las líneas celulares de queratinocitos inmortalizados	110
3.4. Generación y caracterización de las líneas de queratinocitos inmortalizados DKO con reinserción de GR, MR o ambos	112
3.4.1. Evaluación de la respuesta transcripcional a GCs en queratinocitos DKO con reinserción de GR y MR	113
4. Análisis de la contribución relativa de GR y MR al envejecimiento cronológico cutáneo	116
4.1 Estudio histopatológico del envejecimiento cronológico en ratones MR ^{EKO}	117
4.2 Evaluación de las posibles alteraciones en la señalización por GCs en los ratones MR ^{EKO} de 13 meses de edad	119
4.2.1 Análisis de los niveles endógenos de corticosterona en explantes de piel de ratón CO y MR ^{EKO} de 2 y 13 meses de edad	119
4.2.2 Estudio de las alteraciones en la expresión y/o función de GR/MR en los distintos compartimentos de la piel de ratones CO y MR ^{EKO} de 13 meses de edad	120
4.3 Estudio del estatus inflamatorio en piel de ratones CO y MR ^{EKO} de 13 meses de edad	123
4.4 Alteraciones en la matriz extracelular en ratones MR ^{EKO} de 13 meses	126
4.5 Análisis del dWAT en los ratones MR ^{EKO} de 13 meses	130
4.5.1 Estudio histológico y molecular de los adipocitos	130
4.5.2. Análisis del proceso de adipogénesis en los ratones MR ^{EKO} de 13 meses	134
DISCUSIÓN	139
1. Contribución relativa de GR y MR durante el desarrollo	140
2. Contribución de GR y MR a la inflamación cutánea (edad adulta)	141

2.1 Susceptibilidad a patologías inflamatorias cutáneas	141
2.2 Acciones conjuntas de GR y MR: posibles implicaciones en los tratamientos con GCs	144
2.3 Especificidad y selectividad de los dímeros GR/MR en la respuesta a GCs en queratinocitos	145
3. El papel de los GCs en el envejecimiento cutáneo cronológico	146
3.1 La ausencia de MR epidérmico altera la homeostasis de la piel en el envejecimiento cronológico	147
3.2 Las alteraciones en la vía de señalización por GCs en ratones MR ^{EKO} de 13 meses repercuten en el dWAT	149
CONCLUSIONES	155
BIBLIOGRAFÍA	159
ANEXO	183