



VNIVERSITAT [ò✦]
DE VALÈNCIA
Facultat de Farmàcia

Departamento de Farmacología

Doctorado en Biomedicina y Farmacia

Efecto protector del receptor de adenosina
 A_{2B} en un modelo experimental de hiperplasia
epidérmica

Tesis Doctoral presentada por:

M^a Asunción Marín Castejón

Directoras de la Tesis Doctoral

Dra. M^a Carmen Montesinos Mezquita

Dra. M^a Carmen Terencio Silvestre

Valencia, Diciembre de 2020



VNIVERSITAT E VALÈNCIA

Facultad de Farmacia - Departamento de Farmacología

Doctorado en Biomedicina y Farmacia

M^a Carmen Montesinos Mezquita, Profesora Titular de la Universidad de Valencia y **M^a Carmen Terencio Silvestre**, Catedrática de la Universidad de Valencia.

CERTIFICAN:

Que el trabajo presentado por la licenciada **M^a Asunción Marín Castejón**, titulado “**Efecto protector del receptor de adenosina A_{2B} en un modelo experimental de hiperplasia epidérmica**”, para obtener el grado de Doctora, ha sido realizado bajo nuestra dirección y asesoramiento.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizamos la presentación de la Tesis para que sea juzgado por el tribunal correspondiente.

Lo que firmamos en Valencia, Diciembre de 2020

M^a Carmen Montesinos Mezquita

M^a Carmen Terencio Silvestre

Agradecimientos

Pensé que nunca llegaría el día en que escribiera los agradecimientos de mi Tesis Doctoral. Ha sido un proceso arduo y como todas las cosas que merecen la pena, ha tenido sus luces y sus sombras. En primer lugar, me gustaría agradecer a todos los profesores que dentro del Departamento de Farmacología han participado en mi día a día y han avivado esa curiosidad y ganas de aprender necesarias para avanzar. Gracias también a Carlos y Mamen, por hacer todo más fácil. Mención especial e inevitable a mis dos tutoras, gracias por creer en mi y por haberme empujado siempre hacia delante. A Montesinos por tu entusiasmo arrollador y por todos tus consejos, pero sobre todo porque siempre son palabras de aliento. Y Terens, has sido fundamental a nivel científico pero también personal, no terminaría de darte las gracias. A Laura Catalán, por tu infinita paciencia y por todos los momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio. A Josep, M^o José, Carmen, Laura, Miguel, Álvaro, Cris, Fran...y seguro que me dejo a algún compañero de laboratorio, a todos los que me habéis enseñado el mundo de la investigación. A mis chicos de actividades extraescolares, a Laura Vila por esos cafés que me daban la vida, a Silvia por ser mi compañera infatigable, Lola, Patrice, Toni, Carlos...gracias por todos los momentos de felicidad.

A mi familia, porque han hecho esto posible. Gracias por vuestra comprensión y por hacer, incluso lo imposible, para que sea feliz. A mis padres, que siempre me han brindado apoyo de manera incondicional y tienen la red preparada por si acaso. A mi hermano, siempre estás sea

cual sea el problema. A todos mis amigos, pero sobre todo a Merche, por hacerlo todo más bonito.

Han sido tres años, 1095 días de constante aprendizaje y sólo tengo palabras de gratitud a todos los que habéis estado presentes en esta etapa. A los que fueron y son, todos habéis sumado.

Índice

Resumen.....XIII

Abreviaturas.....XVII

Introducción

1. La piel..... 1

1.1 Estructura anatómica 1

1.2 Proceso de cornificación..... 4

1.2.1 Proteínas que intervienen en la cornificación 4

1.2.2 Factores implicados en el proceso de cornificación 8

2. Psoriasis..... 12

2.1. Características histopatológicas..... 13

2.2 Fenotipos de la enfermedad 13

2.3 Etiología de psoriasis..... 15

2.3.1 Factores genéticos..... 15

2.3.2. Factores extrínsecos..... 16

2.4 Inmunopatogénesis..... 19

2.4.1 Tipos celulares implicados 19

2.4.2 Citocinas inflamatorias..... 25

2.4.3 Péptidos antimicrobianos (PAM) 27

2.5 Vías de señalización implicadas en psoriasis..... 28

2.6 Inicio de la enfermedad 29

2.7 Farmacoterapia..... 31

2.7.1 Tratamiento tópico..... 31

2.7.2 Agentes sistémicos no biológicos..... 31

2.7.3 Agentes sistémicos biológicos.....	32
2.7.4 Nuevas perspectivas terapéuticas	34
3. Adenosina.....	35
3.1 Metabolismo de adenosina	35
3.2 Receptores de adenosina.....	35
3.3 Adenosina en psoriasis	37
Objetivos.....	42
 Material es y métodos	
1. Modelo de hiperplasia epidérmica en piel de ratón inducida por TPA.....	43
1.1 Moléculas en estudio y reactivos	43
1.2 Animales de experimentación	44
1.3 Protocolo experimental.....	44
1.4 Homogenización de las biopsias.....	46
2. Procedimiento histológico	47
2.1 Procesamiento de las muestras	47
2.2 Tinción con hematoxilina y eosina (H&E)	48
2.3 Tinción de colágeno.....	48
2.4 Inmunohistoquímica	49
2.5. Inmunofluorescencia.....	52
2.6 Evaluación de las alteraciones histológicas.....	52
3. Determinación de parámetros inflamatorios.....	53

3.1 Determinación de la actividad mieloperoxidasa	53
3.2 Determinación de citocinas por ELISA	54
3.3 Análisis por Western Blot	55
4. Análisis estadístico y expresión de los resultados	61

Resultados

1. Prueba de concepto: estudio preliminar del efecto del agonista A_{2B}AR BAY60-6583 en el modelo de hiperplasia epidérmica en ratón	62
1.1 Efecto sobre la lesión cutánea y el edema	62
1.2 Estudio histopatológico	63
1.3 Estudio del efecto de BAY sobre la síntesis de colágeno.....	65
1.4 Determinación de mediadores relacionados con la infiltración leucocitaria.....	67
2. Estudio del agonismo/antagonismo A_{2B}AR en el modelo de hiperplasia epidérmica en ratón.....	70
2.1. Evaluación del desarrollo de las lesiones cutáneas	71
2.2. Evaluación del edema.....	74
2.3. Estudio histopatológico mediante tinción H&E.....	75
2.4. Estudio inmunohistoquímico de la hiperproliferación epidérmica	77
2.5. Determinación de parámetros relacionados con el efecto antiinflamatorio	82
2.5.1. Determinación de parámetros relacionados con la infiltración celular: MPO y CXCL-1.....	82

2.5.2. Determinación de otras citocinas pro-inflamatorias	83
3. Efecto sobre proteínas de función barrera y cornificación... 86	
3.1. Determinación por inmunohistoquímica de CK10	86
3.2. Estudio de la expresión de involucrina	88
3.3. Estudio de la expresión de loricrina.....	91
3.4 Estudio de la expresión de filagrina.....	95
3.5 Estudio por Western-Blot de la correlación filagrina/caspasa- 14.....	98
 Discusión	
 Parte I: La activación del receptor A_{2B} reduce la hiperplasia epidérmica y la respuesta inflamatoria en la piel	102
 Parte II: La activación del receptor A_{2B} mantiene la integridad de la barrera epidérmica.....	106
 Referencias bibliográficas.....	112
 Anexo	124

Resumen

Resumen

La psoriasis es una patología que afecta aproximadamente al 3% de la población mundial. Su principal manifestación es la aparición de lesiones descamativas en la piel que generalmente están perfectamente delimitadas y cursan con prurito y dolor. Puede llegar a ser inhabilitante y la presencia de lesiones en zonas visibles conlleva una carga psicológica para el paciente. En base a sus mecanismos patológicos la psoriasis es una enfermedad inflamatoria, mediada por el sistema inmunitario, que cursa con una proliferación aberrante y descontrolada de los queratinocitos. Las alternativas terapéuticas no producen la remisión completa, además de que la vía de administración supone una gran limitación como en el caso de fármacos biológicos.

La adenosina regula múltiples procesos fisiológicos mediante la activación de cuatro subtipos de receptores. El receptor de adenosina A_{2B} ($A_{2B}AR$) es el que presenta menor afinidad por adenosina, aunque en determinados tipos celulares es el mayoritariamente expresado. Recientemente, se ha demostrado que el agonista $A_{2B}AR$ BAY60-6583 (BAY), presenta efecto antiproliferativo y antiinflamatorio en queratinocitos humanos estimulados con 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), por lo que el objetivo principal de esta Tesis Doctoral ha sido estudiar el efecto de la aplicación tópica de BAY en un modelo de hiperplasia epidérmica en piel de ratón inducida por TPA, la cual reproduce algunas características de la psoriasis humana.

Tras una prueba preliminar en la que se administró BAY a la dosis de $10\mu\text{g}/\text{área}$, se confirmó la ausencia de reacciones adversas, y su efecto beneficioso sobre las lesiones desarrolladas, la reacción inflamatoria y las alteraciones tisulares, minimizando la hiperproliferación, la acantosis y la aparición de invaginaciones epidérmicas. En una segunda fase, se realizó el estudio dosis-respuesta empleando BAY a las dosis de 1 y $10\mu\text{g}/\text{área}$ en presencia o ausencia del antagonista selectivo de $A_{2B}AR$, PSB-1115

(PSB), a las dosis de 5 y 50 $\mu\text{g}/\text{área}$. La aplicación de BAY a ambas dosis redujo nuevamente todos los parámetros determinados en la primera fase del estudio, así como la expresión de marcadores específicos de queratinocitos proliferativos. En cambio, el tratamiento previo con PSB, revertía en mayor o menor grado estos efectos beneficiosos de la activación A_{2B} .

Por último, se demostró que el tratamiento con BAY normalizaba la expresión de proteínas relacionadas con la función de la barrera epidérmica, cuya integridad está alterada en patologías de la piel, mientras que el tratamiento únicamente con el antagonista PSB, empeoraba el proceso.

Se puede concluir que la administración de BAY en este modelo presentó un perfil antiinflamatorio, antiproliferativo y protector de la barrera epidérmica. Por lo tanto, la activación del A_{2B} AR en la piel puede constituir una posible nueva diana farmacológica para el tratamiento de patologías como psoriasis.

Abreviaturas

Abreviaturas

Con el fin de mantener una mayor coherencia con el lenguaje científico ampliamente divulgado, se ha mantenido el idioma inglés en la mayoría de las abreviaturas empleadas.

AC	Adenilil ciclasa
ADA	Adenosín deaminasa
ADP	Adenosín bifosfato
AK	<i>Adenosin kinase</i>
AMP	Adenosín monofosfato
AMPC	Adenosín monofosfato cíclico
APC	Células presentadoras de antígenos
AP-1	Proteína activadora-1
AR	Receptor de adenosina
ATP	Adenosín trifosfato
CARD14	<i>Caspase recruitment domain-containing protein 14</i>
CCL20	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 20</i>
CK	Citoqueratina
COX	Ciclooxigenasa

CXCL	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand</i>
DAB	3,3'-diaminobencidina
DAG	Diacilglicerol
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DC	Célula dendrítica
DNA	Deoxyribonucleic acid
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
EFG	Factor de crecimiento epidérmico
ENT	<i>Equilibrative nucleoside transporter</i>
FDA	<i>Food And Drug Administration</i>
GWAS	<i>Genome-wide association study</i>
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
ILC	Célula linfoide innata
imDC	Célula dendrítica mioide inflamatoria
IP ₃	Inositol-trifosfato
IPP ₂	Inositol-bifosfato

JAK	<i>Janus cinasa</i>
KHG	Gránulo de queratohialina
KLK	Calicreína
LC	Célula de Langerhans
LL37	Catelicidina
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
mDC	Célula dendrítica mieloide
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
miRNA	<i>Micro-ribonucleid acid</i>
MPO	Mieloperoxidasa
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
NET	Trampa neutrofílica extracelular
NF-κB	Factor de transcripción nuclear κB
NMF	<i>Natural Moisturizing Factor</i>
PAM	Péptido antimicrobiano
PCA	Ácido carboxílico pirrolidina
pDC	Célula dendrítica plasmocitoide
PGE ₂	Prostaglandina E ₂

PIP ₂	Fosfatidil inositol bifosfato
PK	Proteín cinasa
PLC	Fosfolipasa C
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SB	Estrato basal
SC	Estrato córneo
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TGF	Factor de crecimiento transformante
TGM	Transglutaminasa
Th	Linfocitos T <i>helper</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TMB	3,3',5,5'-tetrametil-benzidina
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNFR	Receptor de TNF- α
TPA	12-O-Tetradecanoilforbol-13-acetato
Treg	Células T reguladoras
UCA	Ácido urocánico

UV Ultravioleta

VFGE Factor de crecimiento del endotelio vascular

Introducción

1. La piel:

1.1 Estructura anatómica:

La piel representa el mayor órgano en cuanto a extensión y peso del cuerpo humano. Sus principales funciones son protegernos frente a agentes externos nocivos, actuar como barrera frente a la entrada de organismos patógenos y evitar la pérdida de agua de nuestro organismo. A su vez, presenta una compleja regulación donde intervienen múltiples proteínas y tipos celulares que se puede ver afectada por factores intrínsecos como la edad y hormonas, o extrínsecos, principalmente la radiación ultravioleta (UV), aunque también afectan la dieta, el consumo de alcohol y el tabaco, entre otros (Tobin, 2017).

La piel está constituida por tres capas, que dependiendo de la zona presentan diferente grosor, siendo la **epidermis** la más externa y que se divide a su vez en cinco estratos (Figura 1):

Estrato córneo: es la capa más externa de la epidermis y presenta entre 15-20 capas de corneocitos, tipo celular que resulta del proceso terminal de diferenciación de los queratinocitos al quedar desprovistos de núcleo y orgánulos citoplasmáticos (Niehues et al., 2018).

Estrato lúcido: capa de transición entre el estrato córneo y granuloso en la que los queratinocitos en vez de queratina presentan eleidina, una proteína intracelular que confiere a esta capa un aspecto transparente (Nguyen y Soulika, 2019).

Estrato granuloso: se caracteriza por la presencia de gránulos de queratohialina (KHG) que contienen lorricrina, filagrina y proteínas ricas en prolina. Durante el proceso de cornificación estas proteínas promueven el agregamiento de las fibrillas de colágeno y como consecuencia, la formación de la envuelta cornificada (Bosko, 2019). En este estrato también

destaca la presencia de los cuerpos lamelares (Losquadro, 2017) que sintetizan y almacenan lípidos como ceramidas, ácidos grasos y colesterol que son componentes fundamentales del estrato córneo (Bosko, 2019).

Estrato espinoso: capa donde los queratinocitos se unen mediante desmosomas y en la que se sintetizan marcadores de diferenciación temprana como la citoqueratina-1 (CK1), CK10 e involucrina (Tu et al., 2004).

En el *estrato basal o germinativo* se encuentran las células madre en constante mitosis para dar lugar a los queratinocitos que migran hacia capas más superficiales (Bosko, 2019). En esta capa están presentes los melanocitos y células del sistema inmune como las células dendríticas (DC) y células T (Nguyen y Soulika, 2019).

Epidermis

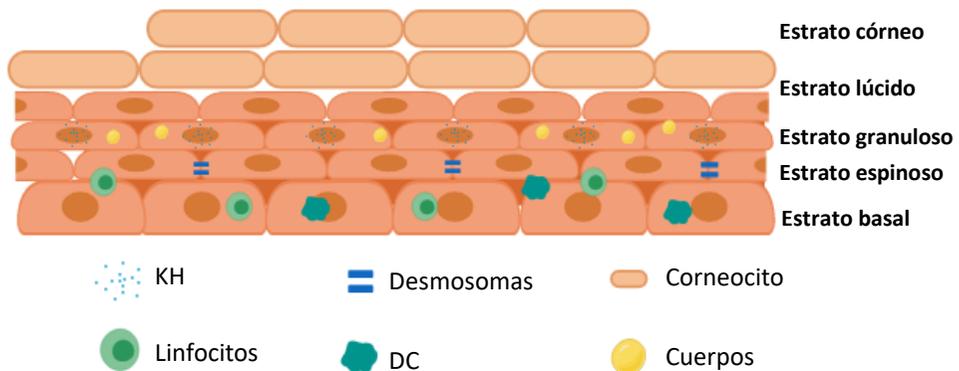


Figura 1. Estructura de la epidermis subdividida en los cinco estratos que la constituyen. Aparecen representadas alguna de las características y tipos celulares de cada uno de los estratos. DC: células dendríticas. KHG: gránulos de queratohialina.

El tipo celular epidérmico predominante es el **queratinocito** pero en la epidermis también existen otras células residentes:

Melanocitos: se encuentran principalmente en la capa basal ya que su función es la síntesis de melanina, pigmento que evita el daño nuclear de los queratinocitos adyacentes (Losquadro, 2017).

Células de Langerhans están presentes en el estrato espinoso, granular y en la dermis principalmente. Desempeñan funciones inmunitarias como células especializadas de la piel presentadoras de antígenos (APC), que migran a los nódulos linfáticos locales para inducir tolerancia inmunogénica o para iniciar la respuesta inmunitaria adaptativa (Nguyen y Soulika, 2019; Losquadro, 2017).

Células de Merkel: tipo celular minoritario presente en la capa basal donde están en contacto con las células nerviosas con las que forman una estructura especializada llamadas discos táctiles (Losquadro, 2017).

Dermis: capa subyacente a la epidermis formada por tejido conectivo pero que también contiene apéndices de glándulas sudoríparas y pilosebáceas (Tobin, 2017). Se divide a su vez en dos regiones, estando ambas constituidas principalmente por fibroblastos y células inmunes residentes como macrófagos y linfocitos. La principal diferencia entre las dos regiones es estructural, ya que la disposición de las fibrillas que las constituyen así como la densidad varía de un estrato a otro (Wong et al., 2016). La capa superficial recibe el nombre de dermis papilar que presenta extensiones que se comunican con la epidermis por capilares y facilitan el transporte de nutrientes (Nguyen y Soulika, 2019). Esta capa está constituida por fibras de colágeno pequeñas entrecruzadas con fibras de elastina mientras que en la región reticular de la dermis las fibras de colágeno son de mayor tamaño. El tipo de colágeno que se encuentra de forma más abundante es el tipo I (entre el 80-90%) mientras que el

colágeno tipo III representa el resto de colágeno presente (Wong et al., 2016).

Por debajo de la dermis se encuentra la **hipodermis** cuya composición es rica en proteoglicanos y glucosaminoglicanos (Nguyen y Soulika, 2019). Está constituida principalmente por fibroblastos y adipocitos. Esta capa es importante para el mantenimiento de la temperatura corporal, actuando como aislante ya que los lípidos que la constituyen no conducen el calor.

1.2 Proceso de cornificación:

El proceso de cornificación hace referencia a todos los cambios morfológicos y funcionales que experimentan los queratinocitos desde el estrato basal hasta el córneo, donde la descamación de los mismos asegura un mantenimiento adecuado del recambio epidérmico (Bosko, 2019). El ciclo normal de vida celular de los queratinocitos tiene una duración de 28 días aproximadamente (Le Bitoux y Haftek, 2008), pero en algunas situaciones la proliferación celular está aumentada y se produce una maduración defectuosa de los queratinocitos. En la regulación de este proceso intervienen numerosas proteínas y enzimas que ejercen un estrecho control sobre la proliferación y diferenciación de queratinocitos, o cornificación.

1.2.1 Proteínas que intervienen en la cornificación

La alteración en el patrón de expresión de **filagrina** se relaciona con la síntesis de una barrera epidérmica defectuosa ya que tanto en psoriasis como en dermatitis atópica se produce una disminución de la expresión de los genes de la familia filagrina (Kezic y Jakasa, 2016; Quaranta et al., 2014). Ésta es una proteína de diferenciación terminal, necesaria para que se produzca el entrecruzamiento de proteínas que forman la envuelta cornificada (Sandilands et al., 2009). Su precursor es profilagrina, un polipéptido insoluble rico en histidina con un peso molecular aproximado de

500 kDa y que se encuentra principalmente asociado a los KHG en el estrato granuloso (McGrath y Uitto, 2008). La principal función de filagrina es unirse específicamente a los filamentos de queratina presentes en el citoesqueleto de queratinocitos, favoreciendo que se agreguen en microfibrillas, lo que produce la compactación celular y marca el inicio de la transición a corneocitos (Sandilands et al., 2009).

La presencia de filagrina está regulada por diversos factores, como el aumento de Ca^{2+} . Conforme los queratinocitos avanzan hacia la capa más externa, los KHG liberan profilagrina, que es desfosforilada en la transición entre el estrato granuloso y el estrato córneo, y posteriormente degradada en fragmentos de filagrina libre, que se une a los filamentos intermedios de queratina produciendo su agregación y compactación.

Ya en el estrato córneo, los monómeros de filagrina son degradados dando lugar a factores naturales de hidratación (NMF) necesarios para la correcta hidratación de la piel y la filtración de la radiación UV. Los principales NMF obtenidos por el catabolismo de filagrina son el ácido urocánico (UCA), rico en histidina y el ácido carboxílico pirrolidina (PCA) constituido principalmente por glutamina (Hoste et al., 2011). Ambos contribuyen a la acidificación de la piel, entre otras funciones. La conservación de un pH adecuado en la piel es relevante ya que evita la proliferación de patógenos y además regula la actividad de algunas enzimas que intervienen en el proceso de cornificación (Lee, 2020).

Existen varias enzimas que intervienen en la maduración de filagrina como calpaína-1, bleomicina hidrolasa y caspasa-14. Caspasa-14 es responsable de la proteólisis del fragmento N-terminal de la profilagrina (Hoste et al., 2011) y por eso es indispensable en la maduración de la epidermis y la formación del estrato córneo. Paralelamente, caspasa-14 también participa en la degradación de filagrina para formar los NMF. Esta enzima no actuaría directamente en la conversión de histidina en UCA o glutamina en PCA, ya que el aminoácido que disminuye drásticamente en

ausencia de caspasa-14 es glicina, que constituye el 15% de filagrina (Hoste et al., 2011). En la Figura 2 se esquematiza el proceso de formación de filagrina y su posterior catabolismo hasta constituir los NMF.

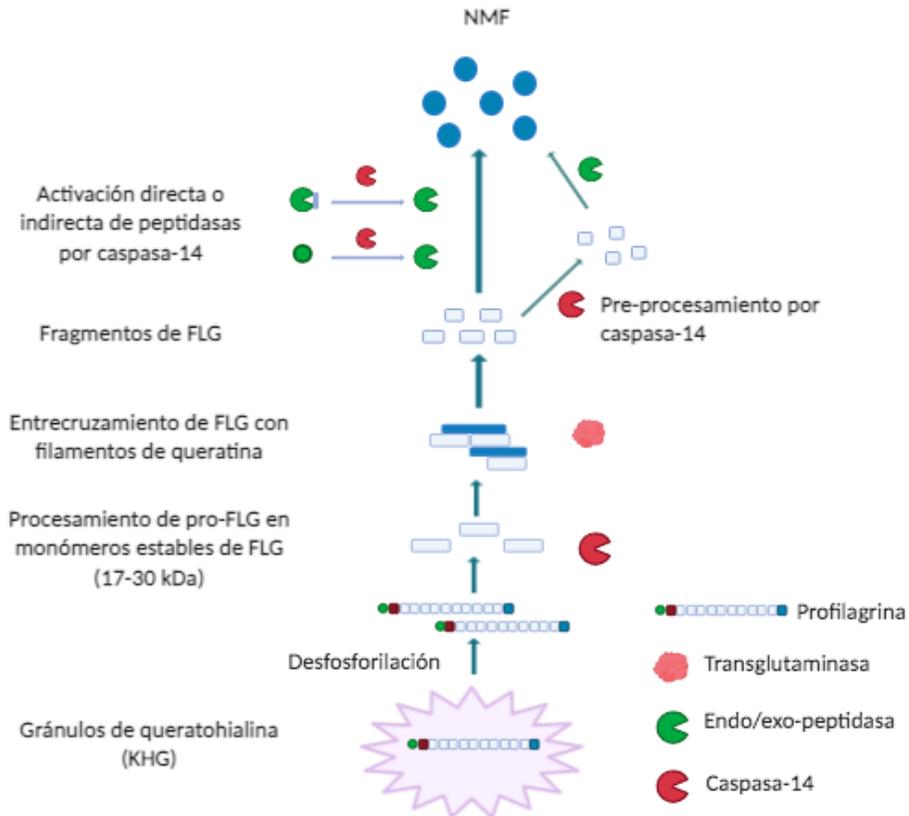


Figura 2. Esquema del catabolismo de filagrina (FLG) desde su precursor profilagrina (pro-FLG) hasta la formación de los NMF. En respuesta a ciertos estímulos, la pro-FLG que se encuentra en los KHG es desfosforilada y procesada proteolíticamente hasta obtener 10-12 monómeros de filagrina, que producen el entrecruzamiento con los filamentos de queratina y posteriormente es degradada a NMF. En todos estos procesos intervienen varios enzimas como transglutaminasas y caspasa-14. Adaptado de (Denecker et al., 2008).

La **loricrina** es una proteína que constituye aproximadamente un 70% de las proteínas que forman el estrato córneo (Nithya et al., 2015). Es posible detectar su presencia a partir del estrato granuloso, ya que es un marcador de diferenciación tardía y es sustrato de transglutaminasa 1 (TGM1) y TGM3 (Nithya et al., 2015). Su principal función es aumentar la elasticidad del estrato córneo al entrecruzarse con el resto de proteínas, así como reforzar la resistencia mecánica de esta capa. En las lesiones de psoriasis se ha descrito la disminución de loricrina (Nithya et al., 2015).

La **involucrina** es un marcador de diferenciación temprana de queratinocitos. En piel sana su expresión solo es detectable en el estrato granuloso y la parte superior del estrato espinoso mientras que en psoriasis se extiende en todo el estrato espinoso, lo que indica que la diferenciación de los queratinocitos no ha sido correcta (Chen et al., 2013). Además, su síntesis está relacionada con la migración celular en la capa basal por lo que su expresión está aumentada en enfermedades de carácter inflamatorio como psoriasis (Bélanger et al., 2020).

Las **citoqueratinas** son proteínas estructurales sintetizadas por los queratinocitos de las que se han descrito hasta 54 tipos (X. Zhang et al., 2019). La agrupación de queratina da lugar a filamentos intermedios que forman parte del citoesqueleto, contribuyendo al mantenimiento de la estructura celular y la integridad de los queratinocitos. Recientemente, se ha demostrado que las citoqueratinas regulan la proliferación, adhesión y la inflamación en los queratinocitos (X. Zhang et al., 2019). Dependiendo del estrato, varía el tipo de citoqueratina presente. Así, en el estrato basal se expresan predominantemente CK5 y CK14 mientras que CK1 y CK10 se expresan en capas suprabasales, estando presentes en la fase temprana de diferenciación de queratinocitos (Nishifuji y Yoon, 2013). La detección de CK6 y CK16 en la epidermis indica una situación patológica en la que hay una activación aumentada de los queratinocitos, que se encuentran en estado proliferativo (X. Zhang et al., 2019). Se ha descrito que algunas de las vías de señalización implicadas en psoriasis, como el

factor de transcripción nuclear κ B (NF- κ B), podrían participar en la regulación de la transcripción de CK6, cuyo aumento en lesiones psoriásicas es uno de los signos clínicos característicos de la enfermedad (X. Zhang et al., 2019).

1.2.2 Factores implicados en el proceso de cornificación

La **caspa-14**, ya comentada anteriormente, es una proteasa específica de residuos de aspartato que pertenece a la superfamilia de las caspasas, relacionadas con inflamación y apoptosis. A diferencia de otras enzimas de esta superfamilia, la presencia de la caspa-14 se limita a los apéndices epidérmicos y la epidermis, donde su expresión aumenta desde la capa basal hasta el estrato granuloso, donde alcanza su mayor expresión (Hvid et al., 2011). En extractos de epidermis, es posible detectar tanto la forma inactiva, conocida como procaspa-14, y la forma biológicamente activa o caspa-14; mientras que en la envuelta cornificada, solo se encuentra presente caspa-14. La procaspa-14 es sustrato de calicreína 7 (KLK7) que la degrada proteolíticamente, dando lugar a una forma intermedia y finalmente a la caspa-14, que como el resto de caspasas, está constituida por dos subunidades, una grande (p17) y otra menor (p11) (Yamamoto et al., 2012).

El proceso de activación y maduración de la caspa-14 se produce en la transición entre el estrato granuloso y el estrato córneo. La adición al medio de queratinocitos de vitamina D₃ y Ca²⁺ se emplea para inducir la diferenciación terminal de queratinocitos. Sin embargo, con respecto a caspa-14 el efecto no es el mismo. La expresión de caspa-14 aumenta tras la adición de vitamina D₃ mientras que disminuye en presencia de Ca²⁺ (Denecker et al., 2008). Paralelamente, se ha relacionado el aumento de la expresión de esta enzima con la activación del factor de transcripción proteína activadora -1 (AP-1). De hecho, los retinoides reducen la expresión de caspa-14 por represión de AP-1 y otros genes relacionados con la diferenciación celular (Ballau et al., 2008; Denecker et al., 2008).

En enfermedades inflamatorias como dermatitis atópica o psoriasis, la presencia de citocinas proinflamatorias derivadas de linfocitos T *helper* (Th) 2 produce una disminución tanto en la transcripción de RNA mensajero (mRNA) de caspasa-14 como en los niveles de la proteína, contribuyendo a una función barrera defectuosa (Hvid et al., 2011). La piel de ratones caspasa14^{-/-} se caracteriza por ser más escamosa y brillante, detectándose un aumento excesivo de los KHG que almacenan profilagrina (Denecker et al., 2008). Además, se produce la acumulación de fragmentos de filagrina en el estrato córneo, lo que sugiere un proceso deficiente de degradación de filagrina a NMF (Hoste et al., 2011). Así, la deficiencia de caspasa-14 en piel de ratón produce la alteración de la función barrera y se caracteriza por un aumento de sensibilidad a la radiación UVB, la disminución del grado de hidratación de la piel y el aumento de la pérdida de agua transepidérmica (Sandilands et al., 2009).

Las **transglutaminasas** en la epidermis se encargan de catalizar la unión entre los precursores de proteínas presentes en el estrato córneo. En epidermis están expresadas TGM1, TGM3 y TGM5. La delección genética de TGM1 en ratones produce la ausencia total de la envuelta celular cornificada; demostrando el importante papel de la TGM1 en este proceso (Nishifuji y Yoon, 2013).

Para mantener la homeostasis epidérmica es necesario que se produzca el recambio epidérmico en el que los corneocitos no funcionales son reemplazados por corneocitos nuevos (Yamamoto et al., 2012). Para ello es crucial que los **corneodesmosomas**, que son las uniones intracelulares que producen la adhesión de los corneocitos, sean desintegrados y se produzca la descamación. Las **calicreínas** (KLK) son un conjunto de 15 proteasas de las que KLK5 y KLK7 están expresadas en piel humana, en concreto, entre el estrato granuloso y el estrato córneo. Su función principal es la degradación de los componentes extracelulares de los corneodesmosomas (Nishifuji y Yoon, 2013). Cabe destacar que la regulación de su actividad enzimática viene determinada por el pH de la

piel, favoreciendo su activación el pH ácido (Lee, 2020; Yousef y Sharma, 2018).

Uniones estrechas: están constituidas por proteínas transmembrana, como las pertenecientes a la familia claudina, que interactúan con los filamentos de actina que forman el citoesqueleto (Bäsler et al., 2016). Son fundamentales para regular la adhesión y permeabilidad entre queratinocitos, impidiendo la difusión de fluidos a través de los espacios intercelulares, pero también intervienen en la diferenciación celular ya que permiten el transporte de iones de pequeño peso molecular como el Ca^{2+} (Barrea et al., 2017). Forman una segunda barrera por debajo del estrato córneo, contribuyendo al mantenimiento del gradiente de calcio en la epidermis, ya que impide la difusión de Ca^{2+} desde el estrato granuloso al estrato córneo (Lee y Lee, 2018). En piel sana, diferentes estímulos como interleucina (IL)- 1β disminuyen la expresión de claudina-1 (Bäsler et al., 2016). En psoriasis, la presencia de uniones estrechas no sólo está disminuida, sino que presenta un patrón de expresión alterado y discontinuo (Visconti et al., 2015) .

En la epidermis, el gradiente de Ca^{2+} fluctúa de una capa a otra, y el mantenimiento de los niveles correctos de Ca^{2+} es fundamental para el ciclo celular de los queratinocitos (Lee, 2020). En la capa basal y espinosa, la concentración de Ca^{2+} es menor y conforme avanzamos hacia el estrato granular, este valor aumenta hasta llegar al estrato córneo, donde los niveles de Ca^{2+} vuelven a disminuir (Lee y Lee, 2018). También se ha relacionado el Ca^{2+} con la composición lipídica del estrato córneo, ya que regula la síntesis y secreción de los cuerpos lamelares (Lee, 2020).

Durante el proceso de cornificación, la importancia del Ca^{2+} reside en que regula la transcripción de genes de proteínas que están relacionadas con la diferenciación de queratinocitos como TGM, loricrina, involucrina y profilagrina. Esto es debido a que presentan en la zona promotora del gen un sitio AP-1. Además, el Ca^{2+} interviene en la modificación postraducciona

de profilagrina induciendo cambios conformacionales que propician el procesamiento a filagrina (Lee y Lee, 2018).

El precursor de la **vitamina D** se encuentra en el citoplasma de los queratinocitos y tras producirse la activación por radiación UVB, se sintetiza calcitriol, que es la forma biológicamente activa y en condiciones fisiológicas regula la diferenciación y proliferación de queratinocitos (Barrea et al., 2017). El calcitriol presenta un efecto anti-proliferativo en queratinocitos y también tiene efecto sobre el proceso de formación del estrato córneo ya que aumenta la síntesis de CK1, CK10, involucrina, TGM, loricirina y filagrina (Barrea et al., 2017). Se cree que las acciones del calcitriol están mediadas en parte por el efecto que tiene sobre él la concentración de calcio intracelular.

Son conocidas las propiedades inmunoreguladoras de la vitamina D al estimular la proliferación de linfocitos T de fenotipo regulador (Treg) además de presentar efecto antiinflamatorio *in vitro* en macrófagos humanos (Barrea et al., 2017). En pacientes psoriásicos se han detectado niveles bajos de **vitamina D** (Orgaz-Molina et al., 2012) así como una disminución en la expresión de su receptor (Barrea et al., 2017; Mattozzi et al., 2016).

2. Psoriasis

La psoriasis es una patología de la piel crónica, dolorosa y no contagiosa cuya prevalencia mundial varía entre el 2-3% (Eissing et al., 2016; Greb et al., 2016), afectando aproximadamente a 125 millones de personas (Rioux et al., 2020). Dependiendo de la gravedad y del tipo de psoriasis, se puede producir desfiguración y puede llegar a ser incapacitante, lo que conlleva un importante impacto negativo en la calidad de vida de los pacientes. A veces, la psoriasis representa una carga psicológica potenciada por la estigmatización social de las lesiones cuando éstas aparecen en sitios visibles, lo que deriva en pérdida de autoestima, episodios de ansiedad y depresión en algunos de los afectados (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2016).

La psoriasis se caracteriza por ser una enfermedad inflamatoria, en la que interviene el sistema inmunológico y que afecta principalmente a la piel, aunque puede también afectar a las articulaciones, ya que en torno al 20-30% de los pacientes psoriásicos desarrollan artritis psoriásica (Coates et al., 2016). Además, debido a la inflamación sistémica crónica, en los pacientes con psoriasis aumenta el riesgo de padecer patologías como síndrome metabólico, diabetes y enfermedades cardiovasculares (Greb et al., 2016; Masson et al., 2020).

Por lo general, la aparición de psoriasis tiene lugar durante la edad adulta, y tienen menor incidencia en la población pediátrica. Existen dos franjas de edad en las que es más probable que se desarrolle psoriasis: entre los 18-39 años y 50-69 años, afectando indistintamente a hombres y mujeres (Greb et al., 2016).

2.1. Características histopatológicas:

Uno de los principales signos de la psoriasis es la aparición de lesiones eritematosas, descamativas que por lo general están perfectamente delimitadas (Figura 3).



Figura 3. Psoriasis vulgaris (Boehncke y Schön, 2015)

Comúnmente, cursan con prurito pudiéndose producir en ocasiones el sangrado de las mismas (Boehncke y Schön, 2015; OMS, 2016). A nivel microscópico, se produce la acumulación de neutrófilos infiltrados, dando lugar a los denominados abscesos de Munro. En el estrato córneo de las placas psoriásicas es posible detectar queratinocitos que poseen núcleo, fenómeno conocido como paraqueratosis y que es representativo de la maduración prematura de los queratinocitos (Perera et al., 2012). Debido a la proliferación descontrolada de queratinocitos, se produce el engrosamiento de la epidermis conocido como acantosis. Otra característica es la aparición de invaginaciones epidérmicas que se extienden hasta la dermis debido a la proliferación aberrante de queratinocitos (Boehncke y Schön, 2015; Perera et al., 2012).

2.2 Fenotipos de la enfermedad:

La clasificación de los tipos de psoriasis se determina en función de la morfología de las lesiones, la naturaleza de las mismas y la zona a la que afectan, existiendo actualmente cinco tipos de psoriasis (Napolitano et al., 2016).

Vulgaris: también conocida como psoriasis en placa, es la forma más común de psoriasis, representando un 80-90% de los casos. Las lesiones psoriásicas presentan un color plateado y tienden a aparecer con una distribución simétrica afectando sobre todo a la zona extensora de los

brazos y piernas, pero también puede afectar frecuentemente al cuero cabelludo y uñas (Boehncke y Schön, 2015; Perera et al., 2012).

En gotas: aparece sobre todo en la infancia y adolescencia (Raychaudhuri et al., 2014), a veces relacionadas con episodios de infecciones estreptocócicas. Se caracteriza por lesiones de pequeño diámetro esparcidas por toda la superficie corporal en forma de gotas o salpicaduras (Boehncke y Schön, 2015). Las lesiones o pápulas suelen aparecer en el tronco, en la parte más proximal de las extremidades, cara y cuero cabelludo (Raychaudhuri et al., 2014).

Eritro dérmica: forma de psoriasis menos frecuente, siendo una de las manifestaciones más severa y peligrosa de la enfermedad (Boehncke y Schön, 2015). Las lesiones pueden cubrir hasta el 75% (Carrasquillo et al., 2020) de la superficie corporal del paciente. Entre las complicaciones de esta forma de psoriasis, destaca la pérdida de la función de la barrera epidérmica, lo que favorece la aparición de reacciones sistémicas e incluso sepsis. La intensa descamación que se produce en este tipo de lesiones puede producir la pérdida de proteínas, la aparición de edema en las extremidades inferiores e incluso problemas cardiacos (Carrasquillo et al., 2020).

Pustulosa: se caracteriza por la aparición de ampollas y normalmente se desarrolla en individuos que previamente han padecido psoriasis *vulgaris* (Raychaudhuri et al., 2014). Las ampollas suelen aparecer en las plantas de los pies y las palmas de las manos aunque puede presentarse de forma generalizada como placas oscuras diseminadas, siendo este último tipo de psoriasis una de las formas de la enfermedad que más compromete la vida del paciente (Roszkiewicz et al., 2020)

Invertida: es característica de piel en zonas flexoras como ingles, axilas y región submamaria, siendo la aparición de las lesiones independiente del grado de hidratación de esas zonas. Las lesiones no

presentan un contorno definido y son de un color rojo brillante. Es la forma de psoriasis más resistente a los tratamientos clásicos (Omland y Gniadecki, 2015).

Otra manifestación de psoriasis es la ungueal, que afecta a las uñas y puede aparecer de manera aislada o coexistir con otro tipo de psoriasis que presente el paciente. A parte de las consideraciones estéticas, este tipo de afección dificulta enormemente la destreza manual y propicia la aparición de infecciones (OMS, 2016).

2.3 Etiología de psoriasis

2.3.1 Factores genéticos

En torno a 1960 se comenzó a estudiar el componente genético de la psoriasis, debido a que esta presentaba una mayor incidencia cuando familiares habían padecido esta patología (Boehncke y Schön, 2015; Perera et al., 2012). Se han realizado *Genome-wide Association Studies* (GWAS) que han identificado hasta 15 *loci* (Singh et al., 2019) que albergan genes relacionados con psoriasis (PSORS1-15). El principal *locus* relacionado con psoriasis es PSOR1 ya que la probabilidad de heredabilidad es del 30%-50% (Greb et al., 2016; Boehncke y Schön, 2015) y codifica para el alelo HLA-Cw6 que contiene genes del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Sin embargo, las alteraciones en PSOR1 solo están presente en el 50% de los casos de psoriasis (Perera et al., 2012), lo que sugiere que a parte de la predisposición genética existen otros factores que intervienen en el desarrollo de psoriasis como el estilo de vida (Roszkiewicz et al., 2020). Existen también mutaciones en PSORS2 que comprende el gen CARD14 (*Caspase recruitment domain-containing protein*), o en PSORS4 que afecta al complejo epidérmico de diferenciación terminal que está constituido, entre otros, por loricrina y filagrina (Greb et al., 2016; Perera et al., 2012).

El estudio de las variaciones genéticas que se observan en la enfermedad ha permitido diferenciarla de otras patologías que cursan con manifestaciones cutáneas, como la dermatitis atópica. Cabe destacar, que los genes relacionados con el metabolismo de glucosa, lípidos y aminoácidos se encuentran aumentados exclusivamente en psoriasis (Quaranta et al., 2014).

2.3.2. Factores extrínsecos

A parte de los factores genéticos, existen algunos factores externos que desencadenan la aparición o producen el agravamiento de la psoriasis.

- Leves traumas físicos como tatuajes y *piercings* pueden producir el fenómeno Koebner (Perera et al., 2012), que consiste en la aparición de nuevas lesiones psoriásicas en piel sana (Ji y Liu, 2019). El mecanismo por el que se produce este fenómeno no es específico pero los mastocitos serían uno de los principales tipos celulares que participan, actuando tanto sobre fibroblastos como sobre queratinocitos (Ji y Liu, 2019).

- Existe una importante asociación entre infecciones estreptocócicas y el desarrollo de psoriasis en gotas (Kamiya et al., 2019; Perera et al., 2012). De hecho, episodios de exacerbación de psoriasis coinciden con infecciones recientes por *Streptococcus*. Esto es debido al alto grado de homología existente entre la proteína antigénica M presente en el agente patógeno y la queratina, que es una proteína propia de los queratinocitos, lo que produce el aumento de células T circulantes (Thorleifsdottir et al., 2012).

- Uso de determinados fármacos que actúan a nivel sistémico:
 β -bloqueantes: empleados ampliamente en patologías cardiovasculares, pueden producir la aparición de psoriasis *de novo* o la exacerbación de la misma. El bloqueo del receptor adrenérgico β inhibe la actividad de la enzima adenilil ciclasa (AC), disminuyendo a nivel epidérmico el mensajero intracelular adenosín monofosfato cíclico (AMP_c) y, a su vez, la

concentración de Ca^{2+} intracelular, lo que favorece la proliferación de queratinocitos (Grželj y Dolenc, 2020). Paralelamente, otro mecanismo patogénico propuesto ha sido la modulación de la fosforilación proteica en linfocitos T por parte de los fármacos β -bloqueantes, favoreciendo por tanto la exacerbación de la enfermedad (Grželj y Dolenc, 2020; Basavaraj et al., 2010).

Litio: aunque ha caído en desuso, es empleado como alternativa terapéutica en depresión y trastornos bipolares. La aparición de psoriasis es una de las reacciones adversas de la piel más frecuentes derivadas del uso de litio. A nivel molecular, el litio actúa sobre la vía de señalización proteína cinasa C-inositol bifosfato (PKC-IPP₂), inhibiendo a la enzima inositol monofosfatasa, lo que produce la disminución del calcio intracelular, favoreciendo la hiperproliferación de queratinocitos y disminuyendo la diferenciación terminal (Grželj y Dolenc, 2020).

Antimaláricos sintéticos: la cloroquina e hidroxiclороquina son fármacos empleados para la profilaxis y tratamiento de malaria y su uso puede producir el empeoramiento de psoriasis en placas, si bien no están asociados con la aparición de psoriasis en pacientes que no la han padecido previamente (Balak y Hajdarbegovic, 2017). Los antimaláricos inhiben de manera dosis-dependiente las TGM epidérmicas, cuyo papel es fundamental para que el proceso de formación del estrato córneo sea correcto, tal y como se ha comentado anteriormente (Grželj y Dolenc, 2020).

Antiinflamatorios: en pacientes psoriásicos debe considerarse el uso de ellos. En concreto, indometacina es uno de los fármacos más asociados con la aparición de brotes de psoriasis, mientras que la incidencia es menor al emplearse ibuprofeno, naproxeno y fenilbutazona (Grželj y Dolenc, 2020). La inhibición de la vía de la ciclooxigenasa (COX), aumenta la síntesis de leucotrienos por la vía 5-lipooxigenasa, los cuales son mediadores quimiotácticos y proinflamatorios. Por otro lado, la disminución de la síntesis de prostaglandinas por la COX podría afectar a la

concentración de Ca^{2+} intracelular vía AC (Grželj y Dolenc, 2020; Arasa et al., 2019; Hong y Bernstein, 2012.)

Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA): dentro de las reacciones adversas de este grupo de fármacos, las cutáneas son una de las más comunes incluyendo psoriasis y dermatitis psoriasiforme (Grželj y Dolenc, 2020). Varios son los mecanismos de acción propuestos por los que producirían este tipo de reacciones. Al inhibir la ECA, disminuye el metabolismo y degradación de la sustancia P, neuropéptido implicado en la inflamación y el dolor (Bali et al., 2014). En concreto, la sustancia P en queratinocitos regula la liberación de IL-1 β e IL-6, así como del factor de crecimiento transformante (TFG)- α , iniciando la cascada inflamatoria (Sandoval-Talamantes et al., 2020).

Antibióticos orales: pueden producir la aparición de psoriasis pustulosa aparte de empeorar la psoriasis en placas. Comúnmente, el grupo que produce este efecto adverso es el de las tetraciclinas debido a que interfiere en los niveles de AMP_c, así como en el metabolismo del ácido araquidónico. Además, presentan fototoxicidad por lo que en pacientes predispuestos que se expongan a radiación ultravioleta puede favorecer la aparición del fenómeno Koebner (Grželj y Dolenc, 2020).

- **Estilo de vida:** aunque no existe evidencia consistente que relacione la psoriasis con la alimentación, es cierto que las personas obesas tienen el doble de probabilidad de desarrollar psoriasis (Owczarczyk-Saczonek et al., 2020). La ingesta excesiva de grasas saturadas se acumula en el tejido graso visceral, lo que, a la larga, favorece la metainflamación. Este tipo de dieta puede favorecer la exacerbación de psoriasis ya que los ácidos grasos saturados interactúan con células mieloides como macrófagos, que iniciarían la cascada de inflamación que, en última instancia, afectaría a los queratinocitos (Owczarczyk-Saczonek et al., 2020). El tabaco y el consumo de alcohol han sido asociados con la aparición de psoriasis, aunque la relación es difícil de establecer ya que son situaciones multifactoriales en las que la relación puede ser indirecta (Kamiya et al., 2019).

2.4 Inmunopatogénesis

Inicialmente se pensaba que la psoriasis era una patología exclusivamente dermatológica, pero tras el tratamiento efectivo en los años 80 con fármacos que modulan la actividad de los linfocitos T, se demostró que existe una participación muy importante del sistema inmunitario (Billi et al., 2019). A pesar de que no se ha detectado ningún antígeno específico para la psoriasis, se han descrito moléculas que pueden actuar como autoantígenos. En la piel lesional de pacientes psoriásicos, el infiltrado que se produce está compuesto principalmente por células dendríticas, linfocitos CD8⁺ en epidermis y linfocitos Th en dermis (Hawkes et al., 2017; Boehncke y Schön, 2015), pero también intervienen diversas células como queratinocitos, macrófagos y neutrófilos (Perera, 2012).

2.4.1 Tipos celulares implicados:

Queratinocitos: es el tipo celular que constituye mayoritariamente la epidermis y tienen un papel principal en el desarrollo de psoriasis al actuar tanto a nivel de la respuesta inmune como en la conservación de la función barrera de la piel. Como se ha descrito en el apartado anterior, el ciclo celular de los queratinocitos está sometido a un estrecho control desde la membrana basal hasta que ascienden al estrato córneo y pasan a denominarse corneocitos. Durante esta transición, el fenotipo de los queratinocitos varía, expresando diferentes citoqueratinas y proteínas.

Cuando se produce un daño en la piel, los queratinocitos son activados expresando CK6, CK16 y CK17. Paralelamente proliferan, migran y sintetizan mediadores angiogénicos como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y citocinas para intentar reparar el daño. Una vez realizada su función protectora frente agresiones externas, los queratinocitos volverían a su estado basal y continuarían su ciclo celular. Sin embargo, en psoriasis esto no sucede, resultando en una activación sostenida de los queratinocitos que sufren una diferenciación terminal defectuosa. En este sentido, se ha demostrado que alteraciones en los

cambios fenotípicos de los queratinocitos, necesarios para la formación de la envuelta cornificada, pueden contribuir al inicio, el mantenimiento y la cronificación de la psoriasis (Albanesi et al., 2018; Perera et al., 2012).

Los queratinocitos también liberan mediadores que interactúan con el sistema inmune. En las fases iniciales y como respuesta a diversos factores desencadenantes, los queratinocitos liberan factores quimiotácticos como CXCL-1 (*Chemokine (C-X-C motif) ligand-1*) y CCL20 (*Chemokine (C-C motif) ligand 20*). Como parte de la respuesta innata también liberan IL-1 α que favorece la acumulación de neutrófilos y monocitos en las lesiones psoriásicas (Albanesi et al., 2018). En la fase de mantenimiento y una vez se han puesto en marcha todos los mecanismos patológicos relacionados con la respuesta inmune en psoriasis, los queratinocitos son a su vez estimulados por citocinas y quimiocinas derivadas de la activación de los linfocitos Th17 (Albanesi et al., 2018). Además, IL-17 produce la síntesis del péptido antimicrobiano catelicidina (LL-37), por lo que se produce una retroalimentación positiva que culmina con la cronificación de psoriasis (Figura 4).

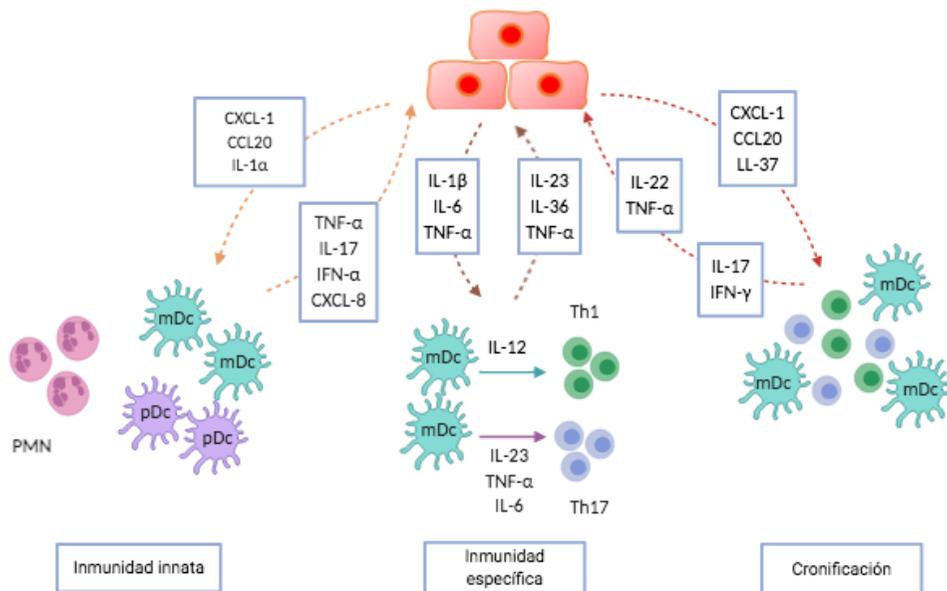


Figura 4. Interacción entre queratinocitos y sistema inmune. Durante el inicio de la enfermedad se produce la activación de la respuesta inmune innata y el reclutamiento de células inflamatorias debido a la liberación de mediadores por los queratinocitos. La activación de células dendríticas mieloides (mDc) favorece la expansión clonal de los linfocitos Th17 y Th1, que a su vez liberan IL-23, IL-36 y TNF- α que interaccionan con los queratinocitos. Durante la fase de cronificación IFN- γ induce en queratinocitos psoriásicos la liberación de mediadores quimioatrayentes de monocitos, células Th1 y Th17 o DC. IL-17 retrasa la diferenciación terminal de queratinocitos y junto a TNF- α producen la activación de la vía NF- κ B. IL-22 estimula la liberación de quimiocinas y produce acantosis celular vía STAT-3. IFN- γ : interferón- γ ; mDc: células dendríticas mieloides; pDc: células dendríticas plasmocitoides; PMN: células polimorfonucleares; TNF- α (factor de necrosis tumoral- α). Adaptado de (Albanesi et al., 2018).

Fibroblastos: constituyen el tipo celular predominante en la dermis, responsable de la síntesis de los componentes de la matriz extracelular, como proteoglicanos y colágeno, muy relacionado por tanto con la remodelación y conservación de la estructura tisular de la piel (Gęgotek et al., 2020). Los fibroblastos juegan un papel relevante en la respuesta inmune innata, pudiendo contribuir al desarrollo de diversas patologías. Sin

embargo, su papel en psoriasis presenta controversia. Algunos autores sugieren que los fibroblastos dérmicos son funcionalmente similares a las células madre mesenquimales, pudiendo reducir el reclutamiento de linfocitos y la activación de macrófagos y células dendríticas mediante la liberación de mediadores considerados clásicamente proinflamatorios, como la prostaglandina E₂ (PGE₂) (Arasa et al., 2019; Buckley, 2017). En este sentido, se ha puesto de manifiesto que la PGE₂ generada por fibroblastos dérmicos sanos promueve un fenotipo antiinflamatorio en macrófagos, mientras que los fibroblastos psoriásicos pierden la capacidad de inducir dicho eicosanoide, manteniendo el fenotipo proinflamatorio (Arasa et al., 2019). Por otra parte, los fibroblastos liberan también adipocinas, como quemerina, que favorece la migración y el reclutamiento de células dendríticas plasmocitoides (pDC) (Albanesi et al., 2018).

Células dendríticas (DC): ejercen multitud de funciones en cuanto a la activación del sistema inmune, actuando como células presentadoras de antígeno (APC) e interactuando con linfocitos T. En condiciones fisiológicas las DC ejercen un papel regulador manteniendo el equilibrio en la respuesta inmunitaria; pero bajo determinados estímulos son capaces de diferenciarse y migrar al foco inflamatorio (Tokuyama y Mabuchi, 2020; Chu et al., 2011).

Existen diferentes poblaciones como las células de Langerhans (LC), las células dendríticas mieloides (mDC) y pDC, que en condiciones normales ya se encuentran en la piel (Chiricozzi et al., 2018). En concreto, las LC residentes están en la epidermis desde la embriogénesis (Wang y Bai, 2020) y se insertan entre los queratinocitos asociándose vía E-caderina, una glicoproteína transmembrana que está regulada por Ca²⁺ (Yan et al., 2020). En psoriasis, el papel que desempeñan estas células no está totalmente establecido ya que se ha observado variabilidad en el infiltrado celular, aumentando, disminuyendo o sin cambios en pacientes psoriásicos (Wang y Bai, 2020; Yan et al., 2020).

Respecto a las mDC, existen varios subtipos de poblaciones, que responden a estímulos quimiotácticos, migrando a focos inflamatorios. Las mDC inflamatorias (imDC) son células que no han terminado de diferenciarse fenotípicamente y que sintetizan citocinas como factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), IL-6, IL-12, IL-20 e IL-23 (Tokuyama y Mabuchi, 2020). Así mismo expresan la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) que junto a TNF- α generan un entorno inflamatorio. Por otro lado, la liberación de IL-20 promueve la proliferación de queratinocitos, desencadenando la hiperplasia epidérmica observada en esta patología. Además, IL-12 e IL-23 estimulan la diferenciación de linfocitos T, activando por tanto la respuesta inmunitaria. En concreto, en el infiltrado de piel psoriásica, el porcentaje del subtipo imDC es 30 veces mayor que en piel sana (Chiricozzi et al., 2018).

El otro subtipo de mDC actúa principalmente como células presentadoras de antígeno, interactuando con linfocitos T y su presencia no varía en piel psoriásica en contraste con piel sana (Chiricozzi et al., 2018).

En sangre periférica se encuentran las pDC que están muy relacionadas tanto con procesos autoinmunes así como con el reconocimiento de virus a través de los receptores *toll-like-7* y 9 (TLR7 y TLR9) (Albanesi et al., 2018; Ye et al., 2020). En las lesiones psoriásicas se detecta un aumento significativo de los niveles de interferón- α (IFN- α) con respecto a piel no lesional (Chiricozzi et al., 2018). Una vez activadas, las pDC liberan IFN- α en la piel y este evento se considera uno de los iniciadores de la inflamación psoriásica. IFN- α actúa sobre varios tipos celulares, activando a las mDC y estimulando el desarrollo, maduración y polarización de los linfocitos T hacia Th17, incrementando por tanto los niveles de IL-17 (Chiricozzi et al., 2018; Deng et al., 2016).

Macrófagos: en condiciones fisiológicas son células residentes de la dermis, pero pueden migrar a los nódulos linfáticos locales cuando se

desencadena la inflamación. Representan una de las principales fuentes de TNF- α y se han detectado en lesiones psoriásicas, donde contribuyen al mantenimiento del estado inflamatorio de la piel (Perera et al., 2012).

Neutrófilos: en respuesta a agresiones externas o presencia de patógenos, se produce la diapédesis de neutrófilos hacia el foco de infección donde constituyen la primera línea de respuesta de la inmunidad innata. Dentro de los mecanismos de defensa de los neutrófilos está la formación de trampas neutrofílicas extracelulares (NET) (Chiang et al., 2019) y la generación masiva de radicales de oxígeno (ROS). Además, las enzimas lisosomales contenidas en los gránulos azurófilos, como la mieloperoxidasa (MPO), producen ácido hipocloroso a partir de los ROS, con potente efecto bactericida. En lesiones psoriásicas, se ha descrito la presencia de NET así como un aumento significativo de la actividad MPO, contribuyendo al desarrollo de la reacción inflamatoria en las primeras etapas de la enfermedad (Takahashi y Yamasaki, 2020; Dilek et al., 2016).

Células T reguladoras (Treg): población de linfocitos CD4⁺ que en la piel adulta representan un 20% de la población de células T (Owczarczyk-Saczonek et al., 2018). Desempeñan un papel inmunoregulador, evitando la cronificación de enfermedades inflamatorias o la aparición de patologías autoinmunes (Perera et al., 2012).

Para la diferenciación de las células Treg es necesaria IL-6 que a su vez, inhibe la liberación de IL-17, existiendo un equilibrio entre la presencia de Treg y la citocina inflamatoria IL-17 (Deng et al., 2016). En lesiones psoriásicas, el número de Treg está aumentado (Chiricozzi et al., 2018), lo que sugiere que se produce una disfunción de este tipo celular ya que estudios *in vitro* han demostrado que las Treg procedentes de pacientes psoriásicos no son capaces de inhibir la respuesta Th1, mientras que los aislados de pacientes sanos si conservan su funcionalidad (Owczarczyk-Saczonek et al., 2018).

Células linfoides innatas (ILC): se caracterizan por no presentar ningún tipo de especificidad con respecto al reconocimiento de antígenos y desempeñan un papel importante en cuanto al remodelado y la protección tisular. A diferencia de la activación de células T, que requieren la presentación de antígenos por el MHC-II, las ILC son activadas por citocinas como IL-1 β e IL-23 (Kobayashi et al., 2020). Se ha detectado un incremento de ILC3 en lesiones psoriásicas en comparación con piel psoriásica no lesional, lo que representaría, junto a las células Th17, una de las principales fuentes de IL-17 (Chiricozzi et al., 2018; Kobayashi et al., 2020)

2.4.2 Citocinas inflamatorias

El TNF- α es una citocina transmembrana que se procesa y libera en procesos inflamatorios, y cuyos niveles se ven aumentados de manera crónica en patologías en las que existe una inflamación subyacente como artritis reumatoide, esclerosis múltiple y enfermedad de Crohn (Nosenko et al., 2019). En psoriasis, fue una de las primeras citocinas empleada como diana terapéutica con anticuerpos monoclonales y sus niveles están elevados tanto en biopsias de piel lesional como en el análisis serológico de pacientes psoriásicos (Chiricozzi et al., 2018).

El TNF- α es liberado principalmente por macrófagos, pero existen otros tipos celulares que también lo liberan, aunque en menor medida, como células Th1, Th17, DC y queratinocitos (Chiricozzi et al., 2018; Nosenko et al., 2019; Perera et al., 2012). Esta citocina regula varias funciones una vez que interacciona con el receptor de TNF- α (TNFR1) (p55) presente en leucocitos y células endoteliales, o TNFR2 (p75) presente en la mayoría de las células. Esta interacción produce la activación de 3 vías de señalización:

1. Activación de las caspasas, familia de proteínas relacionadas con vías de señalización que inducen la apoptosis celular.

2. Activación de la MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) que favorece la proliferación y diferenciación celular.
3. Activación de NF- κ B, que induce la transcripción de citocinas inflamatorias (Nosenko et al., 2019).

Por otro lado, la cascada de inflamación se amplifica, ya que el TNF- α induce la producción de IL-23 en DC y la activación del eje IL-23/IL-17 (Chiricozzi et al., 2018; Deng et al., 2016). La IL-23 es una citocina heterodimérica que pertenece a la familia de las IL-12, con la que comparte la subunidad p40, siendo la p19 la otra subunidad que la compone (Deng et al., 2016). Es sintetizada por queratinocitos, mDC, LC y macrófagos en respuesta a patógenos infecciosos de naturaleza fúngica o bacteriana que activan los TLR (Perera et al., 2012). La IL-23 actúa a través de su receptor IL-23R, expresado en múltiples células del sistema inmunitario como en neutrófilos, macrófagos, ILC y células T de memoria (Chiricozzi et al., 2018). Contribuye al mantenimiento de la respuesta inmune favoreciendo la expresión de su propio receptor IL-23R, y también induciendo la proliferación de queratinocitos al activar la vía de señalización STAT-3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*) (Deng et al., 2016; Grän et al., 2020). IL-23 tienen un papel crucial en el desarrollo y proliferación de células Th17, que liberan IL-17, favoreciendo el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos al inducir la liberación de quimiocinas como CXCL-1 por parte de los queratinocitos (Tokuyama y Mabuchi, 2020).

La inyección intradérmica de IL-23 representa uno de los modelos *in vivo* empleados para el estudio de psoriasis, ya que produce la aparición de eritema y lesiones similares a las que aparecen en psoriasis (Chiricozzi et al., 2018; Perera et al., 2012).

Otra citocina relacionada con psoriasis es IL-1 β , producida principalmente por macrófagos y que contribuye a la activación de las células T. El tratamiento con el antagonista del receptor de IL-1 β , Anakinra,

no mejoró la psoriasis en placa de los pacientes; sin embargo sí que mostró cierta efectividad en psoriasis pustular generalizada (Grän et al., 2020).

IL-6 es una citocina que está muy implicada en el crecimiento y diferenciación de células dérmicas y epidérmicas y su aumento ha sido detectado tanto en el análisis inmunohistoquímico (Castells-Rodellas et al., 1992) como serológico de pacientes que presentan psoriasis activa (Pietrzak et al., 2020). Entre los efectos derivados de IL-6 destaca la activación de los linfocitos T, además de presentar propiedades antiapoptóticas sobre estas células, al aumentar la expresión de Bcl-2 (B cell lymphoma 2) vía STAT-3, y la diferenciación de células T a Th17 (Scheller et al., 2011).

2.4.3 Péptidos antimicrobianos (PAM)

Son moléculas de naturaleza proteica que se caracterizan por poseer efecto “antibiótico”, modular la respuesta inflamatoria, promover la liberación de factores angiogénicos y regular la proliferación celular (Takahashi y Yamasaki, 2020). En la piel son sintetizados por neutrófilos, macrófagos y queratinocitos en respuesta a daño tisular y a la activación por citocinas (Tokuyama y Mabuchi, 2020). Se ha relacionado el aumento de estas moléculas, que actúan como autoantígenos, con patologías de la piel como rosácea, dermatitis atópica y psoriasis (Takahashi y Yamasaki, 2020). En concreto, el PAM LL-37 es uno de los más ampliamente estudiados, ya que la población de células T anti-LL37 se encuentra aumentada tanto en la serología como en placas psoriásicas, correlacionándose directamente con la severidad de la enfermedad (Rendon y Schäkel, 2019). Recientemente, en 2015 se describió otro PAM relacionado con psoriasis presente en melanocitos: ADAMTSL5 (Chiricozzi et al., 2018; Hawkes et al., 2017). En linfocitos T aislados de pacientes psoriásicos, la estimulación con ADAMTSL5 aumenta la expresión de IL-17A e IFN- γ (Hawkes et al., 2017)

2.5 Vías de señalización implicadas en psoriasis:

NF- κ B es un conjunto de factores de transcripción que están estrechamente relacionados con la respuesta inmunitaria y que mantiene la homeostasis de la inflamación. Esta vía es activada en respuesta a determinados estímulos, siendo los miembros de la familia de citocinas TNF uno de los principales inductores. El complejo NF- κ B está constituido por 5 proteínas (p50, p52, p65 o RelA, Relb y c-Rel) que presentan un dominio de interacción con el ADN promoviendo la transcripción de genes que codifican para mediadores antiapoptóticos, citocinas como IL-6 y factores de proliferación (Rinkenbaugh y Baldwin, 2016; Hayden y Ghosh, 2014). En condiciones basales, el complejo se encuentra en el citoplasma celular unido a un inhibidor de proteínas KB (IKB), que una vez es fosforilado y degradado, libera el dímero de NF- κ B que se transloca al núcleo donde actúa sobre la secuencia génica diana (Hayden y Ghosh, 2014; Goldminz et al., 2013).

STAT: el aumento de actividad de la vía de las Janus cinasas (JAK), fosforila una serie de proteínas transductoras de señal y activadoras de transcripción (STAT), entre las que destaca STAT-3, factor de transcripción relacionado con la respuesta inflamatoria y la proliferación de queratinocitos. Además, en psoriasis, STAT-3 está implicado tanto en la inducción de la expresión del receptor IL-23 como en la diferenciación a Th17, ya que ambos procesos están suprimidos en ausencia de STAT-3 tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo* (Calautti et al., 2018). Tal es la implicación, que uno de los modelos animales empleados para reproducir la psoriasis consiste en ratones transgénicos K5.Stat3C, en los que la mutación produce una activación constitutiva de STAT-3 (Nakajima y Sano, 2018). La activación de esta vía de señalización está mediada por factores de crecimiento como el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) o el factor de crecimiento epidérmico (EGF), además de citocinas como IL-6, IL-10 e IL-12 (Logotheti y Pützer, 2019). Las JAK representan una diana terapéutica para enfermedades que presentan componente

autoinmune. Por ejemplo, Tofacitinib es un inhibidor oral de JAK empleado en artritis reumatoide y artritis psoriásica que inhibe de manera indirecta el eje IL-23/Th17 al disminuir la actividad STAT-3 (Calautti et al., 2018).

2.6 Inicio de la enfermedad

Debido a que la etiología de la enfermedad no está definida claramente, varios son los mecanismos propuestos para el desencadenamiento de psoriasis. En la Figura 5 se resumen las principales células y mediadores involucrados en este proceso. En fases iniciales de la enfermedad se considera que las DC juegan un papel fundamental en la respuesta inflamatoria. En primer lugar, el desarrollo de una infección o un trauma favorecen la liberación de LL-37 por los queratinocitos o de ADAMTSL5 por los melanocitos, formando un complejo de ácidos nucleicos que activarían a las pDC vía TLR7 y TLR9. A su vez, las pDC sintetizan IFN- α que estimula la activación de las mDC, favoreciendo la diferenciación de células T a Th1/Th17 y la sensibilización de queratinocitos (Rendon y Schäkel, 2019; Boehncke y Schön, 2015).

Inicialmente, se pensaba que la psoriasis era una enfermedad predominantemente mediada por linfocitos Th1. Sin embargo, la caracterización del nuevo subtipo de células Th17 supuso un nuevo paradigma en patologías mediadas por el sistema inmunitario. De hecho, el eje IL-23/Th17 representa una de las principales dianas farmacológicas para el tratamiento de psoriasis (Hawkes et al., 2017). Las imDC liberan, entre otros mediadores inflamatorios, IL-23 e IL-12 que a su vez actúan sobre células productoras de IL-17 que se encuentran en la piel como células Th17, ILC y linfocitos T citotóxicos (Hawkes et al., 2017). Conjuntamente con IL-17 liberan TNF- α , presentando ambas citocinas una actividad sinérgica al inducir la transcripción de genes proinflamatorios como IL-1 β , IL-6 e IL-8 que, a su vez, activan a las mDC, de manera que se produce una amplificación de la respuesta inflamatoria. Por otro lado,

IL-17 en queratinocitos estimula la activación de las vías de señalización STAT y NF- κ B, relacionadas con la hiperproliferación de queratinocitos y la inflamación. Los queratinocitos activados expresan CCL20, que producen el reclutamiento de más mDC y células Th17, produciéndose un ciclo de retroalimentación positiva que favorece en última instancia la movilización de células Th1 y por tanto, la cronificación del proceso inflamatorio (Hawkes et al., 2017)

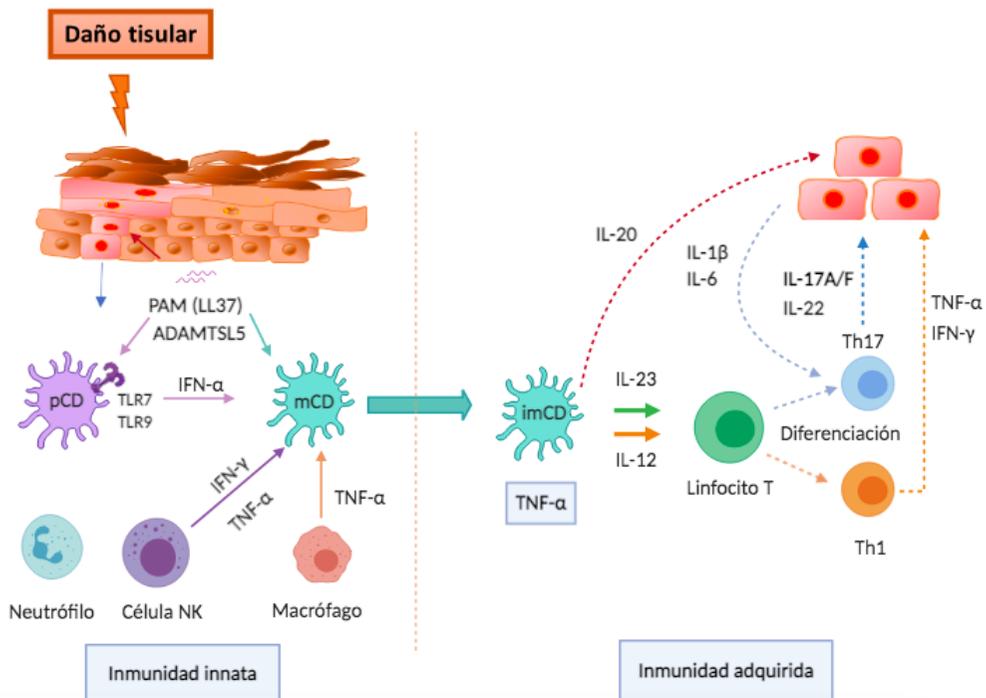


Figura 5. Inicio patogénico de psoriasis. Tras una agresión externa, bien de carácter física o química, se desencadena la liberación de los PAM, que forman complejos que son reconocidos por las pDC vía receptor TLR. Las pDC junto con las células que participan en la respuesta innata promueven la activación de las mDC, liberando TNF- α y propiciando un entorno inflamatorio. A su vez, la liberación de IL-23 e IL-12 por las imDC promueve la expansión clonal de linfocitos Th17 y de linfocitos de Th1, lo que perpetua el estado inflamatorio, activando de nuevo a los queratinocitos, que liberan factores quimiotácticos manteniendo el reclutamiento de linfocitos y mDC. Célula NK: célula Natural Killer; imDC: célula dendrítica mieloide inflamatoria; mDC: célula dendrítica mieloide; PAM: péptido antimicrobiano; pDC: célula dendrítica plasmocitoide; Th1: linfocito T helper 1; Th17: linfocito T helper 17.

2.7 Farmacoterapia

Actualmente no existe ningún tratamiento que produzca la remisión completa de la psoriasis, por lo que los fármacos disponibles están orientados a controlar las exacerbaciones de la enfermedad y a paliar los síntomas. El tratamiento se elige en función del tipo de psoriasis, del grado de severidad de la patología, así como la zona en la que aparezca, siendo común el uso simultáneo de varios tratamientos.

2.7.1 Tratamiento tópico:

Es la primera opción para el tratamiento de la psoriasis leve a moderada. Entre los agentes tópicos más comúnmente empleados destacan los **corticosteroides** como betametasona dipropionato, los **análogos de la vitamina D₃** como el calcipotriol, y **retinoides** como tazaroteno. Se pueden emplear en monoterapia o como coadyuvante del tratamiento sistémico, existiendo también alguna presentación en la que se combinan corticoides y derivados de la vitamina D₃. También como tratamiento tópico en casos de psoriasis moderada a grave se emplea fototerapia, en concreto con radiación UVB o radiación PUVA que consiste en la administración previa al tratamiento con radiación UVA de psoralenos, que son agentes fotosensibilizantes (Torsekar y Gautam, 2017).

2.7.2 Agentes sistémicos no biológicos

El **metotrexato** es uno de los principales fármacos empleados desde que en 1972 se aprobara su uso para el tratamiento de psoriasis. Presenta efecto inmunosupresor y antineoplásico ya que interfiere en los procesos de síntesis, reparación y replicación celular del ADN. Se emplea en múltiples patologías como artritis reumatoide o en procesos neoplásicos, y aunque el mecanismo de acción exacto por el que resulta efectivo en el tratamiento de psoriasis no está establecido del todo, parece estar relacionado con el aumento de adenosina extracelular que produce al inhibir de manera indirecta la AMP deaminasa (Maksimovic et al., 2020).

Otro agente inmunomodulador tradicionalmente utilizado es la **ciclosporina A** cuyo efecto principal es la inhibición de la respuesta inmunitaria al modular selectivamente la activación de linfocitos T (Amber y Tabassum, 2020).

Actualmente, el único derivado de la vitamina A empleado vía oral en la psoriasis es la **acitetrina** que actúa modulando la diferenciación y proliferación de las células epidérmicas y también presenta efecto antiinflamatorio (Tokuyama y Mabuchi, 2020).

Por último, en 2014 la *Food and Drug Administration* (FDA) aprobó el uso de **apremilast** (Otezla®) en psoriasis en placas. Esta molécula actúa inhibiendo la fosfodiesterasa-4 (PDE-4) intracelular que media la degradación del AMP_c, mensajero secundario intracelular. Su eficacia se explica por la desregulación de la respuesta inmune innata y adaptativa, que está mediada por este mensajero (Afra et al., 2019). Es de destacar, que tanto el mecanismo de acción del metotrexato como el de apremilast tienen en común que provocan, por diferentes vías, un aumento de AMP_c, presentando un perfil antiinflamatorio y beneficioso en el tratamiento de psoriasis (Afra et al., 2019).

2.7.3 Agentes sistémicos biológicos

Desde que en 2004 la FDA aprobase el primer medicamento biológico anti-TNF- α , etanercept, se han autorizado 11 agentes biológicos para el tratamiento de psoriasis (Tabla 1). Como dianas terapéuticas se emplean los principales ejes y mediadores inflamatorios que se han mencionado anteriormente y desempeñan un papel crítico en la patogénesis de psoriasis (Menter et al., 2019).

Tabla 1. Tratamientos biológicos aprobados por la FDA para el tratamiento de psoriasis (Menter et al., 2019).

	Estructura	Diana terapéutica	Año comercialización
Etanercept	Proteína de fusión: dominio extracelular de TNFR+Fc* de IgG	TNF- α	2004
Infliximab	Anticuerpo quimérico monoclonal IgG		2006
Adalimumab	Anticuerpo monoclonal humano IgG		2008
Certolizumab	Proteína de fusión: subunidad Fab* del anticuerpo humanizado		2018
Secukinumab	Anticuerpo monoclonal IgG1/ κ	IL-17	2015
Ixekizumab	Anticuerpo monoclonal humanizado IgG4		2016
Brodalumab	Anticuerpo monoclonal humano IgG2		2017
Ustekinumab	Anticuerpo humano monoclonal IgG1	IL-23	2009
Tildrakizumab	Anticuerpo monoclonal humanizado IgG1/ κ		2018
Guselkumab	Anticuerpo monoclonal IgG1 λ		2017
Risankizumab	Anticuerpo monoclonal humanizado IgG1		2019

*Fc: fragmento cristalizante; Fab: fragmento de unión al antígeno; TNFR: receptor de TNF- α .

2.7.4 Nuevas perspectivas terapéuticas

Los miRNA (micro-ribonucleic acid) son pequeños RNA de una longitud aproximada entre 19-25 nucleótidos, no codificantes y que intervienen en la regulación post-transcripcional de genes (Lee, 2020; Timis y Orasan, 2018). Mayoritariamente los miRNA producen el silenciamiento de genes o bien la degradación de las dianas del RNA mensajero (RNAm).

Se han descrito numerosos miRNA cuya presencia está desregulada en psoriasis, como miR-203 que es específico de la piel y en condiciones fisiológicas se encuentra en queratinocitos suprabasales, regulando la diferenciación de queratinocitos inducida por Ca^{2+} (Lee, 2020). Es posible detectar tanto en la piel como en la sangre de pacientes psoriásicos la sobreexpresión tanto de miR-203 como de miR-31. Esta desregulación al alza produce una proliferación aberrante de los queratinocitos. Entre sus efectos destaca la activación de la vía de señalización NF- κ B y la consiguiente producción de TNF- α y mediadores quimiotácticos (Timis y Orasan, 2018). Otro miRNA sobreexpresado en psoriasis es miR-210, que actúa favoreciendo la diferenciación de células T a Th1 y Th17 y disminuyendo la actividad de las Treg (Nedoszytko et al., 2020).

Por el contrario, la expresión de miR-125 está significativamente disminuida en piel psoriásica en comparación con piel sana. Este miARN es un modulador negativo de la proliferación de queratinocitos (N. Xu et al., 2011). Por lo tanto, su disminución en psoriasis contribuiría al aumento de la hiperproliferación epidérmica.

El descubrimiento del papel de los miARN en psoriasis aporta nuevas perspectivas para el tratamiento de esta enfermedad, ya que se podrían considerar como una nueva diana farmacológica o como biomarcadores para el diagnóstico y la prognosis de la psoriasis.

3. Adenosina

La adenosina es un nucleósido purínico cuya estructura química consta de la base adenina unida por un enlace glicosídico a una molécula de ribosa (Figura 6). La adenosina es una molécula endógena y la fuente extracelular a partir de la que se obtiene principalmente es el

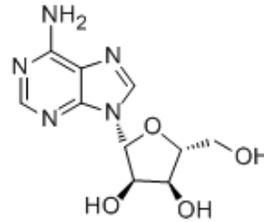


Figura 6. Estructura molecular de adenosina

metabolismo de ATP, uno de los principales mensajeros celulares (Vecchio et al., 2019). En condiciones normales, la concentración de adenosina se encuentra en un rango de 20-300 nM (Borea et al., 2018) pero en situaciones de daño tisular, hipoxia o estrés, estos niveles se incrementan notablemente (Magni y Ceruti, 2020; Haskó et al., 2018).

3.1 Metabolismo de adenosina

El ATP intracelular es la principal reserva para la síntesis de adenosina. Generalmente, la adenosina es sintetizada extracelularmente, a partir de la desfosforilación de sus nucleótidos ATP, ADP y AMP, que puede producirse debido a una hidrólisis espontánea o por la actividad de 5'-ectonucleotidasas (Burnstock et al., 2012; Hinz et al., 2018). Tras ello, se produce un incremento de adenosina extracelular que, en condiciones normales, es captada por las células a través de ENT (*Equilibrative nucleoside transporter*). En el interior de la célula, la adenosina puede volver a ser fosforilada por la AK (*Adenosin kinase*) o bien puede ser desaminada a inosina por la adenosín deaminasa (ADA) (Cronstein y Sitkovsky, 2017).

3.2 Receptores de adenosina

La adenosina ejerce sus efectos a través de la interacción con sus receptores (AR) A₁, A_{2A}, A_{2B} y A₃, los cuales difieren tanto en sus efectos, como en los tipos celulares en los que están presentes. Existen también

diferencias en cuanto a la afinidad por adenosina de los distintos receptores, ya que el valor de K_i (humano) varía entre 310 nM, 700 nM y 290 nM para los subtipos A_1 , A_{2A} y A_3 respectivamente, mientras que para el receptor A_{2B} el valor de K_i (h) es de 24000 nM (Borea et al., 2018). Esta baja afinidad del receptor A_{2B} ha sugerido siempre un papel poco relevante en condiciones fisiológicas, requiriéndose concentraciones fisiopatológicas de adenosina para su activación. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que el efecto de la activación A_{2B} no depende sólo de la afinidad, sino que puede ser patente en aquellos tipos celulares donde este subtipo de AR es el mayoritario (Borea et al., 2018; Fredholm et al., 2011).

Los receptores de adenosina A_1 y A_3 están asociados a proteínas G_i (Figura 7), por lo que su activación disminuye la formación de AMP_c . Por el contrario, $A_{2A}AR$ y $A_{2B}AR$ producen un aumento de AMP_c debido a la activación de la AC vía proteína G_s . Además, el receptor A_{2B} activa otras vías de transducción de señales a través de proteínas G_q , produciendo la movilización de Ca^{2+} y, en ocasiones, también puede estar acoplado a proteínas G_i . Esto explicaría por qué la activación del receptor A_{2B} puede tener efectos contrapuestos, lo que va a depender tanto del tipo celular en el que esté presente como del tipo de proteína G al que se encuentre acoplado (Gao et al., 2018).

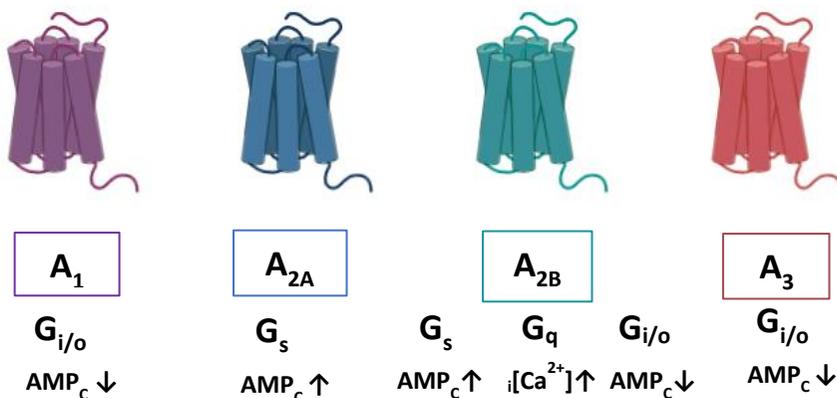


Figura 7. Subtipos de receptores de adenosina (AR) asociados a proteínas G

Inicialmente, se estudió la adenosina por la modulación que ejerce sobre el sistema cardiovascular, pero actualmente se ha demostrado que los AR están ampliamente distribuidos en diversos tejidos, órganos y tipos celulares, interviniendo además en la regulación del sistema nervioso central, del sistema endocrino y de la respuesta inflamatoria e inmune (Burnstock, 2018; Vecchio et al., 2019). Así, la adenosina extracelular generada en condiciones de daño celular tiene efecto inmunomodulador y antiinflamatorio (Magni y Ceruti, 2020). Este incremento de adenosina es debido a la liberación de nucleótidos intracelulares y también causado por alteraciones en el metabolismo de la propia adenosina, pudiéndose producir por la inducción de ectoenzimas como CD37, por la inhibición de AC y ADA o por la disminución de la actividad de ENT (Ramakers et al., 2011; Vecchio et al., 2019).

3.3 Adenosina en psoriasis

La mayoría de los efectos antiinflamatorios e inmunosupresores de la adenosina están mediados por los receptores A_{2A} y A_3 , altamente expresados en las células inflamatorias e inmunes. Su activación reduce los procesos de migración celular, la diferenciación y activación linfocitaria, y la liberación de citocinas y otros mediadores inflamatorios (Cronstein y Sitkovsky, 2017). Precisamente, y como se ha comentado anteriormente, el efecto beneficioso del metotrexato en el tratamiento de la psoriasis se debe en parte al aumento de adenosina que éste produce y el consiguiente incremento del AMP_c vía A_{2A} AR (Hasko et al 2018). Por otra parte, el agonista A_3 AR piclidenosona se encuentra en ensayo clínico fase III para el tratamiento oral de psoriasis en placas, ya que, entre sus efectos, inhibe la proliferación de queratinocitos y la producción de citocinas proinflamatorias (Balogh et al., 2020; Cohen et al., 2018). Además de en células inflamatorias e inmunes, en la piel se han identificado receptores de adenosina en queratinocitos, fibroblastos, melanocitos, células de Langerhans, folículos pilosos y células endoteliales, entre otros tipos

celulares, si bien no se ha establecido exactamente su participación tanto en procesos fisiológicos como patológicos (Burnstock et al., 2012).

Es conocido que la activación del receptor A_{2A} , mayoritario en los fibroblastos de la dermis, induce la proliferación celular y la síntesis de colágeno, jugando un papel importante en la promoción de la cicatrización de heridas al favorecer la formación del nuevo tejido de granulación y la revascularización (Montesinos y Valls, 2010; Montesinos et al., 2002). En cambio, el AR mayoritario en la epidermis es el A_{2B} , y su activación inhibe la proliferación de los queratinocitos por aumento del Ca^{2+} intracelular (Andrés et al., 2017). Además, la expresión de este AR está reducida en la epidermis de pacientes psoriásicos, mientras que la expresión del AR A_{2A} aumenta. Esto sugiere un papel fisiológico del A_{2B} AR como regulador del crecimiento normal de los queratinocitos, que se perdería en la epidermis psoriásica, favoreciéndose la hiperproliferación por alteración de la ratio normal de expresión A_{2B}/A_{2A} (Andrés et al., 2017).

Curiosamente, este efecto fisiológico protector del A_{2B} AR se ha puesto de manifiesto recientemente en otros tipos celulares en los que éste es el AR mayoritariamente expresado, como las células del músculo liso de arteria coronaria (Dubey et al., 2015) o las células que conforman la barrera epitelial intestinal (Aherne et al., 2015). Estos resultados han hecho resurgir en la comunidad científica el interés en el estudio del A_{2B} AR, generalmente relegado por su baja afinidad por la adenosina y por la falta de ligandos potentes y selectivos. En este sentido, el reciente desarrollo de nuevos agonistas y antagonistas más selectivos y de alta afinidad ha favorecido este resurgimiento (Müller et al., 2020). En la Tabla 2 se resumen algunos de los nuevos agonistas y antagonistas A_{2B} , en comparación con adenosina o con 5'-N-etilcarboxamido adenosina (NECA), considerándolo como agonista A_{2B} clásico, pero no selectivo.

Tabla 2. Agonistas y antagonistas del receptor A_{2B}. Valores de Ki obtenido por estudios de unión de radioligando (Müller et al., 2020). NECA; 5'-N-etilcarboxamido adenosina.

Receptor A _{2B}	
Agonistas	Ki (nM) (h = humano, m = murino)
Adenosina	24000 (h)
NECA	1900 (h) 660 (m)
BAY60-6583	110 (h) 136 (m)
Capadenosona	1,2 (h)
Antagonistas	Ki (nM)
MRS-1754	1,97 (h) 3,12 (m)
MRS-1706	2,00 (h)
PSB-603	0,55 (h) 0,26 (m)
PSB-1115	53,4 (h) 1940 (m)

En estos nuevos estudios se ha puesto de manifiesto que el receptor A_{2B} presenta un papel dual en las células inflamatorias, ya que produce efectos proinflamatorios y antiinflamatorios (Effendi et al., 2020). Así, la activación $A_{2B}AR$ induce la liberación de IL-6 en macrófagos, la producción de L-1 β y VEGF en mastocitos (Cekic y Linden, 2016) y estimula la diferenciación de células dendríticas, promoviendo la respuesta inmune mediada por linfocitos Th17 (Cronstein y Sitkovsky, 2017). Paralelamente, la activación de $A_{2B}AR$ puede inhibir la adhesión neutrofílica o inducir un cambio fenotípico de macrófagos M1 a M2, disminuyendo la producción de TNF- α e IL-1 β (Effendi et al., 2020).

Así pues, el papel fisiopatológico del receptor A_{2B} plantea mucha controversia debido a las múltiples vías de señalización implicadas en su activación, ya que además de estar involucradas las proteínas de membrana G_s , G_i y G_q , también participan las MAPK (Vecchio et al., 2019) (Figura 8). Además, la expresión del $A_{2B}AR$ puede estar influenciada por cambios en el entorno celular, respondiendo a condiciones como inflamación, hipoxia o fibrosis (Vecchio et al., 2019). En este sentido, un entorno inflamatorio propiciado por citocinas reduce la expresión de este AR en queratinocitos humanos (Andrés et al., 2017).

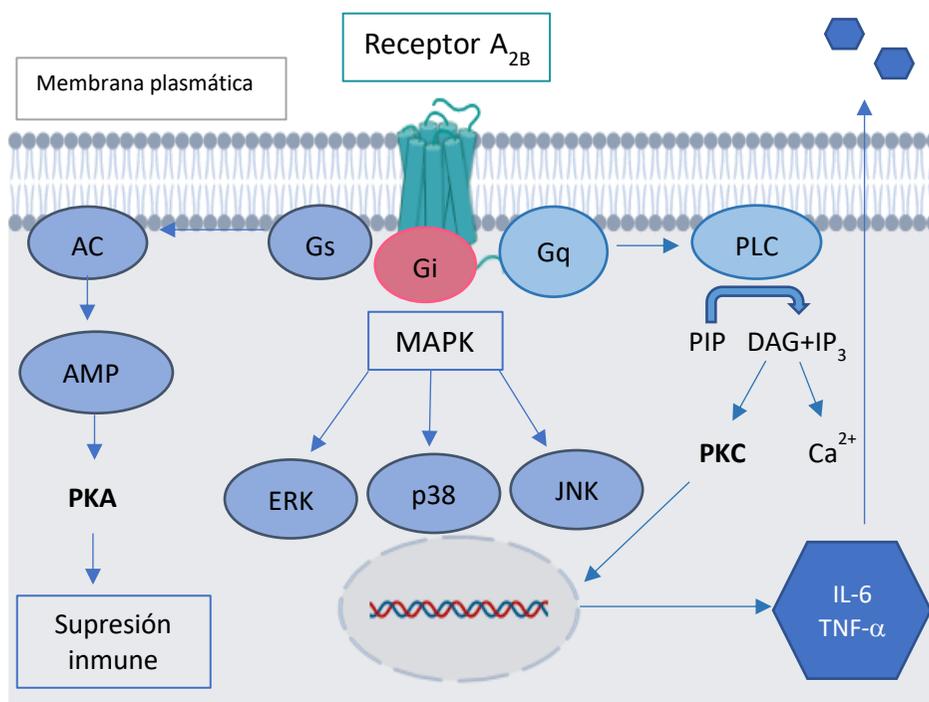


Figura 8. Efectos moleculares de la activación del receptor de adenosina A_{2B} . AC: adenil ciclasa; DAG: diacilglicerol; ERK: cinasas reguladas por señales extracelulares; IP_3 : inositol-trifosfato; JNK: c-Jun N-terminal cinasa; PIP_2 : fosfatidil inositol difosfato; PKA: protein cinasa A; PKC: protein cinasa C; PLC: fosfolipasa C.

En base a los estudios previos realizados en nuestro laboratorio, el receptor A_{2B} de adenosina juega un papel importante en el control de la proliferación de los queratinocitos humanos pero también en la regulación de la inflamación epidérmica, ya que disminuye la producción de citocinas proinflamatorias y quimiotácticas en este tipo celular (Andrés et al., 2017). La activación de este AR podría constituir por lo tanto una interesante estrategia terapéutica en el control del estado hiperproliferativo e inflamatorio de la piel psoriásica, si bien hasta el momento no se han realizado estudios *in vivo* a este nivel. Esta consideración dará pie al principal objetivo de la presente Tesis Doctoral.

Objetivos

Como se ha comentado en el apartado de introducción, el posible papel del A_{2B}AR en los distintos tipos celulares implicados en la patogenia de la psoriasis genera gran controversia. En estudios previos realizados en nuestro laboratorio se demostró que la activación de dicho receptor en queratinocitos humanos disminuía la proliferación celular y la producción de citocinas proinflamatorias, sugiriendo que la activación A_{2B}AR en la epidermis podría constituir una estrategia terapéutica en el control de patologías de la piel con componente proliferativo e inflamatorio.

Considerando estos antecedentes, el principal objetivo de la presente Tesis Doctoral es analizar por primera vez en un modelo *in vivo* de inflamación cutánea, el efecto de la activación de los A_{2B}AR, mediante la aplicación tópica de una agonista o un antagonista de dichos receptores. Para ello, se ha seleccionado el modelo de hiperplasia epidérmica en ratón inducida por TPA en el que se abordarán los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar el posible efecto beneficioso de la activación A_{2B}AR sobre las lesiones macroscópicas que se producen en este modelo *in vivo*
2. Confirmar el efecto antiproliferativo de la activación A_{2B}AR en la epidermis mediante técnicas histológicas e inmunohistoquímicas
3. Establecer el posible efecto antiinflamatorio de la activación A_{2B}AR y analizar los mecanismos involucrados
4. Profundizar en el posible papel fisiopatológico del A_{2B}AR en el mantenimiento de la función de la barrera epidérmica.

Materiales y métodos

1. Modelo de hiperplasia epidérmica en piel de ratón inducida por TPA

1.1 Moléculas en estudio y reactivos

En la presente tesis se ha estudiado el efecto de la administración tópica del agonista del receptor A_{2B} BAY60-6583 (BAY) en el modelo *in vivo* de hiperplasia epidérmica en piel de ratón. Paralelamente y para confirmar que los efectos observados son consecuencia de la activación de este receptor, hemos empleado en este estudio el antagonista selectivo del receptor A_{2B} PSB-1115 (PSB).

Tanto BAY (2-[6-amino-3,5-diciano-4- [4- (ciclopropilmetoxi) fenil] piridin-2-il] sulfanil acetamida), como PSB (4-(2,3,6,7-tetrahidro-2,6-dioxo-1-propil-1*H*-purin-8-il)-ácido bencensulfónico), han sido adquiridos a Tocris Bioscience (Bristol, UK) (Figura 9).

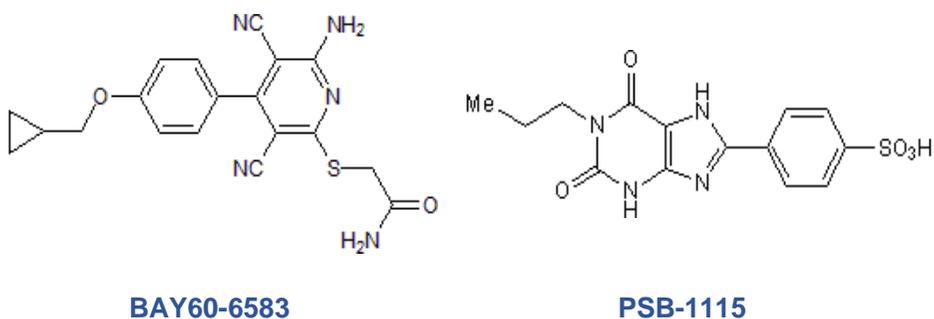


Figura 9. Estructura química de BAY60-6583 y PSB-1115

Para realizar el estudio, ambos productos son disueltos en acetona, que será el vehículo del tratamiento tópico. En el estudio preliminar se ha ensayado BAY a la dosis de 10 μ g/área. En la segunda fase del estudio se ha ensayado BAY a 1 y 10 μ g/área y PSB a 5 y 50 μ g/área con el fin de establecer un estudio dosis-respuesta y minimizar el riesgo de la pérdida

de especificidad que puede suceder cuando se emplean dosis muy elevadas.

Por otra parte, todos los reactivos empleados en la presente Tesis Doctoral que no están especificados en el correspondiente apartado han sido adquiridos de Sigma-Aldrich (San Louis, Missouri, USA).

1.2 Animales de experimentación

El manejo de los animales durante los estudios *in vivo* se realiza de acuerdo con la normativa europea para el manejo de animales de laboratorio. Los protocolos seguidos fueron aprobados por el Comité de Ética de Experimentación y Bienestar Animal de la Universidad de Valencia (Anexo I), según la normativa del Real Decreto 53/2013.

Se han empleado ratones hembra *Swiss CD1* (Janvier, Le Genest St Isle, Francia) de entre 6-8 semanas de edad y con un peso aproximado de 25-35 g. Los animales están estabulados en la Sección de Producción y experimentación Animal del Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCSIE) en la Facultad de Farmacia (Burjassot) donde se mantienen con unas condiciones de luz y temperatura estandarizadas (22 ± 3 °C, 60 % humedad relativa) y libre acceso a agua y comida, durante al menos una semana o periodo de adaptación.

1.3 Protocolo experimental

La aplicación de 12-O-Tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) en la piel de ratón induce la aparición de lesiones macroscópicas en la zona de aplicación que se caracterizan por presentar descamación, eritema y engrosamiento de la epidermis (Sato et al., 2004). La molécula TPA es un activador de PKC, de la que se conocen 10 isoformas las cuales regulan múltiples vías de señalización relacionadas con la diferenciación, proliferación y apoptosis celular (Breitkreutz et al., 2007). El tratamiento agudo con un agente activador de la PKC estimula la migración de neutrófilos así como la activación de la vía de señalización NF- κ B, la liberación de citocinas y la producción de ROS, induciendo la respuesta

inflamatoria (Yang et al., 2019). Por lo tanto, este modelo de hiperplasia en piel de ratón reproduciría parte de las características histopatológicas y alteraciones bioquímicas que caracterizan a la psoriasis en humanos (Ma et al., 2018; Rodríguez-Luna et al., 2017; Sato et al., 2004).

Día 0: se rasura el dorso de los ratones con una maquinilla eléctrica y posteriormente se depila la zona con crema depilatoria (Deliplus, Barcelona, España).

Día 1: tras 24 horas, los ratones que no presentan crecimiento de pelo o lesiones derivadas de la depilación son seleccionados y clasificados según el tratamiento que vaya a ser aplicado. Estos grupos se irán ampliando, dependiendo de la dosis de BAY o PSB a administrar.

- **Grupo 1:** Vehículo (acetona)
- **Grupo 2:** PSB
- **Grupo 3:** BAY
- **Grupo 4:** TPA
- **Grupo 5:** PSB+TPA
- **Grupo 6:** BAY+TPA
- **Grupo 7:** PSB+BAY+TPA

El tratamiento tópico se realiza en un área del dorso de los ratones previamente delimitada y con una superficie de aproximadamente 1cm². A partir de una solución madre realizamos diluciones para obtener las dosis de BAY (1 y 10 µg/área) y PSB (5 y 50 µg/área). Con una micropipeta administramos los productos (20 µl/sitio), diluidos en acetona (vehículo), en función del grupo al que pertenecen los ratones. El orden de aplicación de los productos es relevante; aplicándose siempre primero el antagonista (como en el caso del grupo 7), seguido del agonista y transcurrida media hora, el agente inflamatorio TPA (2nmol/sitio). Todos los grupos de

animales reciben el mismo volumen final de acetona, incluyendo los blancos (grupos 1, 2 y 3).

Días 2 y 3: se repite el procedimiento detallado en el día 1. Cada día, la evolución de las lesiones de los ratones es evaluada de manera visual por un observador independiente y puntuada mediante un *score* establecido previamente (Bhor y Pande, 2006) cuya escala varía de 0-4 en función de la gravedad de las alteraciones presentes (Tabla 3).

Tabla 3. Resumen de los criterios establecidos para la puntuación (*score*) de las lesiones observadas en los ratones.

Score	Descripción
0	Normal, no se observan lesiones
1	Lesión leve (incluyendo la aparición de eritema o irritación)
2	Lesión moderada, aparición de descamación
3	Lesión marcada
4	Lesión severa con ulceración

Día 4: tras la evaluación a tiempo final, los ratones son sacrificados mediante dislocación cervical. Obtenemos las biopsias de la piel tratada (1 cm²) con la ayuda de un sacabocados, que pesamos para la determinación del edema desarrollado. Seguidamente, cada biopsia es dividida en dos. Una mitad es fijada en paraformaldehído 4% y conservada entre 4-6°C, mientras que la otra es congelada a -80°C para su posterior homogenización.

1.4 Homogenización de las biopsias

Las biopsias, previamente congeladas a -80°C, son traspasadas a un recipiente con N₂ líquido. A continuación, se introducen en un cilindro congelado a -80°C y son pulverizadas y compactadas con la ayuda de un pistón y un martillo. El pulverizado obtenido es introducido en un *ependorf* con 1 ml de tampón de lisis, cuya composición está detallada

en la Tabla 4 y contiene un cóctel de inhibidores de proteasas. Tras sonicar en hielo (3 ciclos de 10 segundos) e incubar durante 10 minutos a 4°C, se centrifugan los homogenados dos veces (10000xg, 5 minutos, 4°C), recogiendo el sobrenadante y cambiando de *ependorf* entre la primera y la segunda centrifugación. Por último, obtenemos el sobrenadante final que congelamos a -80°C hasta la determinación de los distintos parámetros de estudio.

Tabla 4. Composición del TAMPÓN A de lisis celular (pH=8,0)			
HEPES 10 mM	DTT	1mM	
EDTA 1 mM	NaF	5mM	
EGTA 1 mM	Na ₃ VO ₄	1mM	
KCl 10mM	Leupeptina	1 µg/mL	
H ₂ O miliQ c.s.p	Aprotinina	0,1 µg/mL	
	PMSF	0,5 mM	

* DTT: ditioneitol; PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo

2. Procedimiento histológico

2.1 Procesamiento de las muestras

Las biopsias fijadas en paraformaldehído al 4% son deshidratadas en un gradiente creciente de etanol, xileno y dos baños de parafina, uno de cuatro horas y otro durante toda la noche a 70°C. Orientamos las biopsias en la dirección adecuada para los cortes histológicos y las incluimos en parafina utilizando un dispensador (*Tissue embedding System Tes 99*, Nunningen, Suiza). Una vez los bloques se han enfriado,

obtenemos secciones de 7 μ m con un microtomo Leica RM (Biosystems, Nussloch, Alemania), las cuales son montadas en portaobjetos Menzel-Gläser, Braunschweig, Alemania).

2.2 Tinción con hematoxilina y eosina (H&E)

Mediante esta tinción es posible visualizar las estructuras celulares ya que los núcleos de las células adquieren coloración violeta azulado debido a la afinidad de la hematoxilina por las moléculas de carácter ácido, mientras que el citoplasma y demás elementos celulares presentes en él adquieren una coloración rosada debido a la eosina.

Protocolo experimental:

Los cortes histológicos son rehidratados en un gradiente decreciente de alcoholes y son teñidos con hematoxilina de Harris durante 1 minuto. A continuación, son lavados para eliminar el colorante y sumergidos en una solución de diferenciación (ácido clorhídrico concentrado 25% en etanol 70°) durante 30 segundos. Seguidamente se tiñen con una solución de eosina al 50% en etanol 95° durante 90 segundos y se procede a la deshidratación de los cortes, que son montados con líquido de montaje DPX (Panreac, Barcelona, España).

2.3 Tinción de colágeno

Sirius Red /Fast Green

Esta técnica permite distinguir el colágeno del resto de componentes tisulares, ya que estos adquieren una coloración verde debido a *Fast Green* (FCF).

Protocolo experimental:

Tras la rehidratación de las muestras se tiñen con la solución I (300 ml ácido pícrico+0,03 g FCF 0.01%) durante 15 minutos. Lavamos los cortes histológicos con agua acidificada y teñimos las muestras en la solución II (300 ml ácido pícrico+0,12 g FCF 0.04%+0.3 g *Direct Red 80* 0.1%) durante

otros 15 minutos. Posteriormente, los cortes se lavan con agua acidificada, se deshidratan en una batería de alcoholes y se montan con medio no acuoso DPX (Panreac, Barcelona, España).

[Picrosirius Red](#)

Este método se basa en las propiedades anisotrópicas del colágeno al refractar la luz. La birrefringencia de esta molécula aumenta al emplear *Direct Red 80* que se orienta de manera paralela a las fibras de colágeno y que, mediante luz polarizada, nos permite distinguir los distintos tipos de fibras de colágeno presentes en el tejido (Rittié, 2017).

Protocolo experimental:

Después de la rehidratación, los núcleos se tiñen con hematoxilina Harris durante 1 minuto. A continuación, se lavan las secciones histológicas y se mantienen durante 1 hora en una solución de *Direct Red 80* al 0,1% en una solución acuosa saturada de ácido pícrico. Tras el lavado de las muestras con agua acidificada con ácido acético glacial, se montan en un medio no acuoso DPX (Panreac, Barcelona, España). Las imágenes son adquiridas con un microscopio Nikon Eclipse E800 (Nikon Instruments Europe, Amstelveen, Holanda) equipado con un filtro polarizador y una cámara digital (Nikon Digital Camera DXN 1200) mediante el programa Nikon ACT-1.

[2.4 Inmunohistoquímica](#)

La técnica de inmunohistoquímica (Figura 10) está basada en la detección de antígenos presentes en tejidos mediante anticuerpos específicos. La observación en el microscopio de esta unión es posible gracias a la conjugación con distintas enzimas como la fosfatasa alcalina o la peroxidasa, que es la utilizada en este protocolo, la cual actúa sobre su sustrato correspondiente, que en este caso es DAB (3,3'-diaminobencidina).

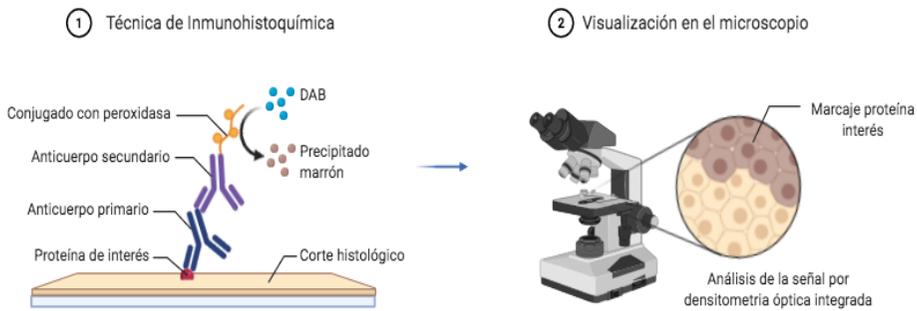


Figura 10. Representación esquemática de la técnica de inmunohistoquímica

Protocolo experimental:

Tras rehidratar las muestras, se realiza el proceso de recuperación antigénica, ya que, debido a los tratamientos químicos o físicos, como la fijación o el calor, la estructura de los antígenos se puede modificar impidiendo el reconocimiento de los epítomos antigénicos por el anticuerpo. Para ello, se introducen las muestras en tampón citrato 10 mM (pH=6,0) durante 10 minutos a 100°C, dejando reposar los cortes en el mismo tampón durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para iniciar el proceso de inmunotinción, se bloquea la actividad peroxidasa endógena de las muestras con una solución de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 3% en MeOH al 70%. A continuación, se lavan los cortes con PBS 1x y para minimizar uniones inespecíficas, se realiza un bloqueo con albúmina sérica bovina (BSA) al 2% diluida en PBS, incubándose durante 15 minutos a temperatura ambiente. A partir de este punto, el tampón de lavado empleado será PBS con Tween20 al 0,05%. Posteriormente se delimitan los cortes con un rotulador lipofílico. En cada portaobjetos se disponen varios cortes histológicos, uno de ellos sin anticuerpo primario que servirá como control negativo. Dependiendo del anticuerpo primario empleado, el tiempo de incubación y las condiciones varían. En la Tabla 5 se resumen los anticuerpos empleados y las principales características de cada uno de ellos.

Transcurrido el tiempo de incubación especificado para cada uno de los anticuerpos, los cortes histológicos se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente, con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa (1:100) (DAKO Dinamarca). Finalmente, se añade el sustrato cromogénico DAB (Vector Labs, USA), el cual es oxidado por la peroxidasa, dando una coloración marrón. Finalmente, se usa hematoxilina de Gill nº2 como contratinción nuclear y para observar al microscopio, los cortes se montan en medio acuoso (Agilent DAKO, Dinamarca).

Tabla 5. Anticuerpos primarios empleados en el estudio de inmunohistoquímica

Anticuerpo	Dilución	Condiciones incubación		Fabricante
		T(°C)	Tiempo	
Anti-Ki67	1:200	4°C	12 horas	ThermoFischer Scientific Waltham, USA
Anti-CK6	1:500	4°C	12 horas	R&D System, Abingdon, Reino Unido.
Anti-filagrina	1:500	Ambiente	1 hora	BioLegend, San Diego California USA
Anti-Ioricrina	1:500	Ambiente	1 hora	BioLegend, San Diego California USA
Anti-involucrina	1:500	Ambiente	1 hora	BioLegend, San Diego California USA
Anti-CK10	1:500	Ambiente	1 hora	Sigma-Aldrich. St. Louis, MO, USA
Anti-caspasa-14	1:500	Ambiente	1 hora	ThermoFischer Scientific Waltham, USA

2.5. Inmunofluorescencia

El protocolo llevado a cabo es similar al empleado en la técnica de inmunohistoquímica. Tras el rescate antigénico con tampón citrato se realiza el bloqueo con BSA y se delimitan los cortes con un rotulador lipofílico. Posteriormente se añade el anticuerpo primario correspondiente y se incuba durante el tiempo especificado en la Tabla 5. En este caso se emplea el anticuerpo secundario *Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit* (Molecular Probes™ Invitrogen, Paisley, UK) con una dilución 1:500 en PBS/BSA 1%, durante 1 hora a temperatura ambiente. En último lugar se añade el medio de montaje *ProLong™ Gold Antifade Mountant* con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Molecular Probes™ Invitrogen, Paisley, UK) con el fin de obtener la contratinción de los núcleos.

2.6 Evaluación de las alteraciones histológicas

Todas las determinaciones histológicas se han realizado en un tamaño muestral de 3 ratones por grupo, en los que se elegían cuatro campos aleatorios, obteniéndose la media aritmética y finalmente, un valor por ratón. Todas las imágenes son tratadas mediante el programa *Leica Application Suite* una vez adquiridas con un microscopio Leica DM IL LED acoplado a una cámara digital Leica DFC425 C (Solms, Alemania). Dicho programa ha sido empleado para cuantificar el grosor de la epidermis y la infiltración leucocitaria en las tinciones de H&E y el recuento de células ki67 positivas en la correspondiente inmunohistoquímica. Para la cuantificación de la expresión del resto de proteínas identificadas, se ha empleado el programa *ImageJ*, obteniendo los resultados mediante densitometría óptica.

3. Determinación de parámetros inflamatorios

3.1 Determinación de la actividad mieloperoxidasa

Este método detecta la actividad neutrofílica, ya que la MPO es una enzima lisosomal que utiliza el peróxido de hidrógeno generado por la activación neutrofílica para oxidar iones cloruro presentes en el medio, dando lugar a ácido hipocloroso, que posee un importante efecto bactericida. Un aumento en los niveles séricos de esta enzima indica activación neutrofílica que está implicada en la respuesta inflamatoria y la activación del sistema inmune innato (Chiang et al., 2019; Rosales, 2018).

Protocolo experimental:

Evaluamos la actividad MPO en los homogenados obtenidos de las biopsias de piel. El protocolo está basado en el descrito anteriormente por De Young y cols., 1989. Se incuban 5 µl de los homogenados con tampón PBS, tampón fosfato pH=5,4, H₂O₂ (0,052%) y 3,3',5,5'-tetrametil-benzidina (TMB) que será el sustrato de la reacción. Tras incubarse a 37°C durante 5-10 minutos, se detiene la reacción con ácido sulfúrico 2N (v/v), determinando la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro Wallac 1420 VICTOR3™ (PerkinElmer, Finlandia). La composición de los tampones empleados se describe en la Tabla 6.

Tabla 6. Tampones empleados en el estudio de la actividad MPO

Tampón fosfato (pH=5,4)		Tampón PBS (pH=7,4)	
Na ₂ HPO ₄	0,086 g	NaCl	8,00 g/l
NaH ₂ PO ₄	1,153 g	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	1,16 g/l
		KH ₂ PO ₄	0,20 g/l
		KCl	0,20 g/l

3.2 Determinación de citocinas por ELISA

El fundamento principal de la técnica ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorvent Assay*) se basa en la detección de un antígeno presente en una muestra biológica. En la técnica de ELISA en *sandwich* los pocillos son tapizados previamente con el anticuerpo primario o de captura que reconoce de manera específica el epítipo del antígeno de la muestra, que es añadido posteriormente. Al complejo formado anteriormente se le une un anticuerpo secundario o de detección y que está biotilado. A este anticuerpo secundario se une el conjugado de estreptavidina-peroxidasa que al añadir su sustrato enzimático producirá derivados coloreados que pueden ser cuantificados espectrofotométricamente.

Protocolo experimental:

Para llevar a cabo la determinación de IL-1 β , CXCL-1, IL-6 y TNF- α , se han seguido las recomendaciones de los correspondientes *kits* comerciales (Tabla 7).

Tabla 7. Datos sobre los kits empleados para la determinación de citocinas

Citocina	Sensibilidad	Fabricante
CXCL-1	15,6 pg/mL	PromoKine, Heidelberg, Germany.
IL-6	4,0 pg/mL	ThermoFisher Scientific, Waltham, USA.
IL-1 β	15,6 pg/mL	R&D Systems®, Minneapolis, USA.
TNF- α	31,3 pg/mL	R&D Systems®, Minneapolis, USA.

En líneas generales, el protocolo se basa en tapizar con el anticuerpo primario la placa de 96 pocillos e incubar durante 18 horas a 4°C (Figura 11). Al día siguiente, se lavan los pocillos con el tampón correspondiente y

se bloquea con BSA al 2% durante 1 hora. A continuación, y tras el posterior lavado, se añaden las muestras, en este caso los homogenados de piel de ratón, y la correspondiente curva patrón. Tras la adición del anticuerpo secundario biotinilado, se incuba durante el periodo indicado. Después de una serie de lavados, se añade la solución del conjugado estreptavidina-peroxidasa, incubando a temperatura ambiente el tiempo adecuado. Tras nuevos lavados, se añade la solución de TMB. Este sustrato cromogénico es oxidado por la enzima, dando lugar a la aparición de coloración azul. La adición de la solución de ácido sulfúrico 2N detiene la reacción y vira el color a amarillo. La absorbancia es cuantificada mediante un espectrofotómetro Wallac 1420 VICTOR3™ (PerkinElmer, Finlandia) a 450nm.

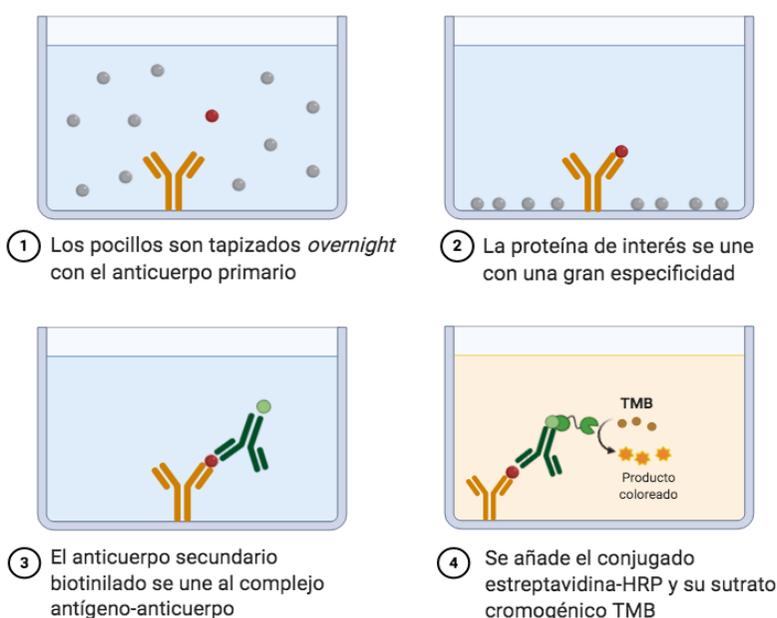


Figura 11. Representación esquemática de la técnica de ELISA

3.3 Análisis por Western Blot

La técnica de Western Blot permite la detección de proteínas en una muestra biológica. En primer lugar, es necesaria la desnaturalización de las proteínas, tras lo que son separadas en función de su peso molecular

por electroforesis en un gel de poliacrilamida. A continuación, las proteínas son transferidas del gel a una membrana que será el soporte sintético donde se encuentran inmovilizadas las proteínas. Para la identificación de una proteína en concreto, incubaremos la membrana con el anticuerpo específico, de manera que reconocerá el epítipo del antígeno, en este caso, la proteína de interés. A continuación, se incuba con un anticuerpo secundario acoplado a un sistema de detección enzimática que al añadir el sustrato emitirá una señal detectada por quimioluminiscencia. De esta manera se puede asociar la intensidad de la señal obtenida con la cantidad de proteína presente en los diferentes grupos.

Preparación de las muestras:

La concentración de proteína en cada muestra es analizada empleando el reactivo *DC Bio-Rad Protein* (Laboratorios Bio-Rad, California, USA) empleando BSA como curva patrón. Los tampones y reactivos empleados a lo largo del protocolo de Western Blot se recogen en la Tabla 8. Una vez cuantificada la concentración de proteínas, diluimos las muestras con tampón de carga Laemmli en una proporción (1:5) para asegurar que la cantidad de proteína en cada pocillo es equivalente. A continuación, calentamos las muestras a 99°C durante 5 minutos para que se produzca la desnaturalización y la pérdida de la estructura terciaria de las proteínas.

Electroforesis:

Las proteínas contenidas en las muestras (20µg) son separadas en un gel de acrilamida/bisacrilamida-dodecilsulfato sódico (SDS), utilizando un equipo de electroforesis (Laboratorios Bio-Rad, Madrid, España) y el correspondiente tampón (Tabla 8). Al emplear el tampón de carga de Laemmli, las condiciones de electroforesis son desnaturalizantes o reductoras, ya que contiene SDS que se une de forma regular a las proteínas confiriendo una carga neta negativa proporcional al peso molecular de la misma. Por otro lado, el SDS evita las interacciones

hidrofóbicas, rompiendo los puentes de hidrógeno y junto al ditioneitol (DTT), presente también en el tampón y que rompe los puentes disulfuro, favorecen la linealización completa de la proteína. Al aplicarse un campo eléctrico, las proteínas cargadas negativamente migrarán hacia el cátodo y la tasa de migración dependerá de su peso molecular; las moléculas más pequeñas migran más rápidamente que aquellas con pesos moleculares mayores.

Otras consideraciones a tener en cuenta con respecto al gel son su espesor y el tamaño de poro del mismo. El espesor determina la capacidad de volumen de carga pero a mayor grosor las condiciones de transferencia pueden variar. El tamaño de poro viene determinado por el porcentaje de acrilamida y bisacrilamida que adecuaremos en función del tamaño de la proteína. En el caso de los experimentos de la presente tesis, los geles empleados han sido al 10%.

Una vez se han cargado los pocillos con las muestras, se aplica un voltaje de 110mV durante aproximadamente 15 minutos hasta que todas las muestras atraviesan la banda superior del gel o *stacking*. A continuación, se aumenta el voltaje a 140mV durante 45 minutos aproximadamente para que las proteínas se separen por su peso molecular.

Transferencia:

Una vez las proteínas han migrado se lleva a cabo la transferencia del gel, aplicando una corriente de 125 mA durante 50 minutos aproximadamente, a una membrana de difluoruro de polivinilo (PVDF) (GE Healthcare Life Sciences, Barcelona, España) que presenta una gran resistencia mecánica y mayor unión que las de nitrocelulosa. El método de transferencia empleado ha sido el semiseco ya que presenta ventajas, como la economización de reactivos, y disminución del tiempo necesario para la transferencia. Previamente, la membrana es activada con metanol y se coloca en estrecho contacto con el gel, que cubrimos en ambas caras

con papel de filtro mojado en tampón de transferencia. Aplicamos una corriente eléctrica entre dos electrodos planos, humedeciendo todo el montaje previamente con tampón de transferencia. Para comprobar los residuos de proteína en el gel, lo teñimos con azul de Coomassie. Los geles son sumergidos en el colorante durante 90 minutos en agitación. Después, son tratados con un disolvente durante 12 horas que elimina el colorante, quedando teñidas con mayor intensidad las bandas de proteínas.

Tabla 8. Tampones empleados en el protocolo experimental de Western-Blot

PBS (pH=7,4)		Tampón de carga Laemmli	
KH ₂ PO ₄	1,09 g	DTT	30,8 mg
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	1,09 g	SDS 20%	200 mg
NaCl	9,00 g	Tris 1M pH=6,8	60 ml
H ₂ O miliQ	c.s.p 1l	Glicerol 100%	200 ml
		Azul de bromofeno	40 ml
		H ₂ O miliQ	c.s.p 1ml

Tampones	Electroforesis	Transferencia	Azul de Coomasie	
Glicina	15,00 g	14,4 g	Azul de coomasie	2,50 g
Trizma base	3,00 g	3,00 g	MeOH	450,00 ml
SDS 20%	5,00 ml	-	Ác. acético glacial	100,00 ml
Metanol	-	200 ml	H ₂ O miliQ	c.s.p.1l
H ₂ O miliQ	c.s.p 1l	c.s.p 1l		

Solución <i>RUNNING</i>		Solución <i>STACKING</i>	
Gel al 10%			
H ₂ O mili Q	4,9 ml	H ₂ O mili Q	3,68 ml
Tris HCl 3M pH 8,7	1,12 ml	Tris HCl 1M pH 6,8	0,63 ml
Acril-Bisacrilamida	3,00 ml	Acril-Bisacrilamida	0,65 ml
SDS 20 %	50,00 µl	SDS 20 %	25,00 µl
TEMED*	5,00 µl	TEMED	5,00 µl
APS* 10 %	50,00 µl	APS 10 %	25,00 µl

*TEMED:N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina; *APS: persulfato amónico; c.s.p: cantidad suficiente para.

Incubación de la membrana y revelado:

Las membranas son bloqueadas para reducir los lugares de unión no específicos con BSA 3% (p/v) disuelto en tampón PBS-Tween20 (0,1%) durante 1 hora, con agitación y a temperatura ambiente. Posteriormente se incuban las membranas *overnight*, a 4°C y con agitación con los anticuerpos primarios específicos (recogidos en la Tabla 9), diluidos en tampón PBS-Tween20 y BSA al 3%. Tras lavar las membranas tres veces con PSB-Tween20 (0,1%), se incuban con el anticuerpo secundario Anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa (1:5000) (Dako, Glostrup, Denmark) durante 1 hora, en agitación y a temperatura ambiente. Para el revelado de las membranas se tratan durante 2 minutos con una solución de Luminol y peróxido de hidrógeno a partes iguales. La peroxidasa acoplada al anticuerpo secundario cataliza la oxidación del Luminol en presencia del peróxido de hidrógeno. La señal de quimioluminiscencia emitida es detectada por un equipo computarizado de revelado denominado *Autochemi™ System* (UPV Inc., Upland, CA, USA), que permite capturar secuencialmente las imágenes con el programa *LabWorks™* 4.6. Las intensidades de las bandas obtenidas en el revelado de las membranas son determinadas por densitometría utilizando el programa *Image J*.

Tabla 9. Anticuerpos primarios utilizados en los ensayos de Western Blot

Anticuerpo primario	Peso molecular	Dilución	Fabricante
Procaspasa-14 Caspasa-14	28-37 kDa 11-17 kDa	1:1000	ThermoFisher Scientific Waltham, USA
Filagrina	26-45 kDa	1:1000	BioLegend. San Diego, CA, USA
β-actina	42 kDa	1:5000	Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA

Posteriormente, las membranas son incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo de la proteína control β -actina y a continuación, con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Dako, Glostrup, Denmark).

Para señalar el peso molecular de las proteínas empleamos el marcador *Precision Plus Protein^{MT} Standards* (BIO-RAD Laboratorios, Madrid, España) que contiene proteínas con pesos moleculares conocidos. Además, los valores de densitometría de la proteína de interés se normalizan respecto a la densitometría de la proteína control, revelada en la misma membrana. En la Figura 12 se resume los pasos descritos en el protocolo de Western-Blot.

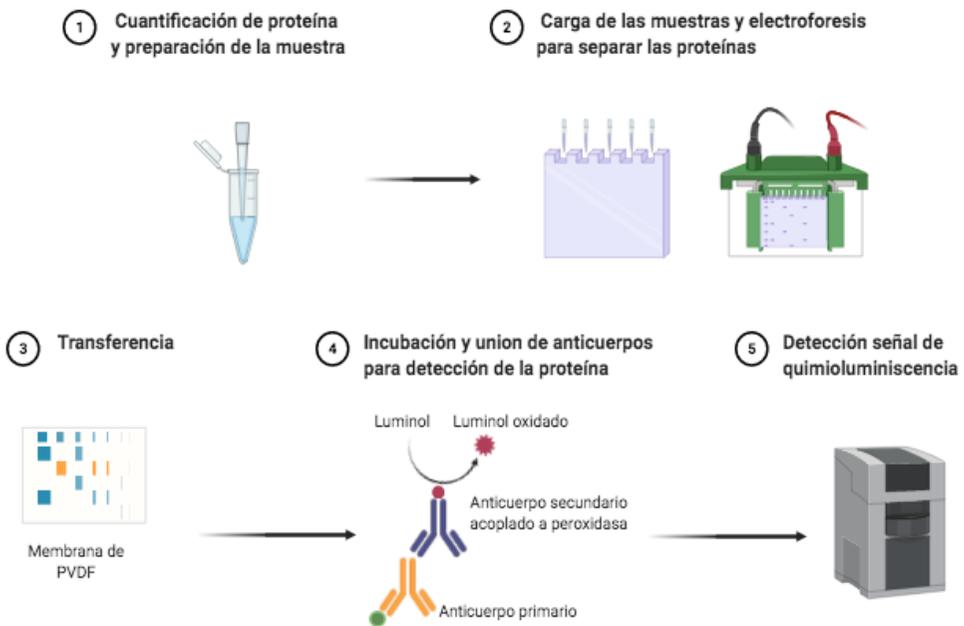


Figura 12. Representación gráfica y esquemática del protocolo Western-Blot. PVDF: fluoruro de polivinilideno.

4. Análisis estadístico y expresión de los resultados

Los resultados se han presentado como media aritmética de los valores \pm desviación estándar de la media (SD). n representa el número de animales utilizado por grupo. Los resultados obtenidos se han sometido a distintos tratamientos estadísticos en función de los datos analizados, mediante el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA).

En la mayoría de los casos se ha utilizado el método ANOVA de una variable seguido del post-test de Tukey, el cual permite hacer una comparación múltiple de todos los posibles pares de datos entre todos los grupos testados. Se considera que existe diferencia significativa entre los grupos con un valor de p menor de 0,05 cuando el valor t obtenido es mayor que el tabulado para un nivel de confianza del 95%. Además, esta diferencia puede ser muy significativa para p menor de 0,01 (nivel de confianza del 99%) o para p menor de 0,001 (niveles de confianza del 99,9%). Se ha utilizado los siguientes símbolos:

(*) para las comparaciones respecto al grupo vehículo tratado con acetona

(#) para las comparaciones respecto al grupo vehículo tratado con TPA

(+) para las comparaciones respecto al grupo tratado con BAY.

Resultados

1. Prueba de concepto: estudio preliminar del efecto del agonista A_{2B}AR BAY60-6583 en el modelo de hiperplasia epidérmica en ratón

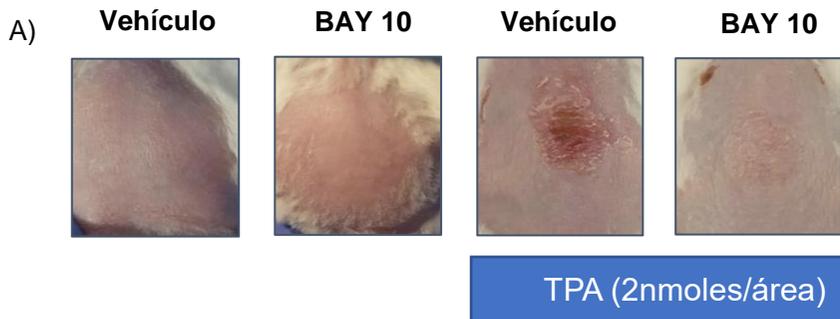
Como se ha indicado anteriormente, los estudios sobre la implicación de los A_{2B}AR en diferentes sistemas biológicos se han visto limitados por la escasez de compuestos selectivos para este tipo de receptor. Por tanto, existen relativamente pocos estudios *in vivo* con el agonista BAY60-6583, el primero comercializado. Adicionalmente, la vía tópica de administración presenta ciertas particularidades derivadas de la diferente naturaleza hidrofóbica/hidrofílica de las distintas capas de la epidermis. Así pues, en una primera fase se ha determinado el efecto de la aplicación tópica de BAY en este modelo experimental a la dosis de 10 µg/área, elegida como dosis inicial para establecer de manera orientativa su potencial efecto farmacológico y la posible aparición de efectos adversos.

Debido a que no hay datos sobre la administración de BAY vía tópica, la elección de la dosis de este agonista se ha realizado en base al rango de dosis empleado en este mismo modelo para el estudio del agonista del receptor A_{2A}, CGS-21680 (CGS) (Arasa et al., 2014) y en los resultados obtenidos en el estudio concentración-dependiente realizado previamente con CGS y BAY en queratinocitos humanos (Andrés et al., 2017).

1.1 Efecto sobre la lesión cutánea y el edema

Tras la aplicación de TPA durante tres días consecutivos, se produce la aparición de una lesión cutánea en la zona administrada, que como ya se ha comentado, por sus características fenotípicas se asemeja a las lesiones psoriásicas humanas (Amigó et al., 2007; Sato et al., 2004). En la Figura 13A se observa cómo, a nivel macroscópico, la aplicación de BAY reduce la gravedad de la lesión inducida por TPA, mientras que no produce ninguna alteración en la piel cuando se administra únicamente con el vehículo. Cada una de las biopsias obtenidas es pesada para

determinar el grado de desarrollo de edema, ya que el aumento de peso se relaciona con la extravasación de líquidos debido a la respuesta inflamatoria producida. En la Figura 13B se observa como el tratamiento con BAY disminuye el edema de forma estadísticamente significativa con respecto al grupo control tratado únicamente con TPA.



B)

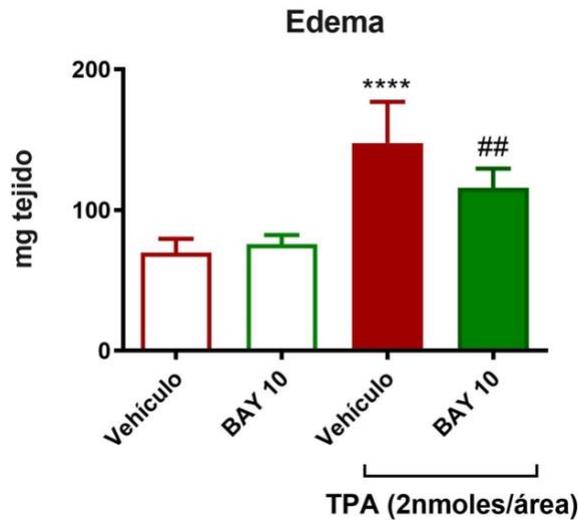


Figura 13. Efecto de la aplicación de BAY sobre la lesión cutánea y el desarrollo del edema. (A) Imagen representativa de la lesión cutánea para cada grupo de tratamiento. (B) Edema desarrollado medido por el peso de las biopsias obtenidas. BAY 10: 10 μ g/área. Los datos son representados como media \pm SD (n= 6). **** p <0,0001 vs. grupo vehículo; ## p <0,01 vs. grupo vehículo+TPA. Test ANOVA seguido de Tukey's post-test.

1.2 Estudio histopatológico

La tinción de hematoxilina y eosina (H&E) muestra los cambios en la arquitectura epidérmica tras el tratamiento con TPA (Figura 14) como la aparición de invaginaciones epidérmicas, características de la acantosis psoriasiforme, y el engrosamiento de la epidermis debido al aumento descontrolado de la proliferación de queratinocitos, lo que se conoce también como hiperplasia epidérmica.

Así mismo, se observa en el grupo control tratado con TPA, un engrosamiento de la dermis como consecuencia del edema producido, y un aumento del infiltrado celular, que visualmente se ven en parte inhibidos tras el tratamiento con BAY.

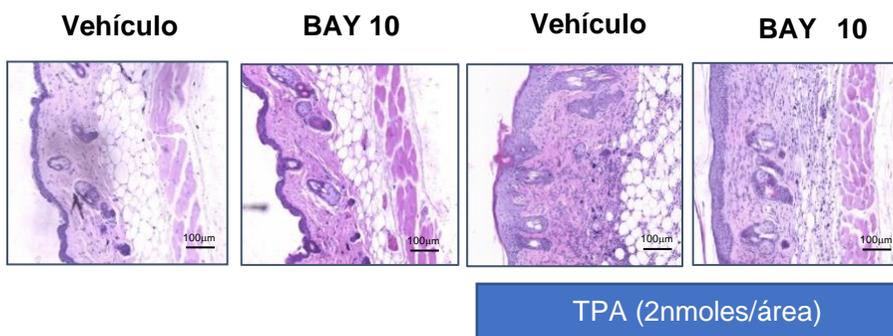


Figura 14. Efecto de BAY sobre las alteraciones histológicas inducidas por TPA. Imagen representativa de los cortes histológicos de las biopsias teñidos con H&E. BAY 10: 10µg/área. Barra de escala=100µm.

El nivel de hiperplasia epidérmica ha sido cuantificado mediante la medida del grosor de la epidermis en 4 zonas diferentes del mismo corte histológico, empleándose 3 cortes por ratón y considerándose representativo 3 ratones por grupo. Como se muestra en la Figura 15, el tratamiento con BAY reduce significativamente dicho parámetro, confirmando la capacidad de este agonista A_{2B} para controlar la hiperplasia epidérmica que se desarrolla tras el tratamiento con TPA

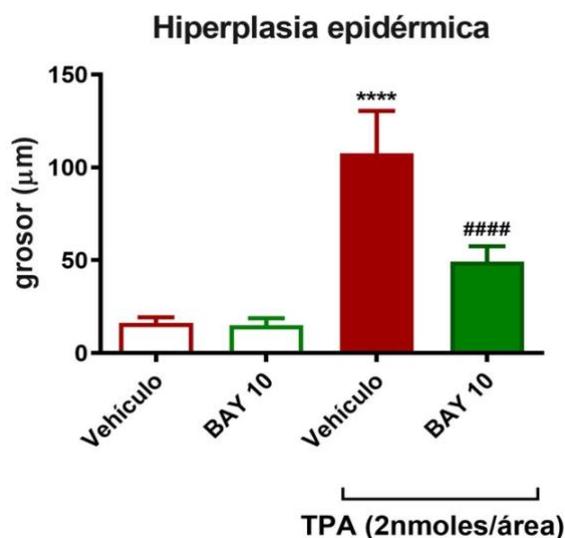


Figura 15. El tratamiento con BAY disminuye la hiperplasia epidérmica inducida por TPA. Los datos son representados como media \pm SD (n= 3). **** p <0,0001 vs. grupo vehículo; #### p <0,0001 vs. grupo vehículo+TPA. Test ANOVA seguido de Tukey's post-test

1.3 Estudio del efecto de BAY sobre la síntesis de colágeno

La adenosina promueve la proliferación y la síntesis de colágeno en los fibroblastos dérmicos por activación de los receptores A_{2A} , (Montesinos et al., 1997; Perez-Aso et al., 2013). Este efecto también había sido confirmado durante el estudio *in vivo* del agonista A_{2A} CGS-21680 en este modelo de hiperplasia epidérmica en ratón (Arasa et al., 2014). Por lo tanto, en el presente trabajo, hemos considerado de interés analizar el posible papel de un agonista de los receptores A_{2B} a este nivel.

El efecto de BAY sobre la síntesis de colágeno ha sido determinado mediante dos tinciones histológicas específicas de esta proteína estructural. Tras la tinción *Fast-Green Sirius Red* (Figura 16A) es posible visualizar las fibras de colágeno que aparecen teñidas de rojo frente al resto de componentes tisulares, que adquieren una tinción verde. El TPA es un derivado de forbol que puede inducir la síntesis de colágeno en función de la duración del estímulo (Fukaya et al., 2013). Se observa cierto

aumento de la densidad de empaquetamiento de fibras de colágeno rojas en los cortes correspondientes a ratones tratados con TPA frente a los tratados con el vehículo. Sin embargo, el tratamiento con BAY no afecta a la presencia de fibras teñidas de rojo si se compara con el grupo vehículo o con vehículo+TPA respectivamente, sugiriendo que la activación de los receptores A_{2B} no afecta a este nivel.

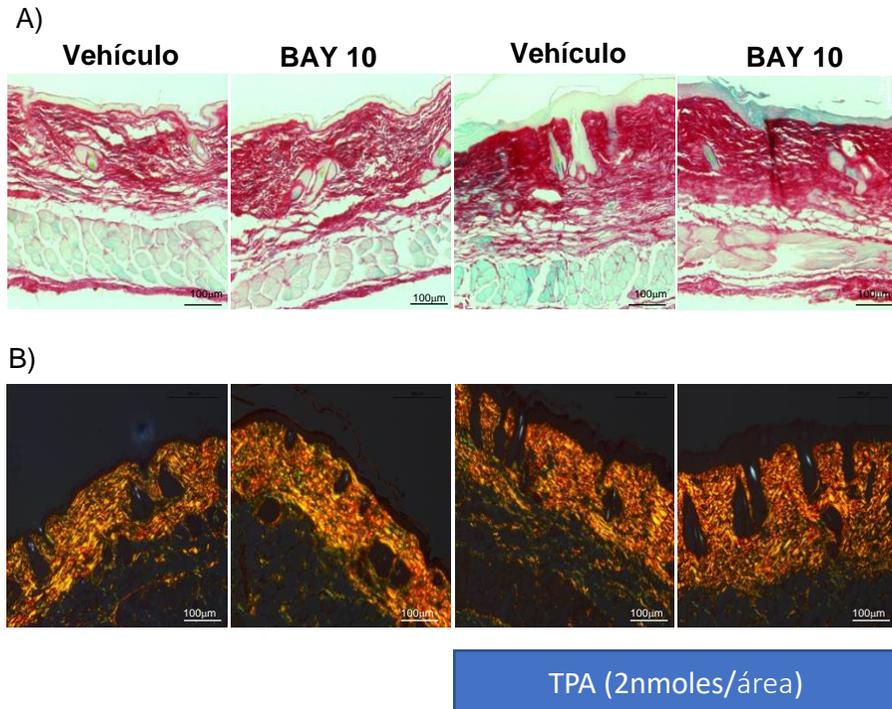


Figura 16. Estudio histológico del efecto de BAY sobre la síntesis de colágeno. (A) Tinción Fast Green-Sirius Red. (B) Tinción Picro-Sirius Red visualizada bajo luz polarizada. Imágenes representativas de tres animales por grupo. BAY 10: 10 μ g/área. Barra de escala= 100 μ m.

Por otra parte, la tinción Picro-Sirius Red (Figura 16B) permite distinguir mediante luz polarizada la coloración rojiza-amarillenta del colágeno de tipo I y la coloración verde-azulada del colágeno tipo III, ambos característicos de la piel. En ningún caso se observan diferencias con respecto a ambos tipos de colágeno entre los grupos tratados con BAY y

los grupos vehículo con o sin TPA, corroborando la ausencia de efecto de BAY a nivel de la síntesis de colágeno en la dermis.

1.4 Determinación de mediadores relacionados con la infiltración leucocitaria

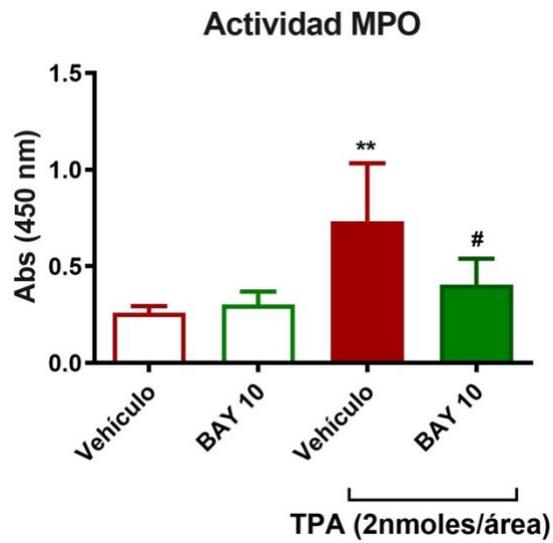
Tras observar en la tinción H&E el aumento de infiltración neutrofílica en la dermis de las biopsias de animales tratados con TPA, se ha abordado el estudio de dos parámetros directamente relacionados con la activación de neutrófilos, empleando para ello los homogenados obtenidos de las biopsias.

En primer lugar, se ha determinado la actividad MPO, presente en los gránulos azurófilos de los neutrófilos y, por lo tanto, directamente relacionada con la infiltración neutrofílica inducida por el TPA. El incremento de la actividad MPO ha sido descrito en placas psoriásicas, estando directamente relacionada con la severidad de la enfermedad (Chiang et al., 2019).

Por otra parte, se han determinado los niveles de la quimiocina CXCL-1, liberada por diversos tipos celulares como queratinocitos, y fibroblastos, la cual favorece el reclutamiento de neutrófilos circulantes (Chiang et al., 2019; Chiricozzi et al., 2018)

En la Figura 17 se observa como la aplicación de BAY en la piel de los ratones tratados con TPA, reduce de manera significativa la actividad MPO con respecto al grupo vehículo+TPA. Los niveles de CXCL-1 también tienden a ser reducidos tras el tratamiento con BAY, si bien los resultados no llegan a ser estadísticamente significativos.

A)



B)

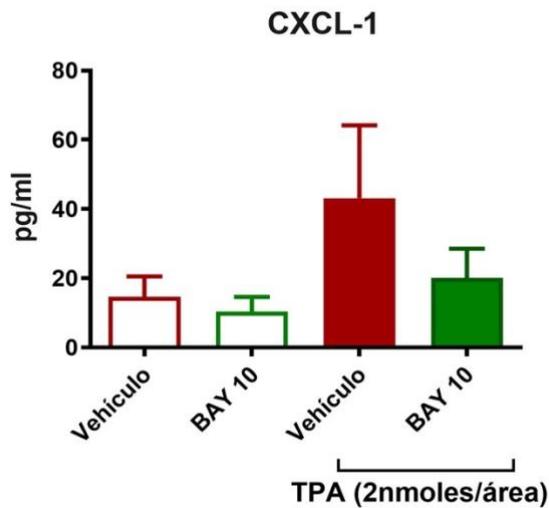


Figura 17. Efecto de BAY sobre parámetros relacionados con la infiltración leucocitaria. (A) Actividad mieloperoxidasa. (B) Niveles de CXCL-1. Los datos son representados como media \pm SD ($n=6$). ** $p<0,01$ vs. grupo vehículo; # $p<0,05$ vs. vehículo+TPA. Test ANOVA seguido de Tukey's post-test

El efecto antiproliferativo que produce la activación del receptor A_{2B} ha sido previamente evaluado en estudios *in vitro* realizados en queratinocitos humanos (Andrés et al., 2017). Los resultados de este estudio preliminar indican que la activación del receptor A_{2B} tras la aplicación tópica de BAY reduce la hiperplasia epidérmica inducida por TPA. Por tanto, se demuestra por primera vez en un modelo *in vivo* el efecto antiproliferativo que produce la activación de este receptor.

Por otra parte, BAY no afecta a la síntesis de colágeno en la dermis, a diferencia de la activación de los $A_{2A}AR$, subtipo de receptores de adenosina mayoritariamente expresado en la dermis y responsable de la proliferación de fibroblastos y síntesis de colágeno a este nivel (Perez-Aso et al., 2013; Shaikh y Cronstein, 2016).

Además, la activación de los $A_{2B}AR$ tras la aplicación tópica de BAY demuestra un claro perfil antiinflamatorio, reduciendo tanto el edema como la infiltración leucocitaria inducida por TPA.

En vista de todos estos resultados, se ha planteado la segunda fase del estudio en la que se realiza un estudio dosis-respuesta de BAY, en presencia y ausencia de un antagonista A_{2B} , con el fin de confirmar que los efectos obtenidos son dependientes del receptor.

Paralelamente se han determinado nuevos parámetros que nos permitirán profundizar en el potencial papel beneficioso de la activación $A_{2B}AR$ a nivel de la hiperplasia epidérmica y la reacción inflamatoria cutánea.

2. Estudio del agonismo/antagonismo A_{2B}AR en el modelo de hiperplasia epidérmica en ratón

En los ensayos realizados en este apartado, se ha abordado el estudio del agonista A_{2B} BAY60-6583 a las dosis de 1 y 10 µg/área. Por otra parte, se ha seleccionado el antagonista selectivo del receptor A_{2B}, PSB-1115 (PSB), por ser el más ampliamente utilizado para los estudios *in vivo* en la bibliografía consultada.

Las dosis de PSB ensayadas han sido de 5 y 50 µg/área en base al ratio 1:5 (relación de dosis agonista/antagonista) establecido en todos los estudios referenciados que emplean ambas moléculas, siendo la dosis de PSB administrada siempre 5 veces mayor que la dosis de BAY (Xu et al., 2018; Sorrentino et al., 2015; Iannone et al., 2013; Hart et al., 2009; Eckle et al., 2008).

En los diferentes grupos de ratones establecidos, las dosis de BAY y PSB se han ensayado en presencia y en ausencia de TPA, mientras que la interacción agonista-antagonista se ha realizado siempre en presencia de TPA. En este caso, el orden de administración de los productos ha sido primero el antagonista, seguido del agonista y finalmente el TPA.

En la Tabla 10 se resumen los grupos de animales establecidos en función del tratamiento. Según el procedimiento de experimentación animal aprobado para la realización de este ensayo, el número de animales por grupo ha sido n=6 excepto en el grupo vehículo+TPA (n=10).

Tabla 10. Grupos de animales y tratamientos	
Vehículo (acetona)	
PSB 5 µg/área	
BAY 1 µg/área	
PSB 50 µg/área	
BAY 10 µg/área	
Vehículo (acetona)	+ TPA
PSB 5 µg/área	+ TPA
BAY 1 µg/área	+ TPA
PSB 5 µg/área + BAY 1 µg/área	+ TPA
PSB 50 µg/área	+ TPA
BAY 10 µg/área	+ TPA
PSB 50µg/área + BAY 10µg/área	+ TPA

2.1. Evaluación del desarrollo de las lesiones cutáneas

En la Figura 18 se muestran imágenes representativas de cada grupo de tratamiento a tiempo final del experimento. En los animales tratados con TPA, se observa como la aplicación de BAY a 1 y 10 µg/área reduce de manera visible la severidad de las lesiones inducidas por el estímulo, mientras que el tratamiento con el antagonista PSB, produce lesiones similares (PSB 5 µg/área) o incluso superiores (PSB 50 µg/área) a las inducidas por TPA. En los grupos donde se administra el agonista en presencia de antagonista, se revierte en parte el efecto beneficioso de BAY, produciéndose un grado de lesión intermedia.

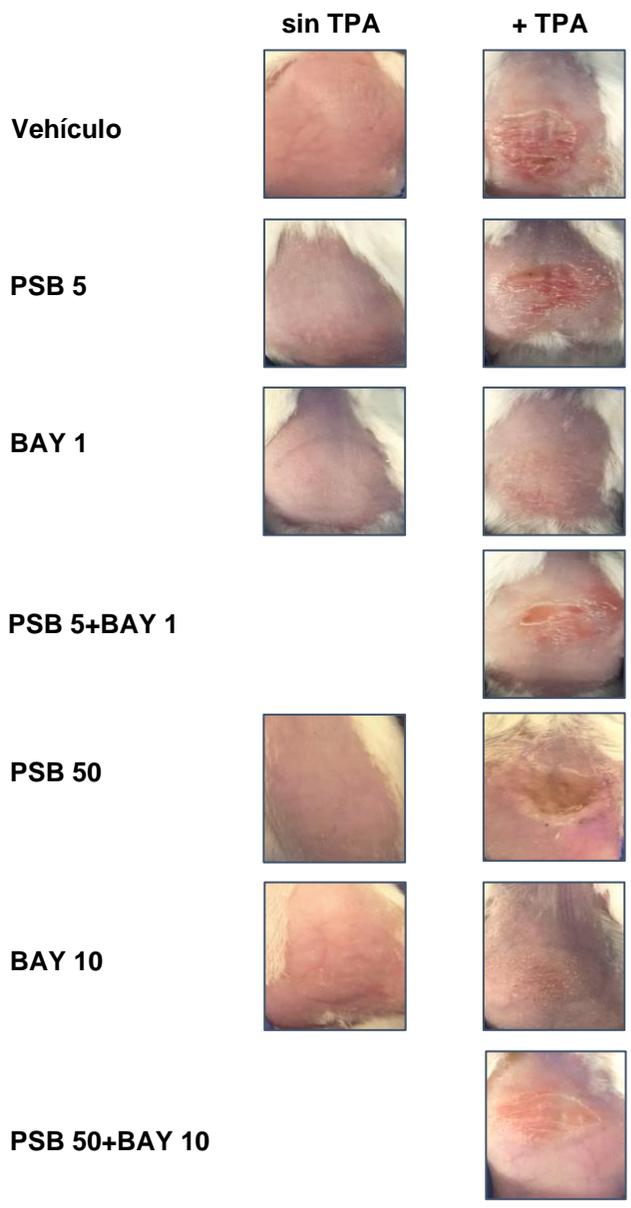


Figura 18. Efecto de BAY y PSB sobre las lesiones macroscópicas inducidas por TPA. Imagen representativa de la apariencia de las lesiones producidas en el área de administración a tiempo final del experimento.

Para cuantificar la evolución de las lesiones a lo largo de los tres días del experimento, se evalúa visualmente la severidad de las heridas teniendo en cuenta diversos parámetros como la aparición de eritema, descamación y la ulceración de las mismas. La puntuación o *score* se obtiene tras la valoración con una escala que varía entre 0 y 4, donde 0 indica la ausencia de lesión en la zona de aplicación; 1 aparición de irritación; 2 irritación y eritema; 3 aparición de lesión; 4 lesión ulcerada. En la Figura 19 se muestra el resultado del *score* en el día final del experimento, el cual se correlaciona con el aspecto visual de las imágenes observadas en la Figura 18. Los resultados indican que el tratamiento con BAY reduce significativamente la severidad de las lesiones a ambas dosis ensayadas, mientras que en los tratamientos conjuntos de PSB+BAY, el antagonista revierte de manera significativa, el efecto beneficioso de BAY.

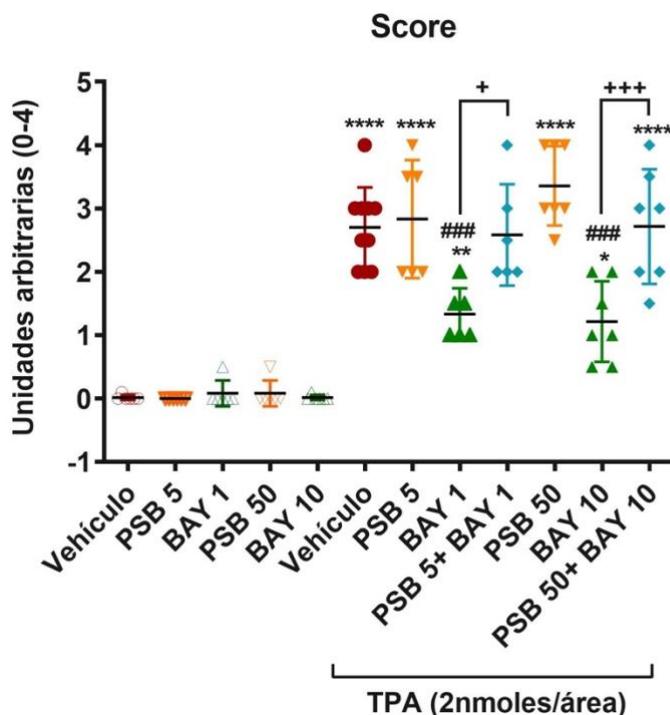


Figura 19. Evaluación de las lesiones a tiempo final del experimento. Datos representados como media \pm SD (n= 6-10). **** p <0,0001, ** p <0,01, * p <0,05 vs. vehículo; ### p <0,001 vs. vehículo+TPA; + p <0,05 vs. BAY 1, +++ p <0,001 vs. BAY 10. Test ANOVA seguido de Tukey's post-test.

2.2. Evaluación del edema

Una vez sacrificados los animales, las biopsias obtenidas son pesadas para determinar el grado de edema generado. En la Figura 20 se muestra cómo el tratamiento con BAY a ambas dosis reduce de manera significativa el edema, aunque no se observa una clara relación dosis-efecto. La aplicación del antagonista PSB antes del tratamiento con BAY tiende a revertir la reducción del edema, siendo el resultado significativamente estadístico a la dosis más alta (grupo PSB 50+BAY 10).

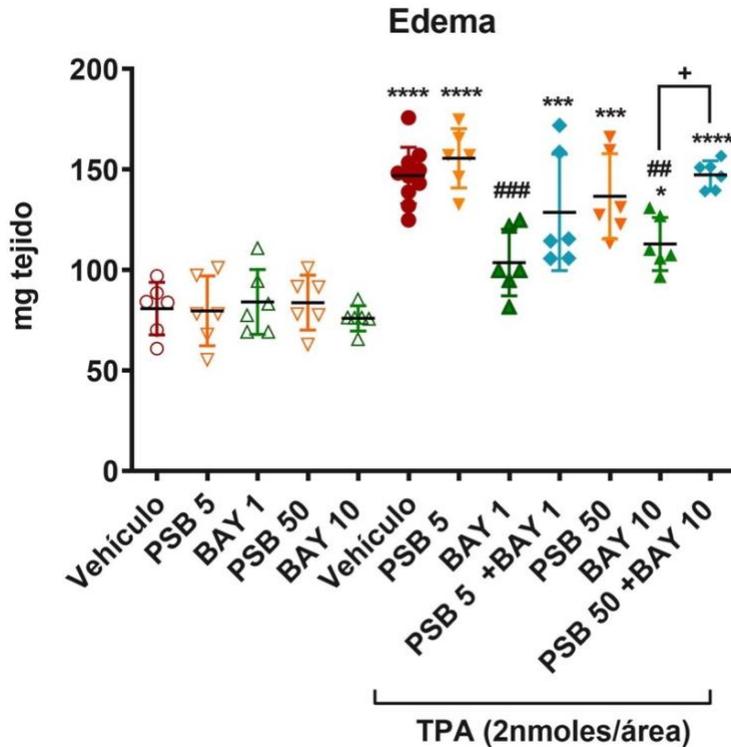


Figura 20. Evaluación del edema. Los datos son representados como media \pm SD (n= 6-10). **** p <0,0001, *** p <0,0001, * p <0,05 vs. vehículo; ### p <0,001, ## p <0,01 vs. vehículo+TPA; + p <0,05 vs. BAY10. ANOVA seguido de Tukey's post-test.

2.3. Estudio histopatológico mediante tinción H&E

Realizamos la tinción de H&E para analizar los cambios que aparecen en la piel tras la aplicación de los diferentes tratamientos (Figura 21).

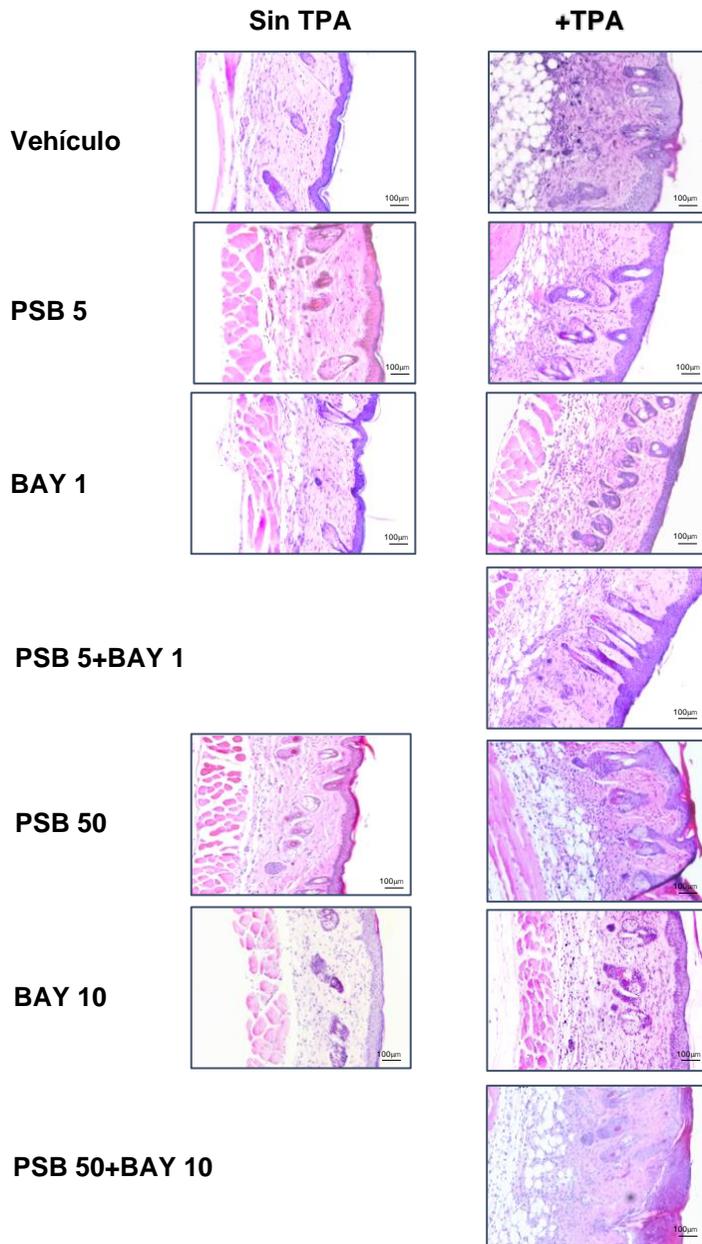


Figura 21. Tinción H&E. Imagen representativa de los cortes histológicos de las biopsias de los diferentes grupos. Barra de escala=100µm.

Visualmente, en la tinción H&E se observa como en los animales tratados con TPA, la aplicación de BAY a 1 y 10 $\mu\text{g}/\text{área}$, disminuye el grosor, las invaginaciones epidérmicas y la infiltración neutrofílica con respecto al vehículo, corroborándose el efecto ya observado en la anterior prueba de concepto.

El análisis de los cortes histológicos demuestra que la aplicación de ambas dosis de este agonista A_{2B} reduce de manera significativa la hiperplasia epidérmica (Figura 22) y la infiltración celular en la dermis (Figura 23). Esta disminución obtenida en ambos parámetros tiende a ser revertida en los grupos de animales en los que al mismo tiempo se ha aplicado el antagonista PSB, observándose un efecto estadísticamente significativo en el grupo PSB 50+BAY 10.

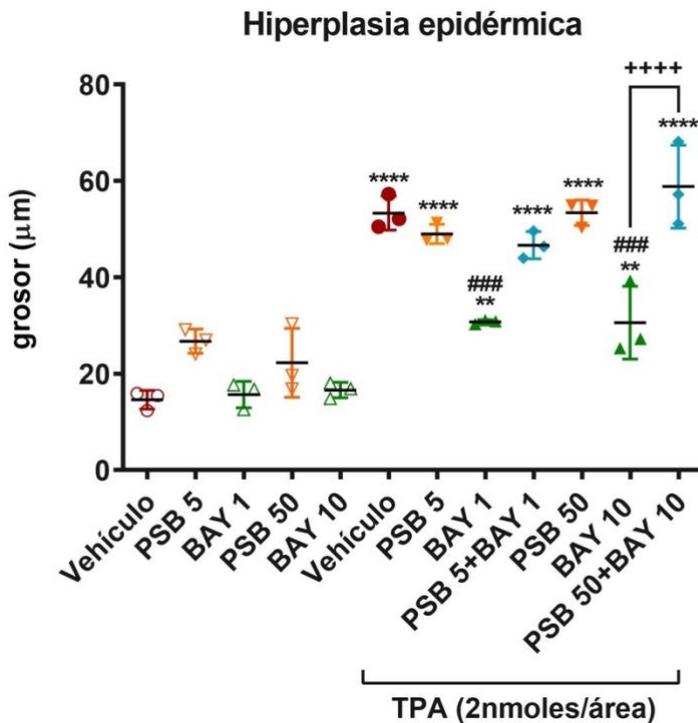


Figura 22. Cuantificación de la hiperplasia epidérmica. Grosor de la epidermis determinada en cuatro campos aleatorios por cada corte histológico (n=3). **** $p < 0,0001$, ** $p < 0,01$ vs. vehículo; ### $p < 0,001$ vs. vehículo+TPA; +++ $p < 0,0001$, vs. BAY 10. Test ANOVA seguido de Tukey's post-test.

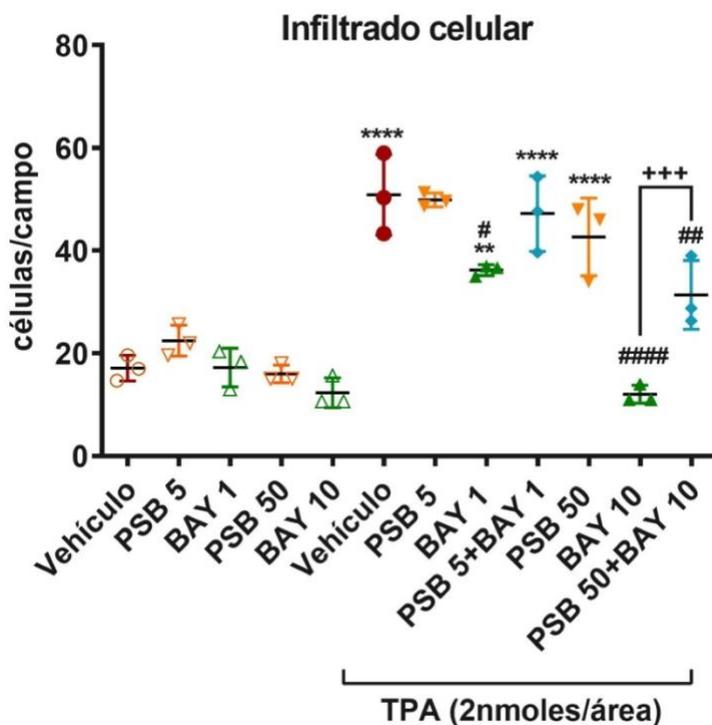


Figura 23. Cuantificación del infiltrado celular. Recuento celular en cuatro campos aleatorios de cada corte histológico (n=3 ratones). **** $p < 0,0001$, ** $p < 0,01$ vs. vehículo; ##### $p < 0,0001$, ## $p < 0,01$, # $p < 0,05$ vs. vehículo+TPA. +++ $p < 0,001$ vs. BAY 10. Test ANOVA seguido de Tukey's post-test.

2.4. Estudio inmunohistoquímico de la hiperproliferación epidérmica

Para una mejor caracterización del efecto de BAY y PSB sobre la hiperplasia epidérmica, se ha realizado el análisis inmunohistoquímico de dos marcadores de proliferación: la citoqueratina 6 (CK6) (Figura 24), proteína que forma parte del citoesqueleto y es característica de los queratinocitos en estado proliferativo, y Ki67, un antígeno nuclear expresado en células en proliferación.

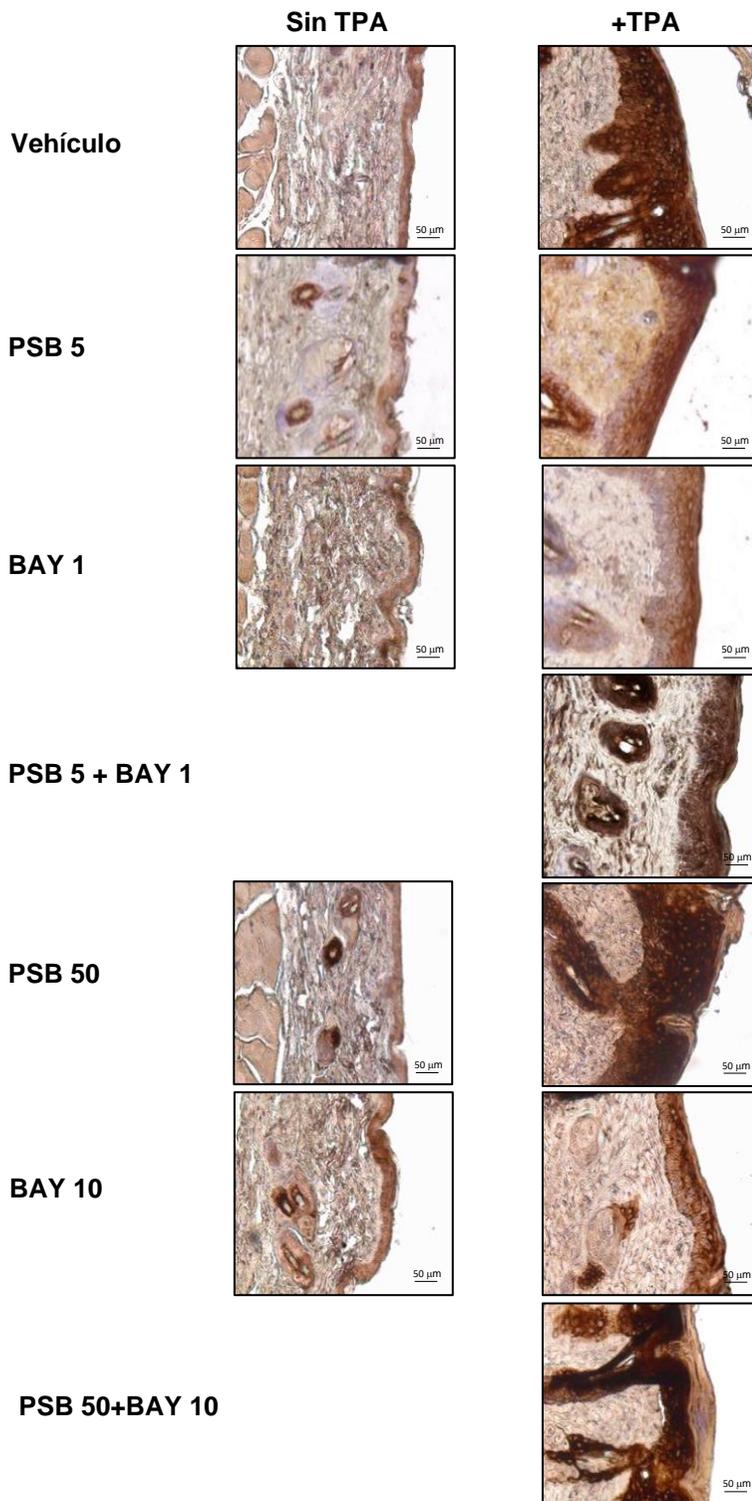


Figura 24. Estudio inmunohistoquímico de la expresión de CK6. Imágenes representativas de la detección de CK6 en los cortes histológicos. CK6 aparece marcada con una tonalidad marrón oscura. Barra de escala=50µm.

Como se observa en las Figuras 24 y 25, el TPA produce un incremento en la intensidad de la coloración marrón en la epidermis, indicativa del aumento de CK6. La aplicación de BAY a 1 y 10 $\mu\text{g}/\text{área}$ disminuye significativamente la expresión de esta citoqueratina en los ratones tratados con TPA, mientras que la administración conjunta con el antagonista (grupos PSB+BAY) revierte el efecto en los dos rangos de dosis ensayados. Es de señalar que la aplicación de PSB 50 en presencia de TPA (grupo PSB 50+TPA) tiende incluso a potenciar el incremento de CK6 inducido únicamente por el agente irritante, aunque los datos no llegan a ser significativos.

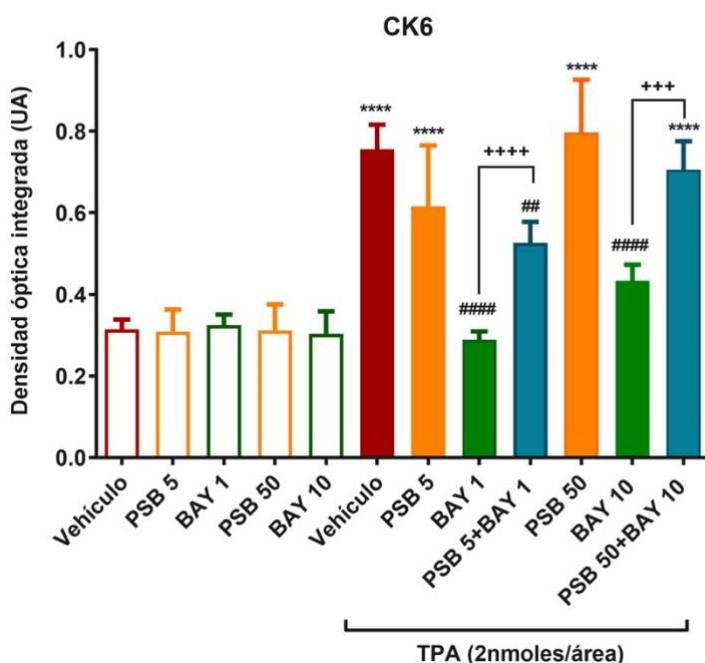


Figura 25. Cuantificación de la expresión de CK6 en el estudio inmunohistoquímico. Resultado del análisis de densidad óptica integrada (DOI), expresada como unidades arbitrarias. Se han analizado cuatro campos por sección, obteniendo la media. Datos representados como media \pm SD (n=3 ratones). **** p <0,0001 vs. grupo vehículo; #### p <0,0001, ## p <0,01 vs. vehículo+TPA; ++++ p <0,0001 vs. BAY 1; +++ p <0,001 vs. BAY 10. ANOVA seguido de Tukey's post-test.

Respecto al estudio inmunohistoquímico de Ki67, en la Figura 26 se muestra como el tratamiento con TPA aumenta los queratinocitos en estado proliferativo que se encuentran principalmente en la capa suprabasal de la epidermis. El tratamiento de BAY disminuye las células Ki67 positivas hasta el punto de que no se aprecian en los cortes histológicos analizados. Por el contrario, el bloqueo del receptor A_{2B} aumenta la presencia de células proliferativas, tanto en el grupo PSB 50 como en el grupo PSB 5. Además, la aplicación de PSB afecta a la distribución de los queratinocitos en división de manera que estos no se encuentran únicamente en la capa suprabasal, que es donde se produce la mitosis en condiciones normales, si no que se encuentran también en capas superiores. El tratamiento conjunto PSB 5+BAY 1 tiende a aumentar de nuevo el número de células Ki67 positivas en comparación con el tratamiento con BAY 1 $\mu\text{g}/\text{área}$. Sin embargo, en el grupo PSB 50+BAY 10 se observa una acusada degradación de las estructuras que constituyen la epidermis, no pudiéndose apreciar claramente la presencia de células Ki67 positivas.

Los resultados obtenidos en el estudio inmunohistoquímico de CK6 y Ki67 sugieren que la activación de los receptores A_{2B} podría tener un papel importante en la regulación de la proliferación descontrolada de queratinocitos en patologías de la piel que cursan con este fenómeno, como es la psoriasis.

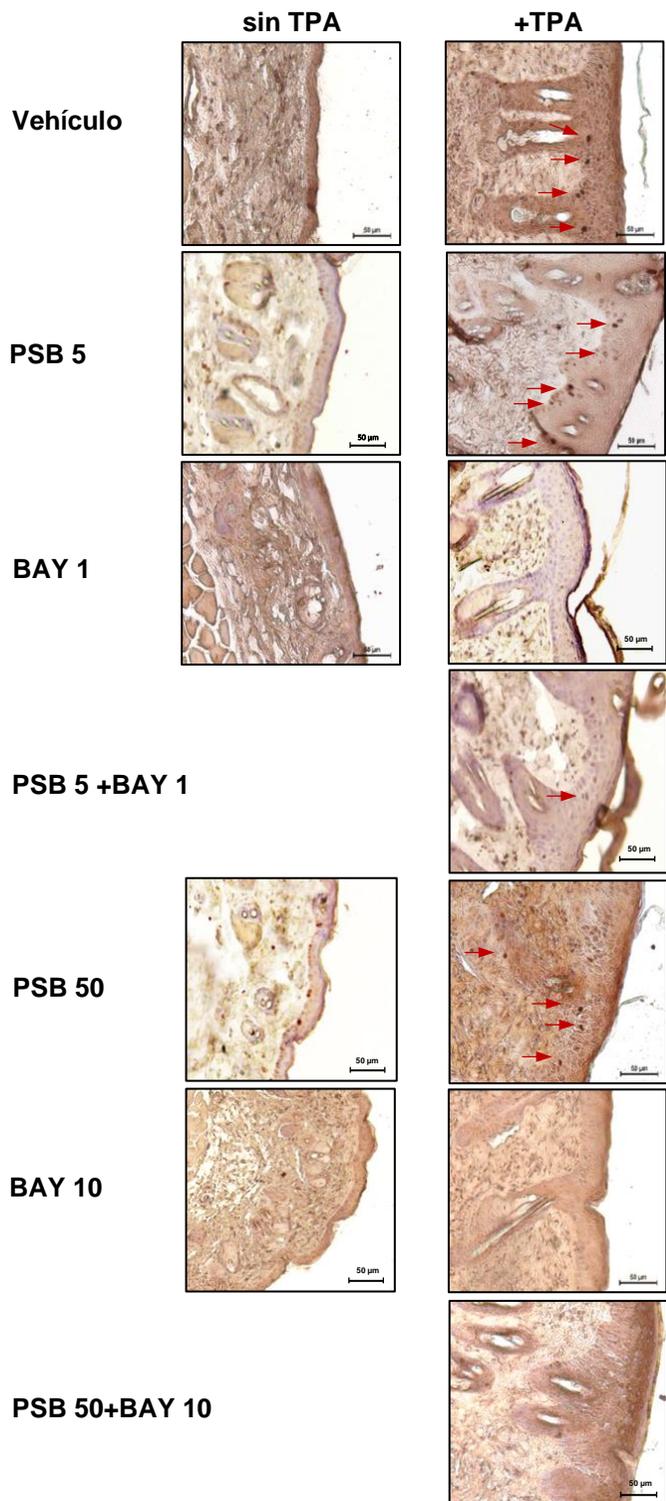


Figura 26. Estudio inmunohistoquímico de Ki67. Imagen representativa de la detección de ki67 en los cortes histológicos. Las flechas rojas indican células ki67 positivas. Barra de escala=50µm.

2.5. Determinación de parámetros relacionados con el efecto antiinflamatorio

Con el fin de profundizar en el estudio del efecto antiinflamatorio que produce la activación de A_{2B}AR en este modelo experimental, y completar los resultados obtenidos en la prueba de concepto, se ha determinado tanto la actividad MPO, como los niveles de CXCL-1 en los homogenados de todas las biopsias. Paralelamente, se han evaluado los niveles de otras citocinas que participan en la instauración de la respuesta inflamatoria inducida por el TPA en este modelo, como TNF- α , IL-6 e IL-1 β (Rodríguez-Luna et al., 2017).

2.5.1. Determinación de parámetros relacionados con la infiltración celular: MPO y CXCL-1

En la Figura 27A se observa en general una gran variabilidad de resultados dentro de cada grupo experimental, tal como se deduce de las desviaciones estándar obtenidas en el estudio estadístico. Así y todo, en los ratones tratados con TPA, la administración de BAY a las dos dosis ensayadas reduce la actividad MPO en los homogenados de las biopsias con respecto al grupo control (vehículo+TPA). El tratamiento previo con PSB tiende a revertir el efecto de BAY, si bien los resultados no son estadísticamente significativos.

De modo similar, los resultados obtenidos tras la determinación de CXCL-1 (Figura 27B) en los homogenados, también muestran cierta variabilidad, siendo únicamente significativa la inhibición de esta quimiocina en el grupo tratado con la dosis menor de BAY (1 μ g/área). Con todo, el perfil de respuesta obtenido tras la determinación tanto de MPO como de CXCL-1 apoya los datos obtenidos en la Figura 23, confirmando la inhibición de la infiltración neutrofílica que se produce tras la aplicación tópica de un agonista de los receptores A_{2B} en este modelo experimental.

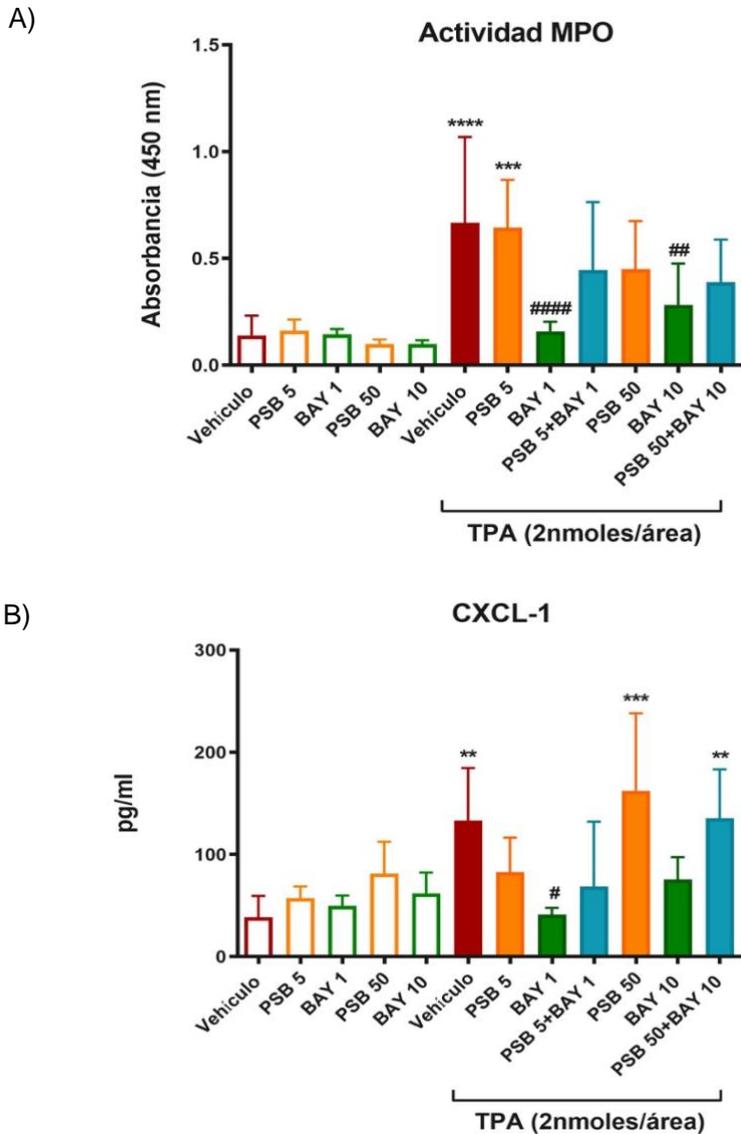


Figura 27. Determinación de la actividad MPO (A) y CXCL-1 (B) en los homogenados de las biopsias. Resultados expresados como media \pm SD (n=6-10). **** p <0,0001, *** p <0,001, ** p <0,01 vs. vehículo; #### p <0,0001, ## p <0,01, # p <0,05 vs. vehículo+TPA. Test ANOVA seguido de Tukey's post-test.

2.5.2. Determinación de otras citocinas pro-inflamatorias

Se ha determinado los niveles de las citocinas TNF- α , IL-6 e IL-1 β en los homogenados obtenidos de las biopsias (Figura 28).

Los resultados obtenidos muestran que en los ratones tratados con TPA la administración de BAY tiende a reducir los niveles de estas tres citocinas en comparación con el vehículo, si bien los resultados solo muestran significación estadística respecto a los niveles de IL-6 a la dosis de 1 $\mu\text{g}/\text{área}$ de BAY.

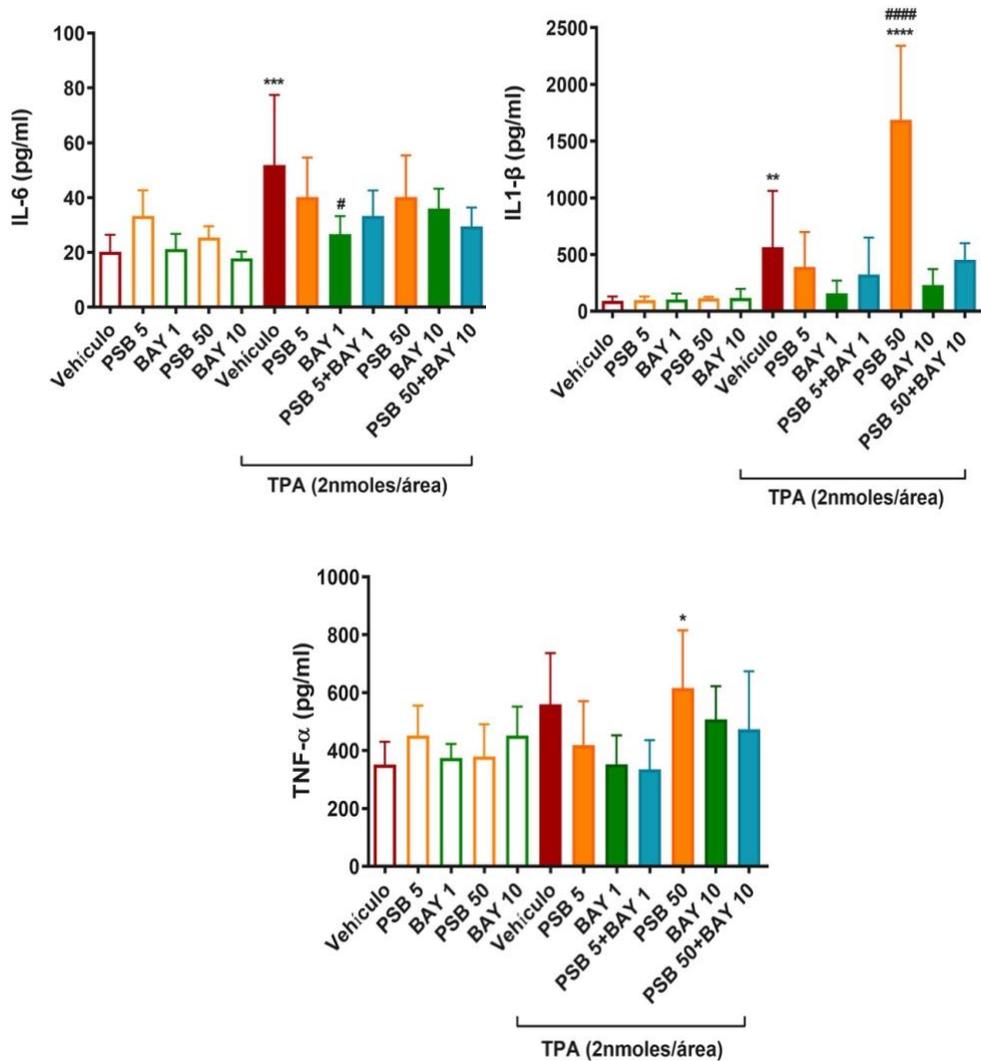


Figura 28. Determinación de los niveles de IL-1 β , IL-6 y TNF- α en los homogenados de las biopsias. Los resultados se muestran como media \pm SD (n=6-10). *** p <0,001, ** p <0,01, * p <0,05 vs. vehículo; #### p <0,0001, # p <0,05 vs vehículo+TPA. ANOVA seguido de Tukey's post-test.

Por otra parte, es de destacar que la administración de PSB 50 μ g/área en presencia de TPA tiende a aumentar la liberación de TNF- α y principalmente de IL-1 β , por encima de los niveles obtenidos en el grupo vehículo+TPA, produciéndose en el caso de la IL-1 β , un incremento muy significativo.

De los resultados obtenidos en esta fase del estudio, se puede concluir que la administración de BAY en presencia de TPA inhibe la mayoría de los parámetros determinados en este modelo experimental, tanto a nivel de hiperplasia epidérmica como de reacción inflamatoria, si bien en la mayoría de las veces, no hay una clara relación dosis-efecto. De hecho, la mayoría de los resultados son incluso más significativos y homogéneos a la dosis menor de BAY (1 μ g/área), lo que sugiere que sería interesante completar el estudio incluso a dosis menores.

Por otra parte, todos los resultados obtenidos con BAY tienden a ser revertidos en presencia del antagonista, con mayor o menor significación estadística, dependiendo de la dosis empleada, lo que hace pensar en un efecto relacionado específicamente con la activación/bloqueo del receptor A_{2B}.

Cabe destacar que la dosis 50 μ g/área del antagonista PSB posiblemente sea demasiado elevada, a pesar del ratio 1:5 comúnmente utilizado en la bibliografía para los estudios agonista/antagonista. En este sentido, algunos parámetros determinados, como el *score* macroscópico de las lesiones, o los niveles de CK6, TNF- α y principalmente IL-1 β tienden a estar aumentados en el grupo PSB 50+TPA en comparación con los ratones vehículo+TPA.

Por todo ello, para continuar con el estudio, centrado en el posible efecto del receptor A_{2B} a nivel de la función barrera epidérmica, se han seleccionado las dosis bajas tanto de BAY (1 μ g/área) como de PSB (5 μ g/área).

3. Efecto sobre proteínas de función barrera y cornificación

Los resultados obtenidos en el apartado anterior demuestran que la activación de los receptores A_{2B} en la epidermis reduce la hiperproliferación de queratinocitos y la producción de CK6, sugiriendo que este receptor podría jugar un papel importante como regulador de la función barrera en la piel, cuya homeostasis se encuentra alterada en patologías como la psoriasis.

Por ello, en el presente apartado se ha analizado el efecto de la aplicación de BAY ($1\mu\text{g/sitio}$) y de PSB ($5\mu\text{g/sitio}$) sobre diversas queratinas y proteínas estructurales implicadas en la formación y mantenimiento de la barrera epidérmica.

3.1. Determinación por inmunohistoquímica de CK10

Durante el proceso de diferenciación, la CK10 se expresa predominantemente en el estrato espinoso, indicando que el proceso de diferenciación y cornificación está teniendo lugar de manera adecuada.

Como se observa en las Figuras 29 y 30, el grupo de ratones tratados únicamente con el vehículo o con BAY, en ausencia de estímulo, presentan unos valores elevados de CK10 en la epidermis, mientras que el grupo tratado sólo con PSB tiende incluso a reducir los valores basales de CK10, si bien los datos no llegan a ser estadísticamente significativos.

En el grupo tratado sólo con TPA, los niveles de CK10 disminuyen muy significativamente con respecto al grupo vehículo en ausencia de estímulo, lo que es indicativo de la alteración en la diferenciación de los queratinocitos que se produce en este modelo experimental. La aplicación de BAY en los ratones tratados con TPA recupera totalmente la expresión de CK10 hasta valores similares a los basales obtenidos en los ratones tratados únicamente con el vehículo.

Por otra parte, el PSB en presencia de TPA presenta unos niveles de CK10 que tienden a ser incluso más bajos que cuando aplicamos únicamente el estímulo, revirtiendo al mismo tiempo el efecto beneficioso de BAY cuando ambos se aplican simultáneamente en el mismo grupo (PSB 5+BAY 1).

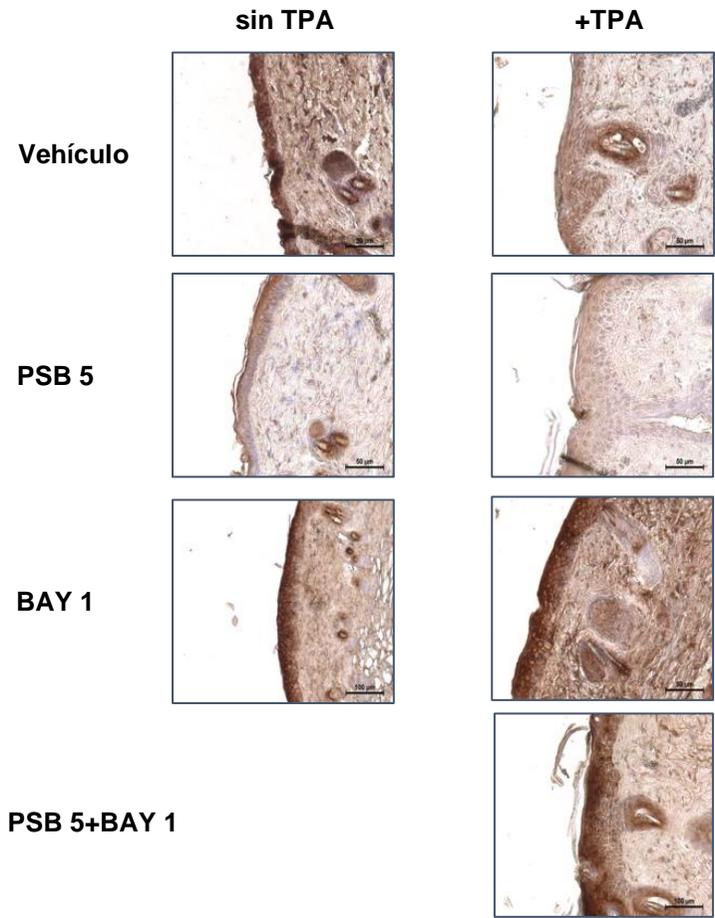


Figura 29. Estudio inmunohistoquímico sobre la expresión de CK10 en la epidermis. Imagen representativa de la detección de CK10 en los cortes histológicos. Barra de escala=50 μm .

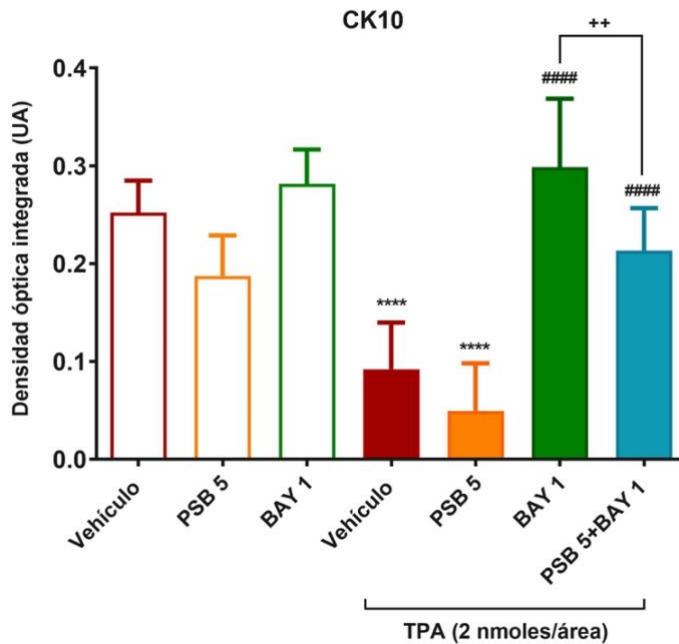


Figura 30. Cuantificación de CK10 en las imágenes obtenidas por inmunohistoquímica. Medida de la densidad óptica integrada (DOI) expresada como unidades arbitrarias (UA). Se han analizado cuatro campos por cada biopsia, obteniendo la media. Datos representados como media \pm SD (n=3 ratones). **** p <0,0001 vs. vehículo; #### p <0,0001 vs. vehículo+TPA, ++ p <0,01 vs. BAY 1+TPA. Test ANOVA seguido de Tukey's post-test.

3.2. Estudio de la expresión de involucrina

La involucrina es una proteína estructural que sirve como marcador de diferenciación temprana. En entornos inflamatorios, involucrina se encuentra sensiblemente aumentada, lo que favorece la aparición de hiperqueratosis y la pérdida de la función barrera debido a un proceso de diferenciación terminal defectuoso (Bélanger et al., 2020; Perera et al., 2012).

La expresión de involucrina en este modelo experimental se ha analizado tanto por inmunohistoquímica como por inmunofluorescencia en los cortes histológicos de las biopsias de la piel del ratón (Figura 31).

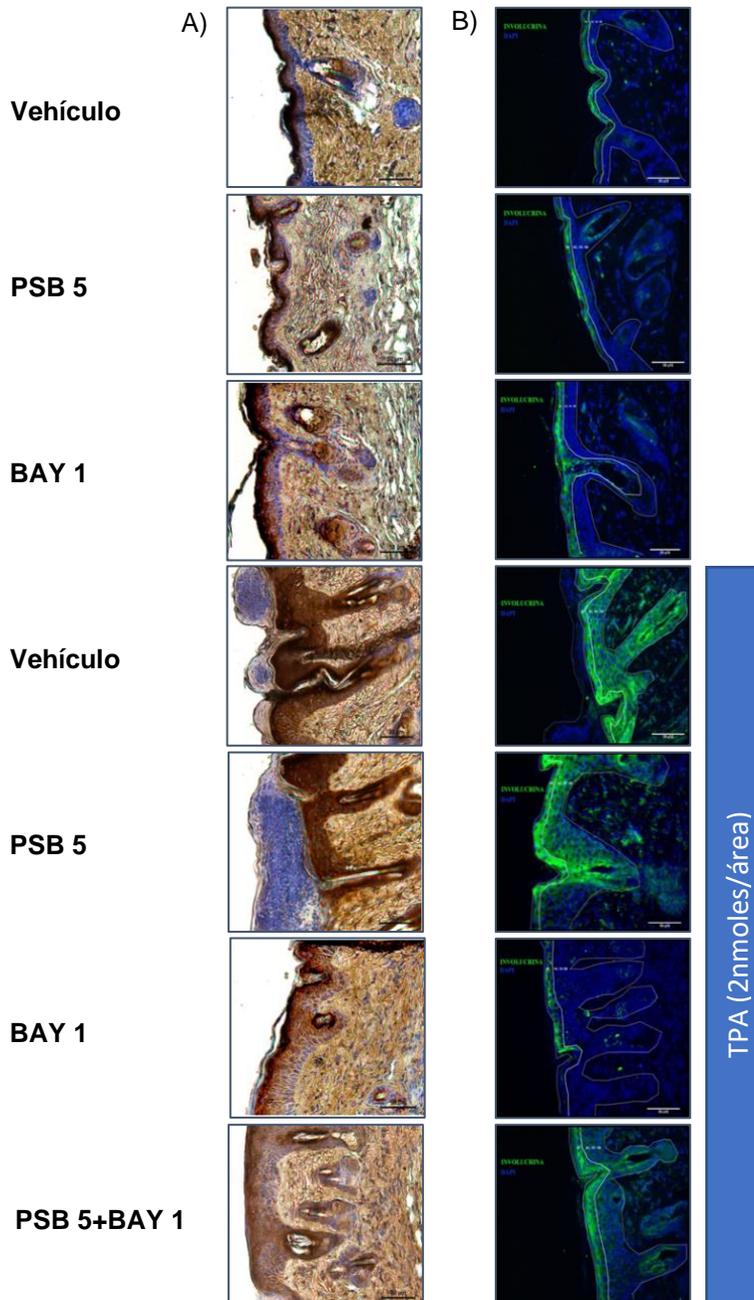
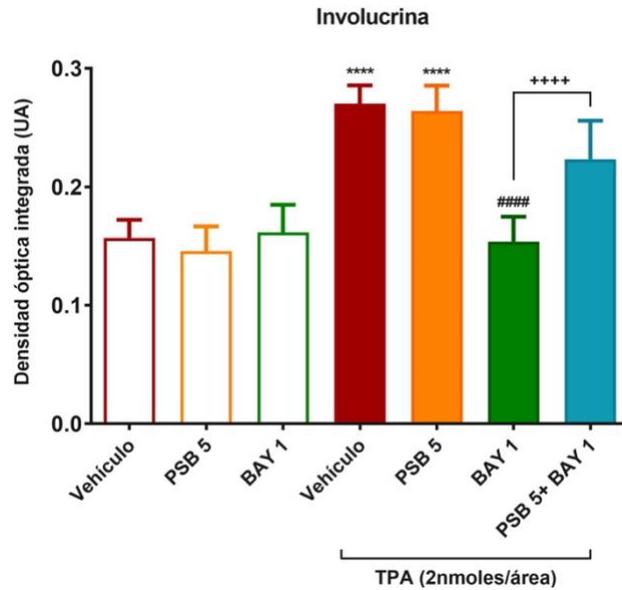


Figura 31. Expresión de involucrina en los cortes histológicos. Microfotografías representativas de cada grupo. (A) Inmunohistoquímica, donde involucrina presenta tonalidad marrón oscuro. (B) Inmunofluorescencia, donde involucrina presenta fluorescencia verde. La tonalidad azul se corresponde con la contratinción nuclear (DAPI). Las líneas marcan el estrato córneo (SC) y el estrato basal (SB). Barra de escala=50 μ m

A)



B)

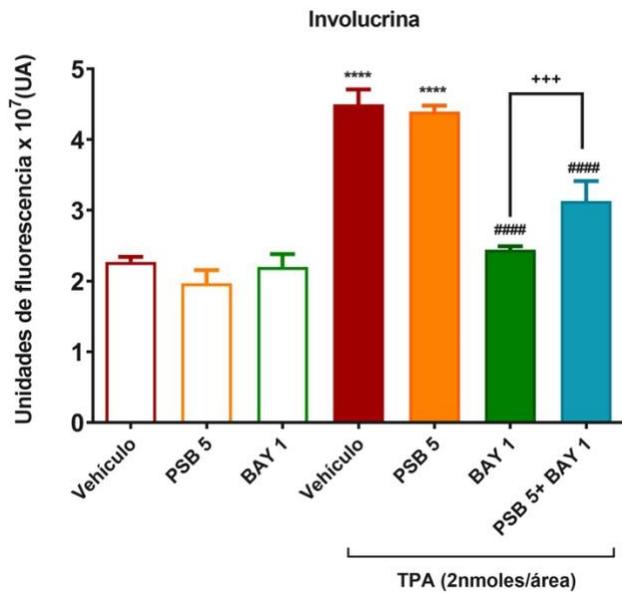


Figura 32. Cuantificación de la expresión de involucrina en el estudio histológico.

(A) Análisis de las imágenes obtenidas por inmunohistoquímica expresadas como unidades arbitrarias (UA) de la densidad óptica integrada. (B) Análisis de las imágenes obtenidas en el estudio por inmunofluorescencia. Intensidad de la fluorescencia expresada como unidades arbitrarias (UA) Cada valor es la media del análisis de cuatro campos por sección. Datos representados como la media \pm SD (n=3 ratones). ****p < 0,0001 vs. vehículo, ####p < 0,0001 vs. vehículo+TPA, +++++p < 0,0001, +++)p < 0,0001 vs. BAY 1+TPA. Test ANOVA seguido de Tukey's post-test

Tal como se aprecia en la Figura 31, la expresión de involucrina se muestra aumentada en los animales tratados con vehículo+TPA, y en el grupo PSB 5+TPA, extendiéndose por todas las capas de la epidermis. En cambio, el tratamiento con BAY, al igual que los grupos sin estímulo, favorece la expresión localizada de la involucrina en las capas más superiores, siendo esta expresión menos marcada. Estos efectos pueden observarse más claramente en el estudio por inmunofluorescencia, en el que se observa como en el grupo PSB 5+BAY 1, la aplicación del antagonista parece incluso revertir parte del efecto favorable producido por BAY, volviéndose a observar una expresión más intensa y extendida de la involucrina.

El resultado del análisis y cuantificación de las imágenes obtenidas tanto por inmunohistoquímica como por inmunofluorescencia (Figura 32) confirman el aumento significativo de la expresión de involucrina en los grupos vehículo+TPA y PSB 5+TPA. En cambio, la aplicación de BAY en los ratones tratados con TPA, reduce significativamente la expresión de involucrina, devolviéndola a niveles similares a los basales. Por otra parte, el pretratamiento con el antagonista (grupo PSB 5+BAY 1) revierte de manera significativa el potencial efecto beneficioso que manifiesta el agonista.

3.3. Estudio de la expresión de loricrina

Loricrina es una proteína marcadora de diferenciación terminal. La disminución de su expresión está relacionada con un proceso de cornificación defectuoso, el cual está asociado a patologías de la piel como la psoriasis (Ma et al., 2018).

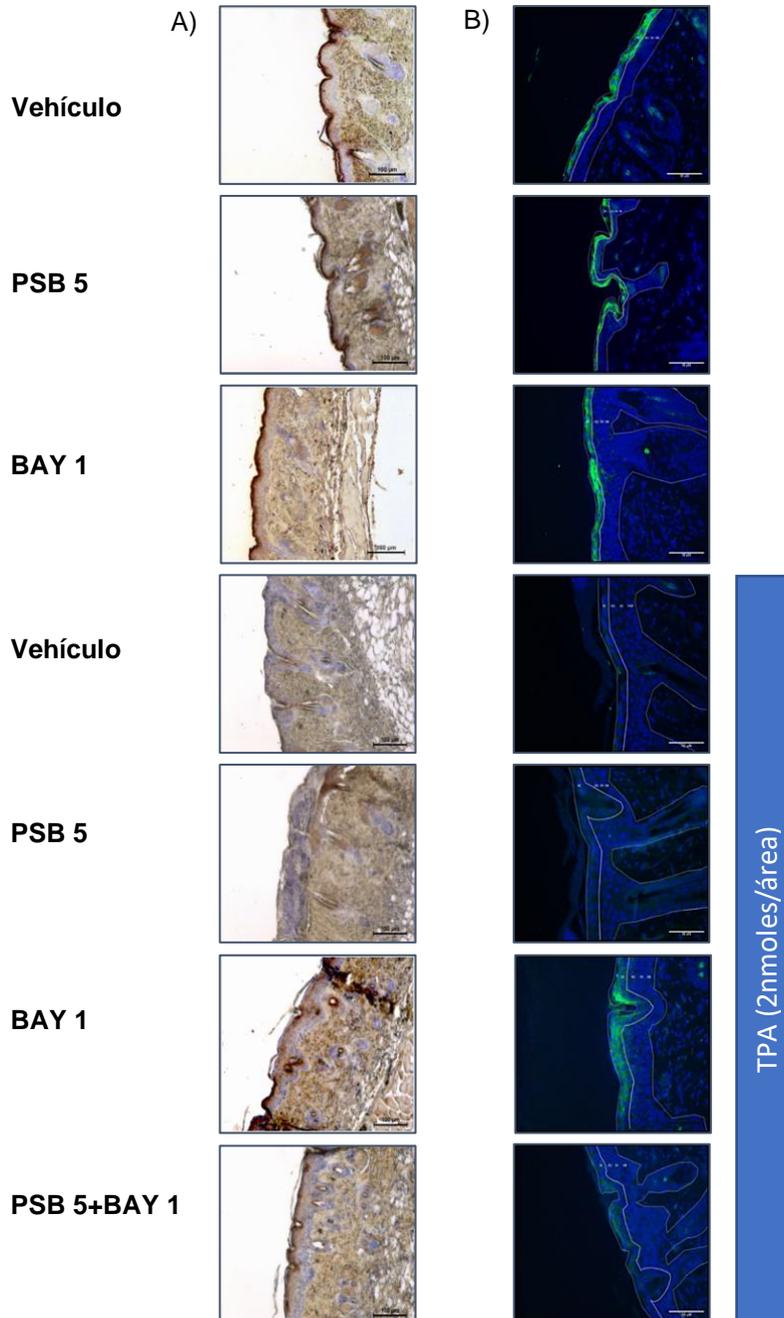


Figura 33. Expresión de loricrina. (A) Estudio inmunohistoquímico donde la expresión de loricrina aparece marcada con tonalidad marrón oscuro. (B) Estudio por inmunofluorescencia donde loricrina presenta fluorescencia verde. En azul se muestra la contratinción nuclear (DAPI). Barra de escala=50-100 μm . Las líneas separan el estrato córneo (SC) y el estrato basal (SB) del resto de capas de la piel.

En la Figura 33A, se observa como en todos los grupos de ratones ensayados en ausencia de estímulo, es posible distinguir claramente la expresión basal de loricrina, que disminuye significativamente tras la aplicación de TPA, tanto en el grupo tratado con vehículo como con PSB. De hecho, en las imágenes obtenidas en el estudio de inmunofluorescencia (Figura 33B), prácticamente desaparece el marcaje fluorescente en estos dos grupos de tratamiento. En cambio, la administración del agonista BAY en condiciones de estímulo, preserva la expresión de esta proteína estructural, efecto que es de nuevo revertido al administrar conjuntamente BAY con el antagonista (grupo PSB 5+BAY 1).

El análisis de estos resultados (Figura 34) sugiere que la aplicación tópica de un agonista de los receptores A_{2B} podría por lo tanto mejorar el proceso de cornificación y diferenciación terminal, cuando se encuentra alterado en diversas situaciones patológicas.

Es de señalar también que el tratamiento con el antagonista A_{2B} en ausencia de estímulo, tiende *per se* a reducir los niveles basales de expresión de loricrina, llegando a dar resultados significativos en el análisis realizado en el ensayo de inmunofluorescencia. Esto sugiere un posible papel fisiológico del receptor A_{2B} en la correcta regulación de la diferenciación terminal de los queratinocitos incluso en ausencia de patologías, las cuales se podrían incluso desencadenar por bloqueo o alteraciones fisiopatológicas de este receptor.

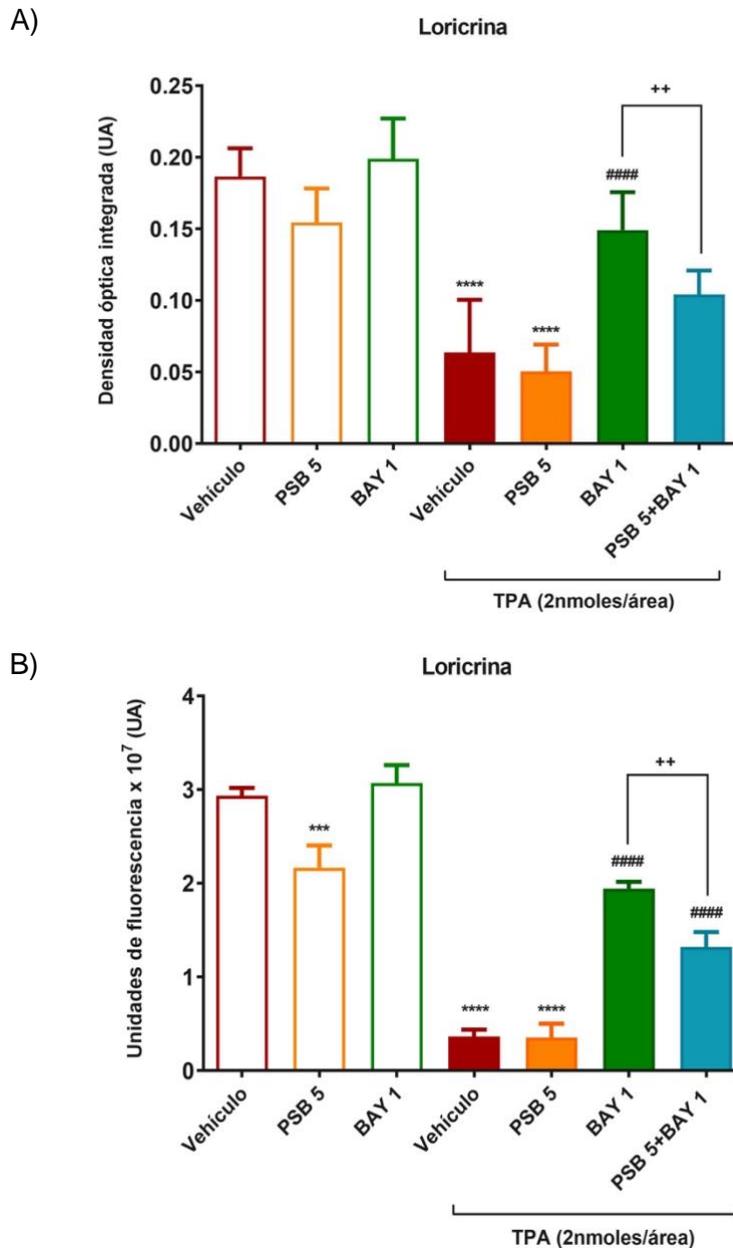


Figura 34. Cuantificación de la expresión de loricrina en el estudio histológico.

(A) Análisis de las imágenes obtenidas por inmunohistoquímica expresadas como unidades arbitrarias (UA) de la densidad óptica integrada. (B) Intensidad de la fluorescencia (UA) en el ensayo de inmunofluorescencia. Cada valor es la media del análisis de cuatro campos por sección. Datos representados como la media \pm SD (n=3 ratones). **** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$ vs. vehículo, #### $p < 0,0001$, vs. vehículo+TPA; ++ $p < 0,01$ vs. BAY 1+TPA. Test ANOVA seguido de Tukey's post-test.

3.4 Estudio de la expresión de filagrina

La filagrina es una proteína estructural fundamental para el desarrollo y mantenimiento óptimo de la barrera epidérmica. El déficit en su expresión confiere un mayor riesgo de desarrollar dermatitis atópica (Quaranta et al., 2014) y agravar otras patologías de la piel, ya que se produce una alteración en la estructura y en la hidratación del estrato córneo (Nishifuji y Yoon, 2013).

La Figura 35 muestra como la filagrina, presente en las biopsias de los grupos de ratones sin estímulo inflamatorio, desaparece prácticamente en el grupo tratado con TPA y en el grupo PSB 5+TPA. Sin embargo, la aplicación de BAY en presencia de TPA favorece la recuperación del patrón de expresión normal de esta proteína.

La cuantificación de las imágenes obtenidas (Figura 36) demuestra la reducción significativa de la expresión de filagrina en el grupo de ratones tratados con TPA, y también, cómo la aplicación del agonista BAY consigue aumentar de nuevo la expresión de esta proteína hasta valores similares a los mostrados en el grupo tratado sólo con el vehículo.

Al igual que en el estudio de loricrina, el pretratamiento con PSB revierte en parte el efecto beneficioso obtenido con BAY e incluso disminuye significativamente los niveles basales de expresión mostrados en el grupo tratado sólo con el vehículo (grupo PSB 5), sugiriendo de nuevo el posible papel del A_{2B} en el adecuado desarrollo y mantenimiento de la barrera cutánea.

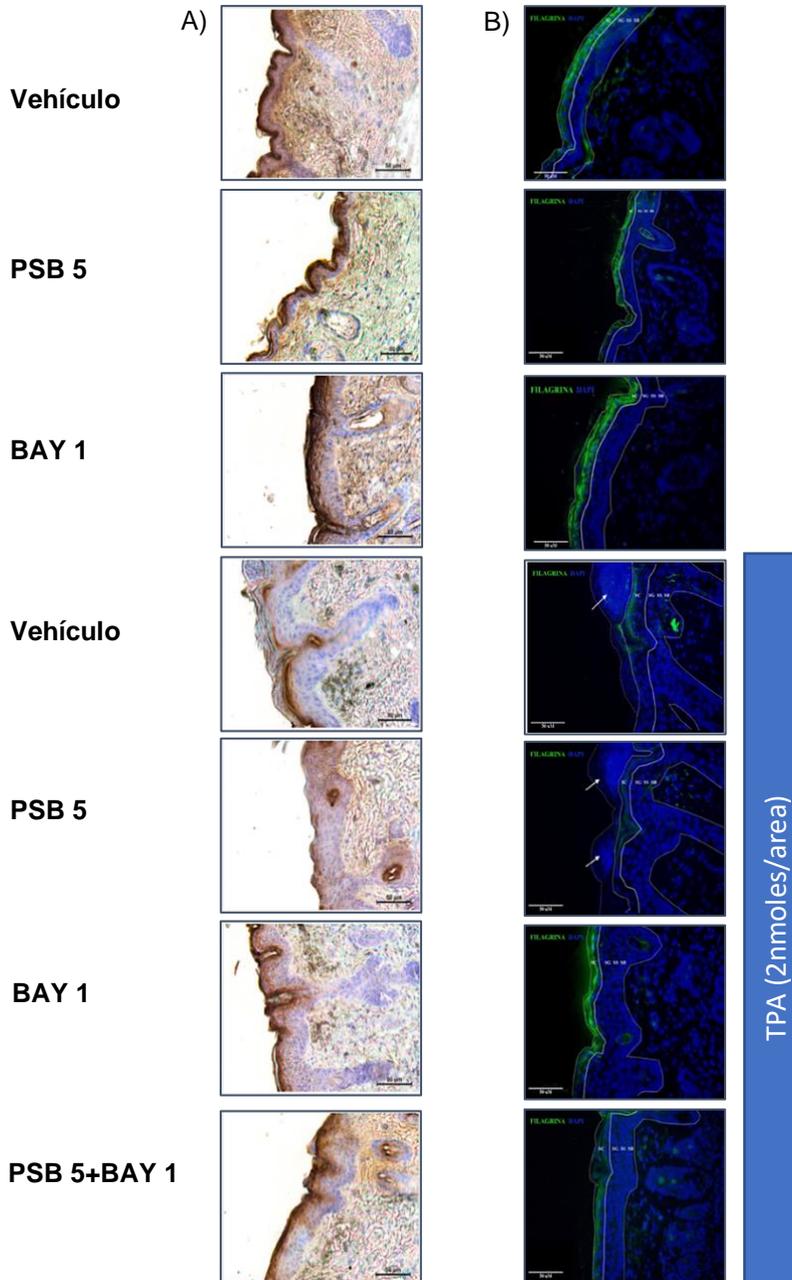
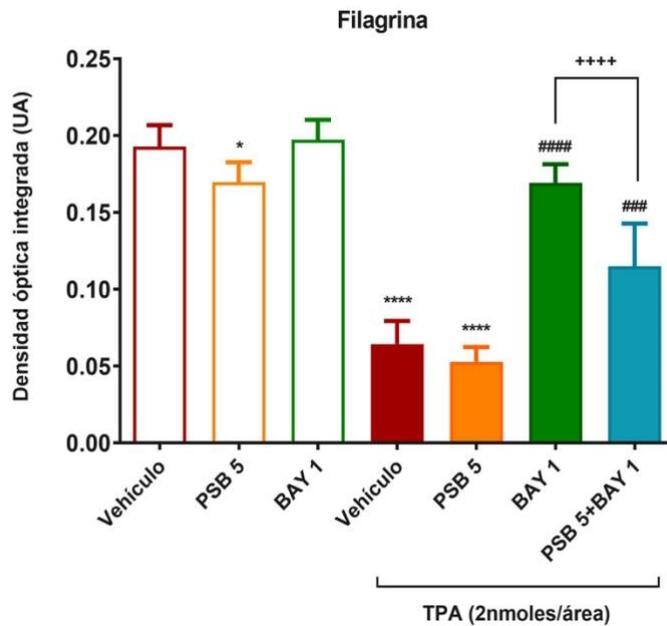


Figura 35. Expresión de filagrina en cortes histológicos. (A) Inmunohistoquímica: la expresión de filagrina aparece con una tonalidad marrón intensa. (B) Inmunofluorescencia: filagrina marcada con fluorescencia verde mientras que el marcaje azul se corresponde con contratinción nuclear (DAPI). Las líneas separan el estrato corneo (SC) y el estrato basal del resto de capas de la piel. Barra de escala=50 μ m

A)



B)

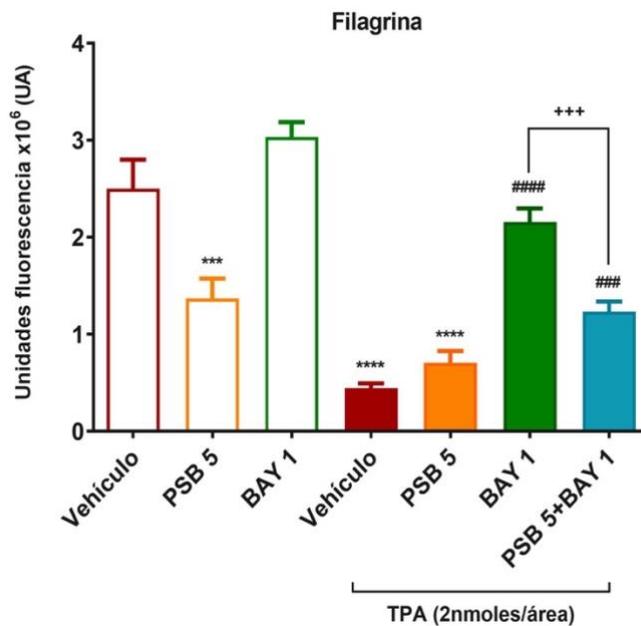


Figura 36. Cuantificación de la expresión de filagrina en el estudio histológico. (A) Análisis de las imágenes obtenidas por inmunohistoquímica expresadas como unidades arbitrarias (UA) de la densidad óptica integrada. (B) Intensidad de la fluorescencia (UA) en el ensayo de inmunofluorescencia. Cada valor es la media del análisis de cuatro campos por sección. Datos representados como la media \pm SD (n=3 ratones). **** p <0,0001, *** p <0,001, * p <0,05 vs. vehículo; #### p <0,0001, ### p <0,001 vs. vehículo+TPA; ++++ p <0,0001, +++ p <0,001 vs. BAY 1+TPA. Test ANOVA seguido de Tukey's post-test

3.5 Estudio por Western-Blot de la correlación filagrina/caspasa-14

En vista de los interesantes resultados obtenidos en el capítulo anterior sobre la activación de los receptores A_{2B} y la expresión de filagrina, hemos creído de interés profundizar en las causas y alteraciones que puedan estar relacionados con la síntesis de esta proteína.

La filagrina se sintetiza a partir de la profilagrina, un precursor altamente fosforilado, que se almacena en forma inactiva e insoluble dentro de los KHG en la capa granular de la epidermis. A medida que los queratinocitos experimentan la diferenciación terminal, que tiene lugar en la transición entre el estrato granular y el cornificado, la profilagrina se desfosforila y se divide en monómeros de filagrina gracias a endonucleasas como la caspasa-14 (Hoste et al., 2011a). Para que se produzca el paso de profilagrina a filagrina, es necesario que la procaspasa-14 cambie estructuralmente a caspasa-14 activa.

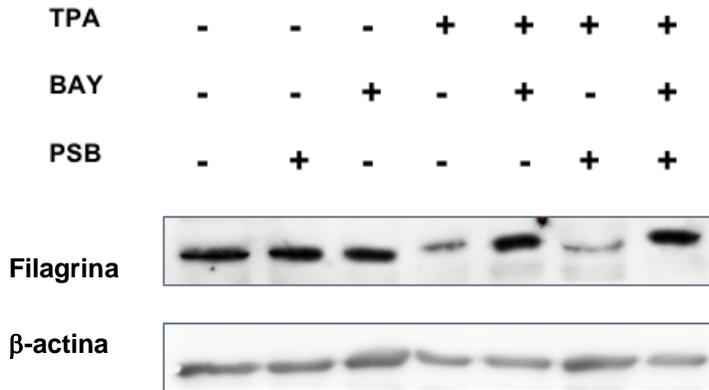
En este apartado, se ha determinado por Western-Blot la relación entre los niveles de filagrina, caspasa-14 y procaspasa-14 en los homogenados de las biopsias obtenidas.

En la Figura 37 (A-B), se observa como la administración de TPA y TPA+PSB reducen la filagrina presente en los homogenados de piel de ratón, mientras que el tratamiento con BAY en las mismas condiciones de estímulo aumenta de nuevo los niveles de esta proteína.

Por otra parte, la aplicación del antagonista reduce por sí mismo los niveles de filagrina en ausencia de TPA, además de revertir el efecto beneficioso de BAY sobre la expresión de esta proteína en presencia del estímulo (grupo PSB 5+BAY 1). Todos estos resultados están en concordancia con los obtenidos en el estudio inmunohistoquímico realizado en el apartado anterior, reforzando el posible papel fisiológico

del receptor A_{2B} en la expresión adecuada de filagrina y el mantenimiento de la barrera epidérmica en la piel.

A)



B)

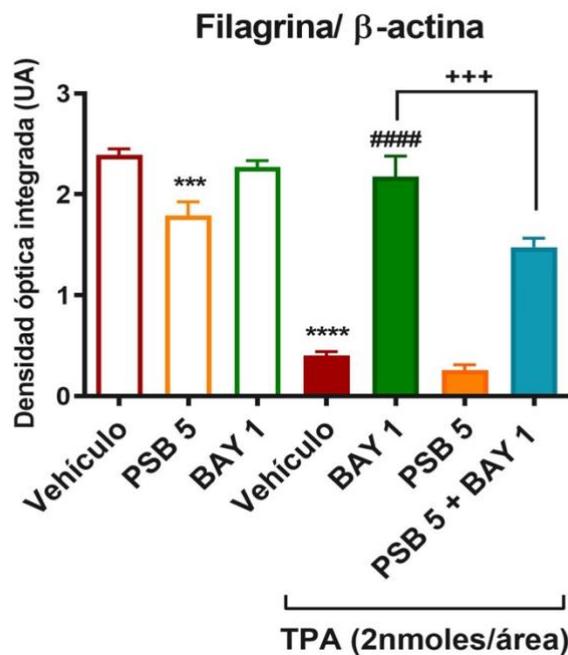


Figura 37. Estudio por Western-Blot de la expresión de filagrina. (A) Imagen representativa del análisis por Western-Blot en homogenado de piel. (B) Análisis densitométrico expresado como unidades arbitrarias (UA) de la densidad óptica integrada de las imágenes, analizándose la relación filagrina/ β -actina. Datos representados como la media \pm SD (n=3 ratones). **** p <0,0001; *** p <0,001 vs. vehículo; #### p <0,0001 vs. vehículo+TPA, +++ p <0,001 vs. (BAY 1+TPA). Test ANOVA con Tukey's post-test.

Respecto al estudio de la caspasa-14, en el análisis por Western Blot de los homogenados de las biopsias, detectamos dos bandas: una que oscila entre 28-30 kDa que se corresponde con la procaspasa-14, y otra que aparece entre 11-17 kDa y que detecta la caspasa-14, que es la biológicamente activa (Figura 38A).

Como puede observarse en los grupos de animales sin estímulo inflamatorio, los valores de la subunidad activa de caspasa-14 se encuentran muy elevados en comparación con los de procaspasa-14. Por otro lado, en los grupos en los que se ha aplicado TPA esta relación se invierte, a excepción del grupo tratado con TPA+BAY, en el que los niveles de caspasa-14 tienden a mantenerse elevados.

Los resultados del análisis densitométrico (Figura 38B) confirman estos resultados, manteniéndose la relación inversa entre caspasa-14 y procaspasa-14 dentro de cada grupo de tratamiento. Es de destacar que en el grupo vehículo+TPA se reduce muy significativamente la caspasa-14 con respecto al grupo tratado sólo con el vehículo, mientras que el tratamiento con BAY (grupo BAY 1+TPA) consigue mantener los niveles de esta subunidad activa elevados. Sin embargo, el pretratamiento con el antagonista A_{2B} (grupo PSB 5+BAY 1) vuelve a revertir significativamente este efecto.

A la vista de los resultados de este apartado, podemos concluir que la activación de los receptores A_{2B} consigue mantener unos niveles elevados tanto de filagrina como de caspasa-14, subunidad activa del enzima responsable de la síntesis de esta proteína estructural. Esto refuerza la hipótesis del potencial papel beneficioso de este receptor en la integridad y grado óptimo de hidratación de la barrera epidérmica; lo que sugiere que sería interesante completar el estudio incluso a dosis menores.

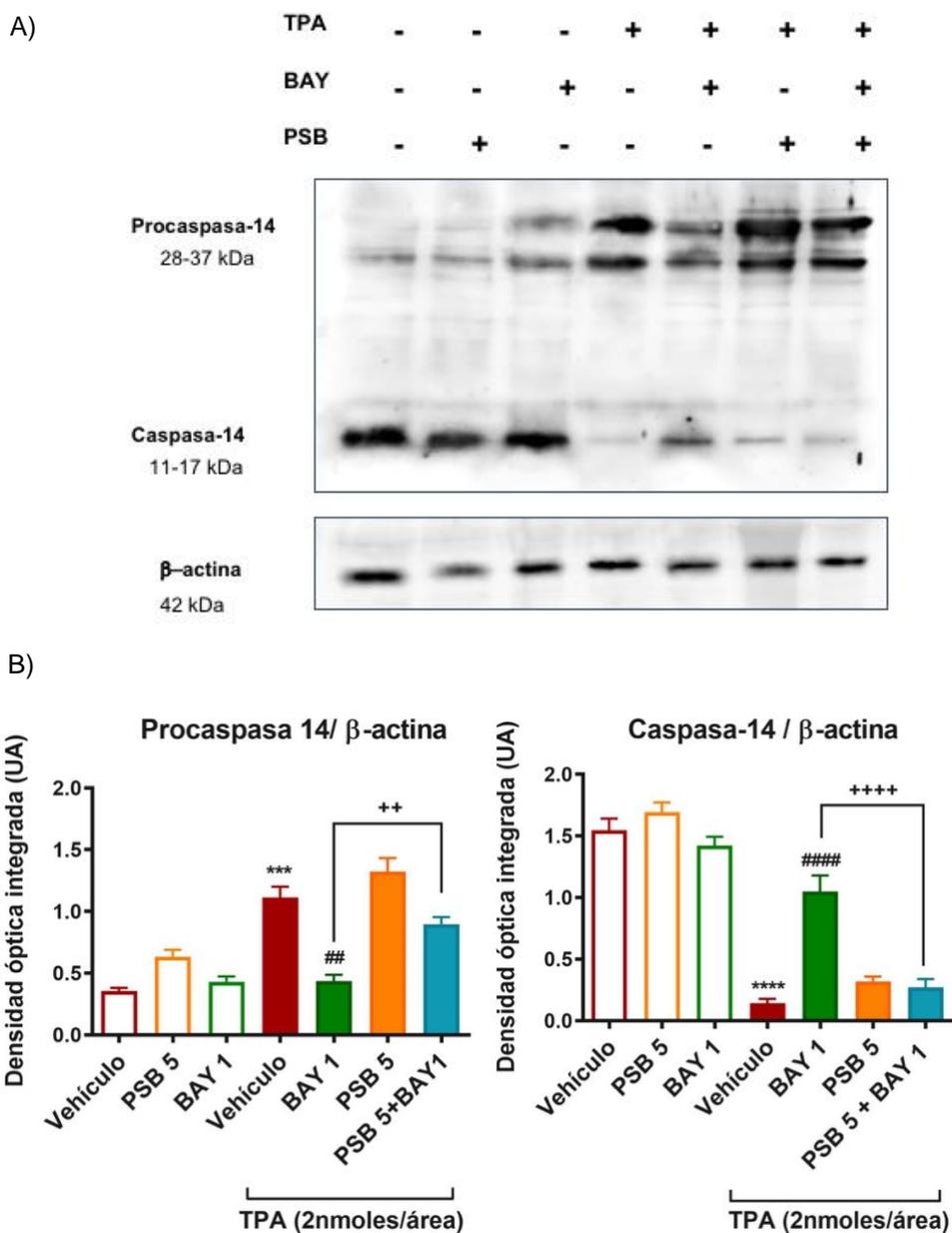


Figura 38. Estudio de la expresión de caspasa-14. (A) Imagen representativa del análisis por Western-Blot en los homogenados de las biopsias. (B) Análisis densitométrico expresado como unidades arbitrarias (UA) de la densidad óptica integrada de las imágenes, analizándose la relación procaspasa-14/ β -actina y caspasa-14/ β -actina. Datos representados como la media \pm SD (n=3 ratones). ****p <0,0001, ***p <0,001 vs. vehículo; ####p <0,0001, ##p <0,01 vs. vehículo+TPA, +++p <0,0001, ++p <0,01 vs. BAY 1+TPA. Test ANOVA seguido de Tukey's test

Discusión

Parte I: La activación del receptor A_{2B} reduce la hiperplasia epidérmica y la respuesta inflamatoria en la piel

Desde que en los años 30 se describieran los potentes efectos mediados por adenosina y se comenzase a estudiar su interés a nivel cardiovascular y como neurotransmisor, las funciones y los efectos de la señalización purinérgica a través de sus receptores, anteriormente denominados P1, ha generado controversia. Dependiendo del tipo celular, la expresión de los receptores de adenosina puede variar y sus efectos biológicos también (Borea, Varani, et al., 2018)

En la piel, diversos estudios sugerían que la activación de los receptores de adenosina promovían la proliferación de queratinocitos (Braun et al., 2006), mientras que otros sostenían lo contrario (Brown et al., 2000; Cook et al., 1995). Con la aparición de agonistas más selectivos, se pudo observar que la activación de los receptores A_{2A} en queratinocitos humanos aumenta la proliferación, mientras que la activación de los A_{2B} la disminuye (Andrés et al., 2017). Curiosamente en la epidermis, el receptor A_{2B} es el subtipo mayoritario y puede ser activado por concentraciones fisiológicas de adenosina a pesar de que su afinidad sea mucho menor (Andrés et al., 2017; Fredholm et al., 2011). En este sentido, en los últimos años se ha puesto de manifiesto que la expresión del receptor A_{2B} suele ser mayoritaria en determinados tipos celulares en los que fisiológicamente actúa controlando la correcta proliferación, como fibroblastos cardiacos (Phosri et al., 2017; Vecchio et al., 2017), músculo liso arterial (Dubey et al., 2015) células epiteliales intestinales (Aherne et al., 2015) o células epiteliales alveolares (Borea, Varani, et al., 2018).

A la vista de estos antecedentes, y puesto que el receptor A_{2B} también parece participar en el control de la respuesta inflamatoria en queratinocitos (Andrés et al., 2017) consideramos relevante confirmar en un estudio *in vivo* el posible papel beneficioso de la activación de los A_{2B}AR en la piel. Para ello, hemos empleado el modelo de hiperplasia epidérmica inducida por TPA en ratón, ya que es capaz de recrear ciertas

manifestaciones características de patologías cutáneas, produciendo alteraciones histopatológicas típicas de la psoriasis y una respuesta inflamatoria de la piel (Hawkes et al., 2018; Sato et al., 2004)

El TPA es una molécula derivada de forbol que actúa como estímulo de la PKC δ , isoforma mayoritaria en la epidermis (Breitkreutz et al., 2007). La activación de PKC desencadena un entorno inflamatorio debido a la activación de la vía de señalización NF- κ B, la generación de citocinas inflamatorias y la producción de ROS. Paralelamente, el TPA puede dar lugar a un proceso de cornificación defectuoso, ya que la activación de la PKC δ suprime la expresión de marcadores de cornificación tardía (Breitkreutz et al., 2007).

Para la realización del estudio se ha seleccionado el agonista del receptor A_{2B} BAY60-6583, por ser el ensayado en los estudios realizados *in vitro* en queratinocitos humanos (Andrés et al., 2017) y por ser considerado como agonista de referencia en la bibliografía científica. Puesto que BAY no había sido testado previamente vía tópica, se realizó inicialmente una prueba de concepto que permitiera decidir el rango de dosis adecuado y descartara posibles efectos adversos, ya que, en un estudio anterior realizado en el mismo modelo, la aplicación tópica de NECA (considerado clásico agonista A_{2B}, aunque no selectivo) produjo sedación intensa en los animales por activación A₁AR (datos no publicados).

Los resultados de prueba preliminar han demostrado el efecto beneficioso de BAY a la dosis de 10 μ g/área, ya que reduce la gravedad de las lesiones, la hiperplasia epidérmica, el edema y diversos parámetros relacionados con la infiltración celular. Además, y a diferencia de los resultados obtenidos en este mismo modelo con un agonista de los receptores A_{2A} (Arasa et al., 2014), se confirma que la activación A_{2B} producida por BAY no afecta a la síntesis de colágeno en la dermis, ya que este es un proceso principalmente mediado por la activación de receptores

A_{2A}, mayoritarios en los fibroblastos dérmicos (Zhang et al., 2017; Shaik y Cronstein, 2016; Perez-Aso et al., 2013)

A la vista de estos resultados preliminares, en una segunda fase se ha procedido al estudio de BAY a dos dosis diferentes, en presencia y ausencia de PSB-1115, antagonista selectivo de A_{2B}AR (Borea et al., 2018). Una visión global de los resultados obtenidos demuestra que BAY es capaz de mejorar todos los parámetros determinados incluso a la dosis inferior de 1 µg/área, aunque tal vez hubiera sido necesario ensayar alguna dosis inferior, para poder observar una clara relación dosis-efecto. Es importante además destacar que los efectos beneficiosos producidos por la aplicación de BAY son mediados por la activación del receptor A_{2B}, ya que el antagonista PSB revierte en mayor o menor proporción todos estos efectos.

En primer lugar, y con respecto a la hiperplasia epidérmica, los resultados del estudio histológico H&E y la inmunohistoquímica de CK6 y Ki67, indican que BAY reduce el estado hiperproliferativo de los queratinocitos inducido por el TPA, confirmándose en un modelo *in vivo*, el papel del receptor A_{2B} como modulador del crecimiento de queratinocitos observado en los estudios *in vitro* (Andrés, et al 2017, Brown et al., 2000). Además, la inhibición de la expresión de CK6, sugiere el potencial interés terapéutico de la activación A_{2B} en situaciones patológicas de la piel en las que esta citoqueratina está sobreexpresada como en el caso de la psoriasis (Zhang et al., 2019; Perera et al., 2012)

En segundo lugar, la aplicación tópica de BAY reduce la respuesta inflamatoria inducida por el TPA. Este resultado presenta un especial interés, puesto que el papel del receptor A_{2B} resulta muy controvertido, pudiendo actuar como antiinflamatorio o proinflamatorio en función del tipo celular, la vía de señalización involucrada o el entorno fisiopatológico (Effendi et al., 2020; Vecchio et al., 2019). En este contexto, diversos estudios sugieren que la activación A_{2B} reduce la migración neutrofílica y la permeabilidad microvascular en modelos experimentales de inflamación

aguda de pulmón (Konrad et al., 2017) o inflamación de la mucosa del colon (Aherne et al., 2015). De manera similar, los resultados del presente estudio demuestran que la aplicación de BAY, además de reducir el edema producido, inhibe la migración neutrofílica determinada tanto por el análisis histológico, como mediante la actividad MPO en los homogenados de las biopsias.

En el modelo de hiperplasia inducido por TPA, los neutrófilos son las primeras células que migran hacia el foco de inflamación, activados por diversas quimiocinas como CXCL-1 (Arasa et al., 2014; Sato et al., 2004). En el presente estudio, se ha demostrado que la aplicación de BAY reduce los niveles de esta quimiocina en los homogenados de la piel, confirmando nuevamente los efectos observados en los estudios *in vitro*, en los que este agonista era capaz de inhibir de forma concentración dependiente la generación de CXCL-1 en queratinocitos humanos estimulados con TPA (Andrés et al., 2017). Además, y puesto que esta quimiocina es liberada por los queratinocitos durante la fase de respuesta innata de la psoriasis, la aplicación de un agonista $A_{2B}AR$ podría reducir la infiltración y los procesos de activación neutrofílica característicos de estas primeras fases (Albanesi et al., 2018).

Para completar el estudio de la activación del receptor A_{2B} sobre la respuesta inflamatoria, se han analizado los niveles de IL-6, TNF- α e IL-1 β en los homogenados de las biopsias, observando que BAY tiende a disminuir los niveles de estas citocinas, aunque con resultados variables. Tal vez esta variabilidad pueda estar en parte relacionada con posibles efectos contrapuestos (activador/inhibidor) que podría tener la activación A_{2B} en los diversos tipos celulares presentes en la piel, como células dendríticas o mastocitos, donde la activación A_{2B} podría aumentar los niveles de citocinas en determinadas condiciones (Vecchio et al., 2019). Serían necesarios estudios más concretos a este nivel para poder establecer el papel $A_{2B}AR$ en cada tipo celular que participa en el desarrollo del proceso inflamatorio en la piel.

Parte II: La activación del receptor A_{2B} mantiene la integridad de la barrera epidérmica

Como se ha comentado anteriormente, uno de los principales efectos tras la aplicación de BAY ha sido la inhibición de la proliferación y de la expresión de CK6 en la epidermis de los ratones tratados con TPA. Esto sugiere que el receptor A_{2B} podría jugar un papel importante como regulador de la función barrera en la piel, cuya homeostasis se encuentra alterada en patologías como la psoriasis (Zhang et al., 2019). Con esta finalidad, se ha analizado la expresión de proteínas que actúan como marcadores de diferenciación para los queratinocitos y cuya alteración ha sido relacionada con una barrera epidérmica defectuosa, asociada con patologías de la piel (Quaranta et al., 2014; Proksch et al., 2008).

Como primer indicador del estado de la función barrera se ha estudiado la **CK10**, expresada en los queratinocitos basales y necesaria para el inicio del proceso de cornificación, siendo considerada marcadora de diferenciación normal (Nishifuji y Yoon, 2013). Ensayos *in vitro* han demostrado que la expresión de CK10 en los queratinocitos se correlaciona con la disminución de la proliferación celular, aumentando el porcentaje de células en fase G1 y disminuyendo la población celular en fase S (Dmello et al., 2019). Por el contrario, en ratones K10^{-/-} se produce espontáneamente el desarrollo de hiperqueratosis y acantosis, además del incremento de la proliferación de células epidérmicas (Reichelt et al., 2004). En nuestro modelo experimental, la aplicación de TPA disminuye la expresión de CK10 en la epidermis de los ratones, mientras que el tratamiento con BAY recupera el patrón de expresión de la epidermis sana. Esto demuestra el papel beneficioso de la activación A_{2B} en el control de la diferenciación y correcta cornificación de los queratinocitos, no sólo en condiciones patológicas, sino también en condiciones fisiológicas, ya que incluso en los animales no tratados con TPA, el bloqueo del receptor A_{2B} con el antagonista PSB tiende a disminuir la expresión fisiológica de esta citoqueratina.

Resultados similares se han obtenido respecto a la expresión basal de **loricrina**, la cual constituye aproximadamente un 70% de las proteínas que forman el estrato córneo y que se encuentra disminuida en enfermedades que presentan paraqueratosis como psoriasis (Nithya et al., 2015). El tratamiento con BAY recupera los niveles basales de expresión de esta proteína, mientras que el bloqueo A_{2B} , incluso en ausencia de estímulo inflamatorio, la disminuye, confirmando el papel regulador del receptor A_{2B} en el proceso de formación de la envuelta cornificada.

Como contraposición a las proteínas anteriores, la **involucrina** es un marcador de diferenciación temprana de queratinocitos, cuya expresión en piel sana está localizada en las capas superiores de la epidermis, interaccionando con otras proteínas y favoreciendo una correcta cornificación (Sevilla et al., 2007). Sin embargo, en enfermedades de carácter inflamatorio como psoriasis, su expresión está aumentada de forma aberrante en todos los estratos de la piel (Bélanger et al., 2020). Estos mismos efectos pueden observarse en nuestro modelo experimental, ya que la expresión de involucrina se extiende por toda la epidermis en los ratones tratados con TPA, mientras que la activación del receptor A_{2B} favorece un patrón de expresión normal de involucrina. Es de destacar que tanto involucrina como loricrina, forman parte del complejo de diferenciación epidérmica (EDC), que hace referencia al conjunto de genes (más de 50) que codifican proteínas implicadas en la diferenciación y cornificación de los queratinocitos (Hoffjan y Stemmler, 2007). De hecho, la delección de genes contenidos en el EDC junto a mutaciones del alelo HLA-Cw6, están relacionadas con una predisposición importante para el desarrollo de psoriasis (Brettmann y de Guzman Strong, 2018).

Otra proteína importante en la función barrera de la piel es la **filagrina**, proteína de diferenciación terminal necesaria para que se produzca el entrecruzamiento de citoqueratinas y otras proteínas que constituyen la envuelta cornificada. La expresión de esta proteína está disminuida en patologías como dermatitis atópica, ictiosis vulgar o psoriasis (Kezic y Jakasa, 2016; Quaranta et al., 2014). Paralelamente, la expresión

de caspasa-14, enzima que interviene en la transición de profilagrina a la forma activa filagrina, está también significativamente reducida en lesiones psoriásicas tanto en humanos como en ratones (Chamcheu et al., 2018). Así mismo, esta correlación ha sido demostrada en queratinocitos estimulados con citocinas asociadas tanto a la respuesta T_H1 como T_H2 , disminuyendo el RNAm y los niveles de proteína de filagrina y caspasa-14 (Hvid et al., 2011; Kim et al., 2011) Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que el entorno inflamatorio inducido por TPA disminuye drásticamente la expresión tanto de filagrina como de caspasa-14, mientras que el tratamiento con BAY vuelve a incrementar dicha expresión hasta alcanzar los niveles basales. Nuevamente, el tratamiento con el antagonista reduce incluso la expresión basal de filagrina, reafirmando el papel protector del receptor A_{2B} en el proceso de formación de la envuelta cornificada tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

El efecto beneficioso de la activación A_{2B} puesto de manifiesto en este modelo experimental, apoya los resultados de otros estudios que sugieren el papel protector de este receptor en diversos tejidos donde está mayoritariamente expresado. Esto ocurre por ejemplo en el colon, donde el $A_{2B}AR$ es el receptor de adenosina más abundante, actuando como protector de las células epiteliales intestinales. De hecho, en un modelo murino de inflamación intestinal, se observó que en los animales *knockout* $A_{2B}^{-/-}$ se potenciaba la respuesta inflamatoria y se producía una alteración de la barrera epitelial gastrointestinal, mientras que la administración de BAY en animales $A_{2B}^{+/+}$ mejoraba el proceso (Aherme et al., 2015).

Del mismo modo, se ha demostrado que la activación $A_{2B}AR$ promueve la función barrera endotelial para proteger contra la lesión vascular inducida por hipoxia (Eckle et al., 2008). Paralelamente, se han puesto de manifiesto los efectos cardioprotectores de la activación $A_{2B}AR$ en procesos de isquemia-reperfusión, en los que la administración de un agonista reduce el daño miocárdico (Vecchio et al., 2019).

Otros estudios en animales *knockout* $A_{2B}^{-/-}$ revelan que la señalización A_{2B} en células epiteliales alveolares es también relevante para la protección pulmonar. Además, la administración de un agonista A_{2B} en forma de aerosol, atenuó la respuesta inflamatoria en un modelo de inflamación pulmonar aguda (Hoegl et al., 2015).

Así pues, y a pesar de la controversia que sigue creando el papel del $A_{2B}AR$ en los diferentes procesos fisiopatológicos, los resultados expuestos en el presente trabajo ponen de manifiesto, por primera vez en un modelo *in vivo*, el interesante papel del receptor A_{2B} en el control de la proliferación epidérmica y la correcta función barrera en la piel. Esto, unido al potencial efecto antiinflamatorio de este receptor, principalmente en los queratinocitos, abre nuevas vías de investigación para profundizar tanto en las funciones fisiológicas de este receptor en la piel, como para el desarrollo de posibles nuevas terapias de aplicación tópica en patologías cutáneas que cursen con hiperproliferación epidérmica, alteración de la función barrera e inflamación.

Conclusiones

Conclusiones:

I. La aplicación tópica del agonista de los receptores A_{2B} BAY60-6583, reduce las lesiones macroscópicas y minimiza las alteraciones histológicas en el modelo de hiperplasia epidérmica en piel de ratón inducida por TPA, disminuyendo en los queratinocitos los marcadores de proliferación celular CK6 y ki67.

II. La activación $A_{2B}AR$ presenta propiedades antiinflamatorias, reduciendo el edema, citocinas proinflamatorias y diversos parámetros principalmente relacionados con la activación y migración neutrofílica, como la quimiocina CXCL-1

III. En este modelo, la aplicación del agonista A_{2B} normaliza la expresión de proteínas implicadas en la estabilidad de la función barrera epidérmica, como CK10, involucrina, loricrina y filagrina, favoreciendo además la activación de caspasa-14, enzima involucrada en la correcta formación de la envuelta cornificada, y la función protectora de la piel.

IV. Todos los efectos beneficiosos producidos por el agonista BAY60-6583 dependen de la activación del receptor A_{2B} , puesto que son contrarrestados en presencia del antagonista selectivo PSB-1115. Además, algunas alteraciones observadas tras el empleo del antagonista en condiciones basales sugieren un papel fisiológico clave del $A_{2B}AR$ en la función barrera.

V. Los resultados obtenidos en este modelo *in vivo* confirman la importancia del $A_{2B}AR$ en la epidermis. Este receptor representa por lo tanto una potencial diana farmacológica para el tratamiento de enfermedades de la piel con componente inflamatorio y proliferativo, como la psoriasis.

Referencias bibliográficas

Referencias bibliográficas

- Afra, T. P., Razmi, T. M., & Dogra, S. (2019). Apremilast in Psoriasis and Beyond: Big Hopes on a Small Molecule. *Indian Dermatol Online Journal*. 10(1):1–12.
- Aherne, C. M., Saeedi, B., Collins, C. B., Masterson, J. C., Mcnamee, E. N., Perrenoud, L., Rapp, C. R., Curtis, V. F., Bayless, A., Fletcher, A., Glover, L. E., Evans, C. M., Jedlicka, P., Furuta, G. T., De Zoeten, E. F., Colgan, S. P., & Eltzschig, H. K. (2015). Epithelial-specific A2B adenosine receptor signaling protects the colonic epithelial barrier during acute colitis. *Mucosal Immunology*. 8(6):1324–1338.
- Albanesi, C., Madonna, S., Gisondi, P., & Girolomoni, G. (2018). The interplay between keratinocytes and immune cells in the pathogenesis of psoriasis. *Frontiers in Immunology*. 9(1).
- Amber, T., & Tabassum, S. (2020). Cyclosporin in Dermatology: A Practical Compendium. *Dermatologic Therapy*. 33:e13934
- Amigó, M., Payá, M., De Rosa, S., & Terencio, M. C. (2007). Antipsoriatic effects of avarol-3'-thiosalicylate are mediated by inhibition of TNF- α generation and NF- κ B activation in mouse skin. *British Journal of Pharmacology*. 152(3): 353–365.
- Andrés, R. M., Terencio, M. C., Arasa, J., Payá, M., Valcuende-Cavero, F., Navalón, P., & Montesinos, M. C. (2017). Adenosine A2A and A2B Receptors Differentially Modulate Keratinocyte Proliferation: Possible Deregulation in Psoriatic Epidermis. *Journal of Investigative Dermatology*. 137(1): 123–131.
- Arasa, J., Martos, P., Terencio, M. C., Valcuende-Cavero, F., & Montesinos, M. C. (2014). Topical application of the adenosine A2A receptor agonist CGS-21680 prevents phorbol-induced epidermal hyperplasia and inflammation in mice. *Experimental Dermatology*. 23: 555-560
- Arasa, J., Terencio, M. C., Andrés, R. M., Marín-Castejón, A., Valcuende-Cavero, F., Payá, M., & Montesinos, M. C. (2019). Defective induction of COX-2 expression by psoriatic fibroblasts promotes pro-inflammatory activation of macrophages. *Frontiers in Immunology*. 10, 536.
- Balak, D., & Hajdarbegovic, E. (2017). Drug-induced psoriasis: clinical perspectives. *Psoriasis (Auckland, N.Z.)*. 7: 87–94.
- Bali, A., Singh, N., & Jaggi, A. S. (2014). Renin-angiotensin system in pain: Existing in a double life?. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system: JRAAS*. 15(4):329–340.

- Ballaun, C., Karner, S., Mrass, P., Mildner, M., Buchberger, M., Bach, J., Ban, J., Harant, H., Tschachler, E., & Eckhart, L. (2008). Transcription of the caspase-14 gene in human epidermal keratinocytes requires AP-1 and NFκB. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 371(2): 261–266.
- Balogh, E. A., Bashyam, A. M., Ghamrawi, R. I., & Feldman, S. R. (2020). Emerging systemic drugs in the treatment of plaque psoriasis. *Expert Opinion in Emerging Drugs*. 25(2): 89–100.
- Barrea, L., Savanelli, M. C., Di Somma, C., Napolitano, M., Megna, M., Colao, A., & Savastano, S. (2017). Vitamin D and its role in psoriasis: An overview of the dermatologist and nutritionist. *Reviews in and Endocrine Metabolic Disorders*. 18(2): 195–205.
- Basavaraj, K. H., Ashok, N. M., Rashmi, R., & Praveen, T. K. (2010). The role of drugs in the induction and/or exacerbation of psoriasis. *International Journal of Dermatology*. 49(12): 1351–1361.
- Bäsler, K., Bergmann, S., Heisig, M., Naegel, A., Zorn-Kruppa, M., & Brandner, J. M. (2016). The role of tight junctions in skin barrier function and dermal absorption. *Journal of Controlled Release*. 242: 105–118.
- Bélanger, A., Grenier, A., Simard, F., Gendreau, I., Pichette, A., Legault, J., & Pouliot, R. (2020). Dihydrochalcone derivatives from populus balsamifera l. Buds for the treatment of psoriasis. *International Journal of Molecular Sciences*. 21(1): 1–15.
- Bhor, U., & Pande, S. (2006). Scoring systems in dermatology. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*. 72(4):315.
- Billi, A. C., Gudjonsson, J. E., & Voorhees, J. J. (2019). Psoriasis: Past, Present, and Future. *Journal of Investigative Dermatology*. 139(11): 133–142.
- Boehncke, W.-H. H., & Schön, M. P. (2015). Psoriasis. *The Lancet*. 386(9997): 983–994.
- Borea, P. A., Gessi, S., Merighi, S., Vincenzi, F., & Varani, K. (2018). Pharmacology of adenosine receptors: The state of the art. *Physiological Reviews*. 98(3): 1591–1625.
- Borea, P. A., Varani, K., Gessi, S., & Merighi, S. (2018). *The Adenosine Receptors*. New Jersey, EEUU: Springer.
- Bosko, C. A. (2019). Skin Barrier Insights: From Bricks and Mortar to Molecules and Microbes. *Journal of Drugs in Dermatology*. 18(1), :63–67.
- Braun, M., Lelieur, K., & Kietzmann, M. (2006). Purinergic substances promote murine keratinocyte proliferation and enhance impaired wound healing in mice. *Wound Repair and Regeneration*. 14(2):152–161.

- Breitkreutz, D., Braiman-Wiksman, L., Daum, N., Denning, M. F., & Tennenbaum, T. (2007). Protein kinase C family: On the crossroads of cell signaling in skin and tumor epithelium. *Journal Cancer Research and Clinical Oncology*. 133(11):793–808.
- Brettmann, E. A., & de Guzman Strong, C. (2018). Recent evolution of the human skin barrier. *Experimental Dermatology*. 27(8):859–866.
- Brown, J. R., Cornell, K., & Cook, P. W. (2000). Adenosine- and adenine-nucleotide-mediated inhibition of normal and transformed keratinocyte proliferation is dependent upon dipyridamole-sensitive adenosine transport. *Journal of Investigative Dermatology*. 115(5): 849–859.
- Buckley, C. D. (2017). Why should rheumatologists care about fibroblasts?: Answering questions about tissue tropism and disease persistence. *Rheumatology (Oxford, England)*. 56(6): 863–864.
- Burnstock, G. (2018). Purine and purinergic receptors. *Brain and Neuroscience Advances*. 2: 1-10.
- Burnstock, G., Knight, G. E., & Greig, A. V. H. (2012). Purinergic signaling in healthy and diseased skin. *Journal of Investigative Dermatology*. 132(3):526–546.
- Calautti, E., Avalle, L., & Poli, V. (2018). Molecular Sciences Psoriasis: A STAT3-Centric View. *International Journal of Molecular Sciences*. 19, 171.
- Camisa, C. (2007). Drugs That Induce or Exacerbate Psoriasis. *Handbook of Psoriasis (2nd ed)*. New Jersey, EEUU: Wiley-Blackwell. 18(1); 80–87.
- Carrasquillo, O. Y., Pabón-Cartagena, G., Falto-Aizpurua, L. A., Santiago-Vázquez, M., Cancel-Artau, K. J., Arias-Berrios, G., & Martín-García, R. F. (2020). Treatment of erythrodermic psoriasis with biologics: A systematic review. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 83(1): 151–158.
- Castells-Rodellas, A., Castell, J. V., Ramirez-Bosca, A., Nicolas, J. F., Valcuende-Cavero, F., & Thivolet, J. (1992). Interleukin-6 in normal skin and psoriasis. *Acta Dermato Venereologica*. 72(3): 165–168.
- Cekic, C., & Linden, J. (2016). Purinergic regulation of the immune system. *Nature Reviews Immunology*. 16(3): 177–192.
- Chamcheu, J. C., Siddiqui, I. A., Adhami, V. M., Esnault, S., Bharali, D. J., Babatunde, A. S., Adame, S., Massey, R. J., Wood, G. S., Longley, B. J., Mousa, S. A., & Mukhtar, H. (2018). Chitosan-based nanoformulated (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) modulates human keratinocyte-induced responses and alleviates imiquimod-induced murine psoriasiform dermatitis. *International Journal of Nanomedicine*. 13: 4189–4206.

- Chen, J. Q., Man, X. Y., Li, W., Zhou, J., Landeck, L., Cai, S. Q., & Zheng, M. (2013). Regulation of Involucrin in Psoriatic Epidermal Keratinocytes: The Roles of ERK1/2 and GSK-3 β . *Cell Biochemistry and Biophysics*. 66(3): 523–528.
- Chiang, C. C., Cheng, W. J., Korinek, M., Lin, C. Y., & Hwang, T. L. (2019). Neutrophils in Psoriasis. *Frontiers in Immunology*. 10, 2376.
- Chiricozzi, A., Romanelli, P., Volpe, E., Borsellino, G., & Romanelli, M. (2018). Scanning the immunopathogenesis of psoriasis. *International Journal of Molecular Sciences*. 19(1): 179.
- Chu, C. C., Di Meglio, P., & Nestle, F. O. (2011). Harnessing dendritic cells in inflammatory skin diseases. *Seminars in Immunology*. 23,(1): 28–41.
- Coates, L. C., FitzGerald, O., Helliwell, P. S., & Paul, C. (2016). Psoriasis, psoriatic arthritis, and rheumatoid arthritis: Is all inflammation the same?. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 46(3): 291–304.
- Cohen, S., Barer, F., Itzhak, I., Silverman, M. H., & Fishman, P. (2018). Inhibition of IL-17 and IL-23 in human keratinocytes by the A3 adenosine receptor agonist piclidenoson. *Journal of Immunology Research*. 2018:2310970.
- Cook, P. W., Ashton, N. M., & Pittelkow, M. R. (1995). Adenosine and adenine nucleotides inhibit the autonomous and epidermal growth factor-mediated proliferation of cultured human keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*. 104(6): 976–981.
- Cronstein, B. N., & Sitkovsky, M. (2017). Adenosine and adenosine receptors in the pathogenesis and treatment of rheumatic diseases. *Nature Reviews Rheumatology*. 13(1): 41–51.
- Denecker, G., Ovaere, P., Vandenabeele, P., & Declercq, W. (2008). Caspase-14 reveals its secrets. *Journal of Cell Biology*. 180(3): 451–458).
- Deng, Y., Chang, C., & Lu, Q. (2016). The Inflammatory Response in Psoriasis: a Comprehensive Review. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*. 50(3): 377–389.
- Dilek, N., Dilek, A. R., Taskin, Y., Erkinüresin, T., Yalçin, Ö., & Saral, Y. (2016). Contribution of myeloperoxidase and inducible nitric oxide synthase to pathogenesis of psoriasis. *Postepy Dermatologii i Alergologii*. 33(6): 435–439.
- Dmello, C., Srivastava, S. S., Tiwari, R., Chaudhari, P. R., Sawant, S., & Vaidya, M. M. (2019). Multifaceted role of keratins in epithelial cell differentiation and transformation. *Journal of Bioscience*. 44(2):33.

- Dubey, R. K., Fingerle, J., Gillespie, D. G., Mi, Z., Rosselli, M., Imthurn, B., & Jackson, E. K. (2015). Adenosine Attenuates Human Coronary Artery Smooth Muscle Cell Proliferation by Inhibiting Multiple Signaling Pathways That Converge on Cyclin D. *Hypertension*. 66(6): 1207–1219.
- Eckle, T., Grenz, A., Laucher, S., & Eltzschig, H. K. (2008). A2B adenosine receptor signaling attenuates acute lung injury by enhancing alveolar fluid clearance in mice. *Journal of Clinical Investigation*. 118(10): 3301–3315.
- Effendi, W. I., Nagano, T., Kobayashi, K., & Nishimura, Y. (2020). Focusing on Adenosine Receptors as a Potential Targeted Therapy in Human Diseases. *Cells*. 9(3): 785.
- Eissing, L., Rustenbach, S. J., Krensel, M., Zander, N., Spehr, C., Radtke, M. A., Naldi, L., & Augustin, M. (2016). Psoriasis registries worldwide: systematic overview on registry publications. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 30(7): 1100–1106.
- Fredholm, B. B., IJzerman, A. P., Jacobson, K. A., Linden, J., & Müller, C. E. (2011). International union of basic and clinical pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors - An update. *Pharmacological Reviews*. 63(1): 1–34.
- Frick, J.-S., MacManus, C. F., Scully, M., Glover, L. E., Eltzschig, H. K., & Colgan, S. P. (2009). Contribution of Adenosine A2B Receptors to Inflammatory Parameters of Experimental Colitis. *Journal of Immunology*. 182(8): 4957–4964.
- Fukaya, S., Matsui, Y., Tomaru, U., Kawakami, A., Sogo, S., Bohgaki, T., Atsumi, T., Koike, T., Kasahara, M., & Ishizu, A. (2013). Overexpression of TNF- α -converting enzyme in fibroblasts augments dermal fibrosis after inflammation. *Laboratory Investigation*. 93(1): 72–80.
- Gao, Z. G., Inoue, A., & Jacobson, K. A. (2018). On the G protein-coupling selectivity of the native A2B adenosine receptor. *Biochemical Pharmacology*. 151: 201–213.
- Gęgotek, A., Domingues, P., Wroński, A., & Skrzydlewska, E. (2020). Changes in proteome of fibroblasts isolated from psoriatic skin lesions. *International Journal of Molecular Sciences*. 21(15): 1–17.
- Goldminz, A. M., Au, S. C., Kim, N., Gottlieb, A. B., & Lizzul, P. F. (2013). NF- κ B: An essential transcription factor in psoriasis. *Journal of Dermatological Science*. 69(2): 89–94.
- Grän, F., Kerstan, A., Serfling, E., Goebeler, M., & Muhammad, K. (2020). Current developments in the immunology of psoriasis. *Yale Journal of Biology and Medicine*. 93(1): 97–110.

- Greb, J. E., Goldminz, A. M., Elder, J. T., Lebwohl, M. G., Gladman, D. D., Wu, J. J., Mehta, N. N., Finlay, A. Y., & Gottlieb, A. B. (2016). Psoriasis. *Nature Reviews Disease Primers*. 2(1): 1–17.
- Grželj, J., & Sollner Dolenc, M. (2020). The role of xenobiotics in triggering psoriasis. *Archives of Toxicology*. 94(12), 3959–3982
- Hart, M. L., Jacobi, B., Schittenhelm, J., Henn, M., & Eltzschig, H. K. (2009). Cutting Edge: A2B Adenosine Receptor Signaling Provides Potent Protection during Intestinal Ischemia/Reperfusion Injury. *The Journal of Immunology*. 182(7): 3965–3968.
- Haskó, G., Antonioli, L., & Cronstein, B. N. (2018). Adenosine metabolism, immunity and joint health. *Biochemical Pharmacology*. 15: 307–313.
- Hawkes, J. E., Adalsteinsson, J. A., Gudjonsson, J. E., & Ward, N. L. (2018). Research Techniques Made Simple: Murine Models of Human Psoriasis. *Journal of Investigative Dermatology*. 138(1):1–8
- Hawkes, J. E., Chan, T. C., & Krueger, J. G. (2017). Psoriasis pathogenesis and the development of novel targeted immune therapies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 140(3):645–653.
- Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2014). Regulation of NF- κ B by TNF family cytokines. *Seminars in Immunology*. 26(3): 253–266.
- Hinz, S., Navarro, G., Borroto-Escuela, D., Seibt, B. F., Ammon, Y. C., de Filippo, E., Danish, A., Lacher, S. K., Červinková, B., Rafehi, M., Fuxe, K., Schiedel, A. C., Franco, R., & Müller, C. E. (2018). Adenosine A2A receptor ligand recognition and signaling is blocked by A2B receptors. *Oncotarget*. 9(17): 13593–13611.
- Hoegl, S., Brodsky, K. S., Blackburn, M. R., Karmouty-Quintana, H., Zwissler, B., & Eltzschig, H. K. (2015). Alveolar Epithelial A2B Adenosine Receptors in Pulmonary Protection during Acute Lung Injury. *The Journal of Immunology*. 195(4): 1815–1824.
- Hoffjan, S., & Stemmler, S. (2007). On the role of the epidermal differentiation complex in ichthyosis vulgaris, atopic dermatitis and psoriasis. *British Journal of Dermatology*. 157(3): 441–449.
- Hong, J., & Bernstein, D. (2018). *A Review of Drugs That Induce or Exacerbate Psoriasis*. 18(1): 2-11.
- Hoste, E., Kemperman, P., Devos, M., Denecker, G., Kezic, S., Yau, N., Gilbert, B., Lippens, S., De Groote, P., Roelandt, R., Van Damme, P., Gevaert, K., Presland, R. B., Takahara, H., Puppels, G., Caspers, P., Vandenabeele, P., & Declercq, W. (2011). Caspase-14 is required for filaggrin degradation to natural moisturizing factors in the skin. *Journal of Investigative Dermatology*. 131(11): 2233–2241.

- Hvid, M., Johansen, C., Deleuran, B., Kemp, K., Deleuran, M., & Vestergaard, C. (2011). Regulation of caspase 14 expression in keratinocytes by inflammatory cytokines - a possible link between reduced skin barrier function and inflammation? *Experimental Dermatology*. 20(8): 633–636.
- Iannone, R., Miele, L., Maiolino, P., Pinto, A., & Morello, S. (2013). Blockade of A2B adenosine receptor reduces tumor growth and immune suppression mediated by myeloid-derived suppressor cells in a mouse model of melanoma. *Neoplasia (New York)*. 15(12): 1400-1409.
- Ji, Y. Z., & Liu, S. R. (2019). Koebner phenomenon leading to the formation of new psoriatic lesions: Evidences and mechanisms. *Bioscience Reports*. 39(12).
- Kamiya, K., Kishimoto, M., Sugai, J., Komine, M., & Ohtsuki, M. (2019). Risk factors for the development of psoriasis. In *International Journal of Molecular Sciences*. 20(18): 4347.
- Kezic, S., & Jakasa, I. (2016). Filaggrin and Skin Barrier Function. *Current Problems in Dermatology*. 49: 1–7.
- Kim, B. E., Howell, M. D., Guttman, E., Gilleaudeau, P. M., Cardinale, I. R., Boguniewicz, M., Krueger, J. G., & Leung, D. Y. M. (2011). TNF- α downregulates filaggrin and lorixin through c-Jun N-terminal kinase: Role for TNF- α antagonists to improve skin barrier. *Journal of Investigative Dermatology*. 131(6): 1272–1279.
- Kobayashi, T., Ricardo-Gonzalez, R. R., & Moro, K. (2020). Skin-Resident Innate Lymphoid Cells – Cutaneous Innate Guardians and Regulators. *Trends in Immunology*. (41)2: 100-112.
- Konrad, F. M., Meichssner, N., Bury, A., Ngamsri, K. C., & Reutershan, J. (2017). Inhibition of SDF-1 receptors CXCR4 and CXCR7 attenuates acute pulmonary inflammation via the adenosine A2B-receptor on blood cells. *Cell Death & Disease*. 8(5): 2832.
- Le Bitoux, M.-A., & Haftek, M. (2008). *Fisiología cutánea: queratinización epidérmica*. EMC Podología. 10(3): 1-10.
- Lee, A. Y. (2020a). Molecular mechanism of epidermal barrier dysfunction as primary abnormalities. *International Journal of Molecular Sciences* 21(4): 1194.
- Lee, A. Y. (2020b). The role of micrnas in epidermal barrier. *International Journal of Molecular Sciences*. 21(16): 1–23.
- Lee, S. E., & Lee, S. H. (2018). Skin Barrier and Calcium. *Skin Barrier and Calcium*, 30(3), 1013–9087.
- Logotheti, S., & Pützer, B. M. (2019). STAT3 and STAT5 targeting for simultaneous management of melanoma and autoimmune diseases. *Cancers*. 11(10): 1448.

- Losquadro, W. D. (2017). Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*. 25(3): 283–289.
- Ma, N., Tang, Q., Wu, W. T., Huang, X. A., Xu, Q., Rong, G. L., Chen, S., & Song, J. P. (2018). Three constituents of moringa oleifera seeds regulate expression of Th17-relevant cytokines and ameliorate tpa-induced psoriasis-like skin lesions in mice. *Molecules*. 23(12): 7–9.
- Magni, G., & Ceruti, S. (2020). Adenosine signaling in autoimmune disorders. *Pharmaceuticals*. 13(9): 1–22.
- Maksimovic, V., Pavlovic-Popovic, Z., Vukmirovic, S., Cvejic, J., Mooranian, A., Al-Salami, H., Mikov, M., & Golocorbin-Kon, S. (2020). Molecular mechanism of action and pharmacokinetic properties of methotrexate. *Molecular Biology Reports*. 47(6):4699–4708.
- Masson, W., Lobo, M., & Molinero, G. (2020). Psoriasis and Cardiovascular Risk: A Comprehensive Review. *Advances in Therapy*. 37(5): 2017–2033.
- McGrath, J. A., & Uitto, J. (2008). The filaggrin story: novel insights into skin-barrier function and disease. *Trends in Molecular Medicine*. 14, (1): 20–27.
- Menter, A., Strober, B. E., Kaplan, D. H., Kivelevitch, D., Prater, E. F., Stoff, B., Armstrong, A. W., Connor, C., Cordero, K. M., Davis, D. M. R., Elewski, B. E., Gelfand, J. M., Gordon, K. B., Gottlieb, A. B., Kavanaugh, A., Kiselica, M., Korman, N. J., Kroshinsky, D., Lebwohl, M., ... Elmets, C. A. (2019). Joint AAD-NPF guidelines of care for the management and treatment of psoriasis with biologics. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 80(4), 1029–1072.
- Montesinos, M. C., Desai, A., Chen, J. F., Yee, H., Schwarzschild, M. A., Fink, J. S., & Cronstein, B. N. (2002). Adenosine promotes wound healing and mediates angiogenesis in response to tissue injury via occupancy of A2A receptors. *American Journal of Pathology*. 160(6): 2009–2018.
- Montesinos, M. C., Gadangi, P., Longaker, M., Sung, J., Levine, J., Nilsen, D., Reibman, J., Li, M., Jiang, C. K., Hirschhorn, R., Recht, P. A., Ostad, E., Levin, R. I., & Cronstein, B. N. (1997). Wound healing is accelerated by agonists of adenosine A2 (G_{αs}- linked) receptors. *Journal of Experimental Medicine*. 186(9):1615–1620.
- Montesinos, M. C., & Valls, M. D. (2010). Stimulation of wound revascularization by adenosine receptor activation. En Gerasimovskaya, E. y Kaczmarek, E. *Extracellular ATP and Adenosine as Regulators of Endothelial Cell Function: Implications for Health and Disease (95-112)*. New Jersey, EEUU: Springer .

- Müller, C. E., Baqi, Y., & Namasivayam, V. (2020). Agonists and antagonists for purinergic receptors. *Methods in Molecular Biology*. 2041: 45–64.
- Nakajima, K., & Sano, S. (2018). Mouse models of psoriasis and their relevance. *The Journal of Dermatology*. 45(3): 252–263.
- Napolitano, M., Caso, F., Scarpa, R., Megna, M., Patri, A., Balato, N., & Costa, L. (2016). Psoriatic arthritis and psoriasis: differential diagnosis. *Clinical Rheumatology*. 35(8): 1893–1901.
- Nedoszytko, B., Dobosz, A. S., Macleja, M. S., Saczonek, A. O., Reich, A., Bartosinska, J., Baran, A. B., Czajkowski, R., Dobrucki, I. T., Dobrucki, L. W., Sokolowska, M. G., Jasiocka, A. J., Kalinowski, L., Krasowska, D., Bohdan, D. P., Radulska, A., Reszka, E., Samotij, D., Kwapis, M. S., ... Nowicki, R. J. (2020). Pathogenesis of psoriasis in the “omic” era. Part II Genetic, genomic and epigenetic changes in psoriasis. *Postepy Dermatologii i Alergologii*. 37(3): 283–298.
- Nguyen, A. V., & Soulika, A. M. (2019). The dynamics of the skin's immune system. *International Journal of Molecular Sciences*. 20(8): 1811.
- Niehues, H., Bouwstra, J. A., El Ghalbzouri, A., Brandner, J. M., Zeeuwen, P. L. J. M., & van den Bogaard, E. H. (2018). 3D skin models for 3R research: The potential of 3D reconstructed skin models to study skin barrier function. *Experimental Dermatology*. 27(5): 501–511.
- Nishifuji, K., & Yoon, J. S. (2013). The stratum corneum: The rampart of the mammalian body. *Veterinary Dermatology*. 24(1): 60–72.
- Nithya, S., Radhika, T., & Jeddy, N. (2015). Lorincrin - An overview. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*. 19(1): 64–68.
- Nosenko, M. A., Ambaryan, S. G., & Drutskaya, M. S. (2019). Proinflammatory Cytokines and Skin Wound Healing in Mice. *Molecular Biology*. 53(5): 653–664.
- Omland, S. H., & Gniadecki, R. (2015). Psoriasis inversa: A separate identity or a variant of psoriasis vulgaris? *Clinics in Dermatology*. 33(4): 456–461.
- Organización Mundial de la Salud, [OMS]. (2016). *Global report on psoriasis* Recuperado de <https://apps.who.int/iris/handle/10665/204417>
- Owczarczyk-Saczonek, A., Czerwińska, J., & Placek, W. (2018). The role of regulatory T cells and anti-inflammatory cytokines in psoriasis. *Acta dermatovenerologica Alpina, Pannonica, et Adriatica*, 27, 17–23.
- Owczarczyk-Saczonek, A., Purzycka-Bohdan, D., Nedoszytko, B., Reich, A., Szczerkowska-Dobosz, A., Bartosinska, J., Batycka-Baran, A., Czajkowski, R., Dobrucki, I. T., Dobrucki, L. W., Górecka-Sokolowska, M., Janaszak-Jasiocka, A., Kalinowski, L., Krasowska, D., Radulska, A., Reszka, E., Samotij, D., Slominski, A., Slominski, R., ... Nowicki, R. J. (2020). Pathogenesis of psoriasis in the “omic”

- era. Part III. Metabolic disorders, metabolomics, nutrigenomics in psoriasis. *Postepy Dermatologii i Alergologii*. 37(4): 452–467.
- Perera, G. K., Di Meglio, P., & Nestle, F. O. (2012). Psoriasis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 7(1): 385–422.
- Perez-Aso, M., Mediero, A., & Cronstein, B. N. (2013). Adenosine A2A receptor (A2AR) is a fine-tune regulator of the collagen1:collagen3 balance. *Purinergic Signalling*. 9(4): 573–583.
- Phosri, S., Arieyawong, A., Bunrukchai, K., Parichatikanond, W., Nishimura, A., Nishida, M., & Mangmool, S. (2017). Stimulation of Adenosine A2B Receptor Inhibits Endothelin-1-Induced Cardiac Fibroblast Proliferation and α -Smooth Muscle Actin Synthesis Through the cAMP/Epac/PI3K/Akt-Signaling Pathway. *Frontiers in Pharmacology*. 8: 428.
- Pietrzak, A., Chabros, P., Grywalska, E., Pietrzak, D., Kandzierski, G., Wawrzycki, B., Roliński, J., Gawęda, K., & Krasowska, D. (2020). Serum concentration of interleukin 6 is related to inflammation and dyslipidemia in patients with psoriasis. *Postepy Dermatologii i Alergologii*. 37(1): 41–45.
- Proksch, E., Brandner, J. M., & Jensen, J.-M. (2008). The skin: an indispensable barrier. *Experimental Dermatology*. 17(12): 1063–1072.
- Quaranta, M., Knapp, B., Garzorz, N., Mattii, M., Pullabhatla, V., Pennino, D., Andres, C., Traidl-Hoffmann, C., Cavani, A., Theis, F. J., Ring, J., Schmidt-Weber, C. B., Eyerich, S., & Eyerich, K. (2014). Intraindividual genome expression analysis reveals a specific molecular signature of psoriasis and eczema. *Science Translational Medicine*. 6(244).
- Ramakers, B. P., Riksen, N. P., van der Hoeven, J. G., Smits, P., & Pickkers, P. (2011). Modulation of Innate Immunity by Adenosine Receptor Stimulation. *Shock*. 36(3): 208–215.
- Raychaudhuri, S. K., Maverakis, E., & Raychaudhuri, S. P. (2014). Diagnosis and classification of psoriasis. *Autoimmunity Reviews*. 13, (4–5) :90–495.
- Reichelt, J., Breiden, B., Sandhoff, K., & Magin, T. M. (2004). Loss of keratin 10 is accompanied by increased sebocyte proliferation and differentiation. *European Journal of Cell Biology*. 83(11–12): 747–759.
- Rendon, A., & Schäkel, K. (2019). Psoriasis pathogenesis and treatment. In *International Journal of Molecular Sciences*. 20(6): 1475.
- Rinkenbaugh, A., & Baldwin, A. (2016). The NF- κ B Pathway and Cancer Stem Cells. *Cells*. 5(2): 16.

- Rioux, G., Ridha, Z., Simard, M., Turgeon, F., Gu erin, S. L., & Pouliot, R. (2020). Transcriptome profiling analyses in psoriasis: A dynamic contribution of keratinocytes to the pathogenesis. *Genes*. 11(10): 1–22.
- Ritti e, L. (2017). Method for picosirius red-polarization detection of collagen fibers in tissue sections. *Methods in Molecular Biology*. 1627 :395–407.
- Rodríguez-Luna, A., Talero, E., Terencio, M., González-Rodríguez, M., Rabasco, A., de los Reyes, C., Motilva, V., &  vila-Román, J. (2017). Topical Application of Glycolipids from *Isochrysis galbana* Prevents Epidermal Hyperplasia in Mice. *Marine Drugs*. 16(1): 2.
- Rosales, C. (2018). Neutrophil: A cell with many roles in inflammation or several cell types? *Frontiers in Physiology*. 9: 113.
- Roszkiewicz, M., Dopytalska, K., Szymańska, E., Jakimiuk, A., & Walecka, I. (2020). Environmental risk factors and epigenetic alternations in psoriasis. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 27(3): 335–342.
- Sandilands, A., Sutherland, C., Irvine, A. D., & McLean, W. H. I. (2009). Filaggrin in the frontline: Role in skin barrier function and disease. *Journal of Cell Science*. 122(9): 1285–1294.
- Sandoval-Talamantes, A. K., G mez-González, B. A., Uriarte-Mayorga, D. F., Martínez-Guzman, M. A., Wheber-Hidalgo, K. A., & Alvarado-Navarro, A. (2020). Neurotransmitters, neuropeptides and their receptors interact with immune response in healthy and psoriatic skin. *Neuropeptides*. 79: 102004.
- Sarac, G., Koca, T. T., & Baglan, T. (2016). A brief summary of clinical types of psoriasis. *Northern Clinics of Istanbul*. 3(1): 79–82.
- Sato, H., Nakayama, Y., Yamashita, C., & Uno, H. (2004). Anti-Inflammatory Effects of Tacalcitol (1,24 (R) (OH)2D 3, TV-02) in the Skin of TPA-Treated Hairless Mice. *Journal of Dermatology*. 31(3): 200–217.
- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., & Rose-John, S. (2011). The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 1813(5): 878–888.
- Sevilla, L. M., Nachat, R., Groot, K. R., Klement, J. F., Uitto, J., Djian, P., M  tt , A., & Watt, F. M. (2007). Mice deficient in involucrin, envoplakin, and periplakin have a defective epidermal barrier. *Journal of Cell Biology*. 179(7):1599–1612.
- Shaikh, G., & Cronstein, B. (2016). Signaling pathways involving adenosine A2A and A2B receptors in wound healing and fibrosis. *Purinergic Signalling*, 12(2), 191–197.

- Singh, S., Pradhan, D., Puri, P., Ramesh, V., Aggarwal, S., Nayek, A., & Jain, A. K. (2019). Genomic alterations driving psoriasis pathogenesis. *Gene*. 683: 61–71.
- Sorrentino, C., Miele, L., Porta, A., Pinto, A., & Morello, S. (2015). Myeloid-derived suppressor cells contribute to A2B adenosine receptor-induced VEGF production and angiogenesis in a mouse melanoma model. *Oncotarget*. 6(29): 27478–27489.
- Takahashi, T., & Yamasaki, K. (2020). Psoriasis and Antimicrobial Peptides. *International Journal of Molecular Sciences*. 21(18): 6791.
- Thorleifsdottir, R. H., Sigurdardottir, S. L., Sigurgeirsson, B., Olafsson, J. H., Sigurdsson, M. I., Petersen, H., Arnadottir, S., Gudjonsson, J. E., Johnston, A., & Valdimarsson, H. (2012). Improvement of Psoriasis after Tonsillectomy Is Associated with a Decrease in the Frequency of Circulating T Cells That Recognize Streptococcal Determinants and Homologous Skin Determinants. *The Journal of Immunology*. 188(10): 5160–5165.
- Timis, T. L., & Orasan, R. I. (2018). Understanding psoriasis: Role of miRNAs (review). *Biomedical Reports*. 9(5): 367–374.
- Tobin, D. J. (2017). Introduction to skin aging. *Journal of Tissue Viability*. 26(1): 37–46.
- Tokuyama, M., & Mabuchi, T. (2020). New Treatment Addressing the Pathogenesis of Psoriasis. *International Journal of Molecular Sciences*. 21(20): 7488.
- Torsekar, R., & Gautam, M. (2017). Topical therapies in psoriasis. *Indian Dermatology Online Journal*. 8(4): 235.
- Tu, C. L., Oda, Y., Komuves, L., & Bikle, D. D. (2004). The role of the calcium-sensing receptor in epidermal differentiation. *Cell Calcium*. 35(3): 265–273.
- Vecchio, E. A., White, P. J., & May, L. T. (2017). Targeting adenosine receptors for the treatment of cardiac fibrosis. *Frontiers in Pharmacology*. 8: 243.
- Vecchio, E. A., White, P. J., & May, L. T. (2019). The adenosine A2B G protein-coupled receptor: Recent advances and therapeutic implications. *Pharmacology and Therapeutics*. 198: 20–33.
- Visconti, B., Paolino, G., Carotti, S., Pendolino, A. L., Morini, S., Richetta, A. G., & Calvieri, S. (2015). Immunohistochemical expression of VDR is associated with reduced integrity of tight junction complex in psoriatic skin. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 29(10): 2038–2042.
- Wang, A., & Bai, Y. (2020). Dendritic cells: The driver of psoriasis. *The Journal of Dermatology*. 47(2): 104–113.

- Wong, R., Geyer, S., Weninger, W., Guimberteau, J.-C., & Wong, J. K. (2016). The dynamic anatomy and patterning of skin. *Experimental Dermatology*. 25(2): 92–98.
- Xu, N., Brodin, P., Wei, T., Meisgen, F., Eidsmo, L., Nagy, N., Kemeny, L., Stähle, M., Sonkoly, E., & Pivarcsi, A. (2011). MiR-125b, a MicroRNA downregulated in psoriasis, modulates keratinocyte proliferation by targeting FGFR2. *Journal of Investigative Dermatology*. 131(7): 1521–1529.
- Xu, X., Zhu, Q., Niu, F., Zhang, R., Wang, Y., Wang, W., Sun, D., Wang, X., & Wang, A. (2018). A2BAR activation attenuates acute lung injury by inhibiting alveolar epithelial cell apoptosis both in vivo and in vitro. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 315(4): C558–C570.
- Yamamoto, M., Miyai, M., Matsumoto, Y., Tsuboi, R., & Hibino, T. (2012). Kallikrein-related peptidase-7 regulates caspase-14 maturation during keratinocyte terminal differentiation by generating an intermediate form. *Journal of Biological Chemistry*. 287(39): 32825–32834.
- Yan, B., Liu, N., Li, J., Li, J., Zhu, W., Kuang, Y., Chen, X., & Peng, C. (2020). The role of Langerhans cells in epidermal homeostasis and pathogenesis of psoriasis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 24:11646–11655.
- Yang, Q., Langston, J. C., Tang, Y., Kiani, M. F., & Kilpatrick, L. E. (2019). The role of tyrosine phosphorylation of protein kinase C delta in infection and inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*. 20(6): 1498.
- Ye, Y., Gaugler, B., Mohty, M., & Malard, F. (2020). Plasmacytoid dendritic cell biology and its role in immune-mediated diseases. In *Clinical and Translational Immunology*. 9: 1139.
- Yousef H, Alhadj M, Sharma S. Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. [Updated 2020 Jul 27]. In: StatPearls [Internet]. *Treasure Island (FL)*, StatPearlsPublishing. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470464/>
- Zhang, J., Corciulo, C., Liu, H., Wilder, T., Ito, M., & Cronstein, B. (2017). Adenosine A2a Receptor Blockade Diminishes Wnt/ β -Catenin Signaling in a Murine Model of Bleomycin-Induced Dermal Fibrosis. *American Journal of Pathology*. 187(9): 1935–1944.
- Zhang, X., Yin, M., & Zhang, L. (2019). Keratin 6, 16 and 17—Critical Barrier Alarmin Molecules in Skin Wounds and Psoriasis. *Cells*. 8(8): 807.

Anexos

Anexo I



AUTORIZACION PROCEDIMIENTO 2016/VSC/PEA/00138

Vista la solicitud realizada en fecha 22/06/16 con nº reg. entrada 24952 por D/D^a. Pilar Campins Falcó, Vicerrectora de Investigación y Política Científica, centro usuario ES460780001001, para realizar el procedimiento:

"Estudio de alteraciones de la hemostasia bisular en psoriasis: Hiperplasia en piel de ratón inducida por TPA"

Teniendo en cuenta la documentación aportada, según se indica en el artículo 33, punto 5 y 6, y puesto que dicho procedimiento se halla sujeto a autorización en virtud de lo dispuesto en el artículo 31 del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero,

Vista la propuesta del jefe del servicio de Ganadería y Sanidad y Bienestar Animal.

AUTORIZO:

la realización de dicho procedimiento al que se le asigna el código: **2016/VSC/PEA/00138** tipo 2, de acuerdo con las características descritas en la propia documentación para el número de animales, especie y período de tiempo solicitado. Todo ello sin menoscabo de las autorizaciones pertinentes, por otras Administraciones y entidades, y llevándose a cabo en las siguientes condiciones:

Usuario: Universitat de Valencia

Responsable del proyecto: María Carmen Terencio Silvestre

Establecimiento: Sección de Producción Animal SCIE-Campus Burjassot

Necesidad de evaluación retrospectiva:

Condiciones específicas:

Observaciones:

Valencia a 22 de agosto de 2016

El director general de Agricultura, Ganadería y Pesca

Rogelio Llanes Ribas

