

DOCTORAT EN MEDICINA



DETERMINACIÓN DE LA ACTUACIÓN DE LOS BLOQUEADORES BETA ADRENÉRGICOS SOBRE LA VASODILATACIÓN PRODUCIDA POR LAS CATECOLAMINAS EN LA MICROCIRCULACIÓN DE TEJIDOS CUTÁNEOS IN VITRO

TESIS DOCTORAL

Presentada por:
LAURABEL GOZALBES ESTERELLES

Dirigida por:
DR. D. JULIO CORTIJO GIMENO
DR. D. FEDERICO MATA ESCOLANO

VALÈNCIA, 2021



Doctorado en Medicina

D. Julio Cortijo Gimeno, Catedrático de la Universitat de València y D. Federico Mata Escolano, Servicio de Radiología de ERESA,

CERTIFICAN:

Que el trabajo presentado por la Lda. **LAURABEL GOZALBES ESTERELLES**, titulado "Determinación de la actuación de los bloqueadores beta adrenérgicos sobre la vasodilatación producida por las catecolaminas en la microcirculación de tejidos cutáneos in vitro", para obtener el grado de Doctor, 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, a 19 de mayo de 2021

Julio Cortijo Gimeno

Federico Mata Escolano

La presente Tesis Doctoral, realizada en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universitat de Valencia, ha sido posible gracias a las siguientes ayudas:

- **SAF2017-82913-R (JC)**
- **CIBERES (CB06/06/0027)**
- **Ayuda de investigación del Gobierno Regional Prometeo 2017/023/UV (JC, EM) procedente de la Generalitat Valenciana**

Las entidades financiadoras no han contribuido al diseño del estudio ni a la recopilación, análisis e interpretación de datos ni a la redacción del manuscrito.

DEDICATORIA

Os dedico a vosotros, mi querido hijo y mi querida abuela, esta tesis.

Os fuisteis sin conoceros y ahora sé que estáis juntos.

Os quiero.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis no sería posible si no fuera gracias al Dr. Anselm Morell, a él toda mi gratitud.

También agradecer la paciencia infinita de mis directores de tesis, Dr. Julio Cortijo y

Dr. Federico Mata, muchos cambios, muchas cosas, pero ahí está, ¡por fin! A Teresa

Moratal, que la conocí como secretaria en la Fundación y que acabó siendo mi amiga,

sin ella, esta tesis tampoco sería posible, gracias por todo tu apoyo y tus ánimos. Por

supuesto, guardo un pedacito para Jimena y Claudia. A mis padres y a mi hermano. A mi

abuela Isabel, trabajadora incansable, y a mi abuelo Antonio, autodidacta, empedernido

lector y viajero. A mis suegros. A Ampí, Ester, Monti, Neusi y Xusi, que, aunque tengan

mala memoria, siempre se puede contar con ellas (menos quedar todas juntas, azaña

digna de las mejores epopeyas). A Robi, Átor, Gandul, Igor, Otto, Jordi, Nela, Berta y

Marcus, siempre ahí. Y por supuesto, a vosotros, Jorge y Darwin, por enseñarme a

disfrutar, por los viajes que nos quedan por hacer y por trotar juntos y el mundo que nos

queda por descubrir.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	12
1.1 ANTECEDENTES: ESTRUCTURA CUTÁNEA Y SU REGULACIÓN VASCULAR.	12
1.1.1 FUNCIÓN DE LA PIEL.....	12
1.1.2. HISTOLOGÍA.....	13
1.1.3 CIRCULACIÓN CUTÁNEA.....	19
1.1.3.1. Función de la circulación cutánea	19
1.1.3.2 Estructura vascular arterial	21
1.1.3.3. Sistema linfático	23
1.1.3.4. Regulación de la circulación humana	24
1.1.3.5. Vascularización cutánea en inflamación cutánea crónica.....	26
1.1.3.6. Sistema adrenérgico vascular	27
1.1.3.7 Sistema adrenérgico en los vasos cutáneos.....	30
1.2. ROSÁCEA	31
1.2.1. Epidemiología	37
1.2.2. Etiopatogenia	37
1.2.3. Patofisiología	38
1.2.4. Anatomía patológica	40
1.2.5. Tratamiento.....	41
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	45
2.1. HIPÓTESIS.....	45
2.2. OBJETIVO.....	46
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
3.1. MATERIALES	47
3.1.1 REACTIVOS UTILIZADOS	47
3.2. MÉTODOS.....	49
3.2.1. Procedimientos experimentales in vitro	49

3.2.1.1. Procesamiento de las muestras de rodajas de piel humana.....	49
3.2.1.1.1. Experimentos de perfusión	50
3.2.1.1.2. Protocolos experimentales.....	53
3.2.1.2. Experimentos en miógrafo	55
3.2.1.2.1. Protocolos experimentales.....	57
3.2.2. Análisis de la proporción de la expresión de receptores α y β -adrenérgicos en vasos humanos cutáneos.	59
3.2.2.1. Protocolo de inmunofluorescencia confocal.....	60
3.2.2.2. Protocolo PCR en tiempo real para el análisis de la expresión de receptores adrenérgicos	63
3.2.2.3. Protocolo Western Blot	64
3.2.3. Análisis estadístico	65
4. RESULTADOS.....	66
4.1. Experimentos de perfusión en microarterias (<200 μm) de cortes de tejido cutáneo humano.....	66
4.1.1. Experimentos de perfusión en microarterias (<200 μ m) de cortes tejido cutáneo humano en presencia de agonistas alfa-adrenérgicos.	66
4.1.2. Experimentos de perfusión en microarterias (<200 μ m) de cortes de tejido cutáneo humano en presencia de un antagonista del receptor adrenérgico α_1	69
4.1.3. Experimentos de perfusión en microarterias (<200 μ m) de cortes de tejido cutáneo humano precontraídos con cloruro potásico	70
4.1.4. Experimentos de perfusión de microarterias (<200 μ m) de cortes de tejido cutáneo humano precontraídos con cloruro potásico y relajadas con norepinefrina en presencia de prazosín como antagonista α_1 adrenérgico.	72
4.2. Experimentos en anillos de pequeñas arterias cutáneas (500-800 μm) de tejido humano utilizando un microbaño de órganos con miógrafo.	73
4.2.1. Experimentos en anillos de pequeñas arterias cutáneas (500-800 μ m) de tejido humanos utilizando un microbaño de órganos con miógrafo, en presencia de un agonista del receptor adrenérgico.	73
4.2.2. Experimentos en anillos de pequeñas arterias cutáneas (500-800 μ m) de tejido humano utilizando un microbaño de órganos con miógrafo, en presencia de un antagonista del receptor adrenérgico α_1	74

4.2.3. Experimentos en anillos de pequeñas arterias cutáneas (500-800 μm) de tejido humano utilizando un microbaño de órganos con miógrafo precontraídas con cloruro potásico	76
4.2.4. Experimentos en anillos de pequeñas arterias cutáneas (500-800 μm) de tejido humano utilizando un microbaño de órganos con miógrafo precontraídas con cloruro potásico y relajadas con norepinefrina en presencia de prazosín como antagonista α_1 adrenérgico.	78
4.3. Análisis de la proporción de la expresión de receptores alfa y beta adrenérgicos en los vasos cutáneos humanos	79
4.3.1. Experimentos rodajas (<200 μm) de tejido cutáneo humano	79
4.3.2. Experimentos en anillos de pequeñas arterias cutáneas (500-800 μm) de tejido humanos .	83
5. DISCUSIÓN	86
6. CONCLUSIONES	92
7. BIBLIOGRAFÍA	94
8. LISTA DE ABREVIATURAS	100
9. LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	102
ÍNDICE IMÁGENES.....	102
ÍNDICE TABLAS	104

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES: ESTRUCTURA CUTÁNEA Y SU REGULACIÓN VASCULAR.

1.1.1 FUNCIÓN DE LA PIEL

La piel es un órgano dinámico complejo con diferentes funciones, entre las que se encuentran la dual función de protección del individuo respecto del medio, así como también la interacción con él. De este modo, confiere una barrera física de permeabilidad contra agresiones externas como la luz ultravioleta (UV) o patógenos, pero también tiene otras funciones como la termorregulación corporal, la reparación y regeneración de las heridas, la transmisión de la sensibilidad y el aspecto físico.

Así mismo, se halla altamente vascularizada mediante una red vascular que puede dividirse en superficial, justo por debajo de la epidermis, y una profunda en la frontera dérmica-subcutánea, que se interrelacionan entre sí. La función del lecho vascular es tremendamente importante puesto que se encarga de la termorregulación, el aporte de nutrientes, control de las células inmunitarias y el crecimiento del pelo.

La vasculogénesis en el embrión es un proceso complejo que tiene lugar cuando los angioblastos se diferencian en células endoteliales que conformarán los vasos que, de manera progresiva durante el proceso de angiogénesis, irán incrementando en número y complejidad mediante la remodelación vascular (Velasco & Lange-Asschenfeldt, 2002).

1.1.2. HISTOLOGÍA

La organización de la piel se distribuye en tres capas diferentes, cada una con una funcionalidad distinta (Chu, 2009; Craige & Cohen, 2005):

- i) Epidermis: es la auténtica barrera física (si bien depende más de su porción más externa: la capa córnea) frente a agentes como la radiación UV. Básicamente, está formada por una capa estratificada y queratinizada que se renueva constantemente. Es el origen de los apéndices (uñas, glándulas sudoríparas y glándulas pilosebáceas). Su grosor es de unos 0,4 o 1,5 mm, siendo el de la piel aproximadamente de unos 1,5 a 4 mm. Fundamentalmente está compuesta por queratinocitos dispuestos en cuatro capas según su estadio evolutivo. En la primera capa están las células basales proliferativas unidas a la membrana basal epidérmica y en la última, tras las sucesivas evoluciones, acaban convirtiéndose superficialmente en el estrato córneo queratinizado.

Entre los queratinocitos (que suponen el 80% de las células de esta capa) podemos encontrar otro tipo de células como los melanocitos (se encargan de la síntesis de melanina, que proporciona el color de la piel y la protección frente a los rayos UVA), las células de Langerhans (proviene de la médula ósea, como parte del sistema inmunitario, y se desplazan a la piel para favorecer la defensa inmunitaria como células presentadoras de antígenos) y los corpúsculos de Merkel (células sensoriales que conectan con las terminaciones de neuronas sensitivas para la transmisión de la información del tacto). También podemos encontrar linfocitos en una muy escasa cantidad y de manera transitoria. Profundizando en su estructura, la epidermis se organiza de la siguiente manera:

i.i) Capa basal o estrato germinativo

Del ectodermo deriva el queratinocito, la célula principal de la epidermis (80%). Mediante el proceso complejo de queratinización acaba diferenciándose en el corneocito (queratinocito diferenciado), en cuyo interior se encuentran filamentos de queratina, proteínas de la matriz y una membrana plasmática con un refuerzo de proteínas y lípidos en su superficie. Este proceso tiene una duración de, al menos, 14 días, con una posterior descamación que dura otros 14 días, siendo variable en función de la hiperproliferación o detención del crecimiento.

Las queratinas son una familia de proteínas expresadas en las células epiteliales que se disponen como filamentos intermedios en estas células y su función es estructural. El organismo cuenta con 4 genes que codifican 34 queratinas epiteliales y 17 de pelo. Su expresión depende de la célula de la que se trate, el tejido y si existe alguna patología concomitante.

Los queratinocitos se disponen en forma de columna, adheridos a la membrana basal en los hemidesmosomas mediante filamentos de queratina (K5 y K14) y a otras células adyacentes mediante los desmosomas. A la membrana también se unen vacuolas cuyo contenido son los melanosomas pigmentados adquiridos tras la fagocitación de los melanocitos y son los que confieren la pigmentación visible de la piel. En las capas más basales se hallan las células más mitóticamente activas y organizadas según su potencial proliferativo (células madre de larga vida, células amplificadoras de tránsito [quienes surgen de la división de las anteriores y son las responsables del grosor de volumen necesario para la autorrenovación estable, siendo las células más abundantes] y células postmitóticas [originadas de las células amplificadoras, quienes van a realizar la diferenciación terminal]).

i.ii) Capa espinosa

Las células espinosas suprabasales tienen una morfología poliédrica y núcleo redondo, pero conforme se van diferenciando y avanzando superficialmente, su forma cambia aplanándose y presentando en su interior los gránulos laminares secretorios, que serán los precursores de los lípidos del estrato córneo a nivel del espacio intercelular, y que contienen glicoproteínas, glucolípidos, fosfolípidos, esteroides libres e hidrolasas ácidas. Así mismo contienen filamentos de queratina, que se disponen periféricamente dentro de los desmosomas, que acaban formando la morfología espinosa que da nombre a esta capa. Las queratinas que se produce son las K1 y K10, específicas de la queratinización. Por otra parte, estos desmosomas actúan como integradores de la adhesión celular, en la que el calcio juega un papel importante dado que favorece los cambios en la superficie celular promoviendo la adhesión de las células y la resistencia al estrés mecánico.

i.iii) Capa granulosa

Se debe su nombre a la presencia de gránulos queratohialinos basófilos, formados por profilagrina, loricrina y filamentos de queratina que, una vez liberados, favorecen la queratinización de las células granulosa de esta capa. En el paso final de la diferenciación, tiene lugar la destrucción de la célula mediante apoptosis, que se transforma en corneocito, manteniendo únicamente los filamentos de queratina y la filagrina.

i.iv) Estrato córneo

Los corneocitos se disponen de manera apilada, como células queratinizadas, aplanadas y sin núcleo, formando una barrera mecánica contra agentes exógenos y contra la pérdida de agua interna.

ii) Unión dermoepidérmica: Se trata de una zona de la membrana basal que conforman la interfase entre la epidermis y la dermis. Su función es unir la dermis evitando su separación con la tracción. Sería el soporte de la epidermis, organizando el citoesqueleto basal, dando señales de desarrollo y actuando como una barrera semipermeable.

iii) Dermis: junto con la hipodermis, dan soporte estructural a la piel. En ambas capas se localizan los vasos linfáticos, cuya función es la de regular la hidratación de los tejidos y la eliminación de residuos. Tanto elementos fibrosos como filamentos y células del tejido conjuntivo dónde se encuentran los plexos vasculares y nerviosos, los anejos y otros tipos celulares como macrófagos y células circulantes transitorias inmunitarias, así como mastocitos. También se incluyen los receptores sensoriales.

Supone el componente mayoritario de la piel y permite elástica flexible. Como la epidermis actúa como barrera mecánica pero también evita la pérdida de agua y facilita la termorregulación, así como facilita la reparación de las heridas y colabora con la epidermis en su crecimiento.

Se compone de la dermis papilar superior y la dermis reticular más profunda. La dermis papilar se amolda a la base de la epidermis y tiene un grosor menos del doble de su espesor. La dermis reticular la capa mayoritaria formada por colágeno de gran calibre, dispuesto en forma de enrejado, y fibras elásticas que las rodean. Estas estructuras van aumentando de tamaño hacia la profundidad. Ambas dermis están separadas por el plexo subpapilar vascular.

iv) Hipodermis: se localizan los vasos de mayor calibre quienes se encargan del transporte de células inmunitarias migratorias y nutrientes. Desde la hipodermis hacia la dermis se dirigen los nervios finalizando las terminaciones nerviosas en órganos receptores especializados. Su función radica en el aislamiento del organismo, así como de reserva energética, protegiendo a la piel mediante su acolchado, facilita la movilidad sobre las estructuras ubicadas por debajo y es el origen de la apariencia física del sujeto.

Mayoritariamente es un tejido celular adiposo (adipocitos) que en su superficie comparte las ramas de los plexos vascular y nervioso de la dermis y que se organiza en forma de lóbulos separados por tabiques de tejido conectivo en los que se halla la vasculatura, los linfáticos y los nervios.

Por otra parte, también contiene a las glándulas sudoríparas apocrinas y ecrinas, folículos pilosos en desarrollo, nervios, vasos y linfáticos.

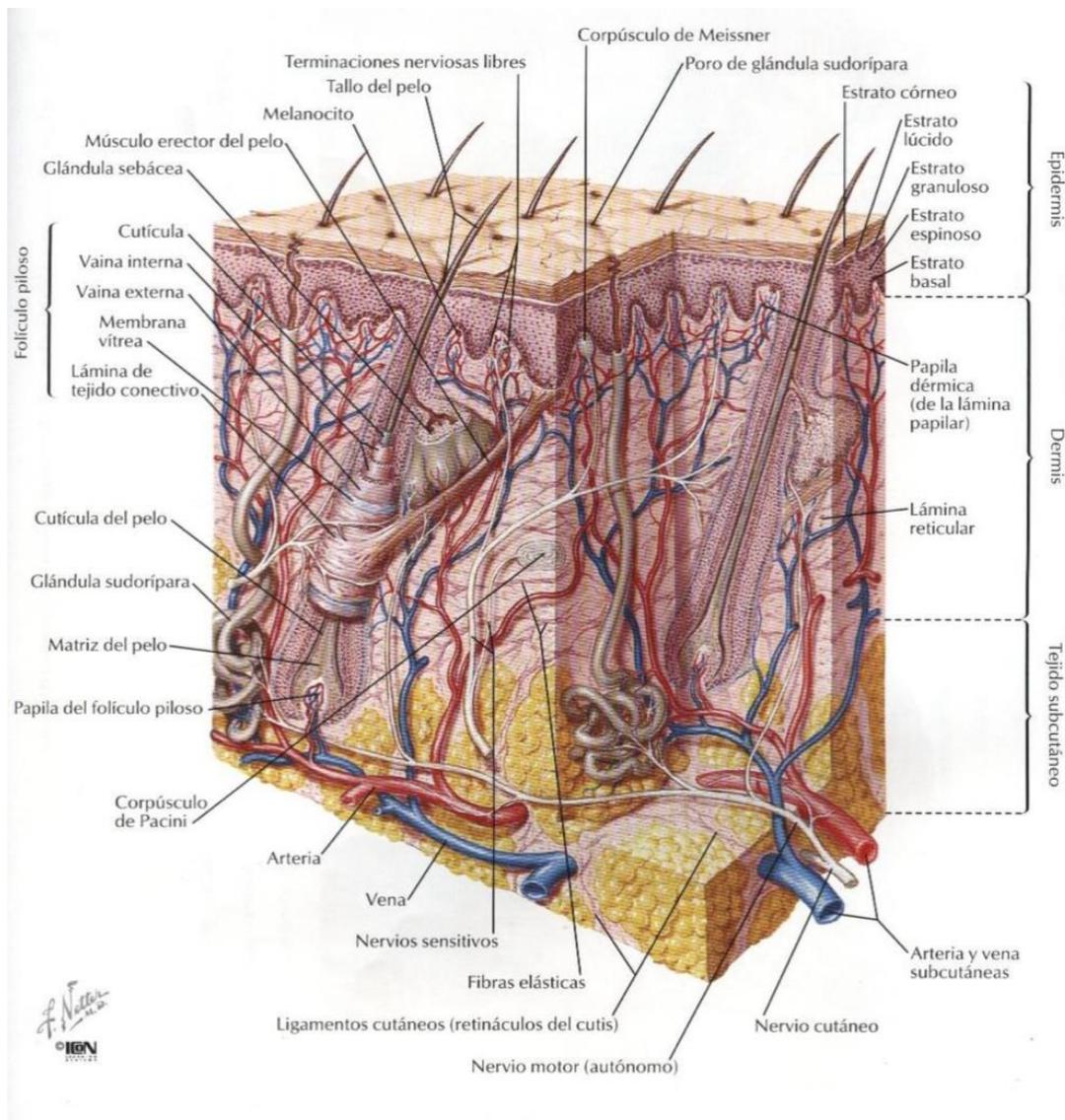


Figura 1. Estructura seccional de la piel. Tomado de Atlas de Anatomía Humana. Segunda Edición. Netter. Segunda Edición. Lámina 511. Editorial Masson. 2001.

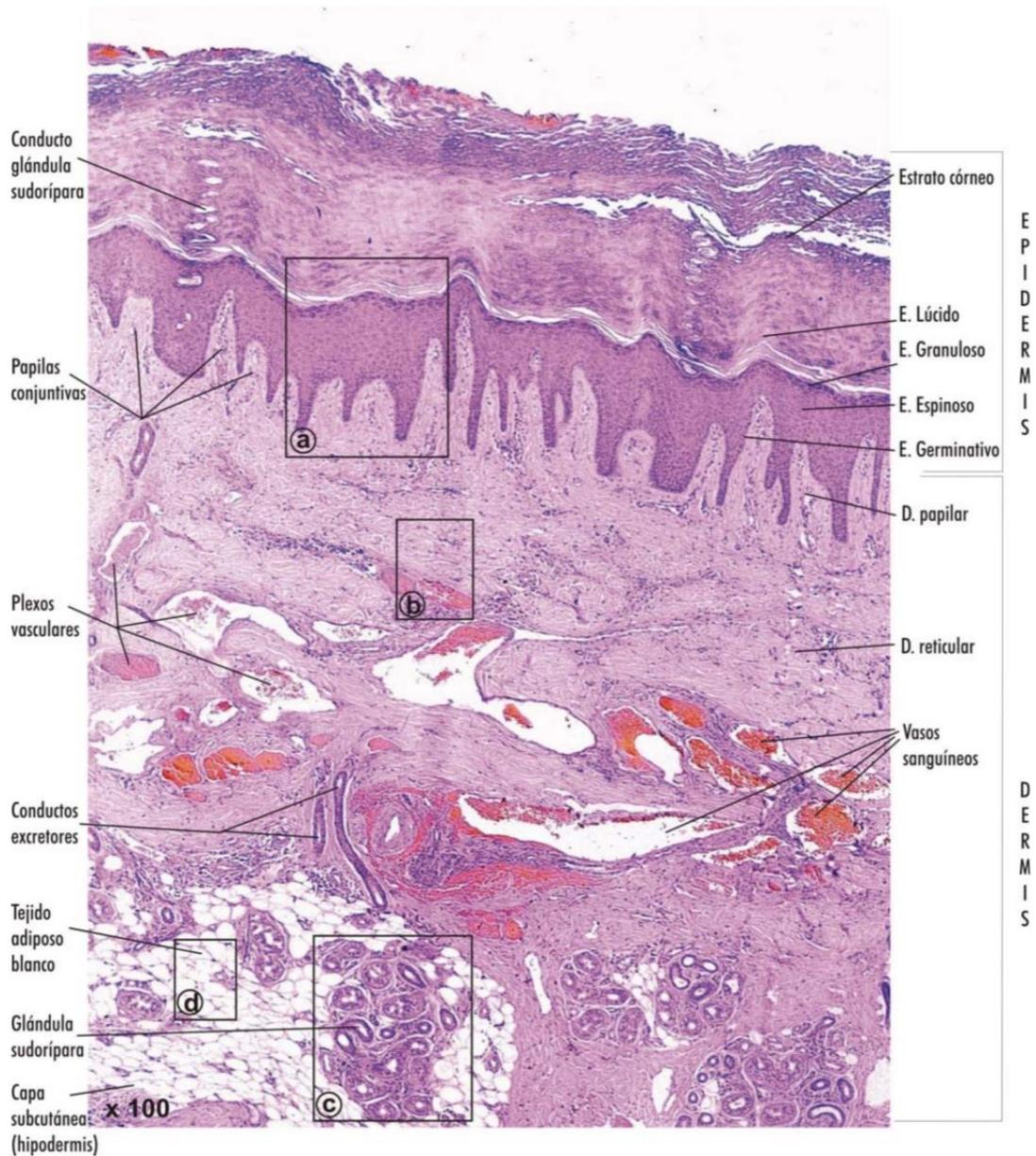


Figura 2 Corte longitudinal de piel humana. Se aprecian la organización de las diferentes capas de la piel. Imagen tomada del Atlas de Histología Humana. Inés Martín-Lacave. Ediciones Díaz de Santos. Edición Electrónica, 2017. Lámina 49. Página 117. ISBN 978-84-9052-064-2.

1.1.3 CIRCULACIÓN CUTÁNEA

En los humanos, la circulación cutánea realiza un papel mayor en el control de la temperatura corporal a través del control de su nivel de perfusión. El control del flujo sanguíneo de la piel manipula la velocidad de transferencia de calor desde el núcleo a la superficie del cuerpo y su eliminación al medio ambiente. El flujo sanguíneo hacia la piel está influenciado tanto por reflejos termorreguladores (impulsado por la temperatura interna y de la piel) y no termorreguladores (barorreflejo, reflejos mediados por el ejercicio, p.ej.) (Johnson & Proppe, 2011). Ese control reflejo lo producen dos brazos del sistema nervioso simpático: un sistema vasoconstrictor adrenérgico como el que se encuentra inervando casi todos los vasos sanguíneos y un sistema vasodilatador no adrenérgico separado. Además, los vasos sanguíneos cutáneos responden al enfriamiento directo o al calentamiento del tejido con reducciones y aumentos en el flujo sanguíneo, respectivamente (Hodges & Johnson , 2009).

1.1.3.1. Función de la circulación cutánea

La función de los vasos sanguíneos es la de aportar nutrientes, así como la termorregulación, la barorregulación, la reparación de disrupciones cutáneas y la facilitación de la inmunidad. Están conformados por las arteriolas que llegan hasta los esfínteres precapilares que se comunican a los capilares y venosos, estos a su vez a las vénulas postcapilares y éstas a las vénulas conectoras. Estos vasos se caracterizan por resistir a las fuerzas de cizallamiento por tener paredes gruesas fijadas por tejido conectivo y miocitos lisos. La microcirculación se halla rodeada por las células en velo dentro de la dermis estando separadas de las paredes de los vasos.

El plexo vascular se localiza en los bordes dérmicos dando soporte nutricional a los anejos. Los vasos que aportan las ramas dérmicas forman arterias musculocutáneas que se introducen en el tejido celular subcutáneo y en la dermis reticular profunda, donde se organizan en un plexo arteriolar horizontal. Desde aquí, las arteriolas, que poseen dos

capas de células musculares lisas y pericitos (células contráctiles) ascienden hacia la epidermis. En la unión entre ambas dermis las arteriolas terminales dan el plexo subpapilar, donde los vasos solo tienen una capa de miocitos lisos como esfínteres precapilares. Las asas capilares sobrepasan las arteriolas terminales hacia la dermis papilar. En cada ápex los vértices de las asas se adelgazan, así como el endotelio y la lámina basal para facilitar la difusión al exterior. Las ramas descendentes extrapapilares de estas asas son capilares venosos que se dirigen a los conductos venosos del plexo subpapilar dispuesto tanto superior inferiormente al plexo arteriolar. Las vénulas postcapilares tienen una alta importancia en la microcirculación respondiendo a sustancias como la histamina, como respuesta a la inflamación, facilitando discontinuidades entre las células del endotelio facilitando extravasación celular (habitualmente células inflamatorias) y de líquidos.

A nivel palmoplantar existen conexiones directas arteriovenosas en las que una arteriola ascendente (cuerpo o glomo) de 3 a 6 capas miocitos lisos con fibras nerviosas simpáticas asociadas. Este shunt puede cerrarse cuando la caída de la presión arterial llega a un punto límite.

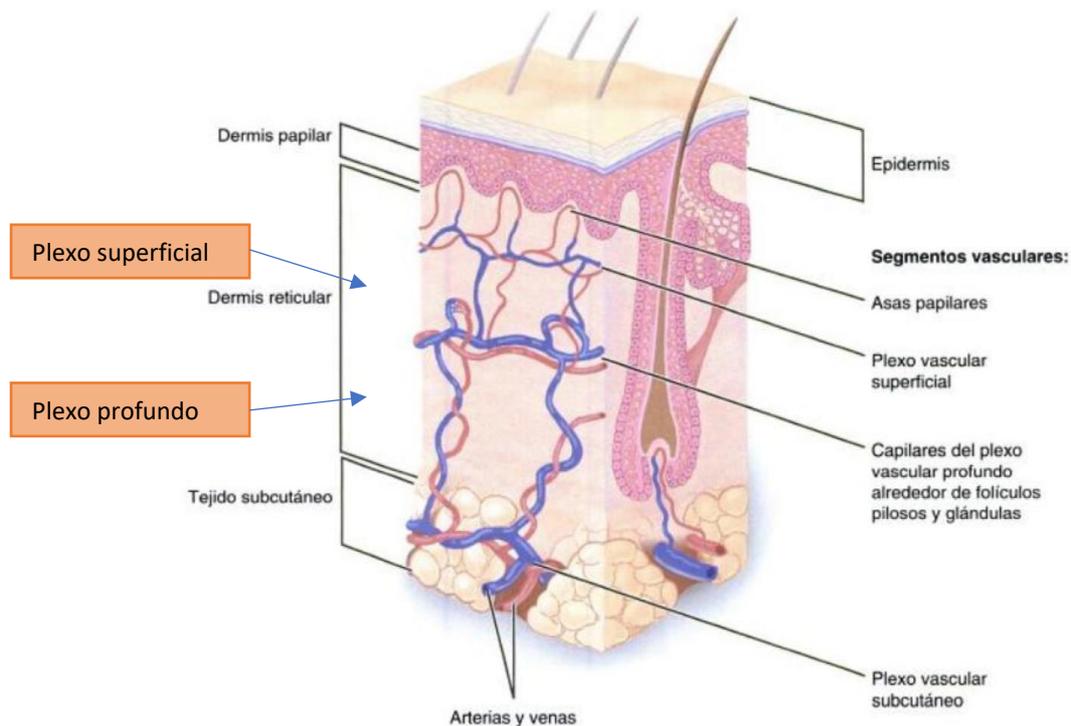


Figura 3. Imagen tomada de *Dermatología en Medicina General. Fitzpatrick. Tomo 3. 7ª Edición. Sección 28. Capítulo 163. Página 1587. Editorial Panamericana. 2009.*

1.1.3.2 Estructura vascular arterial

La estructura de las diferentes arterias es similar entre ellas. De manera constante está formada por tres capas que se disponen de manera concéntrica:

- i) Capa interna o íntima, formada por las células endoteliales se disponen a nivel longitudinal.
- ii) Capa media, donde las células musculares lisas se organizan a nivel circular. Se halla separada de la capa interna por la lámina elástica interna y de la capa externa por la lámina externa.

- iii) Capa externa o adventicia, formada por fibroblastos, fibras de colágeno y fibras elásticas dispuestas de manera longitudinal. Así mismo hasta ella llegan las terminaciones nerviosas y capilares que llegan a alcanzar la capa media.

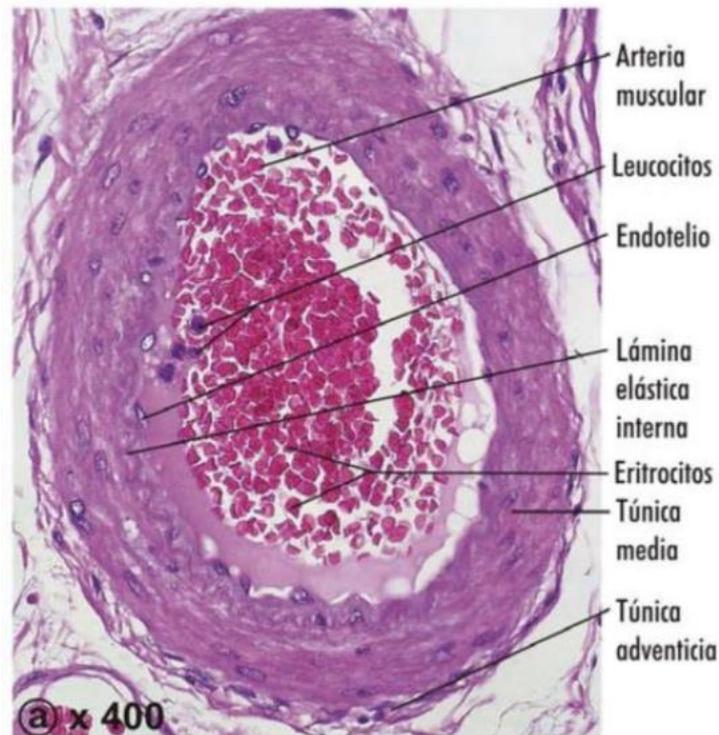


Figura 4 Corte transversal de una arteria humana. Imagen tomada del Atlas de Histología Humana. Inés Martín-Lacave. Ediciones Díaz de Santos. Edición Electrónica, 2017. Lámina 33. Página 117. ISBN 978-84-9052-064-2.

Según el componente que predomine en la capa media, así como el grosor y el diámetro de la luz, podemos clasificar las arterias en:

- i) Elásticas: donde las células endoteliales se acompañan de un espacio subendotelial constituido por una matriz extracelular. En su capa media predomina la elastina, facilitando la adaptación ante cualquier cambio en la presión arterial y manteniendo un flujo sanguíneo continuo.

ii) Musculares: con una íntima más delgada que en las anteriores, predominando las células musculares lisas coordinándose en la contracción por uniones entre ellas mediante pequeñas prolongaciones.

iii) Arterias pequeñas y arteriolas: formadas por endotelio y una capa endotelial más fina. En las primeras, la media está formada entre una y tres capas de músculo liso, mientras que las arteriolas disponen sólo de una. La capa externa en ambas es mucho más fina que en los otros tipos arteriales.

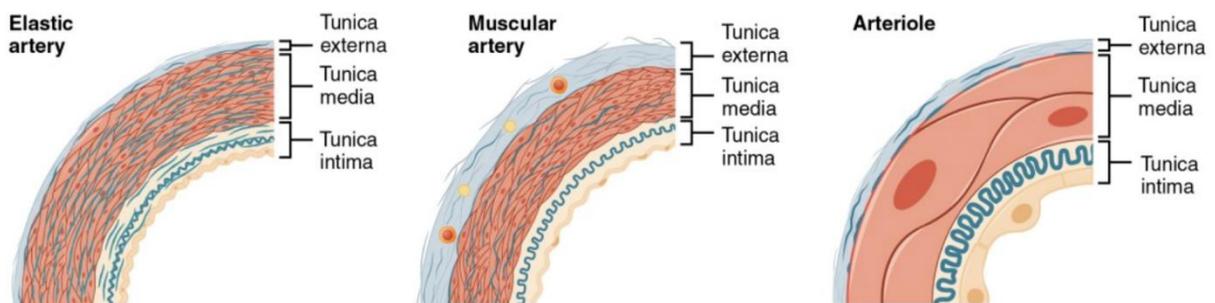


Figura 5. Esquema de los diferentes tipos de arterias con las diferentes capas que las componen. Tomado de <https://courses.lumenlearning.com/suny-ap2/chapter/structure-and-function-of-blood-vessels/>

1.1.3.3. Sistema linfático

Su importancia radica en la regulación de la presión del líquido intersticial reabsorbiendo el líquido fugado a nivel vascular, así como en la eliminación de sustancias de eliminación. Se inician en los vasos linfáticos iniciales en un fondo de saco ciego ubicada en la dermis papilar. Drenan un plexo horizontal de mayor calibre profundo que el plexo venoso subpapilar. De manera vertical se transporta el líquido desde la dermis reticular al plexo colector profundo entre la hipodermis y la dermis reticular.

Lymph capillaries in the tissue spaces

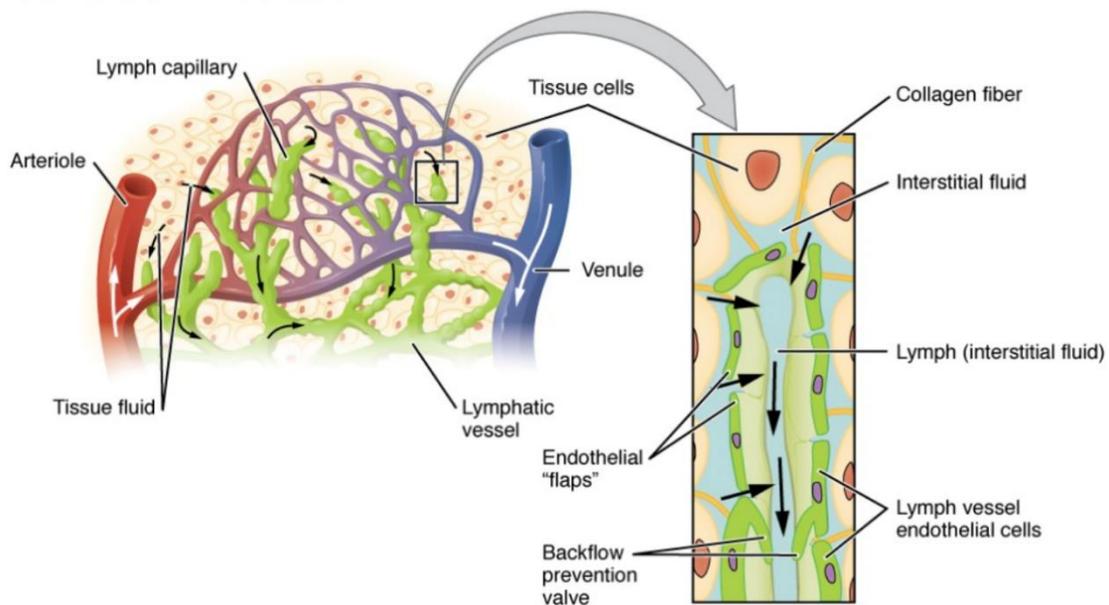


Figura 6. Esquema representativo de la circulación linfática. Los vasos linfáticos se entrecruzan con las arteriolas y las vénulas y se hallan ancladas mediante fibras de colágeno. El líquido intersticial discurre a través de los espacios que quedan entre las células del endotelio que componen el capilar linfático. Tomado de <https://courses.lumenlearning.com/suny-ap2/chapter/anatomy-of-the-lymphatic-and-immune-systems/>.

Los movimientos tisulares tanto por la pulsación arterial como por la contracción muscular facilitan el flujo linfático a través de un sistema valvular que impide flujo.

Los vasos linfáticos, cuya pared es más fina que la de las venas, también está formado por endotelio, lámina basal y fibras elásticas.

1.1.3.4. Regulación de la circulación humana

En los humanos, la circulación cutánea desarrolla un papel fundamental en el control de la temperatura corporal a través del control de su nivel de perfusión. El flujo sanguíneo

cutáneo puede modificar la cantidad de transferencia de calor desde el interior del cuerpo hasta la superficie y su eliminación al exterior.

Este flujo sanguíneo cutáneo está controlado por dos mecanismos: el control del reflejo termorregulador y el efecto directo del calentamiento y enfriamiento de la piel (Johnson & Proppe, 2011), ambos mediados por los sistemas endoteliales, adrenérgicos y sensoriales. El incremento de la temperatura global inicia una vasodilatación transitoria a través del reflejo axonal, consecuencia de una fase plateau en gran parte por el óxido nítrico, todo ello sostenido por los transmisores simpáticos adrenérgicos. La fase plateau es seguida por un fenómeno de desaparición, una reversión lenta de la vasodilatación que es dependiente de los nervios vasoconstrictores simpáticos (Johnson & Kellogg, 2010). Además, los vasos sanguíneos cutáneos responden al enfriamiento o calentamiento directo del tejido con reducciones y aumentos del flujo sanguíneo, respectivamente (Hodges & Johnson, 2009).

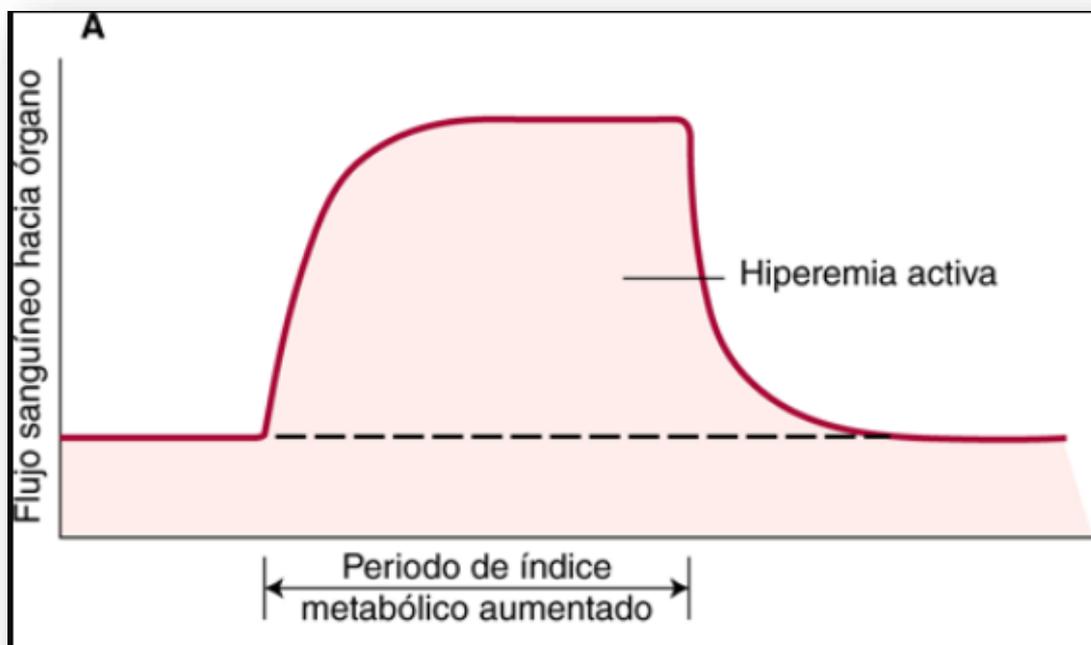


Figura 7. Esquema sobre la regulación de la circulación. Tomado de *Fisiología médica. Un enfoque por aparatos y sistemas*. Hershel Raff, Michael Levitzky. 2013. 1ª Edición. McGraw-Hill Education. ISBN-13: 9786071509130

1.1.3.5. Vascularización cutánea en inflamación cutánea crónica

A nivel cutáneo, la vascularización, de manera conjunta y paralela con el sistema linfático, está conformada por un plexo superficial y otro profundo, siendo desde este último donde aparecen las asas capilares. La estructura de las células endoteliales varía según su localización, cubiertas de pericitos con uniones estrechas y adherentes. Contienen una monocapa endotelial con una membrana basal continua. En las situaciones en las que no existe inflamación (situación de inactividad), las células endoteliales permanecen quiescentes, de manera que inhiben la coagulación y no interactúan con los linfocitos, por lo que no existe un aumento en la extravasación a nivel tisular de proteínas sanguíneas.

En los capilares linfáticos, sin embargo, las uniones son más laxas y las células murales pueden tener o no una membrana basal, unidas a una matriz extracelular de filamentos de anclaje con fibrilina. Esto permite el paso del líquido tisular, incluso de células, de manera directa a la luz de los vasos linfáticos. Comparativamente con los vasos sanguíneos, los linfáticos son más anchos, pero su pared es más delgada. Cuando el líquido entra a los capilares linfáticos, se drena a los vasos precolectores y colectores linfáticos que ya contienen una membrana basal, células musculares lisas y válvulas antirreflujo. Así pues, el líquido, siguiendo el circuito habitual regresará a la circulación sanguínea a nivel yugular. En cambio, cuando hay una inflamación se produce un aumento del calibre vascular con aumento de su flujo responsables del rubor y del calor. Cuando se excede la permeabilidad vascular se produce un aumento de la capacidad de drenaje del sistema linfático con exceso de exudado, produciendo un aumento del volumen ("tumor"). Posteriormente, la activación vascular y la movilización de los leucocitos ocasionará el dolor.

Los mediadores inflamatorios ocasionan la activación endotelial (alfaTNF, VEGF- A, IL-6, etc.), estimulando la adhesión de moléculas como la ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular 1) o las VCAM-1 (moléculas de adhesión vascular 1), que facilitan la interacción leucocitaria.

En las situaciones en las que hay un proceso inflamatorio crónico esta activación es constante, por lo que los vasos permanecen con un aumento de su calibre y con una hiperpermeabilidad,

facilitando el edema por acúmulo de líquido plasmático incluyendo proteínas y células. La hiperpresión tisular facilita esa condición de hiperpermeabilidad linfática con la entrada de células y macromoléculas. Aunque por el momento se desconoce el mecanismo exacto por el que se produce un incremento de la dilatación linfática, se ha visto que no sólo la presión tisular sería la responsable, sino que también se podría deber a citocinas y quimiocinas.

Existen varias enfermedades inflamatorias cutáneas, pero en el caso de la rosácea, se postula que su origen podría deberse a alteraciones inmunitarias, radiaciones UV, patógenos microbianos y alteraciones vasculares (Huggenberger & Detmar, 2011). Se produce un hiperaflujo sanguíneo con vasodilatación a nivel de la dermis que se puede apreciar a la inspección física. Así mismo, se ha apreciado que existe un incremento en la angiogénesis y la linfangiogénesis así como un aumento en la producción de VEGF-A (Gomaa, Yaar, Eyada , & Bhawan, 2007). Se postula que la radiación UV empeora la rosácea al estimular a los queratinocitos que responden produciendo VGF-A (Brauchle, Funk, Kind, & Werner , 1996). Aunque se desconoce cómo actúa el sistema linfático en esta patología, es cierto que los pacientes presentan un edema facial similar al del linfedema (Huggenberger & Detmar, 2011).

1.1.3.6. Sistema adrenérgico vascular

En las membranas celulares existen unos receptores adrenérgicos en donde la adrenalina (A) y la norepinefrina o noradrenalina (NA) funcionan como neurotransmisores y hormonas importantes tanto en el sistema nervioso central como en el periférico. La mayoría de las arterias y venas del organismo están inervadas por nervios simpáticos adrenérgicos que liberan NA como neurotransmisor. En cambio, algunos vasos están inervados tanto por nervios colinérgicos simpáticos como parasimpáticos, quienes liberan acetilcolina (ACh) como neurotransmisor principal.

La unión del neurotransmisor a los receptores adrenérgicos y colinérgicos activa una señal en las vías de transmisión que ocasiona cambios en el tono vascular. La

norepinefrina se une preferentemente a los adrenorreceptores- α_1 (receptor adrenérgico α_1), que causan contracción del músculo liso y vasoconstricción (Hrometz, y otros, 1999). Ocurren respuestas similares cuando la norepinefrina se une a los adrenorreceptores- α_2 postunión (receptor adrenérgico α_2), localizados en algunos vasos. También la norepinefrina se une de manera débil a los adrenorreceptores β_2 postunión (receptor adrenérgico β_2), que ocasiona vasodilatación (Arribas, Marín, Ponte, Balfagón, & Salaices, 1994) (se puede observar durante el bloqueo adrenorreceptor α), aunque este efecto vasodilatador de la norepinefrina es relativamente menor y sobrepasado por la vasoconstricción mediada por los adrenorreceptores α (Hjemdahl, Belfrage, & Daleskog, 1979).

La adrenalina circulante se une con alta afinidad a los adrenorreceptores- β_2 del músculo liso causando una vasodilatación en algunos órganos; de cualquier modo, el efecto de la adrenalina es muy dependiente de la concentración. Mientras la adrenalina tiene una alta afinidad para los β_2 más que para los adrenorreceptores α_1 o α_2 postunión (Floras, Aylward, Victor, Mark, & Abboud, 1988) (Frankl, 1992), en altas concentraciones se une a los adrenorreceptores α_1 o α_2 postunión, que puede anular los efectos vasodilatadores de la estimulación del adrenoceptor β_2 y producir vasoconstricción (Johnson & Proppe, 2011) (Hodges & Johnson, 2009).

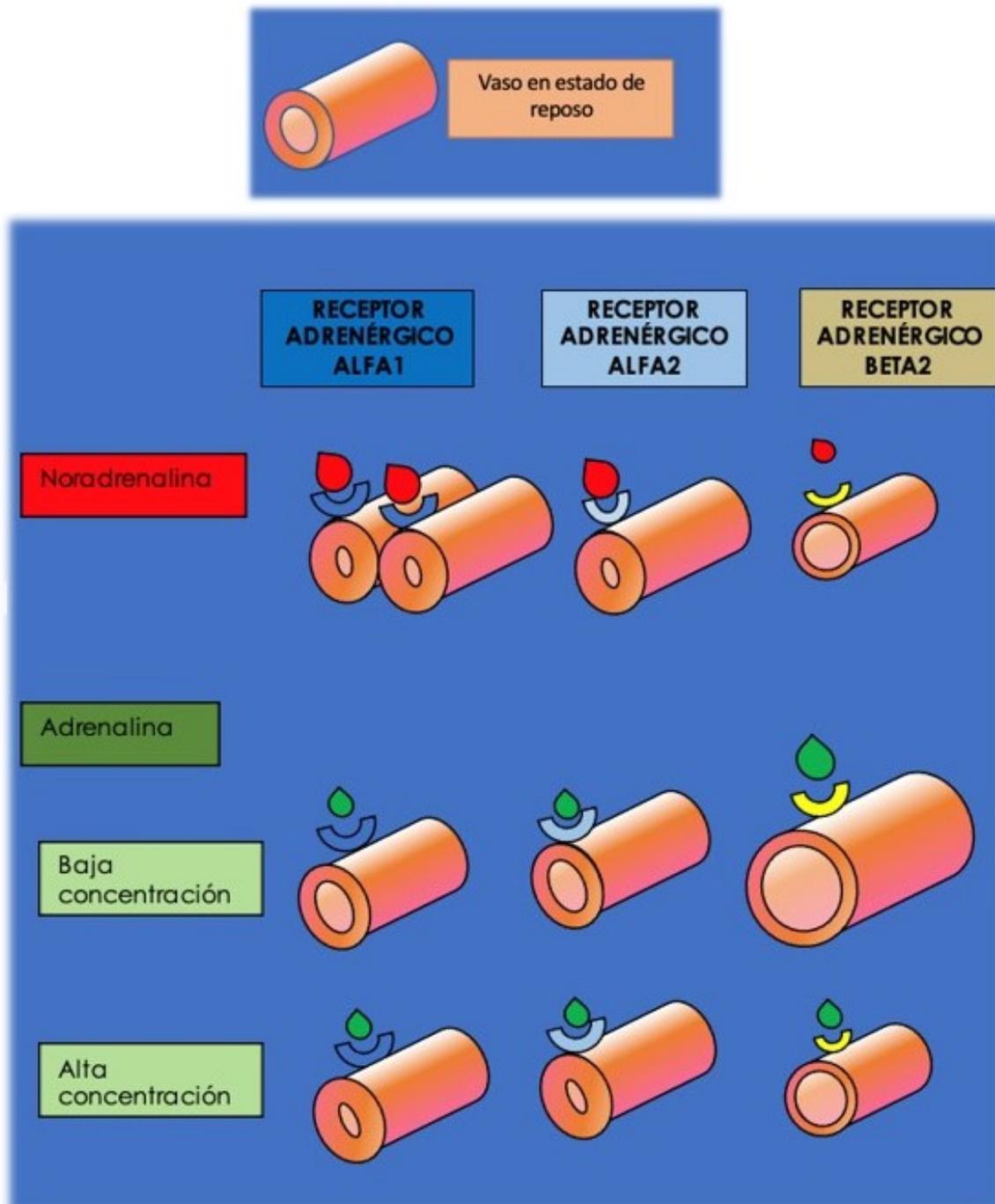


Figura 8. Efecto de las catecolaminas sobre los diferentes receptores adrenérgicos. Vemos como la norepinefrina se une preferentemente a los adrenorreceptores- α_1 (RECEPTOR ADRENÉRGICO ALFA1), provocando una vasoconstricción. El efecto es similar cuando se une a los adrenorreceptores- α_2 (RECEPTOR ADRENÉRGICO ALFA2). La norepinefrina se une de manera débil a los adrenorreceptores- β_2 (RECEPTOR ADRENÉRGICO BETA2), ocasionando una vasodilatación (aunque este efecto vasodilatador es relativamente menor y sobrepasado por la vasoconstricción mediada por los adrenorreceptores alfa). En cuanto a la adrenalina, ésta se une a los adrenorreceptores- β_2 causando una vasodilatación, sin embargo, su efecto es muy dependiente de la concentración. La adrenalina tiene mayor afinidad para los receptores β_2 que para los adrenorreceptores α_1 o α_2 post unión, pero en altas concentraciones se une a los adrenorreceptores α_1 o α_2 post unión, anulando los efectos vasodilatadores de la estimulación del adrenoceptor β_2 y ocasionando vasoconstricción.

1.1.3.7 Sistema adrenérgico en los vasos cutáneos.

Dado que las necesidades cutáneas de la piel son muy bajas, el control del flujo sanguíneo cutáneo en los humanos es mayoritariamente consecuencia de los reflejos o efectos locales de los cambios en la temperatura. El papel más obvio de la función adrenérgica en el control del flujo sanguíneo hacia la piel está en la respuesta refleja al descenso interno de la temperatura cutánea de todo el cuerpo.

El reflejo de vasoconstricción cutánea en los humanos se consigue primariamente a través del sistema simpático noradrenérgico, recayendo principalmente en la actividad nerviosa simpática de la piel causando la liberación de la norepinefrina y el neuropéptido Y (Kellogg, Johnson, & Kosiba, 1989) (Stephens, Aoki, Kosiba, & Johnson, 2001) (Stephens, Saad, Bennett, Kosiba, & Johnson, 2004) (Stephens, y otros, 2002).

El equipo de Crandall (1997) demostró la presencia de receptores β funcionales en la vasculatura cutánea de los humanos. Aunque estos receptores no juegan un papel significativo en la mediación de la vasodilatación cutánea refleja (Kellogg, y otros, 1995), Stephens et al. (2001) encontraron que la adición de propranolol como antagonista de los receptores β provocó una gran vasoconstricción cutánea refleja para el enfriamiento de todo el cuerpo más que bajo las condiciones del antagonismo de los receptores α únicamente. Este último hallazgo sugiere cierta inclusión de receptores β en la respuesta de la red vascular, es decir, su presencia amortiguaría la vasoconstricción α -mediada. Además, informaron que la administración de norepinefrina bajo condiciones de antagonismo de los receptores α frecuentemente daba como resultado una vasodilatación, un fenómeno que era bloqueado por la inclusión del propranolol. Este hallazgo sugiere un potencial para que la función del receptor β sea un importante factor de fondo en el control vascular cutáneo.

1.2. ROSÁCEA

La rosácea es una entidad cuya fisiopatología es desconocida, por lo que no existe un tratamiento específico, basándose en la actualidad en un tratamiento dirigido a mitigar los síntomas que produce. Estos síntomas consisten en un eritema facial central persistente, que afecta a la convexidad de las mejillas y frente. Se considera que existen unos síntomas primarios que incluyen rubefacción facial, pústulas, pápulas y telangiectasias. Los síntomas secundarios comprenden sensación de ardor facial, edema, placas, sequedad cutánea, eritema periférico (cuero cabelludo, pabellones auriculares, región cervical, torácica o laterofacial), que puede confundirse con el daño actínico crónico, y alteraciones oculares. Se puede producir un edema severo facial de tipo sólido que acabe en placa, frecuentemente en la frente y en la glabella, siendo menos habitual a nivel palpebral y en la porción superior malar.

Clasificada inicialmente en 2002 por un Comité de Expertos de la National Rosacea Society (NRS), se divide en cuatro tipos no evolutivos (a diferencia de la anterior clasificación de Plewig- Kligman), pero que pueden superponerse entre ellos:

- i) Eritematotelangiectásico (estadio I de la enfermedad de Plewig- Kligman): presenta eritema facial, sin afectación periorbitaria, persistente con telangiectasias, edema centrofacial, disestesias (sensación de pinchazo y ardor) y/o descamación.
- ii) Papulopustuloso (estadio II de la enfermedad de Plewig- Kligman): existe un eritema persistente centrofacial más leve, sin afectación periorbitaria, asociado a pápulas y pústulas. Las disestesias son menos frecuentes.
- iii) Fimatoso (estadio III de la enfermedad de Plewig- Kligman): presentan folículos amplios y abiertos, engrosamiento cutáneo, nódulos y contornos irregulares en las regiones convexas. Es más frecuente la rinofima (nasal), aunque puede producirse en otras localizaciones como la gnatofima (mentón), la metofima (frente), blefarofima (párpados) y otofima (pabellones auriculares).

La rinofima no se presenta en las mujeres, probablemente por causas hormonales, pero sí folículos amplios.

iv) Ocular: es el primer síntoma en un 20% de los pacientes y en un 50% después de la alteración cutánea, pero es infrecuente de manera conjunta con la afectación cutánea y sin relación en cuanto a gravedad entre ellas. La afectación puede incluir blefaritis (la más frecuente), conjuntivitis, iritis, queratitis, escleritis, hipopión y escleritis. Los síntomas pueden comprender fotofobia, sensación de cuerpo extraño, prurito o quemazón e incluso llegar a una amaurosis.

Así mismo, pueden subdividirse en tres grados en función de la gravedad (de leve a grave).

Las formas eritematotelangiectásica y la papulopustular son los dos subtipos más comunes. En los jóvenes el rubor y el eritema suelen ser los primeros síntomas y las telangiectasias en los más mayores.

Aunque la localización centrofacial es típica de la rosácea, se ha visto que podría haber una asociación causal no excluyente con las características de esa región con un aumento de la densidad de las glándulas sebáceas, redes nerviosas y vasculares aumentadas o la presencia de *Demodex sp.* La presencia de estos ácaros está aumentada en algunos de estos pacientes y su erradicación a veces conduce a una mejoría probablemente.

Así mismo, este Comité de Expertos creó también un sistema de graduación para estandarizar la evaluación clínica, incluyendo el impacto psicológico, social y ocupacional, así como las respuestas al tratamiento.

Esta forma de clasificación fue la primera que se utilizó para sistematizar a rosácea en la práctica diaria y para evaluar el tratamiento en cada una de las formas (Buddenkotte & Steinhoff, 2018).

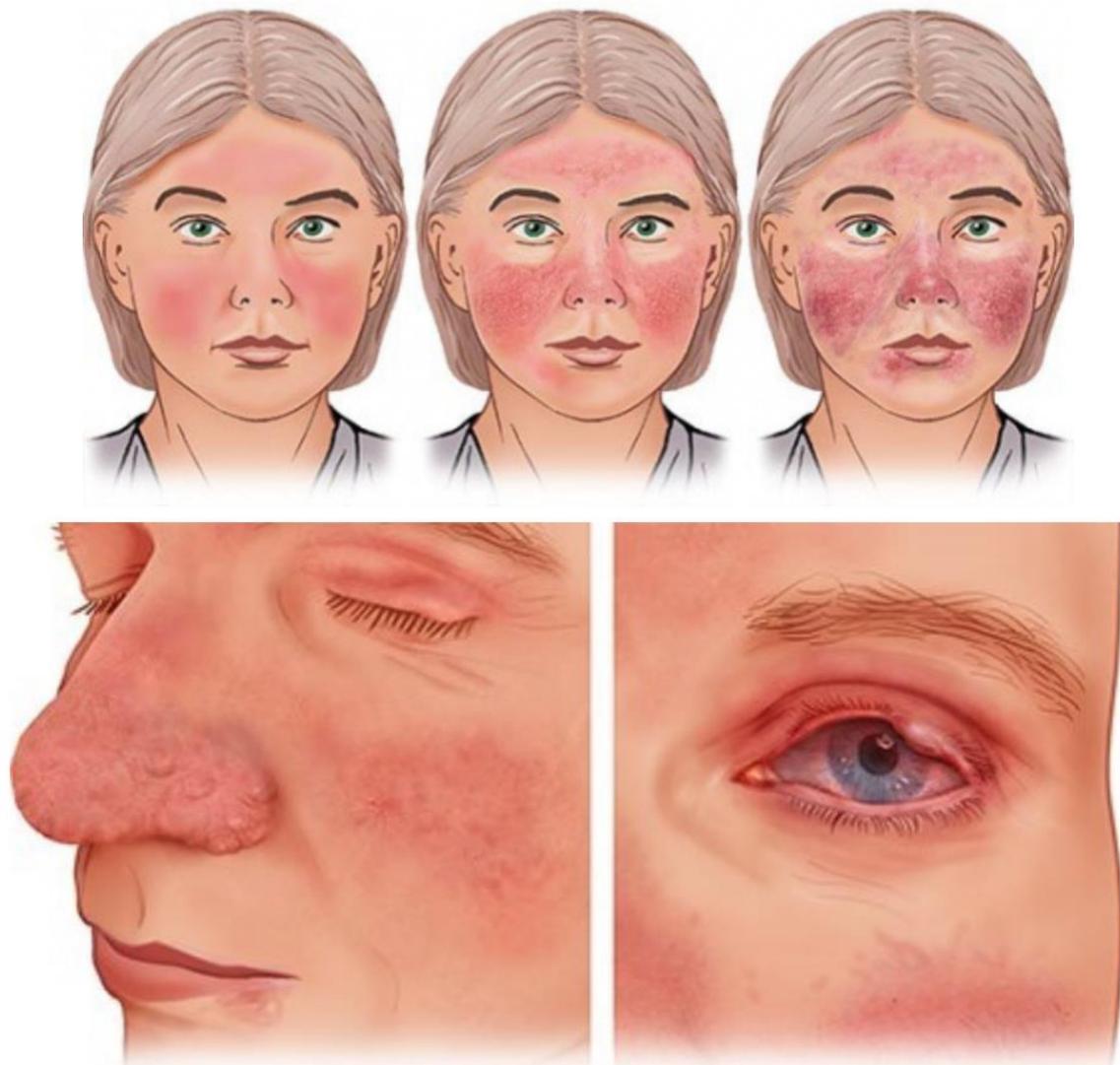


Figura 9. Visión esquemática de los 4 subtipos de rosácea. Imagen A) Rosácea tipo 1 y 2. Imagen B: tipo 3. Imagen C: tipo 4. Tomado de Rosacea: Overview. Cologne, Germany: Institute for Quality and Efficiency in Health Care (IQWiG); 2006. [Updated 2020 Sep 10]

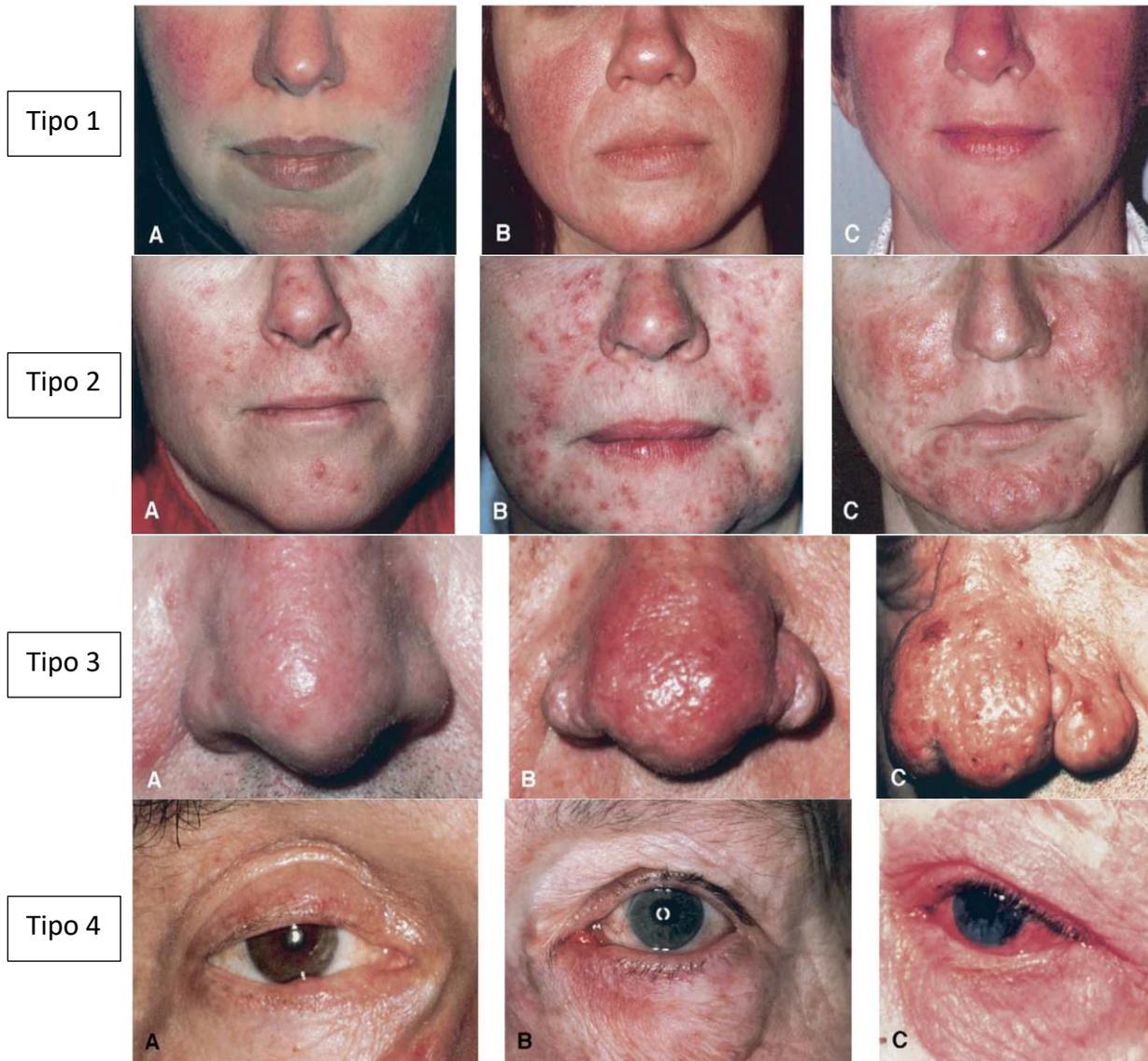


Figura 10. En el tipo 1 (eritematotelangiectásica) se aprecia rubor y eritema facial central persistente, puede haber telangiectasias, pero no son diagnósticas. A: leve, B: moderada, C: severa. En el tipo 2 (papulopustular) existe un eritema facial central persistente con pápulas transitorias y/o pústulas. A: leve, B: moderada, C: severa. En el tipo 3 (fimatosa), puede existir adelgazamiento de la piel, nódulos superficiales irregulares y agrandamiento nasal. Existen telangiectasias y puede haber un agrandamiento folicular. A: leve, B: moderada, C: severa. En el tipo 4 (ocular), se puede apreciar un enrojecimiento ocular o con aspecto de hipersecreción lacrimal, telangiectasias en la conjuntiva o en el borde palpebral, así como eritema palpebral o periocular. Es posible la aparición de blefaritis, conjuntivitis e irregularidades en el borde palpebral. A: leve, B: moderada, C: severa. Modificada de Standard grading system for rosacea: Report of the National Rosacea Society Expert Committee on the Classification and Staging of Rosacea. Special Report. J Am Acad Dermatol 2004;50:907-12. 0190-9622/\$30.00 © 2004 by the American Academy of Dermatology, Inc. doi:10.1016/j.jaad.2004.01.048

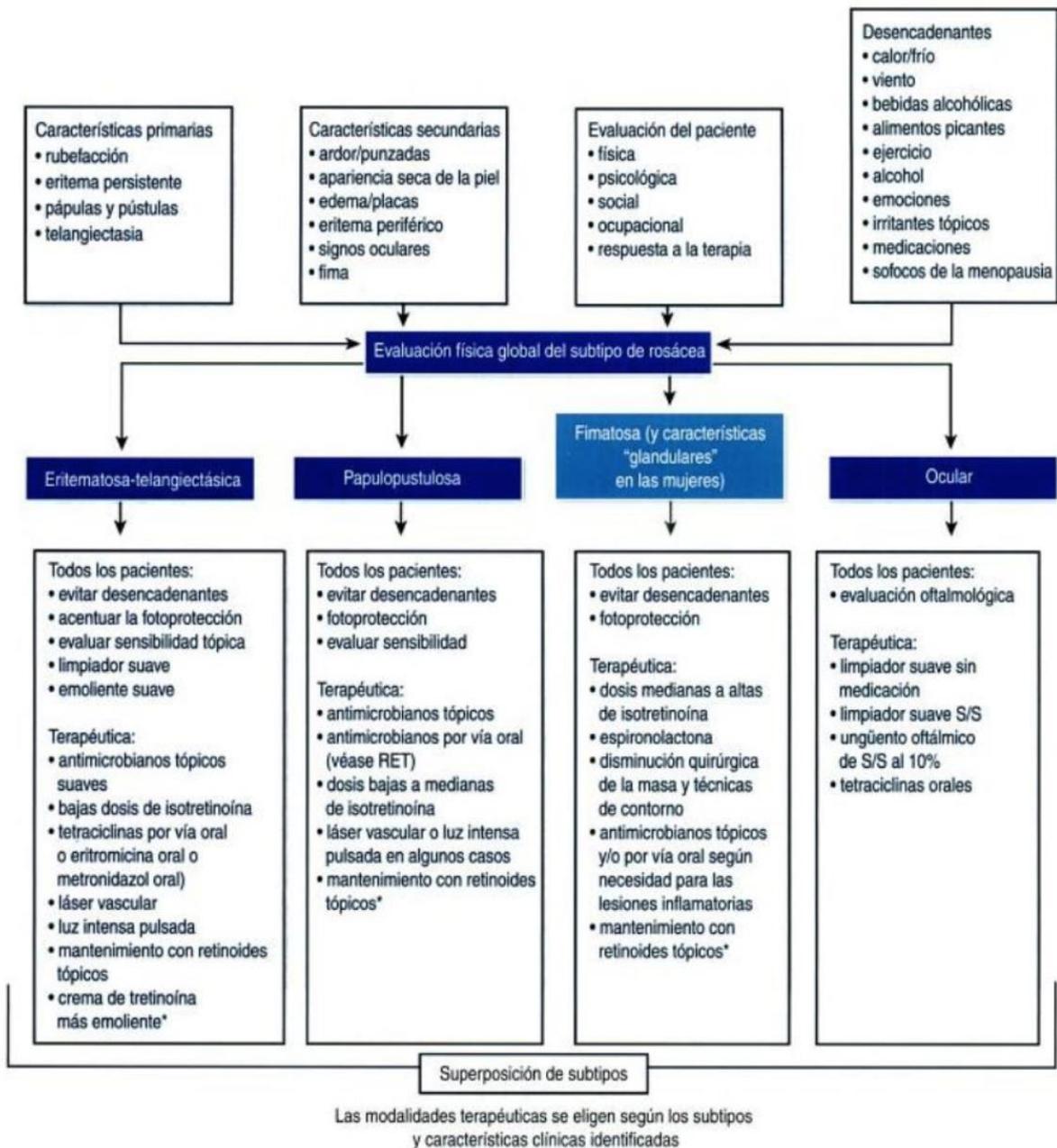


Figura 11. Imagen tomada de *Dermatología en Medicina General. Fitzpatrick. Tomo 2. 7ª Edición. Sección 13. Capítulo 79. Página 707. Editorial Panamericana. 2009. Se resumen los diferentes tipos de rosácea, sus características clínicas y el tratamiento dermatológico propuesto en la actualidad.*

En 2016 se realizó una nueva clasificación, que enfatizaba más en la aproximación fenotípica del paciente.

Características diagnósticas	Criterios mayores	Criterios secundarios
Eritema persistente centrofacial asociado a empeoramiento por factores desencadenantes	Rubor /eritema transitorio	Sensación de quemazón
Cambios fimatosos	Pústulas y pápulas inflamatorias	Sensación de escozor
	Telangiectasia	Edema
	Manifestaciones oculares. Telangiectasia margen palpebral. Blefaritis, queratitis, conjuntivitis y escleroqueratitis	Sensación de sequedad cutánea

Tabla 1 Características diagnósticas

Encontraríamos una verdadera variante en la rosácea granulomatosa, con aparición de nódulos o pápulas marrónáceas-amarillentas o rojizas en la región malar y a nivel periorificial, con la presencia de los típicos granulomas en el estudio anatomopatológico. En la diascopia, su coloración es similar a la gelatina de manzana, como en la sarcoidosis y en el lupus vulgar.

1.2.1. Epidemiología

Su prevalencia no es conocida (se estima sobre un 5%), pero es más frecuente en la población caucásica, sin diferencias de género, afectando a millones de pacientes en el mundo (Alexis, y otros, 2019). Se estima que en EEUU afecta a 16 millones de personas y el pico de incidencia mundial es del 18% (afectaría más a la población de origen céltico) (Buddenkotte & Steinhoff, 2018).

Se inicia pasados los 30 años, aunque puede tener lugar en edades más precoces.

1.2.2. Etiopatogenia

Aunque se desconocen las causas que conducen a la rosácea, en la actualidad se considera que cada uno de los tipos tendría un origen diferente e incluso también diferente fisiopatología. Aun así, se ha visto que ciertas exposiciones crónicas serían desencadenantes para la aparición de los síntomas de la rosácea como temperaturas extremas, exposición actínica, consumo de alcohol, ejercicio, viento, alimentos picantes, cosméticos, situación de estrés, menopausia o fármacos o la infección microbiológica de la cara o intestinal (sobrecrecimiento bacteriano) (Gerber , Buhren , Steinhoff, & Homey, 2011).

Otros mecanismos más controvertidos se han propuesto como el originado por una infección bacteriana folicular o incluso la presencia de microorganismos saprófitos asociados a ácaros ocasionarían una reacción de hipersensibilidad en el caso de la forma papulopustulosa. Esta hipótesis se basa en que, en esta forma, el tratamiento con tetraciclinas es mucho más efectivo que con el tratamiento con antiinflamatorios.

La aparición casi constante de la afectación facial se debería a que el aumento del flujo sanguíneo en dicha localización es más elevado y porque la vascularización cutánea en la cara es más superficial, con vasos en mayor número y calibre que en otras regiones.

1.2.3. Patofisiología

Para las dos presentaciones más comunes sobre todo se ha demostrado que hay una disregulación neurovascular y un incremento de la detección y respuesta inmune (Schwab, y otros, 2011). Así mismo, la disregulación del sistema nervioso autónomo puede producir rubor facial.

En las crisis de eritema, la rosácea se puede convertir en edematosa por la inflamación vascular y la dilatación asociada. De manera secundaria a la inflamación tienen lugar los cambios vasculares faciales que de manera perpetuada contribuyen a la dilatación vascular crónica y el agrandamiento (Rosso Del, 2012).

Los factores desencadenantes (figura 12) pueden estimular la liberación de mediadores de células como los queratinocitos (como catelicidina, factores de crecimiento vasculoendotelial o la endotelina-1), las células endoteliales (óxido nítrico), los mastocitos (catelicidina y metaloproteasas de matriz), los macrófagos (interferón gamma, factor de necrosis tumoral, metaloproteasas de matriz) y linfocitos Th tipo T1 y T17. Así mismo, los factores endoteliales pueden comunicar directamente con el sistema nervioso cutáneo y, mediante neuropéptidos activados neurovasculares y neuroinmunes, facilitar que aparezcan las lesiones cutáneas (Buddenkotte & Steinhoff, 2018).

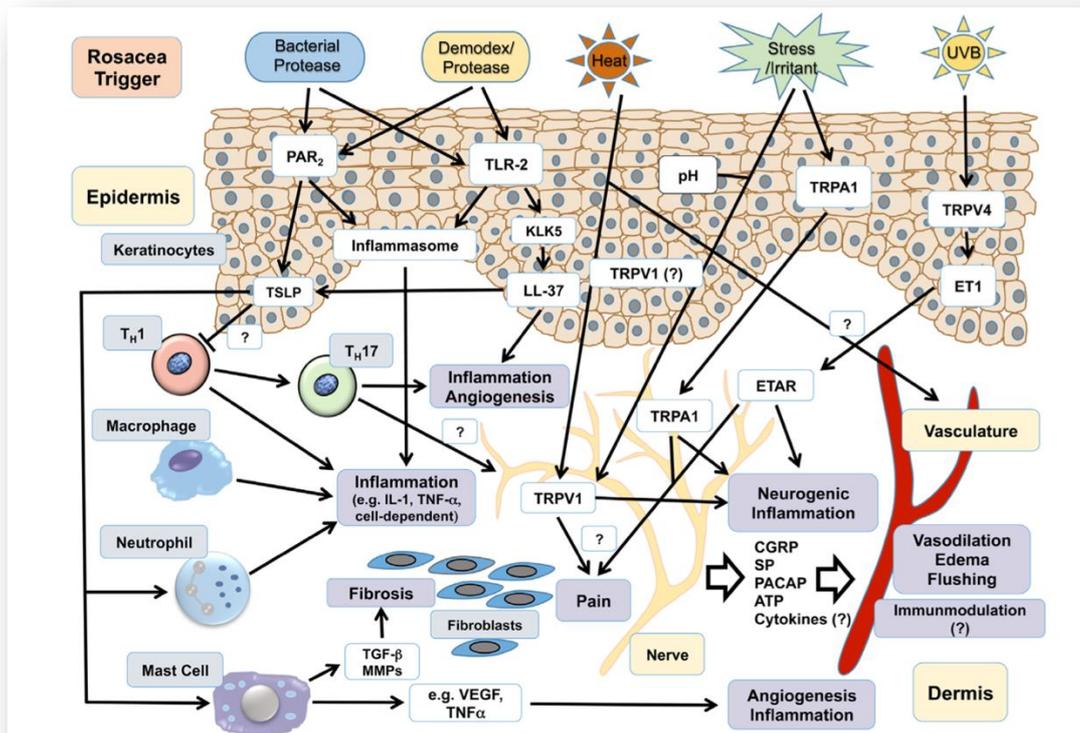


Figura 12. En esta imagen se aprecia cómo los desencadenantes de la rosácea activan las diversas moléculas (cuadros blancos) que, a su vez, estimulan a diferentes células (cuadros grises), facilitando el edema por vasodilatación, angiogénesis así como fibrosis y dolor (cuadros morados). Tomado de (Buddenkotte & Steinhoff, 2018).

Actualmente se ha visto que existen un conjunto de receptores de potencial transitorios (sobre todo, las proteínas anquirina (TRPA1) y la vaniloide (TRPV 1 y TRPV4) que podrían estar en relación con las respuestas celulares a los factores desencadenantes de la rosácea. Los canales TRP podrían ser los responsables de la activación de la vasculatura cutánea conllevando rubor y edema por mediadores inflamatorios neurogénicos (ver figura 12) como la sustancia P. Los nervios sensitivos también expresan TLR2 y PAR₂ que parece que perpetuarían la alteración neurovascular presente en la rosácea. Los canales TRPA1 y TRPV1 y PAR₂ pueden cruzarse con los receptores neuropéptidos o al menos desencadenar la liberación de neuropéptidos, implicaría una perpetuación de la inflamación neurogénica (Buddenkotte & Steinhoff, 2018).

En la tabla 2 se recogen los diferentes desencadenantes y cuáles serían sus vías de acción en la rosácea, así como el régimen terapéutico propuesto para cada uno de ellos.

Vía de acción	Desencadenante	Régimen terapéutico
Inflamasona (NALP3)	Exposición solar, viento, ejercicio intenso, alcohol, estrés, cosméticos (formaldehído), fármacos y microorganismos.	Evitación, terapia antiinflamatoria y antibióticos
TLR-2	Exposición solar, estrés, alcohol, ejercicio, microorganismos/flora intestinal y fármacos.	Evitación, FPS +30 y brimonidina
TRPV1	Estrés, calor, ejercicio, alcohol y comida picante (capsaicina)	Evitación y brimonidina
TRPV2	Calor	Evitación
TRPV4	Exposición solar/radiación UV, humedad y cambios osmóticos	Evitación y FPS +30
TRPA1	Frío, ajo/ aceite de mostaza, productos de cuidado cutáneo y cosméticos (formaldehído)	Evitación y brimonidina
PAR₂	Proteinasas y microorganismos	Terapia antiinflamatoria y antibióticos

Tabla 2. Tabla en la que se representan los desencadenantes de la rosácea y las vías de activación con el actual esquema terapéutico. Tomada de (Buddenkotte & Steinhoff, 2018).

1.2.4. Anatomía patológica

Anatomopatológicamente se evidencia la existencia de una degeneración en la dermis con lesión endotelial debido a alteraciones vasculares o al retraso en la eliminación de los mediadores inflamatorios o en los productos de degradación. La exposición solar

también sería un mecanismo de daño directo sobre la piel incluyendo los vasos sanguíneos y linfáticos, aunque no se ha demostrado un aumento de la prevalencia en pacientes con exposición habitual al sol.

El patrón histológico más característico de la rosácea es la dilatación de los vasos sanguíneos y linfáticos que llevan al eritema y al edema; infiltración perivascular consistente en el aumento de células T, macrófagos y mastocitos; y a menudo, pero no exclusivamente, elastosis solar, edema y vasos tortuosos y dilatados (Cribier, 2011) (Powell, 2004).

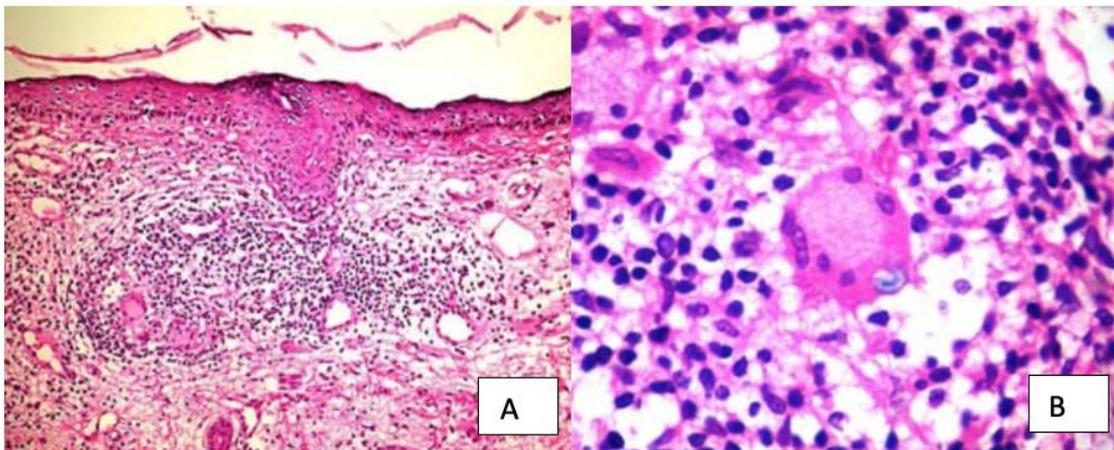


Figura 13. Histología de un caso de un paciente con rosácea granulomatosa. Imagen A: corte histológico en el que se aprecian infiltrados perivasculares y perianexiales. Imagen B: Célula gigante de Langhans. Tomado de "Rosácea granulomatosa. Informe de un caso y revisión de la literatura. Manuel Sarmiento-Laínez et al. Revista médica del Hospital General de México, S.S. Vol 71, Núm 4. Oct-Dic 2008, pp 204-208"

1.2.5. Tratamiento

Como se ha comentado, el mecanismo patogénico de la rosácea permanece poco claro, por lo que el tratamiento actualmente se centra en el alivio de los síntomas ya que no existe una terapia curativa disponible (Schwab, y otros, 2011). A este respecto, una

buena aproximación farmacológica podría abordarse para revertir vasodilatación permanente de los vasos cutáneos.

Para el correcto tratamiento de los pacientes con rosácea, se debería tener en cuenta primero cuáles son los factores desencadenantes y eliminarlos. Por otra parte, se debería proteger la piel de la exposición solar de manera directa evitando los momentos de mayor concentración solar o aplicando barreras físicas como las pantallas solares de amplio espectro contra los UVA y UVB de manera diaria o como los sombreros.

A nivel farmacológico, aunque los tratamientos clásicos como el metronidazol tópico, el ácido azelaico tópico y las tetraciclinas orales pueden potencialmente contrarrestar algunos de los cambios inflamatorios vasculares y la dilatación asociada en la rosácea (eritema de la rosácea), sus efectos son insignificantes en el control de los cambios permanentes vasculares inflamatorios superficiales cutáneos (Rosso Del, Baldwin, Webster, & American Acne & Rosacea Society, 2008).

Por ello, una existe una necesidad de comprender mucho mejor las vías moleculares que controlan la vasodilatación permanente de los pequeños vasos cutáneos (alrededor de 200 μm) y la inflamación.

En este sentido estudios recientes han demostrado la liberación de péptidos vaso activos por neuronas sensoriales cutáneas tras la exposición a desencadenantes conocidos (Steinhoff, y otros, 2011), también se ha demostrado que existe una correlación estrecha entre las terminaciones nerviosas sensoriales faciales y los vasos en los pacientes con rosácea. El sistema simpático es el modulador primario de la vasculatura cutánea, con multitud de adrenorreceptores identificados que incluyen los α_1 , α_2 , β_1 y β_2 (Hieble, 2007). La disregulación del sistema nervioso simpático en la rosácea ha tenido una considerable atención, como la modulación de los receptores alfa adrenérgicos o los bloqueantes beta adrenérgicos que son de utilidad en algunos pacientes (Craig & Cohen, 2005) (Okwundu, Cline, & Feldman, 2019) (Shanler & Ondo, 2007). De hecho, los análisis array génicos y la PCR transcriptasa reversa han detectado

una hiperregulación importante en los genes encargados de la vasorregulación, incluyendo los receptores adrenérgicos (Schwab, y otros, 2011).

La mayoría de las arterias y venas del cuerpo están inervados por el sistema simpático adrenérgico, que libera norepinefrina como neurotransmisor. La unión de norepinefrina a los receptores adrenérgico alfa 1 y alfa 2 activa la señal de transducción que ocasiona la contracción de la musculatura lisa y la vasoconstricción (Hrometz, y otros, 1999). La norepinefrina también se une a los receptores adrenérgicos beta 2 postunión causando vasodilatación en la aorta de las ratas (Arribas, Marín, Ponte, Balfagón, & Salaices, 1994), aunque este efecto es enmascarado por la vasoconstricción mediada por los receptores adrenérgicos alfa (Hjemdahl, Belfrage, & Daleskog, 1979). A este respecto el propranolol como betabloqueante aumenta la vasoconstricción en la respuesta cutánea refleja a la exposición al frío (Stephens, Aoki, Kosiba, & Johnson, 2001).

En la actualidad terapias recientemente aprobadas para el tratamiento de la rosácea permanente se han centrado en reducir el eritema a través de la vasoconstricción de los vasos cutáneos sanguíneos siendo la diana tanto los receptores Alfa adrenérgicos con oximetazolina (receptor adrenérgico alfa 1 agonista o ADRA1) y con brimonidina (receptor adrenérgico alfa 2 agonista o ADRA2) (Okwundu , Cline, & Feldman , 2019). Ambos tratamientos tópicos han demostrado eficacia disminuyendo las escalas Clinician Erythema Assesment (CEA) [Escala visual de eritema o EVE] y la Subjet Self-Assesment (SSA). Aunque ambos tratamientos han demostrado una relativa seguridad en los ensayos clínicos, el uso crónico puede inducir alteraciones cardiovasculares típicas alfa adrenérgicas (Okwundu , Cline, & Feldman , 2019). Por eso una alternativa a los agonistas ADRA podría ser cubierta por los antagonistas ADRB con un mejor perfil en seguridad y recomendados como fuera de ficha de indicación para el tratamiento de la rosácea eritematotelangiectásica (Craigie & Cohen, 2005) (Spoendlin, Voegel, Jick , & Meier, 2014). Aunque existen algunos casos descritos del papel de los antagonistas ADRB disminuyendo el rubor asociado la rosácea (Craigie & Cohen, 2005), actualmente no hay una caracterización farmacológica formal del papel de los antagonistas ADRB en la vasoconstricción de los pequeños vasos cutáneos.

Grado	Escala EVE o CEA	Escala SSA
0	Sin eritema	Sin rojez
1	Poco eritema (casi imperceptible)	Muy poca rojez
2	Eritema moderado (piel rosácea)	Leve rojez
3	Eritema intenso (piel roja o púrpura)	Rojez moderada
4	Piel rota o abrasión (superficial)	Rojez severa

Tabla 3. Escalas de la Clinician Erythema Assesment (CEA): Escala visual de eritema o EVE y la Subjet Self-Assesment o SSA.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS

La hipótesis propuesta en este proyecto de investigación está basada en los antecedentes que se explican a continuación.

Como se ha detallado previamente, la rosácea es una enfermedad cutánea prevalente en la población mundial sin diferencias en cuanto al género.

Los agonistas tópicos de receptores adrenérgicos alfa 1 y alfa 2 (ADRA-1 y ADRA-2), al producir una vasoconstricción cutánea, son eficaces en aliviar la vasodilatación permanente y el eritema facial asociado a la rosácea. Aunque los antagonistas de los receptores adrenérgicos beta (ADRB) se utilizan fuera de ficha técnica en la rosácea, faltan datos farmacológicos y farmacodinámicos sobre estos receptores en los microvasos cutáneos.

En la actualidad, las terapias recientemente aprobadas para el tratamiento de la rosácea permanente se han centrado en reducir el eritema a través de la vasoconstricción de los vasos cutáneos sanguíneos siendo la diana tanto los receptores alfa adrenérgicos tipo 1 con oximetazolina (receptor adrenérgico alfa 1 agonista) como los receptores alfa adrenérgicos tipo 2 con brimonidina (receptor adrenérgico alfa agonista) (Okwundu , Cline, & Feldman , 2019). Ambos tratamientos tópicos han demostrado eficacia, sin embargo, tienen una seguridad relativa en los ensayos clínicos, ya que se ha sugerido que su uso crónico podría inducir alteraciones cardiovasculares típicas alfa adrenérgicas (Okwundu , Cline, & Feldman , 2019), como alteraciones del ritmo cardíaco o de la presión arterial. Por eso, una alternativa a los agonistas ADRA podría ser cubierta por los antagonistas ADRB con un mejor perfil en seguridad y recomendados como fuera de ficha de indicación para el tratamiento de la rosácea eritematotelangiectásica (Craigie &

Cohen, 2005) (Spoendlin, Voegel, Jick , & Meier, 2014). Aunque existen algunos casos descritos del papel de los antagonistas ADRB disminuyendo el rubor asociado la rosácea (Craigie & Cohen, 2005), actualmente no hay una caracterización farmacológica formal sobre el papel de los antagonistas ADRB en la vasoconstricción de los pequeños vasos cutáneos.

2.2. OBJETIVO

El objetivo principal de esta tesis es determinar si el bloqueo de los receptores β -adrenérgicos se opondría a la vasodilatación en los vasos de la piel. Así mismo, se pretende valorar la potencia de antagonistas β -adrenérgicos (propranolol y timolol) en la respuesta vasoconstrictora a la norepinefrina y adrenalina.

También se propone analizar la proporción que existe entre los receptores adrenérgicos α y β en los vasos de la piel, lo que facilitaría comprender las respuestas farmacológicas que se pudieran obtener.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1 REACTIVOS UTILIZADOS

En la siguiente tabla, se describen los reactivos utilizados en cada uno de los experimentos realizados.

Reactivos utilizados	Casa comercial	Referencia
ADRA 1	Bioss Antibody	Bs-0600R
ADRA 2	Bioss Antibody	Bs-1062R
ADRB 1	Novus International	NBP1-59007
ADRB 2	Novus International	NBP2-39091
Kit Aislamiento y recuperación total de ácido nucléico	Invitrogen	AAM1975
Kit transcripción reversa de ADNc de alta capacidad	Applied Biosystems	PN 4368814
Kit TaqMan PreAmp Master Mix	Applied Biosystems	PN 4384267
Cebador prediseñado RECEPTOR ADRENÉRGICO α_{1A}	Applied Biosystems	Hs00169124_m1

Cebador prediseñado RECEPTOR ADRENÉRGICO α_{2A}	Applied Biosystems	Hs01099503_s1
Cebador prediseñado RECEPTOR ADRENÉRGICO β_2	Applied Biosystems	Hs00240532_s1
Tripure	Roche	
GADPH	Applied Biosystems	4310884E
Ácido etilendiamintetraacético	Roche Diagnostics Ltd.	
Triton X-100	Panreac	142314
Anticuerpo monoclonal β- actina de ratón antihumano	Sigma-Aldrich	A1978
Anticuerpo de conejo antihumano RECEPTOR ADRENÉRGICO α_1	Sigma-Aldrich	Nº A270
Anticuerpo de conejo antihumano RECEPTOR ADRENÉRGICO α_2	Sigma-Aldrich	Nº SAB2500033
Anticuerpo de conejo antihumano RECEPTOR ADRENÉRGICO β_1	Sigma-Aldrich	Nº SAB2100064
Anticuerpo de conejo antihumano RECEPTOR ADRENÉRGICO β_2	Sigma-Aldrich	Nº SAB2100065
ECL plus	Amersham GE Healthcare	RPN2132

Tabla 4. Reactivos empleados

3.1.2. PACIENTES

Para la realización de los experimentos se determinó utilizar fragmentos de piel humana, en concreto procedentes de prepucio, obtenidas de 50 voluntarios sanos a los que se les iba a realizar un procedimiento quirúrgico electivo de circuncisión. Para ello, inicialmente se obtuvo permiso favorable del Comité de Ética del Hospital General de Valencia (España). Cada sujeto firmó previamente un consentimiento informado del procedimiento. Todos los donantes eran varones con edades comprendidas entre los 18 y los 30 años.

Se decidió utilizar la piel de prepucio porque se podían obtener muestras de tejido viable y sano cuya conservación se podía realizar rápida y fácilmente en una cámara frigorífica. Así mismo, se trata de una piel que cuya manipulación es cómoda y presenta una elevada vascularización con escaso tejido graso que facilitaba la realización de nuestros protocolos experimentales.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Procedimientos experimentales in vitro

3.2.1.1. Procesamiento de las muestras de rodajas de piel humana.

Debido a que la rosácea eritematotelangiectásica se ha relacionado con una vasodilatación prolongada de los microvasos sanguíneos (<200 μm) (Steinhoff, y otros, 2011) y que la severidad de la rosácea se ha relacionado con la vasodilatación de los mismos, se decidió utilizar la técnica de corte de piel humana con precisión para obtener arteriolas (<200 μm) rodeados de tejido manteniendo su integridad y analizar su función vascular en el tejido cutáneo, siguiendo la técnica descrita, aunque con modificaciones, por Milara J. et al. 2018.

Así pues, se obtuvieron fragmentos de piel humana sana procedentes de técnicas de circuncisión.

Se cortaron en fragmentos de 1 x 0.5 cm y se incubaron en una solución crioprotectora (FBS con DMSO al 10% y 0.1M trehalosa) durante 30 minutos. Los fragmentos de piel fueron insertados en un criomolde Tissue-Tek (Sakura Finetek) relleno con 0.4% de gelatina y posteriormente congelados a -20°C durante 1 hora.

Los moldes de gelatina congelada fueron cortados con criotomo (Thermo Scientific) a 60 µm y descongelado en un medio de Hanks balanceado modificado-HBSS (150mM NaCl, 5.4mM KCl, 10mM HEPES, 10mM Glucosa, 1.2mM MgCl₂, 1.8mM CaCl₂, 23mM EDTA, 0.3mM Ácido ascórbico, FBS 10%) durante 1 hora antes de ser sometido a una mezcla de gas de CO₂ 5%, O₂ 20% y N₂ 75% (pH=7.4) y sustituyendo el medio hasta que gelatina usada como medio era eliminada de los cortes cutáneos.

Los cortes de piel se realizaron de manera que se pudiera analizar correctamente la función de la microcirculación (vasos con diámetros de <200 µm) rodeados de tejido manteniendo su integridad.

3.2.1.1.1. Experimentos de perfusión

Para los procedimientos de perfusión, los cortes de piel fueron colocados en una cámara de perfusión multiválvula (Aparato Harvard, Massachusetts, USA: cat. Nº RC-29) y fijados con una pieza de platino con filamentos de nylon de 50 µm de diámetro. El tejido fue perfundido con una bomba peristáltica (Cole-Parmer GmbH: ISM1089-C) controlado con una válvula de flujo (Aparato Harvard, Massachusetts, USA: cat. Nº RC-50) con un flujo continuo de 0.9 ml/min a 37°C.

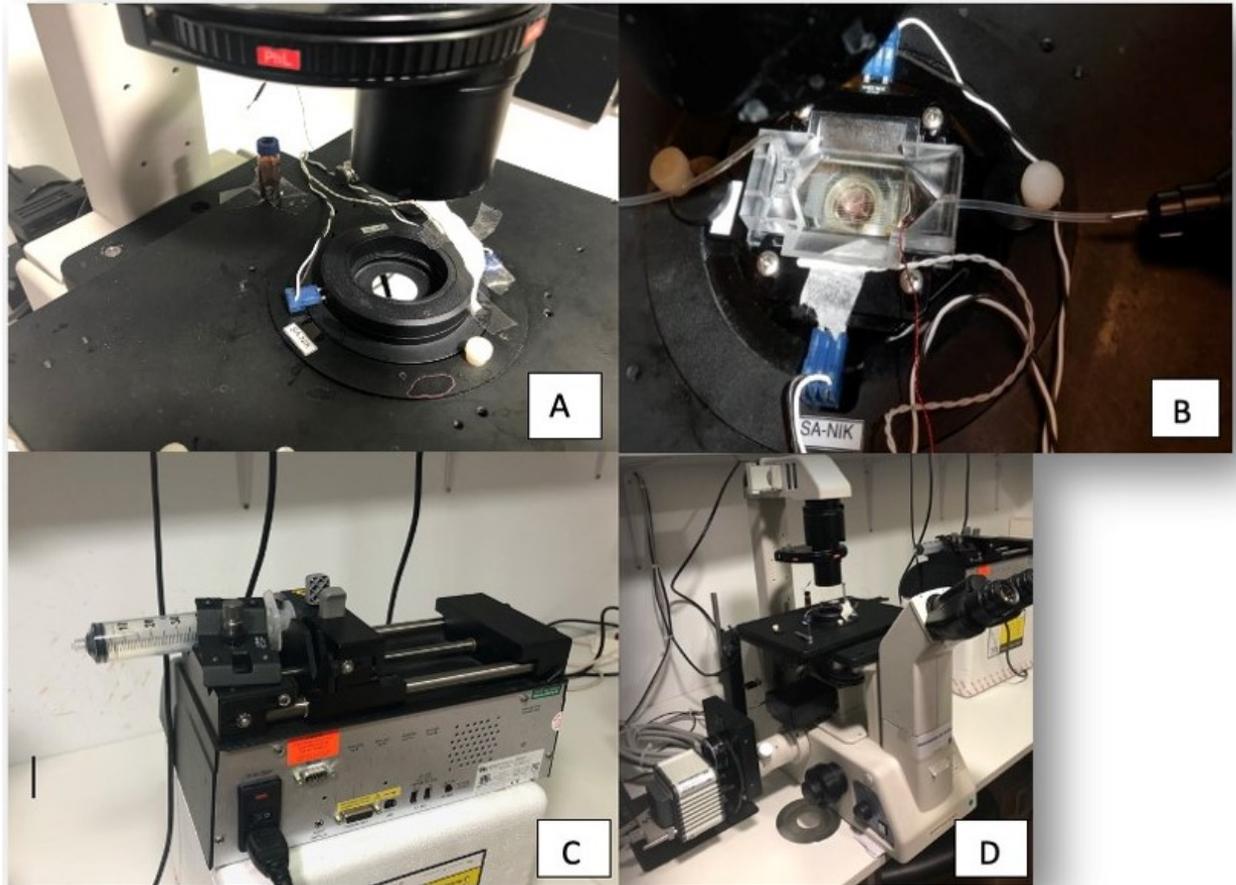


Figura 14. En estas imágenes se muestra el aparataje empleado para la realización de los estudios de perfusión sobre el microscopio invertido. En la imagen A: Montaje de cámara de perfusión sobre microscopio invertido. En la imagen B: Montaje de cámara de perfusión sobre microscopio invertido con muestra de tejido. En la imagen C: Sistema de perfusión. En la imagen D: Microscopio invertido Nikon Eclipse TE200 con montaje final.

La visualización de las microarterias de la piel (<200 μm) se realizó con un microscopio invertido (Nikon Eclipse TE200, aumento x40; Nikon, Tokyo, Japan) acoplado a una cámara de vídeo CCD (CoolSNAP; Teledyne Photometrics, AZ, USA) y conectado al software MetaFluor (Molecular Devices, USA) para el análisis de imágenes.

Para recopilar datos de referencia de los microvasos, se perfundieron los cortes con solución salina equilibrada de Hanks durante 30 minutos y se grabaron videos vivos de referencia cada 10 segundos.

Tras media hora como tiempo de equilibrio para el área de la microcirculación, se utilizó 1 μM de norepinefrina para confirmar que la musculatura lisa era viable al conseguir una vasoconstricción y posteriormente se confirmaba la correcta función endotelial al conseguir la relajación con 1 μM de acetilcolina, como vasodilatador. Luego se lavaban los tejidos para conseguir su relajación. Posteriormente se perfundían con concentraciones incrementales de CIK durante 5 minutos para conseguir una respuesta contráctil máxima (~90% del cierre del área total de la arteria).

Tras el aclarado y el equilibrio, se realizaban los diferentes protocolos de estudio que a continuación se pasan a detallar.

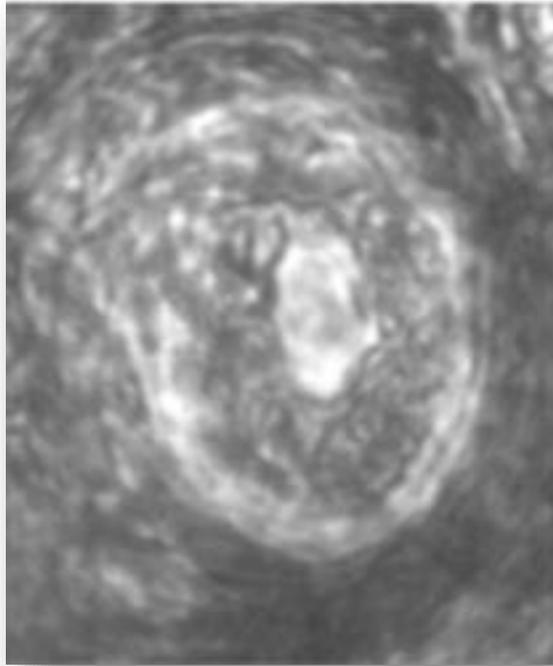


Figura 15. Detalle de una de las imágenes microarteriales obtenidas con el software MetaFluor© durante los estudios de perfusión.

3.2.1.1.2 Protocolos experimentales

- Experimentos de perfusión en microarterias (<200 μm) de cortes de tejido cutáneo humano en presencia de agonistas alfa-adrenérgicos.

Tras el protocolo mencionado, las microarterias cutáneas (<200 μm) obtenidas en los cortes de las muestras de piel eran perfundidas, bajo microscopio, con concentraciones crecientes (0.001, 0.1 y 10 μM) de norepinefrina, como agonista preferencial del receptor adrenérgico α_1 , o brimodina, como agonista preferencial del receptor adrenérgico α_2 , así como CLK a 150 mM.

- Experimentos de perfusión en microarterias (<200 μm) de cortes de tejido cutáneo humano en presencia de un antagonista del receptor adrenérgico α_1 .

Tras el protocolo mencionado, las microarterias cutáneas (<200 μm) se perfundieron con prazosín, como antagonista del receptor adrenérgico α_1 , a una concentración de 1 μM durante 5 minutos. Tras ello, y en presencia de prazosín, se adicionaron noradrenalina o brimonidina a 10 μM , como alfa-agonistas 1 y 2 respectivamente, a la máxima concentración, y finalmente se perfundía cloruro potásico 150 mM a los 10 minutos.

- Experimentos de perfusión en microarterias (<200 μm) de cortes tejido cutáneo humano precontraídas con cloruro potásico.

Las microarterias cutáneas (<200 μm) obtenidas en los cortes de las muestras de piel se perfundían durante 5 minutos, en el microscopio, con cloruro potásico a 150 mM. En presencia del cloruro potásico, se procedía a la perfusión a los 5 minutos prazosín (1 μM), como antagonista ADRA1, solo o en combinación con un antagonista del receptor beta-adrenérgico no selectivo (bloqueante β_1 y β_2), como son el propranolol (1 μM) o el timolol (1 μM). Tras 5 minutos de perfusión con el antagonista α_1 (prazosín) o con la mezcla antagonista α_1 + antagonista $\beta_{1/2}$ (propranolol o timolol), se añadían dosis crecientes de noradrenalina (0.001, 0.1 y 10 μM).

- Experimentos de perfusión en microarterias (<200 μm) de cortes de tejido cutáneo humano precontraídas con cloruro potásico y relajadas con norepinefrina en presencia de prazosín como antagonista adrenérgico α_1 .

Los siguientes experimentos se diseñaron para analizar la eficacia de los antagonistas del receptor adrenérgico β no selectivos (propranolol o timolol), en

la reversión de los efectos vasodilatadores de la norepinefrina en las arterias cutáneas pretratadas con prazosín.

Con este fin, las microarterias (<200µm) se pretrataron durante 5 minutos con CLK procedentes de los cortes cutáneos y posteriormente se perfundían con prazosín (1µM), como antagonista ADRA1, durante 5 minutos, seguido de la perfusión de norepinefrina a dosis crecientes (0.001, 0.1 y 10 µM).

Tras la perfusión con norepinefrina, las microarterias se perfundían a los 20 minutos con los antagonistas del receptor adrenérgico β no selectivos (propranolol (1µM) o timolol (1µM)) en presencia de prazosín, seguido a los 30 minutos de otra perfusión de norepinefrina a concentraciones crecientes (0.001, 0.1 y 10 µM).

Todos los protocolos se realizan por triplicado en muestras de piel de 3 individuos diferentes.

3.2.1.2. Experimentos en miógrafo

El sistema miógrafo de alambre Danish MyoTechnologies (DMT, Hinnerup, Dinamarca) se utilizó para medir la fuerza en anillos de los vasos pequeños aislados de prepucio fresco (diámetro interno de 500 µm – 800 µm) en términos de capacidad de respuesta a los diferentes agonistas y antagonistas.

Tras diseccionar con cautela los vasos del tejido de origen con tijeras y pinzas finas, estos fueron montados (figura 16) como preparaciones en anillo. Se canuló el lumen de los anillos con dos cables de acero inoxidable o tungsteno que debían quedar rectos. Posteriormente se aseguraron con los tornillos a dos soportes, comprobando que los cables quedaran tensos y sin cruzarse. Luego se unió un soporte a un micrómetro, lo que

permitió el control de la circunferencia del vaso. El otro soporte fue unido a un transductor de fuerza para medir el desarrollo de la tensión. Toda la preparación se mantuvo en una cámara con solución salina balanceada de Hank a 37° con una mezcla de CO₂ al 5%, O₂ al 20% y Nitrógeno al 75% (pH= 7.4).

Para cada experimento farmacológico (se siguen los mismos protocolos que en el subapartado anterior, pero utilizando microarterias aisladas de piel de prepucio) se realizó una normalización, que es el proceso para determinar las condiciones de pretensión óptimas para cada arteria antes de realizar un experimento. El software Labchart (ADInstruments, Sydney, Australia) permitió monitorizar y grabar la tensión arterial en gramos. Los resultados se obtienen mediante una curva de dosis-respuesta.



Figura 16. Sistema miógrafo de alambre DMT utilizado en los experimentos de arterias (500-800 mm) aisladas cutáneas.

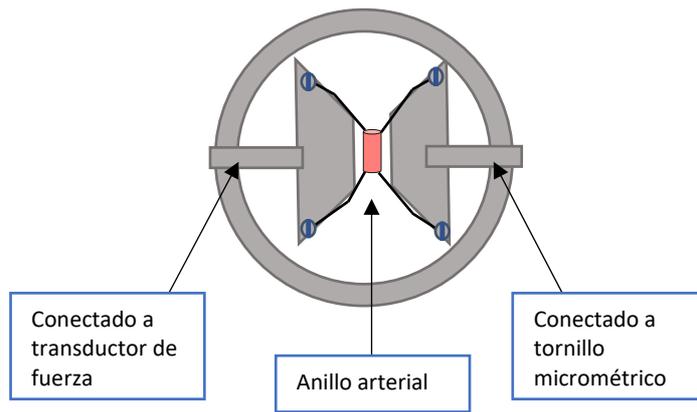


Figura 17. Esquema del montaje en la cámara del sistema miográfico.

3.2.1.2.1. Protocolos experimentales

- Experimentos en anillos de pequeñas arterias cutáneas (500-800 μm) de tejido humanos utilizando un microbaño de órganos con miógrafo en presencia de agonista alfa-adrenérgico.

Para estudiar los efectos de la activación de receptor adrenérgico α en las pequeñas arterias aisladas cutáneas (500–800 μm de diámetro), se estimulaban los anillos arteriales con dosis incrementales de norepinefrina (0.001, 0.1 y 10 μM) como agonista del receptor adrenérgico.

- Experimentos en anillos de pequeñas arterias cutáneas (500-800 μm) de tejido humanos utilizando un microbaño de órganos con miógrafo, en presencia de un antagonista del receptor adrenérgico α_1 .

Para estudiar los efectos de la activación de receptor adrenérgico α en las pequeñas arterias aisladas cutáneas (500–800 μm de diámetro), se estimulaban

los anillos arteriales con dosis incrementales de norepinefrina (0.001, 0.1 y 10 μM). Tras un período de lavado, los anillos arteriales se pretrataban con prazosín 1mM y estimulados, de nuevo, con norepinefrina (10 μM).

En otro grupo de arteriolas y siguiendo el mismo protocolo, se estimulaban los anillos con brimonidina (0.1, 1 y 10 μM). Tras otro período de lavado, se trataban los anillos con prazosín seguido de la adición de brimonidina (0.1, 1 y 10 μM).

- Experimentos en anillos de pequeñas arterias cutáneas (500-800 μm) de tejido humanos utilizando un microbaño de órganos con miógrafo precontraídas con cloruro potásico.

Las arteriolas cutáneas (500-800 mm) obtenidas de las muestras de piel eran precontraídas con cloruro potásico 80 mM. En presencia del cloruro potásico se adicionaba al microbaño, tras 5 minutos, prazosín (1 μM) solo o en combinación con un antagonista del receptor adrenérgico β no selectivo (bloqueante β_1 y β_2), como son el propranolol (1 μM) o el timolol (1 μM).

- Experimentos en anillos de pequeñas arterias cutáneas (500-800 mm) de tejido humanos utilizando un microbaño de órganos con miógrafo precontraídas con cloruro potásico y relajadas con norepinefrina en presencia de prazosín como antagonista adrenérgico α_1 .

Con estos experimentos se pretende analizar la eficacia de los antagonistas del receptor adrenérgico β no selectivos (propranolol o timolol), en la reversión de los efectos vasodilatadores de la norepinefrina en las arterias cutáneas pretratadas con prazosín.

Para este fin, a los anillos de pequeñas arterias cutáneas (500-800 μm) pretratadas con ClK se les adicionaba prazosín (1 μM) durante 5 minutos, seguido de norepinefrina a dosis crecientes (0.001, 0.1 y 10 μM).

A continuación, se adicionaban los antagonistas del receptor adrenérgico β no selectivos, propranolol ($1\mu\text{M}$) o timolol ($1\mu\text{M}$), en presencia de prazosín, seguido de otra adición al microbaño de norepinefrina a concentraciones crecientes (0.001 , 0.1 y $10\mu\text{M}$).

3.2.2. Análisis de la proporción de la expresión de receptores α y β -adrenérgicos en vasos humanos cutáneos.

Para analizar la expresión de los receptores adrenérgicos en microarterias de piel, se realizó una inmunofluorescencia confocal, una PCR en tiempo real o PCR cuantitativa y un Western blot.

La inmunofluorescencia confocal es una técnica que se utiliza para la detección de una proteína celular de interés marcándola mediante la tinción con anticuerpos específicos destinados frente a ella, utilizando para su visualización un microscopio de fluorescencia, en nuestro caso, confocal, donde un láser emite una luz, cuya longitud de onda es específica. El uso del microscopio confocal permite la obtención de imágenes nítidas pudiendo marcar varias proteínas de interés a la vez.

La PCR convencional es una técnica de biología molecular empleada para la amplificación de una secuencia genética específica en un termociclador en la que se precisa de un molde de ADN o ADNc (ADN complementario obtenido mediante la retrotranscripción de ARN (RT-Q-PCT)), cebadores específicos, un tampón de reacción y ADN polimerasa. La PCR en tiempo real o cuantitativa es una variante de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que permite realizar en el mismo procedimiento una amplificación de ácidos nucleicos (ADN y ARN) y la posterior cuantificación del resultado total de dicha amplificación. Para ello se adicionan fluoróforos que marcan el producto

durante la fase de ciclado térmico, de forma que en la fase exponencial se puede cuantificar la cantidad de señal fluorescente, cuya reacción es proporcional a la cantidad obtenida.

El western blot es una técnica empleada para la detección proteica en una muestra biológica empleando la electroforesis en gel para la separación de las proteínas y su posterior transferencia a la superficie de una membrana.

3.2.2.1. Protocolo de inmunofluorescencia confocal

El protocolo que se siguió fue el que se detalla a continuación.

i) Fijación y deshidratación:

d) Las muestras de prepucio fueron fijadas durante 48 horas en formaldehído 3,7-4,0% tamponado a un pH=7

d) Las muestras de tejido fueron deshidratadas siguiendo los siguientes pasos:

- Etanol 70% 60 min.
- Etanol 96% 3 h.
- Etanol 96% 1,5 h.
- Etanol 100% 1 h.
- Etanol 100% 2 h.
- Etanol 100% 6-8 h.
- Xileno 60 min.
- Xileno 60 min.
- Parafina 1 h.

c) Las muestras de tejido deshidratado se incluyeron en parafina, cortado con el micrótopo a una sección de 4-6 μm y colocadas en portaobjetos de microscopio.

d) Se colocaban en secador de tejidos durante 45 minutos a 60°C.

e) Posteriormente se procedía a la desparafinación y rehidratación:

- Lavado de los cortes 3 veces en xileno durante 5 minutos cada vez a temperatura ambiente.
- Lavado de los cortes 3 veces en etanol 100% durante 10 minutos cada vez a temperatura ambiente.
- Lavado de los cortes 2 veces en etanol 95% durante 10 minutos cada vez a temperatura ambiente.
- Lavado de los cortes en etanol 80% durante 3 minutos cada vez a temperatura ambiente.
- Aclarado de los cortes de manera generosa con agua destilada durante 5 minutos a temperatura ambiente

ii) Recuperación de antígenos

- Se hirvieron los portaobjetos en 0.01M de tampón de citrato sódico (pH6) a 100°C durante 15-20 minutos.
- Se retiraron los portaobjetos del calor y se les dejó en reposo a temperatura ambiente en tampón durante 30 minutos.
- Se aclararon dos veces con solución salina tamponada TBST durante 5 minutos a temperatura ambiente.

iii) Inmunotinción

- Se bloqueó con suero al 5% o BSA (albúmina sérica bovina) durante 2 horas a temperatura ambiente.
- Se drenó el tampón de bloqueo del portaobjetos

- Se incubaron los portaobjetos con anticuerpos primarios diluidos a 37° durante 1 hora con anticuerpos policlonales de conejo antihumano como se describen en la siguiente tabla:

RECEPTOR ADRENÉRGICO α_{1A}	Bioss (bs- 0600R)	Rabbit pAb	1:10
RECEPTOR ADRENÉRGICO α_2	Bioss (bs- 1062R)	Rabbit pAb	1:10
RECEPTOR ADRENÉRGICO β_1	Novus (NBP1- 59007)	Rabbit pAb	1:10
RECEPTOR ADRENÉRGICO β_2	Novus (NBP2- 39091)	Rabbit pAb	1:10

Tabla 5. anticuerpos policlonales de conejo antihumano

- Se lavaron los portaobjetos 3 veces con TBST durante 5 minutos a temperatura ambiente
- Se incubaron con IgG de cabra anticonejo diluido a 1:200 (H+L) Alexa Fluor[®] 488 (Invitrogen) durante 1 hora a 37°C en oscuridad.
- Se lavaron los portaobjetos 3 veces con TBST durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Se incubaron los portaobjetos con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) durante 3 minutos.
- Se lavaron los portaobjetos 3 veces con TBST durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Se aplicó el medio de montaje Fluoprep y se colocó el cubreobjetos.

iv) Microscopia confocal:

- Se visualizaron los portaobjetos con un microscopio confocal Leica TCS SP2 con una magnificación x400.
- Para el anticuerpo secundario se usó excitación BP 450-490/emisión LP 515
- Para el marcador DAPI se utilizó la excitación UV BP 340-380/emisión LP 425

3.2.2.2. Protocolo PCR en tiempo real para el análisis de la expresión de receptores adrenérgicos

Se aislaron las microarterias (<200 μm) del tejido cutáneo conservado en parafina mediante una disección microscópica mediante láser con el microscopio microdisector LEICA LMD 6500 (Barcelona, España). Éstas se recolectaron en un tubo Eppendorf.

El ARN total se aisló con el Kit de aislamiento y recuperación total de ácido nucleico (AAM 1975, Invitrogen). El ADNc se sintetizó del total de ARN usando el Kit de transcripción reversa de ADNc de alta capacidad (4368814, Applied Biosystems). La amplificación genética se realizó con el Kit TaqMan PreAmp Master Mix Kit (PN 4384267, Applied Biosystems) con cebadores y primers específicos prediseñados por Applied Biosystems para receptor adrenérgico α_1 (Hs00169124_m1), receptor adrenérgico α_2 (Hs01099503_s1), receptor adrenérgico β_1 (Hs02330048_s1) y receptor adrenérgico β_2 (Hs00240532_s1) en el sistema Fast Real-Time PCR 79000HT (Applied Biosystems) usando el Universal Master Mix (Applied Biosystems).

Se aisló el ARN total de arterias cutáneas (500-800 μm) del prepucio usando el reactivo de aislamiento Tripure® (Roche, Indianapolis, USA). Se confirmó la integridad del ARN extraído con el Bioanizador (Agilent, Palo Alto, CA, USA). La transcripción reversa se realizó con 300 ng del total de ARN con el kit de reactantes de transcripción

reversa TaqMan (PN 4384267, Applied Biosystems, Perkin-Elmer Corporation, CA, USA). El ADNc se amplificó utilizando los mismos primers en el sistema Fast Real-Time PCR 79000HT (Applied Biosystems) utilizando el Universal Master Mix (Applied Biosystems).

La expresión del gen diana se definió como el aumento o disminución de veces en relación la expresión del GAPDH como control endógeno (Applied Biosystems; 4310884E). El valor medio de las repeticiones para cada muestra se calculó y expresó como el umbral del ciclo (Ct). Luego se calculó el nivel de expresión génica como la diferencia (Δ Ct) entre el valor Ct del gen objetivo y el valor Ct de GAPDH. Los cambios en los niveles de ARNm del gen diana se designaron como $2^{-\Delta Ct}$.

3.2.2.3. Protocolo Western Blot

Se disgregaron y lisaron en hielo las microarterias aisladas de la piel de entre 500 y 800 μ m de diámetro mediante un buffer lítico realizado con una mezcla de inhibidor completo con 1 mM de ácido etilendiamintetraacético (Roche Diagnostics Ltd, West Sussex, UK) con 20 mM de base Tris, ClNa al 0.9%, Triton X-100 0.1%, 1 mM de ditiotreitól y 1 mg/ml de pepstatina A. Se utilizó el Bio-Rad assay (Bio-Rad Laboratories Ltd, Herts, UK) según las instrucciones del fabricante para cuantificar el nivel de proteína de cada muestra asegurando la carga igualitaria de proteína. Para separar las proteínas en función de su peso molecular se utilizó la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.

Se cargaron 100 μ g de proteínas desnaturalizadas junto con un marcador de peso proteico molecular (marcador Bio-Rad Kaleidoscope [Bio-Rad Laboratories]) en un gel de acrilamida que consistía en un gel de apilamiento de acrilamida al 5% vertido sobre un gel de resolución de acrilamida al 10%. Se aplicaron 100 V durante 1 hora para el desplazamiento de las proteínas a través del gel. Mediante el método de wet blotting se transfirieron las proteínas del gel a una membrana de difluoruro de polivinilideno. Se bloqueó la membrana con Marvel al 5% en PBS que contenía Tween20 al 0.1% (PBS-T) y luego marcada con los anticuerpos mencionados

previamente y normalizada al total de anticuerpo de β -actina de ratón antihumana (1:1.000) (anticuerpo monoclonal cat núm: A1978, Sigma), anticuerpo de conejo anti-humano ADRA-1 (1:1.000) (Sigma Aldrich, catálogo nº A270), anticuerpo de conejo anti-humano ADRA-2 (1:1.000) (Sigma Aldrich, catálogo nº SAB2500033), anticuerpo de conejo anti-humano ADRB-1 (1:1.000) (Sigma Aldrich, catálogo nº SAB2100064) y anticuerpo de conejo anti-humano ADRB-2 (1:1.000) (Sigma Aldrich, catálogo nº SAB2100065). El método de detección de las proteínas marcadas se consiguió con los reactantes de quimioluminiscencia mejorados (ECL plus [Amersham GE Healthcare, Buckinghamshire, UK]). La densitometría de las películas se realizó con el software Image J 1.42q (disponible en la página web <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>, USA). Los resultados se expresaron como proporciones del control de β -actina endógena.

3.2.3. Análisis estadístico

En los experimentos *in vitro* los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar de la media (SEM) de n experimentos hasta que se confirmó la distribución normal para cada grupo de datos mediante análisis de histogramas y el test de Kolmogorov-Smirnov. En este caso, el análisis estadístico se resolvió por análisis paramétrico. Las comparaciones entre dos grupos fueron analizadas empleando una prueba bilateral t de Student apareada para muestras dependientes, o un t-test no apareado para muestras independientes. Las comparaciones múltiples fueron analizadas mediante test ANOVA de una o dos vías seguido de un test post hoc de Bonferroni (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA). Se consideran datos significativos con valor $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1. Experimentos de perfusión en microarterias (<200 μ m) de cortes de tejido cutáneo humano

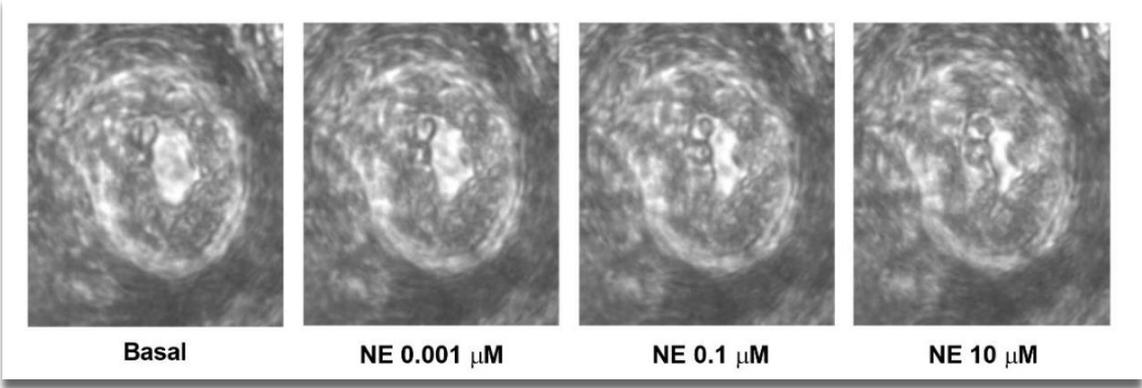
4.1.1. Experimentos de perfusión en microarterias (<200 μ m) de cortes tejido cutáneo humano en presencia de agonistas alfa-adrenérgicos.

Las arteriolas cutáneas (<200 μ m) obtenidas en los cortes de las muestras de piel fueron perfundidas, en el microscopio, con concentraciones crecientes (0.001, 0.1 y 10 μ M) de norepinefrina (agonista del receptor adrenérgico α_1) o brimodina (agonista del receptor adrenérgico α_2).

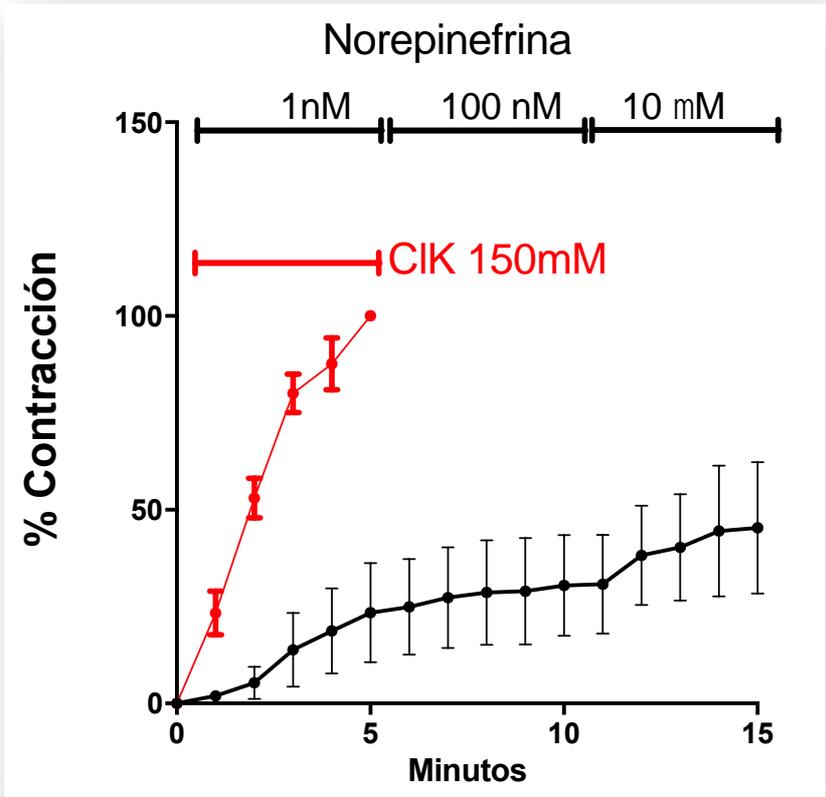
La norepinefrina a las concentraciones de 0.001, 0.1 y 10 μ M produjo unas contracciones medias, respectivamente, de 23.4 \pm 12.8 %, 30.4 \pm 13.0 % y 45.3 \pm 17.0 %, del máximo efecto obtenido con KCl 150 mM (100 %) (figuras 18 A, B).

Se obtuvieron resultados similares, en cuanto a su tendencia creciente, con 0.001, 0.1 y 10 μ M de brimonidina, con unas contracciones medias de 12.2 \pm 0.5 %, 47.7 \pm 4.8 % y 78.2 \pm 2.2 % respectivamente (figura 18 C).

A



B



C

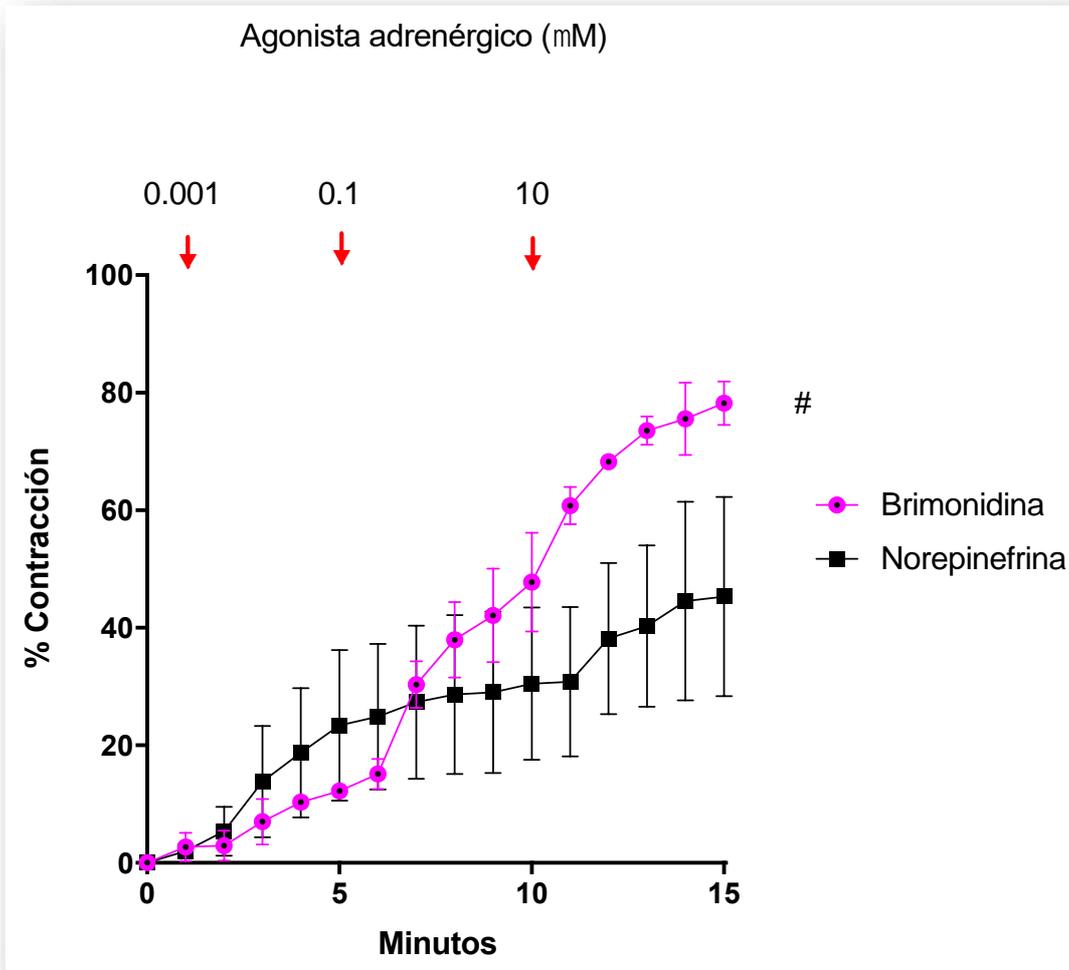


Figura 18. Efectos contráctiles de los agonistas adrenérgicos sobre las arteriolas cutáneas (<math><200\mu\text{m}</math>). A) Video-registro original de la contracción mediada por norepinefrina (NE) B) Curva dosis respuesta del efecto contráctil de las arteriolas presentes en los cortes cutáneos debida a norepinefrina (NE) y C) brimonidina (BR). Los datos se expresan como la media \pm sem ($n=3$, pacientes =3). # $p<0.05$ BR vs NE

4.1.2. Experimentos de perfusión en microarterias (<200 μm) de cortes de tejido cutáneo humano en presencia de un antagonista del receptor adrenérgico α_1 .

En este protocolo experimental las microarterias cutáneas (<200 μm) se perfundieron con prazosín (antagonistas del receptor adrenérgico α_1) a una concentración de 1 μM durante 5 minutos. Tras ello, y en presencia de prazosín, se adicionó noradrenalina o brimonidina a 10 μM (a la máxima concentración) y finalmente se perfundió cloruro potásico 150 mM a los 10 minutos (Figura 19).

Aquí la brimonidina produjo una contracción promedio de 64.6 ± 3.6 %, mientras que la norepinefrina provocó una vasodilatación media de 37.5 ± 4.6 %, sugiriendo una actividad vasodilatadora funcional del receptor adrenérgico β_2 en la acción de la norepinefrina, al estar bloqueados los receptores adrenérgicos α_1 con el prazosín.

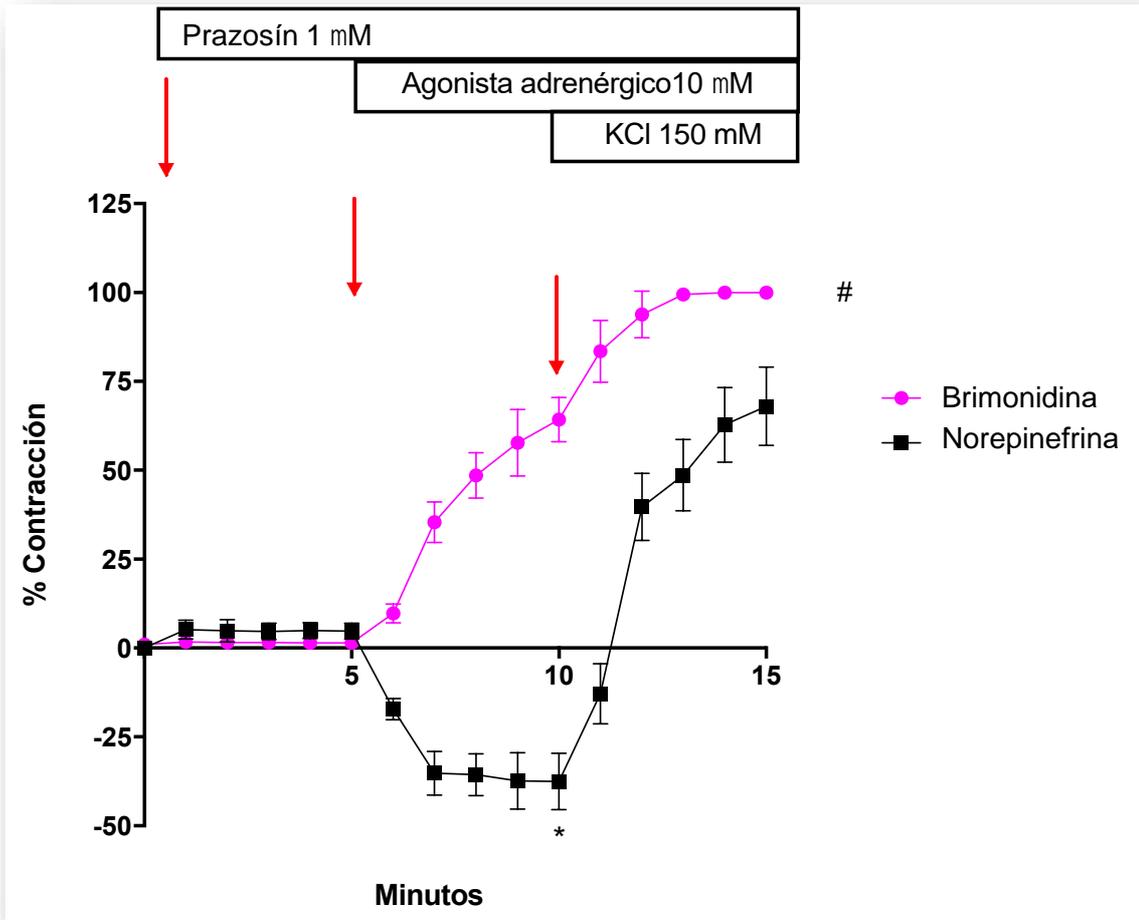


Figura 19. Efectos contráctiles de los agonistas adrenérgicos sobre las arteriolas cutáneas (<math><200\mu\text{m}</math>), por norepinefrina (NE), brimonidina (BR) y cloruro potásico 150 mM (ClK). Los datos se expresan como la media \pm sem ($n=3$, pacientes =3). * $p<0.05$ NR vs BR; # $p<0.05$ BR vs NE.

4.1.3. Experimentos de perfusión en microarterias (<math><200\mu\text{m}</math>) de cortes de tejido cutáneo humano precontraídos con cloruro potásico

Las microarterias cutáneas (<math><200\mu\text{m}</math>) obtenidas en los cortes de las muestras de piel fueron perfundidas durante 5 minutos, en el microscopio, con cloruro potásico a 150 mM, obteniéndose una meseta contráctil. En presencia del cloruro potásico, se perfundió a los 5 minutos prazosín (1 μM), como antagonista ADRA1, solo o en

combinación con un antagonista del receptor beta-adrenérgico no selectivo (bloqueante β_1 y β_2), como son el propranolol ($1\mu\text{M}$) o el timolol ($1\mu\text{M}$), como se muestra en la figura 20. Tras 5 minutos de perfusión con el antagonista α_1 (prazosín) o con la mezcla antagonista α_1 + antagonista $\beta_{1/2}$ (propranolol o timolol), se añadieron dosis crecientes de noradrenalina (0.001 , 0.1 y $10\mu\text{M}$).

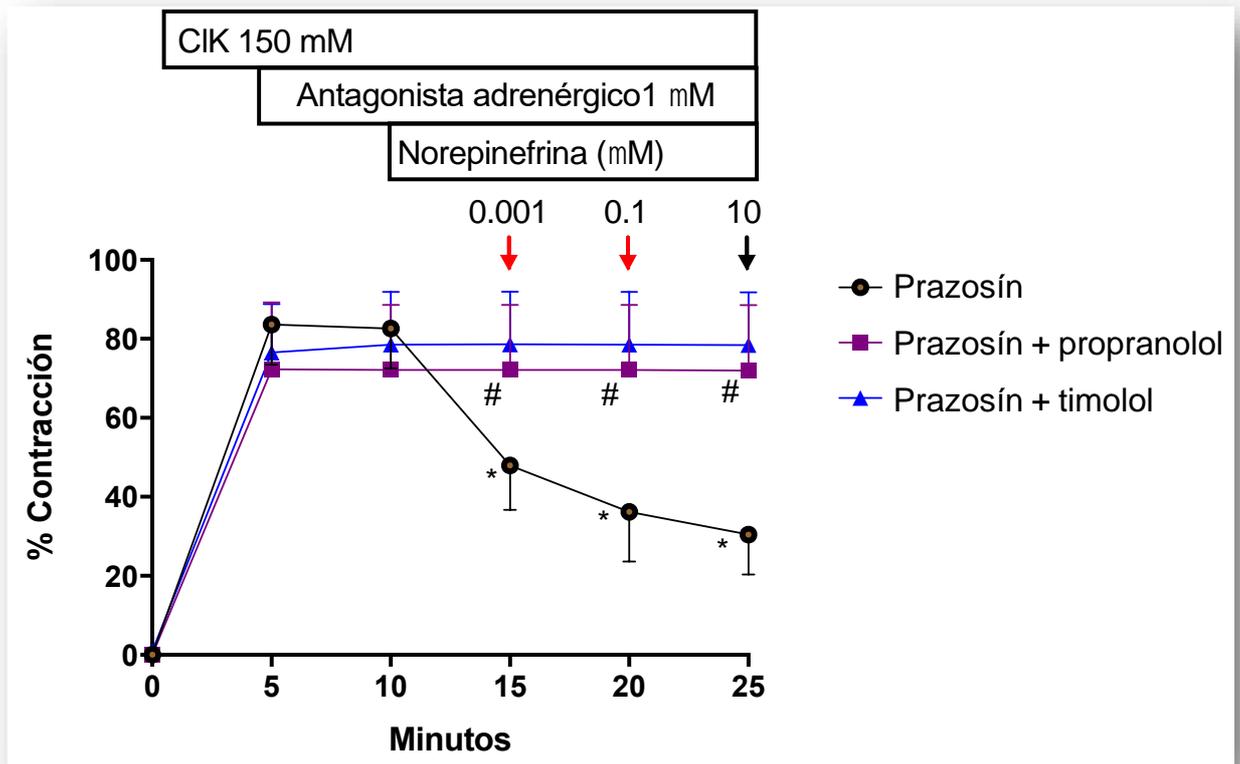


Figura 20. Efecto relajador de la norepinefrina sobre las arteriolas cutáneas ($<200\mu\text{m}$) precontraídas con cloruro potásico 150 mM (ClK) en presencia de prazosín (1mM) y en presencia de prazosín (1mM) + propranolol (1mM) o en presencia de prazosín (1mM) + timolol (1mM). Los datos se expresan como la media \pm sem ($n=3$, pacientes =3). * $p<0.05$ vs contracción a los 5 minutos de la misma arteria; # $p<0.05$ vs grupo tratado con prazosín.

En el grupo pretratado solo con prazosín, las concentraciones de noradrenalina 0.001 , 0.1 y $10\mu\text{M}$ produjeron respectivamente una dilatación arterial de $34.7\pm 9.5\%$, $46.43\pm 12.7\%$ y $52.19\pm 9.4\%$ relativo al área basal. Sin embargo, en las arterias pretratadas con prazosín y los antagonistas del receptor adrenérgico β no selectivos

(propranolol o timolol) la norepinefrina no revirtió la contracción arteriolar provocada por cloruro potásico; en lugar de ello, provocó un muy débil aumento de la contracción arteriolar de 0.057%, 0.035% y 0.12% respectivamente, indicando que la norepinefrina actúa preferentemente sobre receptores α_1 y de manera muy débil sobre los receptores adrenérgicos α_2 .

4.1.4. Experimentos de perfusión de microarterias (<200 μm) de cortes de tejido cutáneo humano precontraídos con cloruro potásico y relajadas con norepinefrina en presencia de prazosín como antagonista α_1 adrenérgico.

Los siguientes experimentos se diseñaron para analizar la eficacia de los antagonistas del receptor adrenérgico β no selectivos (propranolol o timolol), en la reversión de los efectos vasodilatadores de la norepinefrina en las arterias cutáneas pretratadas con prazosín.

Con este fin, las microarterias (<200 μm) se pretrataron durante 5 minutos con CLK procedentes de los cortes cutáneos y posteriormente se perfundieron con prazosín (1 μM), como antagonista ADRA1, durante 5 minutos, seguido de la perfusión de norepinefrina a dosis crecientes (0.001, 0.1 y 10 μM).

Tras la perfusión con norepinefrina, las microarterias se perfundieron a los 20 minutos con los antagonistas del receptor adrenérgico β no selectivos (propranolol (1 μM) o timolol (1 μM)) en presencia de prazosín, seguido a los 30 minutos de otra perfusión de norepinefrina a concentraciones crecientes (0.001, 0.1 y 10 μM). La adición de propranolol o timolol fue incapaz de revertir la vasodilatación inducida por la norepinefrina en las arteriolas cutáneas (figura 21) pretatados con prazosín.

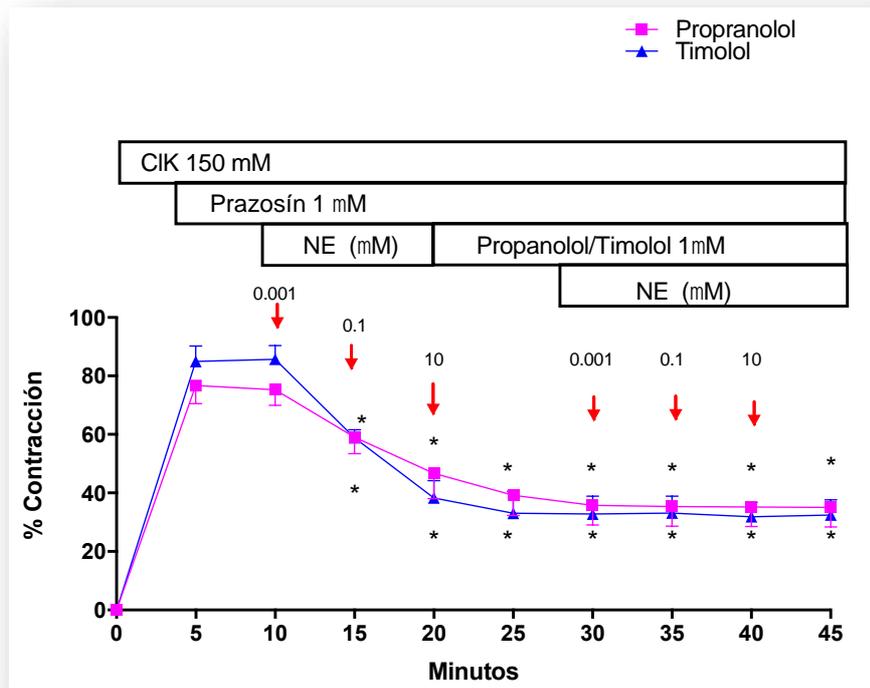


Figura 21. El tratamiento de las arteriolas cutáneas (<math><200\mu\text{m}</math>) precontraídas con cloruro potásico 150 mM (CIK) y pretratadas con prazosín, con antagonistas del receptor adrenérgico β no selectivos (propranolol o timolol), no revierten los efectos vasodilatadores de la norepinefrina. Los datos se expresan como la media \pm sem ($n=3$, pacientes =3). * $p<0.05$ vs contracción de la misma arteria.

4.2. Experimentos en anillos de pequeñas arterias cutáneas (500-800 μm) de tejido humano utilizando un microbaño de órganos con miógrafo.

4.2.1. Experimentos en anillos de pequeñas arterias cutáneas (500-800 μm) de tejido humanos utilizando un microbaño de órganos con miógrafo, en presencia de un agonista del receptor adrenérgico.

Para estudiar los efectos de la activación de receptor adrenérgico α en las pequeñas arterias aisladas cutáneas (500–800 μm de diámetro), se estimularon los anillos

arteriales con dosis incrementales de norepinefrina (0.001, 0.1 y 10 μM) como agonista del receptor adrenérgico.

La administración al baño de órganos del miógrafo de concentraciones crecientes de norepinefrina produjo un incremento de la fuerza isométrica generada por el anillo vascular (Figura 22).

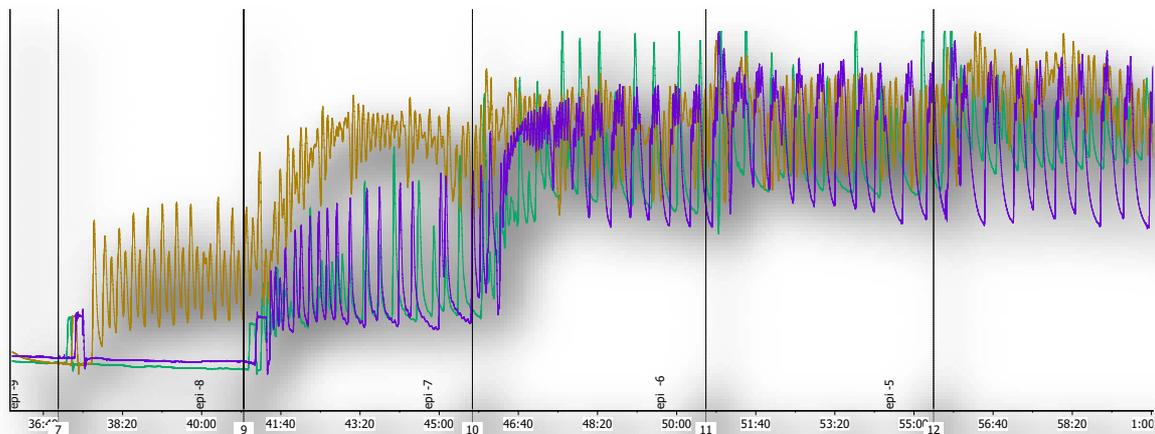


Figura 22. Registro original de la contracción mediada por norepinefrina (NE) en anillos de pequeñas arterias cutáneas (500-800 μm) de tejido humano utilizando un microbaño de órganos con miógrafo.

4.2.2. Experimentos en anillos de pequeñas arterias cutáneas (500-800 μm) de tejido humano utilizando un microbaño de órganos con miógrafo, en presencia de un antagonista del receptor adrenérgico α_1 .

Para estudiar los efectos de la activación de receptor adrenérgico α en las pequeñas arterias aisladas cutáneas (500–800 μm de diámetro), se estimularon los anillos arteriales con dosis incrementales de norepinefrina (0.001, 0.1 y 10 μM), lo que indujo una contracción de los anillos del 60.6 ± 2.2 % de la máxima contracción con ClK 80 mM. Tras un período de lavado, los anillos arteriales fueron pretratados con prazosín 1mM y

estimulados, de nuevo, con norepinefrina (10 μ M), lo que no afectó a la reactividad arterial (figura 23). Estos resultados confirman la implicación del receptor adrenérgico α_1 en la respuesta vasoconstrictora de la norepinefrina sobre las pequeñas arterias aisladas cutáneas.

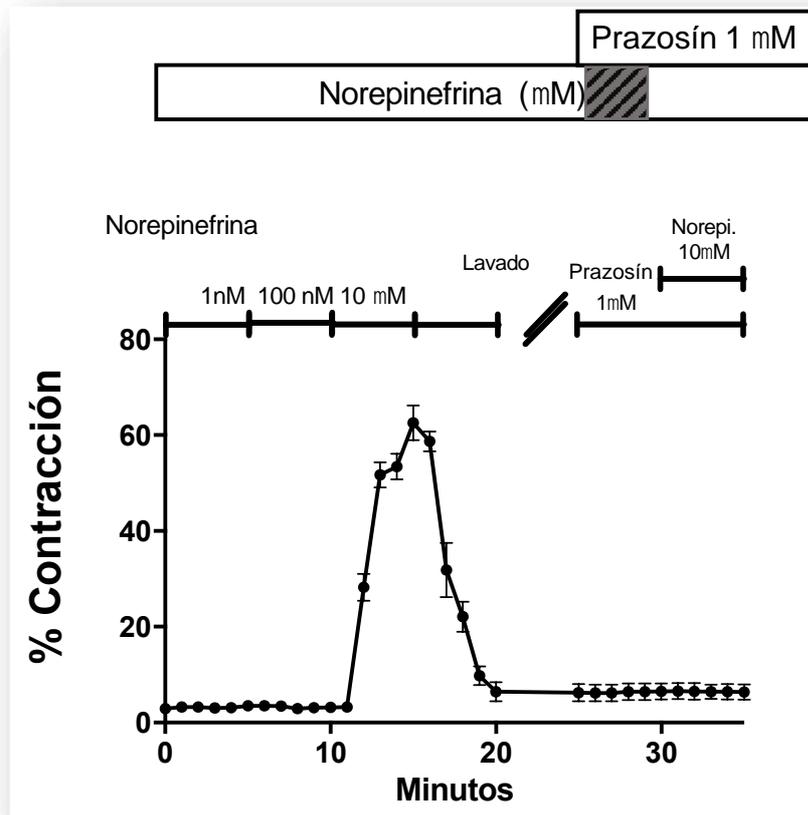


Figura 23. Efectos contráctiles de los agonistas adrenérgicos sobre los anillos de pequeñas arterias cutáneas (500-800 μ m). Curva dosis-respuesta del efecto contráctil de las arteriolas cutáneas debida a norepinefrina (1nM, 100 nM, 10mM). Lavado de las preparaciones y pretratamiento de las arteriolas con prazosín 1 mM, la adición de norepinefrina 10 mM (NE) al baño de órganos no produce efecto contráctil. Los datos se expresan como la media \pm sem (n=3).

En otro grupo de arteriolas y siguiendo el mismo protocolo, se estimularon los anillos con brimonidina (0.1, 1 y 10 μ M), lo que produjo una contracción arterial que alcanzó un 78.3% de la máxima contracción inducida por CIK (figura 24). Tras otro período de

lavado, se trataron los anillos con prazosín seguido de la adición de brimonidina (0.1, 1 y 10 μ M). Con la concentración de 10 μ M de brimonidina se consiguió una pequeña contracción. Esta contracción sería reflejo de la estimulación de los receptores adrenérgicos α_2 postsinápticos.

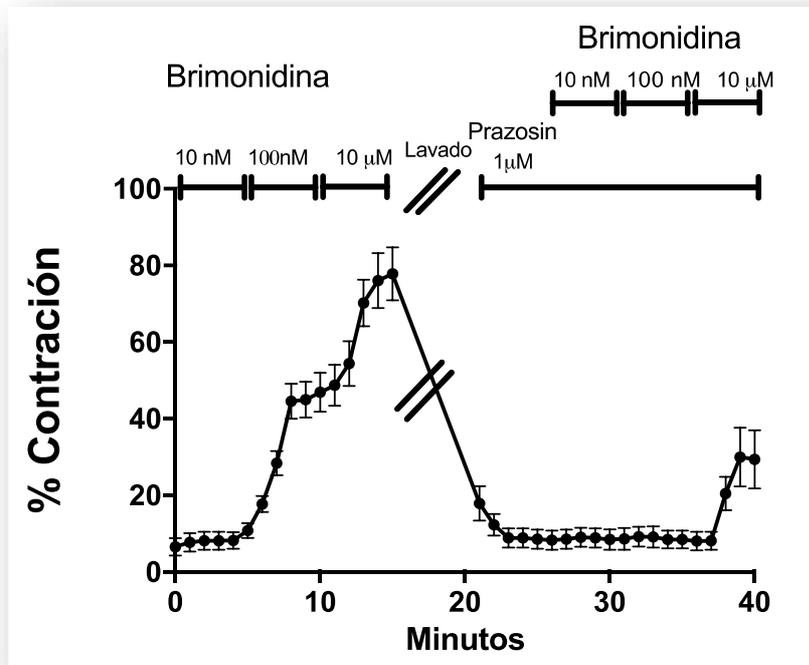


Figura 24. Efectos contráctiles de los agonistas adrenérgicos sobre los anillos de pequeñas arterias cutáneas (500-800 μ m). Curva dosis respuesta del efecto contráctil de las arteriolas cutáneas debida a brimonidina (10nM, 100nM, 10mM). Lavado de las preparaciones y pretratamiento de las arteriolas con prazosín 1 mM, la adición de brimonidina (10nM, 100nM, 10mM) al baño de órganos produce efecto contráctil a la dosis de 10mM. Los datos se expresan como la media \pm sem (n=3).

4.2.3. Experimentos en anillos de pequeñas arterias cutáneas (500-800 μ m) de tejido humano utilizando un microbaño de órganos con miógrafo precontraídas con cloruro potásico

Las arteriolas cutáneas (500-800 μ m) obtenidas de las muestras de piel fueron contraídas con cloruro potásico 80 mM, obteniéndose una meseta contráctil. En

presencia del cloruro potásico se adicionó al microbaño prazosín (1 μ M) solo o en combinación con un antagonista del receptor adrenérgico β no selectivo (bloqueante β_1 y β_2), como son el propranolol (1 μ M) o el timolol (1 μ M), como se muestra en la figura 25. Tras 5 minutos de perfusión con el antagonista α_1 (prazosín) o con la mezcla antagonista α_1 + antagonista $\beta_{1/2}$ (propranolol o timolol), se añadieron dosis crecientes de norepinefrina (0.001, 0.1 y 10 μ M).

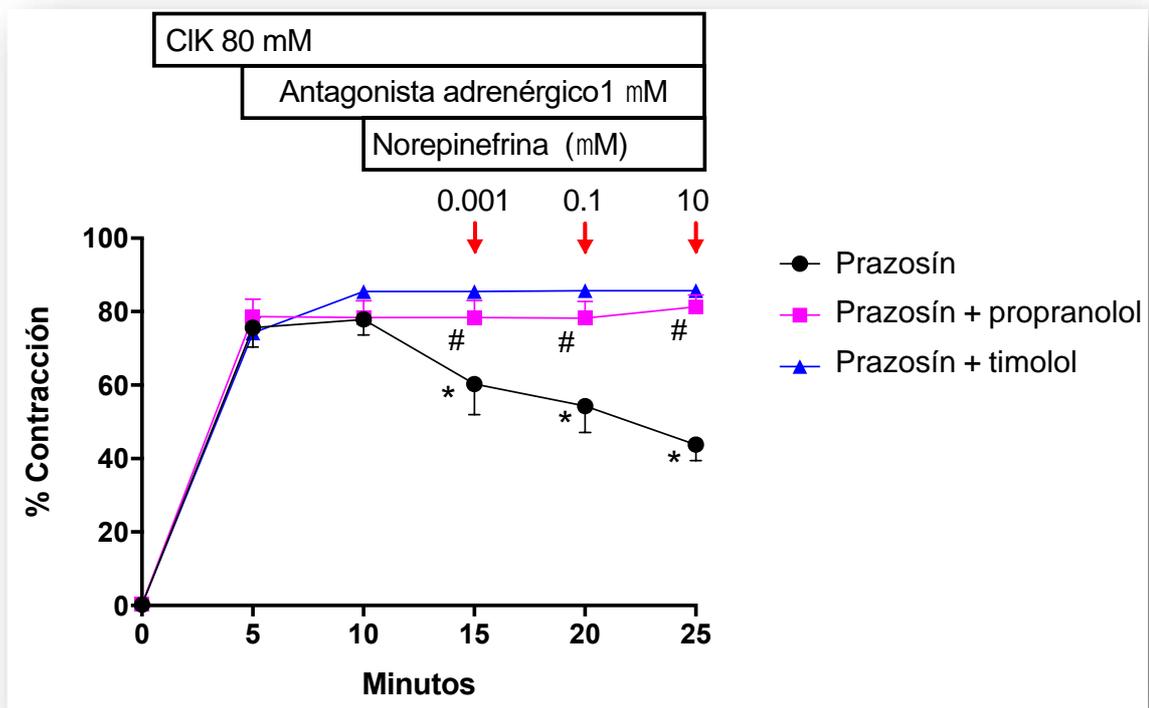


Figura 25. Efecto relajador de la norepinefrina sobre anillos de pequeñas arterias cutáneas (500-800 μ m) de tejido humano precontraídos con cloruro potásico 80 mM (ClK) en presencia de prazosín (1mM) y en presencia de prazosín (1mM) + propranolol (1mM) o en presencia de prazosín (1mM) + timolol (1mM). Los datos se expresan como la media \pm sem ($n=3$). * $p<0.05$ vs contracción a los 5 minutos de la misma arteria; # $p<0.05$ vs grupo tratado con prazosín.

Se han obtenido resultados similares a los descritos en los experimentos de perfusión de microarterias (<200 μ m) de cortes de tejido cutáneo humano precontraídas con

cloruro potásico, aunque los efectos vasodilatadores de la norepinefrina en presencia del prazosín fueron menores, llegando a un 45.83 ± 3.2 % de relajación, sugiriendo que los efectos vasodilatadores de la activación del receptor adrenérgico β_2 son superiores en las arteriolas cutáneas ($\sim 200 \mu\text{m}$).

4.2.4. Experimentos en anillos de pequeñas arterias cutáneas (500-800 μm) de tejido humano utilizando un microbaño de órganos con miógrafo precontraídas con cloruro potásico y relajadas con norepinefrina en presencia de prazosín como antagonista α_1 adrenérgico.

Los siguientes experimentos se diseñaron para analizar la eficacia de los antagonistas del receptor adrenérgico β no selectivos (propranolol o timolol), en la reversión de los efectos vasodilatadores de la norepinefrina en las arterias cutáneas pretratadas con prazosín.

Con este fin, a los anillos de pequeñas arterias cutáneas (500-800 μm) pretratadas con CLK se les adicionó prazosín (1 μM) durante 5 minutos, seguido de norepinefrina a dosis crecientes (0.001, 0.1 y 10 μM). Se han obtenido resultados similares a los descritos en los experimentos de perfusión de microarterias ($<200 \mu\text{m}$) de microcortes de tejido cutáneo humano precontraídas con cloruro potásico, así, la norepinefrina relajó la meseta inducida por CLK 80 mM, aunque los efectos vasodilatadores de la norepinefrina han sido menores. A continuación, se adicionaron los antagonistas del receptor adrenérgico β no selectivos; propranolol (1 μM) o timolol (1 μM), en presencia de prazosín, seguido de otra adición al microbaño de norepinefrina a concentraciones crecientes (0.001, 0.1 y 10 μM). La adición de propranolol o timolol fue incapaz de revertir la vasodilatación inducida por la norepinefrina en las arteriolas cutáneas (figura 26) pretatados con prazosín.

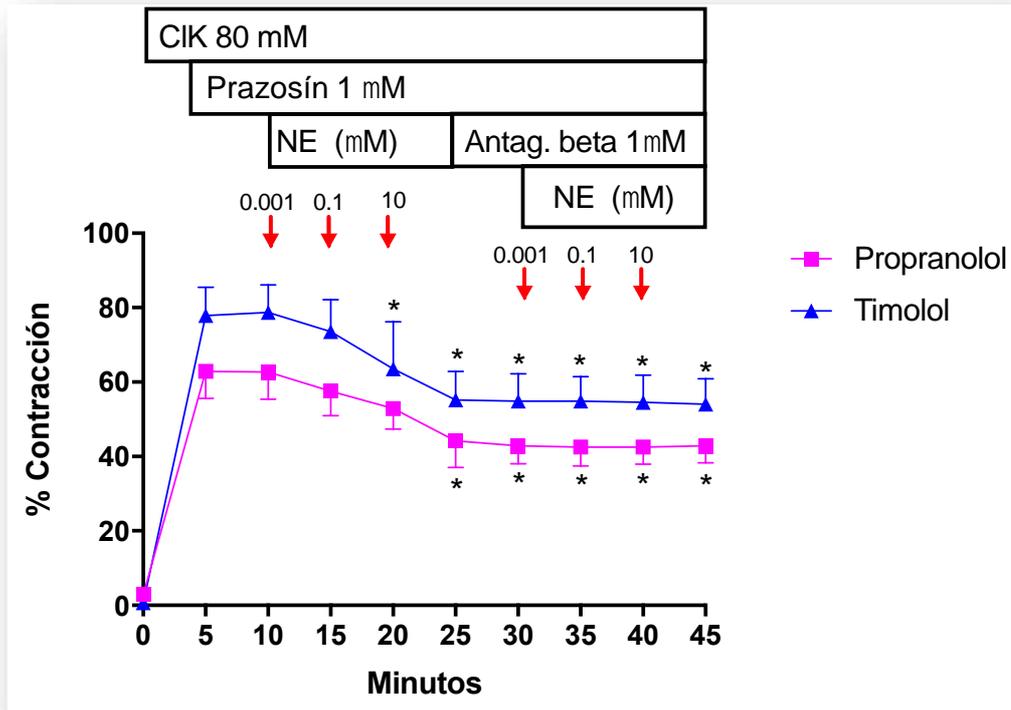


Figura 26. El tratamiento de los anillos de pequeñas arterias cutáneas (500-800 μm) de tejido humano precontraídas con cloruro potásico 80 mM (ClK) y pretratadas con prazosín, con antagonistas del receptor adrenérgico β no selectivos (propranolol o timolol), no revierten los efectos vasodilatadores de la norepinefrina. Los datos se expresan como la media ± sem (n=3). *p<0.05 vs contracción de la misma arteria.

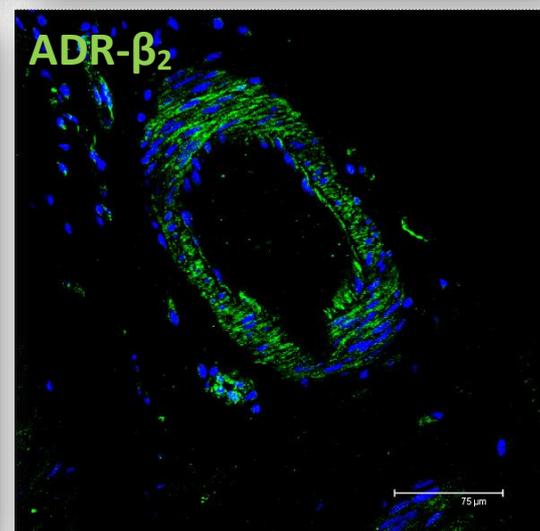
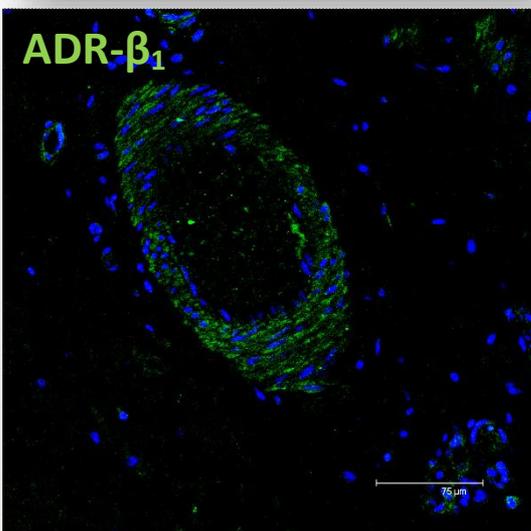
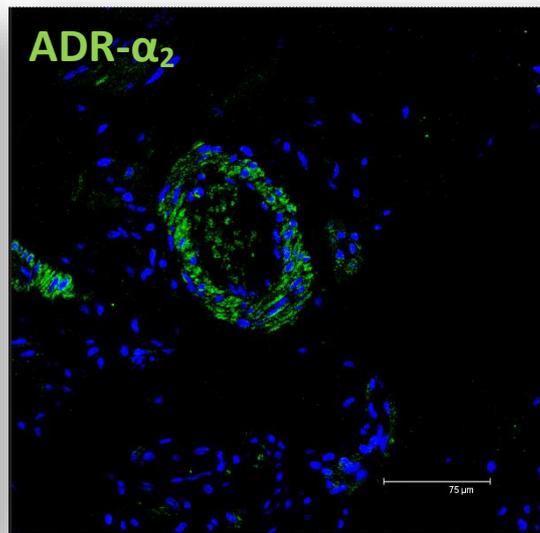
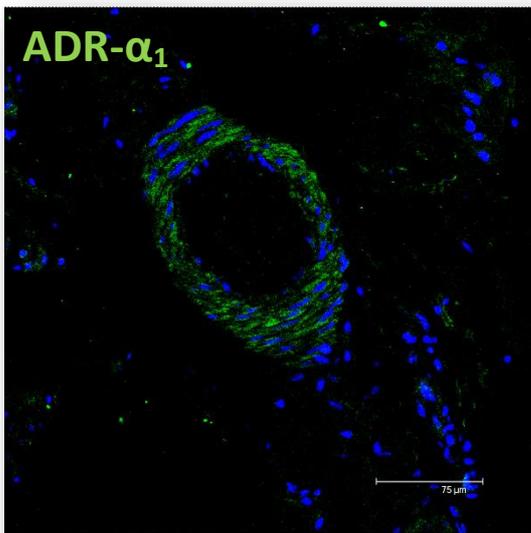
4.3. Análisis de la proporción de la expresión de receptores alfa y beta adrenérgicos en los vasos cutáneos humanos

4.3.1. Experimentos rodajas (<200 μm) de tejido cutáneo humano

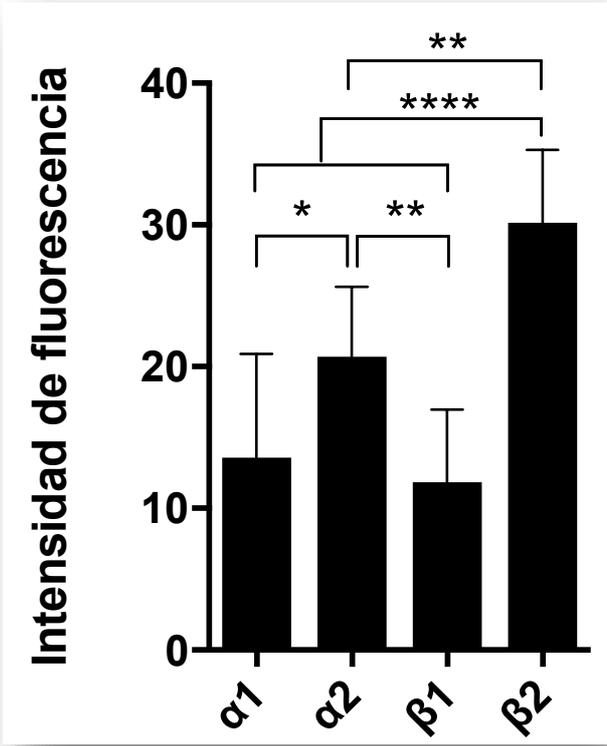
Para analizar la expresión de los receptores adrenérgicos en las microarterias cutáneas (<200 μm de diámetro), se realizaron una inmunofluorescencia confocal y una PCR en tiempo real (RT-PCR).

En la inmunofluorescencia confocal los ADRB2 mostraron la mayor expresión, seguida de los ADRA2, mientras que los ADRA1 y ADRB1 tenían una expresión débil (figura 27A). Para un análisis más profundo de la expresión de los receptores adrenérgicos, se utilizó un microscopio láser para los microcortes cutáneos para diseccionar cuidadosamente las microarterias (<200 μm) del tejido para la extracción del ARN. Los niveles de expresión del ARNm se reflejan por los resultados de la inmunofluorescencia. Los ADRB2 mostraban la mayor expresión, seguida de los ADRA2, mientras que los ADRA1 y ADRB1 mostraban una expresión muy débil (figura 27B). Se encontraron resultados similares en las microarterias cutáneas de prepucio de 6 pacientes.

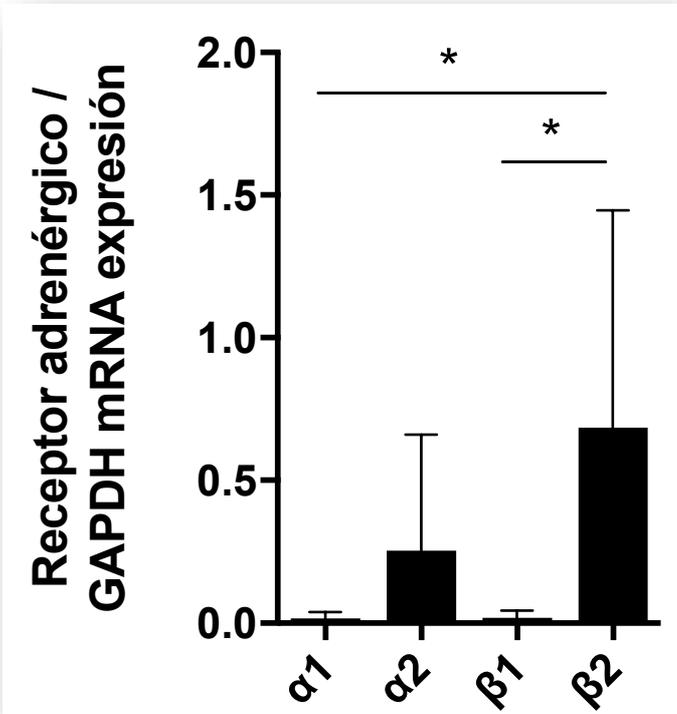
A



B



C



D

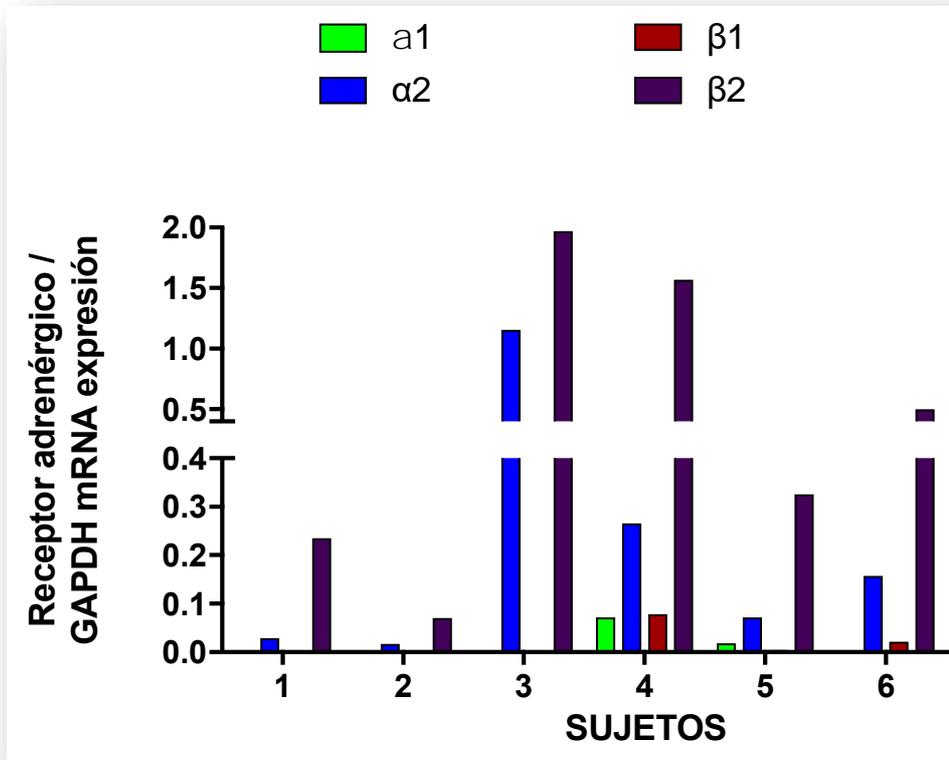
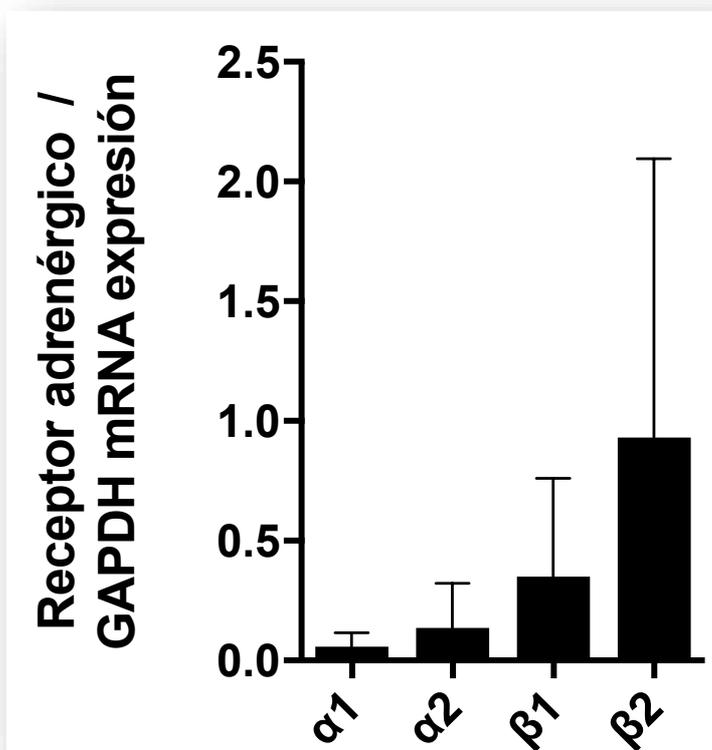


Figura 27. Expresión de los receptores adrenérgicos en las arteriolas (<200 μ m) cutáneas. A) La inmunotinción de los α_1 -, α_2 -, β_1 - y β_2 -adrenorreceptores se observó con el microscopio espectral confocal (Leica TCS SP2) y se cuantificó con ImageJ. Los receptores adrenérgicos se indican mediante la fluorescencia FITC (verde). Los núcleos celulares se marcan por DAPI, en azul. Barra de escala = 75 μ m. B) El histograma muestra la expresión de los diferentes adrenorreceptores. Los datos se expresan como la media \pm SEM (n=6 individuos). C) Expresión génica de los adrenorreceptores en los anillos arteriales (<200 μ m) fijados en parafina de las muestras de piel que habían sido aisladas utilizando la disección mediante el microscopio de láser. La expresión se analiza mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. La expresión del gen diana se representa como el aumento o la disminución de veces en relación con la expresión de GAPDH (como control endógeno). D) El histograma representa la expresión de ARNm a través de los diferentes receptores adrenérgicos para cada sujeto, expresados como la media \pm SEM. ****p<0.0001, ***p<0.001, **p<0.01 y *p <0.05.

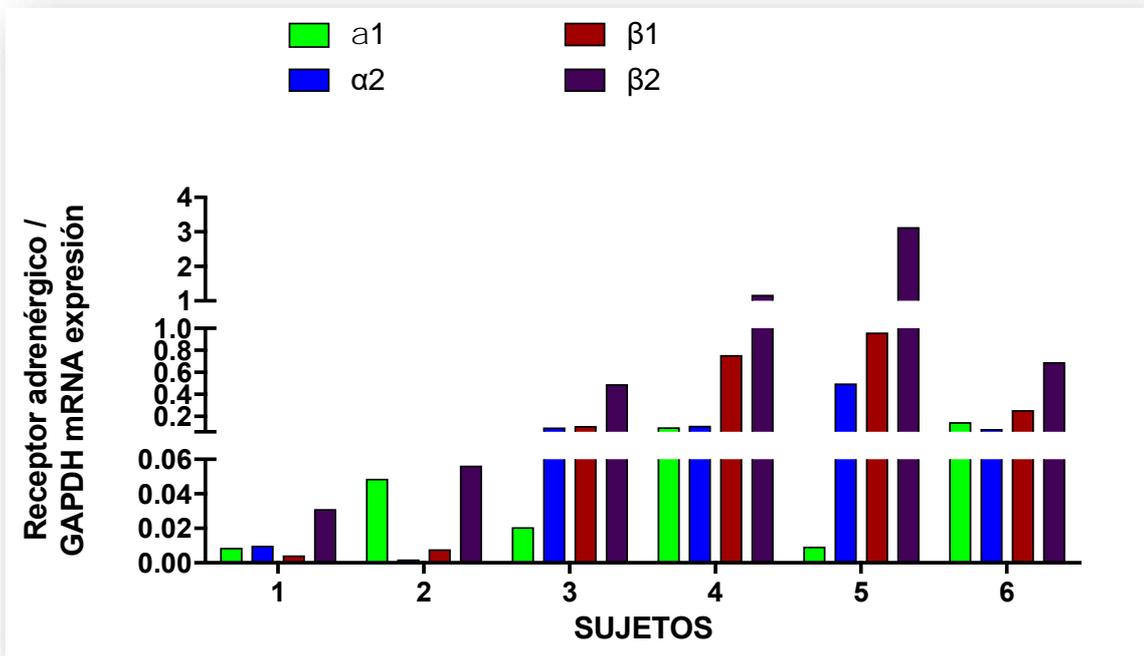
4.3.2. Experimentos en anillos de pequeñas arterias cutáneas (500-800 μm) de tejido humanos

El siguiente paso fue medir la expresión de los receptores adrenérgicos en las pequeñas arterias aisladas de prepucio con mayor diámetro interno (500-800 μm). De estas arterias se extrajo el ARNm total y las proteínas y se analizó la expresión de los receptores adrenérgicos mediante RT-PCR (figura 28A) y Western-blot (figura 28B). Aquí los ADRB2 mostraron los mayores niveles de expresión, seguido de los ADRB1, mientras que los ADRA2 y ADRA1 mostraban una expresión muy débil.

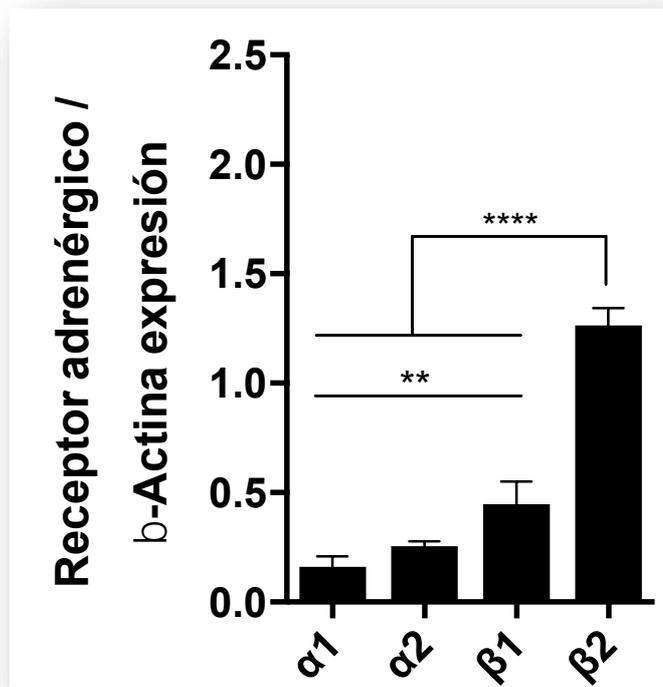
A



B



C



D



Figura 28. La expresión de los receptores adrenérgicos de las pequeñas arterias (500–800 μm) aisladas de prepucio. A) el histograma representa la expresión de ARN, para cada receptor adrenérgico como la media \pm EEM ($n=6$). B) El histograma representa la expresión de ARNm a través de los diferentes adrenerreceptores de cada sujeto, expresados como la media \pm EEM. C) Western-blots representativos de la expresión proteica de los receptores adrenérgicos en arteriolas aisladas de prepucio ($n=3$). D) Los datos de la densitometría se expresan como proporciones de los niveles proteicos de β -actina como control endógeno. **** $p<0.0001$, *** $p<0.001$, ** $p<0.01$ y * $p<0.05$.

5. DISCUSIÓN

El hecho de que las terminaciones de los nervios sensitivos faciales se hallen íntimamente relacionados con los vasos sanguíneos en los pacientes afectados de rosácea, sugiere un mecanismo neuroinflamatorio. La liberación de péptidos vasoactivos, la disminución de la regulación simpaticomimética y la vasodilatación de la microcirculación facial facilita la infiltración inflamatoria celular durante la rubefacción de la rosácea (Steinhoff, y otros, 2011) (Rosso Del, Gallo , Tanghetti, Webster G, & Thiboutot, 2013) (Yamasaki, y otros, 2007).

El tratamiento actual farmacológico de la rosácea incluye la brimonidina, como agonista del receptor adrenérgico α_2 postsináptico, y la oximetazolina, como agonista del receptor adrenérgico α_1 postsináptico, que promueven la vasoconstricción cutánea y disminuyen el eritema facial persistente de la rosácea. Sin embargo, otros agonistas del receptor adrenérgico α_2 presináptico como la clonidina o fármacos centrales hipotensoras como la rilmenidina no mejora el rubor facial comparado con el placebo (Grosshans, Michel , Arcade, & Cribier, 1997) (Wilkin J. K., 1983). Se ha demostrado que la brimonidina induce preferentemente vasoconstricción cutánea en arteriolas pequeñas (<200 μm) (Piwnica, y otros, 2014) y tiene propiedades antiinflamatorias cutáneas.

Los datos obtenidos en los estudios que hemos realizado son consistentes con otros realizados previamente (Piwnica, y otros, 2014). Así, estos autores encontraron que la activación del receptor adrenérgico α_2 postsináptico inducida por brimonidina y la contracción de la arteria eran más altas en las arteriolas de la piel con un diámetro interno de menos de 200 μm . Por el contrario, la contracción de la microcirculación vascular inducida por norepinefrina fue menor en los vasos menores de 200 μm que en los de diámetro comprendido entre 500-800 μm . Estos resultados se podrían explicar por la presencia de un papel predominante de los receptores adrenérgicos β_2 en las pequeñas microarterias (<200 μm), los cuales, al ser activados por la norepinefrina, provocan una vasodilatación. A este respecto, con el bloqueo de los receptores

adrenérgicos α_1 postsináptico, observamos que la vasodilatación inducida por norepinefrina (por estímulo de los receptores adrenérgicos β) fue mayor en los vasos menores de 200 μm (Figura 20) que en los vasos más grandes (Figura 25).

Por otro lado, los experimentos realizados con RT-PCR muestran que la expresión de receptores adrenérgicos β_2 fue predominante en las microarterias <200 μm comparado con otros adrenorreceptores, sugiriendo su papel fundamental de la vasodilatación cutánea. De hecho, en la rosácea, se cree que los bloqueantes de los receptores β reducen el eritema mediante el bloqueo de los receptores adrenérgicos β_2 en el músculo liso de los vasos sanguíneos cutáneos ocasionando una vasoconstricción (Hsu & Lee , 2012). Esta es la primera investigación directa que confirma esta teoría. Hasta la fecha no existen datos sobre el papel de los receptores adrenérgicos β_1 en la contractilidad arteriolar cutánea. Aunque no se ha investigado en esta tesis, los datos de la investigación en las arteriolas coronarias (<100 μm) indican que los antagonistas de receptores adrenérgicos β_2 , pero no de los receptores adrenérgicos β_1 , inhiben la vasodilatación arteriolar inducida por la norepinefrina (Sun, y otros, 2002). En consecuencia, la perfusión arteriolar cutánea con antagonistas receptores adrenérgicos $\beta_{1/2}$ como el propranolol o el timolol inhiben de manera efectiva el efecto vasodilatador de la norepinefrina en las arterias cutáneas con un bloqueo de la actividad de receptores adrenérgicos α_1 . Hallazgos similares se han descrito para vasos grandes de la piel de antebrazo en las que el propranolol inhibe la vasodilatación inducida por el isoproterenol (agonistas receptores adrenérgicos $\beta_{1/2}$) (Crandall , Etzel, & Johnson, 1997).

Los resultados que se han obtenido muestran nuevas evidencias de la expresión y el papel funcional vasodilatador de los receptores adrenérgicos β en los vasos cutáneos. Estos receptores tienen una expresión elevada en las microarterias menores de 200 μm de diámetro y que se inhiben de manera efectiva por los antagonistas β no selectivos (β_1/β_2). Estos resultados son de gran valor porque se pueden extrapolar al eritema facial de la rosácea puesto que se piensa que éste es el resultado de la vasodilatación de los microvasos cutáneos faciales que tienen un diámetro menor de 200 μm (Steinhoff, y

otros, 2011) (Rosina, Zamperetti , Giovannini , Chierigato , & Girolomoni, 2006) (Steinhoff , Schmelz, & Schaubert, 2016).

Mientras la activación de receptores adrenérgicos α_1 , receptores adrenérgicos α_2 postsinápticos y receptores adrenérgicos β_1 en la musculatura lisa de los vasos cutáneos induce la vasoconstricción, la activación de receptores adrenérgicos β_2 produce vasodilatación (Hodges, Kellogg, & Johnson, 2015). Por tanto, el balance de la expresión de los adrenerreceptores y la afinidad de la norepinefrina entre los diferentes adrenerreceptores, modula la reactividad de los vasos cutáneos. A este respecto, la norepinefrina ha demostrado mayor potencia sobre receptores adrenérgicos α_1 seguido de receptores adrenérgicos β_1 , con menor actividad sobre receptores adrenérgicos β_2 (seguido de la actividad de receptores adrenérgicos α_2) (Overgaard & Dzavík, 2008).

A bajas dosis (<2 $\mu\text{g}/\text{min}$), los efectos receptores adrenérgicos β_1 pueden ser más pronunciados, mientras que a dosis más altas que 3 $\mu\text{g}/\text{min}$, los efectos receptores adrenérgicos α_1 pueden ser predominantes. Sin embargo, los efectos de la norepinefrina dependen preferentemente del tipo y el tamaño del lecho vascular. Por ejemplo, la norepinefrina puede estimular los receptores β en el músculo cardíaco y aumentar el metabolismo, lo que conlleva una vasodilatación metabólica (Chilian, 1990). Además, la norepinefrina induce la vasoconstricción a través de los receptores vasculares receptores adrenérgicos $\alpha_{1/2}$, lo que se opone a la vasodilatación metabólica (Chilian, 1991).

Se ha demostrado que el número de receptores adrenérgicos α_1 aumenta con el calibre del vaso, mientras que el número de receptores adrenérgicos α_2 disminuye (Chilian, 1991), lo que podría explicar por qué la brimonidina ocasiona mayor vasoconstricción en las arteriolas cutáneas que en las pequeñas arterias cutáneas, como se ha visto en nuestro estudio. En un modelo de animal de investigación (perros), la infusión de norepinefrina provoca constricción *in vivo* en los vasos >100 μm de diámetro y dilatación en los vasos <100 μm (Sun, y otros, 2002).

La administración repetida de norepinefrina conduce a una taquifilaxia lo que podría explicar las respuestas reducidas a la posterior administración de NE en este estudio. Sin embargo, como se ve en la figura 23, las arterias fueron lavadas el tiempo suficiente para eliminar cualquier resto de norepinefrina. Considerando la corta vida media de la norepinefrina, es poco probable que el pretratamiento con norepinefrina reduzca la sensibilidad del receptor de la misma.

Los estudios que hemos realizado son los primeros que aportan datos sobre los efectos directos de la norepinefrina sobre las arteriolas de la piel humana y la contribución de los subtipos de receptores adrenérgicos de la misma. En nuestros experimentos, las microarterias <200 μm han demostrado menor expresión de receptores adrenérgicos α_1 y receptores adrenérgicos β_1 , seguido por receptores adrenérgicos α_2 y con una mayor expresión de receptores adrenérgicos β_2 . Además, el efecto de la norepinefrina en la vasoconstricción inducida mediante receptores adrenérgicos α_2 fue bajo ya que la norepinefrina no aumentó la vasoconstricción en presencia de prazosín (antagonista receptor adrenérgico α_1) o propranolol (antagonista de los receptores adrenérgicos $\beta_{1/2}$). Aunque la brimonidina y el prazosín han mostrado selectividad para receptores adrenérgicos α_2 y receptores adrenérgicos α_1 respectivamente, se sabe que el prazosín tiene algún grado de afinidad por receptores adrenérgicos α_2 (Bylund & Chacko , 1999) (Jarajapu , Coats, McGrath , Hillier, & MacDonald , 2001) y que la brimonidina puede activar en menor medida receptores adrenérgicos α_1 (Burke & Schwartz, 1996) (Piwnica, y otros, 2014). De hecho, en los experimentos que hemos realizado, la constricción inducida por la brimonidina en la microcirculación (<200 μm) fue menor en los vasos cutáneos pretratados con prazosín y casi ausente en los vasos de mayor tamaño (500-800 μm) donde la expresión de receptores adrenérgicos α_2 era menor que en los microvasos menores de 200 μm . Estos resultados indican que los receptores adrenérgicos α_1 tienen un papel predominante en la vasoconstricción cutánea comparada con los receptores adrenérgicos α_2 .

Los antagonistas de los receptores adrenérgicos β tienen un papel principal en los desórdenes vasculares cutáneos como en el hemangioma infantil cutáneo y la rosácea entre otros (Chen & Tsai, 2018). Los antagonistas de los receptores adrenérgicos β no

selectivos incluyendo el propranolol, carvedilol y nivolol, han sido usados como medicamentos fuera de ficha técnica para la rosácea eritematotelangiectásica y han demostrado que disminuyen el rubor asociado a la rosácea (Craigie & Cohen, 2005) (Spondlin, Voegel, Jick, & Meier, 2014) (Logger, Olydam, & Driessen, 2020). En el hemangioma infantil, la indicación para utilizar los antagonistas β está basada en la inhibición de la angiogénesis/vasculogénesis a través de la regulación a la baja de factores angiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular y el factor de crecimiento de fibroblastos básico, así como también la inducción de la apoptosis celular endotelial capilar (Storch & Hoeger, 2010). Por el contrario, en la rosácea, el rubor disminuye a través de la inhibición de la vasodilatación inducida por los antagonistas β desencadenada por la estimulación nerviosa simpática y las catecolaminas endógenas circulantes que se unen a los ADR (Chen & Tsai, 2018). Sin embargo, no todos los pacientes responden al tratamiento con antagonistas β , lo que indicaría que existen complejas vías moleculares implicadas en la rosácea que se extienden más allá de la actividad vascular que incluye, sin limitarse a ello, la neuroinflamación local. Por ello, se requieren más evidencias clínicas para validar la eficacia clínica de los antagonistas β .

Basados en los datos que se han obtenido en esta tesis y en otros estudios (Logger, Olydam, & Driessen, 2020), el uso de los antagonistas β en el tratamiento de la rosácea podría ser una alternativa al uso de los agonistas α debido a la expresión predominante de los receptores β_2 en las arteriolas cutáneas y su inhibición sobre vasodilatación de las mismas. Además de su efector vascular, el propranolol tiene efectos antiinflamatorios y antioxidantes (Mak & Weglicki, 2004), con ambos procesos implicados en el desarrollo de la rosácea (Gerber, Buhren, Steinhoff, & Homey, 2011) (Bakar, Demirçay, Yuksel, Haklar, & Sanisoglu, 2007). En la mayoría de los estudios se recoge que, con el uso de betabloqueantes orales en pacientes con una larga historia de tratamientos ineficaces tópicos, orales y/o físicos se produce una mejoría del eritema y disminuyen el rubor (Logger, Olydam, & Driessen, 2020). Desafortunadamente, estos estudios clínicos son cortos, por lo que serían necesarios ensayos clínicos prospectivos con un volumen suficiente de sujetos sobre el uso de betabloqueantes a este respecto.

Una limitación de esta tesis es que la afectación cutánea de la rosácea es facial y los tejidos que se han utilizado provienen del área genital. Los componentes vasculares y las propiedades del prepucio pueden variar con respecto a los de la facies. Estas diferencias podrían reflejarse en distribuciones desiguales de la expresión de receptores adrenérgicos o sensibilidades a la norepinefrina, ya que clínicamente, el prepucio presenta un pequeño enrojecimiento en comparación con la piel del rostro.

En resumen, en este estudio se evidencia la expresión predominante de receptores adrenérgicos β_2 en las microarterias cutáneas (<200 μm), así como el papel vasodilatador funcional de los receptores adrenérgicos β_2 , que puede ser inhibido por antagonistas de los receptores adrenérgicos β_2 . Estos resultados proporcionan una justificación para bloquear los receptores adrenérgicos β_2 como tratamiento para la rosácea.

6. CONCLUSIONES

Las conclusiones a las que podemos llegar una vez analizados los datos que hemos obtenido como resultado de la investigación y que pueden resultar prometedoras para el tratamiento de la rosácea son las siguientes:

- Las microarterias <200 μm tienen una menor expresión de receptores adrenérgicos α_1 y receptores adrenérgicos β_1 , seguido por receptores adrenérgicos α_2 y con una mayor expresión de receptores adrenérgicos β_2 .
- La activación de receptores adrenérgicos α_2 inducida por la brimonidina en las microarterias menores de 200 μm es mayor que en los vasos entre 500-800 μm .
- La contracción de la microcirculación vascular inducida por norepinefrina es menor en los vasos menores de 200 μm que en los de diámetro comprendido entre 500-800 μm .
- Con el bloqueo de los agonistas de los receptores adrenérgicos α_1 , la vasodilatación inducida por norepinefrina -como agonista de los receptores adrenérgicos β_2 - es mayor en los vasos menores de 200 μm .
- Los antagonistas de los receptores adrenérgicos β_2 como propranolol o timolol inhiben el efecto vasodilatador de la norepinefrina en los vasos cutáneos cuando se bloquean los receptores adrenérgicos α_1 .

Por tanto, como conclusión final, la expresión de los receptores adrenérgicos β_2 es predominante en las microarterias $<200 \mu\text{m}$ comparado con otros adrenorreceptores, teniendo un papel fundamental en la vasodilatación cutánea. Estos resultados pueden tener un valor potencial traslacional para proveer un bloqueo racional de los receptores adrenérgicos β_2 en el tratamiento de la rosácea.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Alexis, A. F., Callender, V. D., Baldwin, H. E., Desai, S. R., Rendon, M. I., & Taylor, S. C. (2019). Global epidemiology and clinical spectrum of rosacea, highlighting skin of color: Review and clinical practice experience. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 80(6), 1722-1729.
- Almebayadh, M. (2020, Jun). Successful treatment of ulcerated infantile hemangioma with brimonidine-timolol cream: 2 cases report and review of the literature. *Journal of Dermatological Treatment*, 31(4), 433-434.
- Arribas, S., Marín, J., Ponte, A., Balfagón, G., & Salaices, M. (1994, Aug). Norepinephrine-induced relaxations in rat aorta mediated by endothelial beta adrenoceptors. Impairment by ageing and hypertension. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 270(2), 520-527.
- Bakar, O., Demirçay, Z., Yuksel, M., Haklar, G., & Sanisoglu, Y. (2007, March). The effect of azithromycin on reactive oxygen species in rosacea. *Clinical and Experimental Dermatology*, 32(2), 197-200.
- Borelli, C., Becker, B., Thude, S., Fehrenbacher, B., & Isermann, D. (2017, Dec). Dermasence refining gel modulates pathogenetic factors of rosacea in vitro. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 16(4), 31-36.
- Brauchle, M., Funk, J. O., Kind, P., & Werner, S. (1996, Sept). Ultraviolet B and H₂O₂ are potent inducers of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 271(36).
- Buddenkotte, J., & Steinhoff, M. (2018, Dec). Recent advances in understanding and managing rosacea. *F1000Research*, 3(7).
- Burke, J., & Schwartz, M. (1996, Nov). Preclinical evaluation of brimonidine. *Survey of Ophthalmology*, 41(1 Suppl), 9-18.
- Bylund, D. B., & Chacko, D. M. (1999, Sept). Characterization of alpha₂ adrenergic receptor subtypes in human ocular tissue homogenates. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 40(10), 2299-2306.
- Chen, L., & Tsai, T. F. (2018, Mar). The role of β -blockers in dermatological treatment: a review. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 32(3), 363-371.
- Chilian, W. M. (1990). Adrenergic vasomotion in the coronary microcirculation. *Basic Research in Cardiology*, 85(Suppl 1), 111-120.
- Chilian, W. M. (1991, Nov). Functional distribution of alpha 1- and alpha 2-adrenergic receptors in the coronary microcirculation. *Circulation*, 84(5), 2108-2122.
- Christensen, C. E., Andersen, F. S., Wienholtz, N., Egeberg, A., Thyssen, J. P., & Ashina, M. (2018, Jun). The relationship between migraine and rosacea: Systematic review and meta-analysis. *Cephalalgia*, 38(7), 1387-1398.
- Chu, D. (2009). Capítulo 3. Generalidades de la biología, el desarrollo y la estructura de la piel. In T. Fitzpatrick, *Dermatología en Medicina General*. (Vol. I). Madrid: Panamericana.

- Craige, H., & Cohen, J. B. (2005, Nov). Symptomatic treatment of idiopathic and rosacea-associated cutaneous flushing with propranolol. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 53(5), 881-883.
- Crandall, C. G., Etzel, R. A., & Johnson, J. M. (1997, Aug). Evidence of functional beta-adrenoceptors in the cutaneous vasculature. *American Journal of Physiology*, 273(2 Pt 2), 1038-1043.
- Cribier, B. (2011, Nov). Pathophysiology of rosacea: redness, telangiectasia, and rosacea. *Annales de Dermatologie et de Vénéréologie*, 138(Suppl 3), 184-191.
- Draelos, Z. D., Gold, M. H., Weiss, R. A., Baumann, L., Grekin, S., Robinson, D. M., . . . Berk, D. (2018, Jun). Efficacy and safety of oxymetazoline cream 1.0% for treatment of persistent facial erythema associated with rosacea: Findings from the 52-week open label REVEAL trial. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 78(6), 1156-1163.
- ER services. (2020). Retrieved Jan 2021, from Lumen Learning:
<https://courses.lumenlearning.com/suny-ap2/chapter/structure-and-function-of-blood-vessels/>
- ER services. (2020). Retrieved Jan 2021, from Lumen Learning:
<https://courses.lumenlearning.com/suny-ap2/chapter/anatomy-of-the-lymphatic-and-immune-systems/>
- Fitzpatrick. (2009). In Fitzpatrick, *Dermatología en Medicina General* (p. 1587). Madrid: Panamericana.
- Floras, J. S., Aylward, P. E., Victor, R. G., Mark, A. L., & Abboud, F. M. (1988, Apr). Epinephrine facilitates neurogenic vasoconstriction in humans. *The Journal of Clinical Investigation*, 81(4), 1265-1274.
- Frankl, O. L. (1992, Oct). Epinephrine and the genesis of hypertension. *Hypertension*, 20(4), 583.
- Gerber, P. A., Bühren, B. A., Steinhoff, M., & Homey, B. (2011, Dec 15). The cytokine and chemokine network. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 1, 40-47.
- Gomaa, A. H., Yaar, M., Eyada, M. M., & Bhawan, J. (2007, Oct). Lymphangiogenesis and angiogenesis in non-phymatous rosacea. *Journal of Cutaneous Pathology*, 34(10), 748-753.
- Grosshans, E., Michel, C., Arcade, B., & Cribier, B. (1997). Rilmenidine in rosacea: a double-blind study versus placebo. *Annales de Dermatologie et de Vénéréologie*, 124(10), 687-691.
- Hieble, J. (2007). Subclassification and nomenclature of alpha- and beta-adrenoceptors. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 7(2), 129-134.
- Hjemdahl, P., Belfrage, E., & Daleskog, M. (1979, Nov). Vascular and metabolic effects of circulating epinephrine and norepinephrine. Concentration-effect study in dogs. *Journal of Clinical Investigation*, 64(5), 1221-1228.
- Hodges, G. J., & Johnson, J. M. (2009, Oct). Adrenergic control of the human cutaneous circulation. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*, 34(5), 829-839.
- Hodges, G. J., & Johnson, J. M. (2009, Oct). Adrenergic control of the human cutaneous circulation. *Applied physiology, nutrition, and metabolism*, 34(5), 829-839.

- Hodges, G., Kellogg, D., & Johnson, J. (2015, Apr). Effect of skin temperature on cutaneous vasodilator response to the β -adrenergic agonist isoproterenol. *Journal of Applied Physiology*, *118*(7), 898-903.
- Hrometz, S. L., Edelmann, S. E., McCune, D. F., Olges, J. R., Hadley, R. W., Perez, D. M., & Piascik, M. T. (1999, Jul). Expression of multiple alpha1-adrenoceptors on vascular smooth muscle: correlation with the regulation of contraction. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *290*(1), 452-463.
- Hsu, C. C., & Lee, J. Y. (2012, Sep). Pronounced facial flushing and persistent erythema of rosacea effectively treated by carvedilol, a nonselective β -adrenergic blocker. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *67*(3), 491-493.
- Huggenberger, R., & Detmar, M. (2011, Dec). The cutaneous vascular system in chronic skin inflammation. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, *15*(1), 24-32.
- Jackson, J. L., Kuriyama, A., Kuwatsuka, Y., Nickoloff, S., Storch, D., Jackson, W., . . . Hayashino, Y. (2019, Mar). Beta-blockers for the prevention of headache in adults, a systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE*, *14*(3).
- Jarajapu, Y. P., Coats, P., McGrath, J. C., Hillier, C., & MacDonald, A. (2001). Functional characterization of alpha(1)-adrenoceptor subtypes in human skeletal muscle resistance arteries. *British Journal of Pharmacology*, *133*(5), 679-686.
- Johnson, J. M., & Kellogg, D. L. (2010, Oct). Local thermal control of the human cutaneous circulation. *Journal of Applied Physiology*, *109*(4), 1229-1238.
- Johnson, J. M., & Proppe, D. W. (2011). *Cardiovascular Adjustments to Heat Stress*. In *Comprehensive Physiology*. R. Terjung.
- Kellogg, D. L., Johnson, J. M., & Kosiba, W. A. (1989, Nov). Selective abolition of adrenergic vasoconstrictor responses in skin by local iontophoresis of bretylium. *American Journal of Physiology*, *257*(5 Pt 2), 1599-1606.
- Kellogg, D. L., Pérgola, J. P., Piest, K. L., Kosiba, W. A., Crandall, C. G., Grossmann, M., & Johnson, J. M. (1995, Dec). Cutaneous active vasodilation in humans is mediated by cholinergic nerve cotransmission. *Circulation Research*, *77*(6), 1222-1228.
- Kulkarni, N. N., Takahashi, T., Sanford, J. A., Tong, Y., Gombart, A. F., Hinds, B., . . . Gallo, R. L. (2020, Mar). Innate Immune Dysfunction in Rosacea Promotes Photosensitivity and Vascular Adhesion Molecule Expression. *Journal of Investigative Dermatology*, *140*(3), 645-655.
- Li, Y., Xie, H., Deng, Z., Wang, B., Tang, Y., Zhao, Z., . . . Li, J. (2019, Feb). Tranexamic acid ameliorates rosacea symptoms through regulating immune response and angiogenesis. *International Immunopharmacology*, *67*, 326-334.
- Logger, J. G., Olydam, J. I., & Driessen, R. J. (2020, Oct). Use of beta-blockers for rosacea-associated facial erythema and flushing: A systematic review and update on proposed mode of action. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *83*(4), 1088-1097.
- Mak, I. T., & Weglicki, W. B. (2004, Jan). Potent antioxidant properties of 4-hydroxypropranolol. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *301*(85), 85-90.
- Martín-Lacave, I. (2017). *Atlas de Histología humana*. Madrid: Díaz de Santos.

- Milara, J., Ballester, B., Morell, A., Ortiz, J. L., Escrivá, J., Fernández, E., . . . Pas. (2018, Jun). JAK2 mediates lung fibrosis, pulmonary vascular remodelling and hypertension in idiopathic pulmonary fibrosis: an experimental study. *Thorax*, 73(6), 519-529.
- Molinoff, P. B. (1984). α - and β -Adrenergic Receptor Subtypes: Properties, Distribution and Regulation. *Drugs*, 29(Suppl 2), 1-15.
- Netter, F. H. (2001). *Atlas de Anatomía Humana*. Barcelona: Masson.
- Okwundu, N., Cline, A., & Feldman, S. R. (2019, Aug). Difference in vasoconstrictors: oxymetazoline vs. brimonidine. *Journal of Dermatological Treatment*, 12, 1-7.
- Ortiz, J. L., Milara, J., Juan, G., Montesinos, J. L., Mata, M., Ramón, M., . . . Cortijo, J. (2010, Jun). Direct effect of cigarette smoke on human pulmonary artery tension. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 23(3), 222-228.
- Overgaard, C. B., & Dzavík, V. (2008, Sep). Inotropes and vasopressors: review of physiology and clinical use in cardiovascular disease. *Circulation*, 118(10), 1047-1056.
- Piwnica, D., Rosignoli, C., de Ménonville, S. T., Álvarez, T., Schuppli Nollet, M., Roye, O., . . . Aubert, J. (2014, Jul). Vasoconstriction and anti-inflammatory properties of the selective α -adrenergic receptor agonist brimonidine. *Journal of Dermatological Science*, 75(1), 49-54.
- Pollard, S., Edwin, S. B., & Alaniz, C. (2015, Jul). Vasopressor and Inotropic Management Of Patients With Septic Shock. 40(7), 438-450.
- Pons, L. (2004, Mar). Red vascular dérmica. Implicaciones estéticas. *Offarm*, 23(3), 155-156.
- Powell, F. C. (2004). The histopathology of rosacea: 'where's the beef?'. *Dermatology*, 209(3), 173-174.
- Ramos, B. P., & Arnsten, A. F. (2007, Mar). Adrenergic pharmacology and cognition: focus on the prefrontal cortex. *Pharmacology & Therapeutics*, 113(3), 523-536.
- Rosina, P., Zamperetti, M. R., Giovannini, A., Chierigato, C., & Girolomoni, G. (2006, Gen). Videocapillaroscopic alterations in erythematotelangiectatic rosacea. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 54(1), 100-104.
- Rosso Del, J. Q. (2012, Mar). Advances in understanding and managing rosacea: part 1: connecting the dots between pathophysiological mechanisms and common clinical features of rosacea with emphasis on vascular changes and facial erythema. *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*, 5(3), 16-25.
- Rosso Del, J. Q. (2013, Dec). Management of facial erythema of rosacea: what is the role of topical α -adrenergic receptor agonist therapy? Del Rosso JQ. Management of facial erythema of rosacea: what is the role of topical α -adrenergic receptor agonist therapy? *J Am Acad*, 69(6 Suppl 1), 44-56.
- Rosso Del, J. Q., Baldwin, H., Webster, G., & American Acne & Rosacea Society. (2008, Jun 7). American Acne & Rosacea Society rosacea medical management guidelines. *Journal of Drugs in Dermatology*, 6, 531-533.
- Rosso Del, J. Q., Gallo, R. L., Tanghetti, E., Webster G, & Thiboutot, D. (2013, Mar). An evaluation of potential correlations between pathophysiologic mechanisms, clinical manifestations, and management of rosacea. *Cutis*, 91(3 Suppl), 1-8.
- Schwab, V. D., Sulk, M., Seeliger, S., Nowak, P., Aubert, J., Mess, C., . . . Metz. (2011). Neurovascular and neuroimmune aspects in the pathophysiology of rosacea. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 15(1), 53-62.

- Sgouros , D., Apalla, Z., Ioannides , D., Katoulis , A., Rigopoulos , D., Sotiriou , E., . . . Lallas, A. (2018, Oct). Dermoscopy of Common Inflammatory Disorders. *Dermatologic Clinics*, 36(4), 359-368.
- Shanler , S. D., & Ondo, A. L. (2007, Nov). Successful treatment of the erythema and flushing of rosacea using a topically applied selective alpha1-adrenergic receptor agonist, oxymetazoline. *Archives of Dermatological Research*, 143(11), 1369-1371.
- Spoendlin, J., Voegel, J. J., Jick , S. S., & Meier, C. R. (2014, Jul). Antihypertensive drugs and the risk of incident rosacea. *British Journal of Dermatology*, 171(1), 130-136.
- Steinhoff , M., Schmelz, M., & Schaubert, J. (2016, Jun). Facial Erythema of Rosacea - Aetiology, Different Pathophysiologies and Treatment Options. *Acta Dermato Venereologica*, 96(5), 579-586.
- Steinhoff, M., Buddenkotte, J., Aubert, J., Sulk, M., Novak, P., Schwab, V., . . . Voegel, J. (2011, Dec). Clinical, cellular, and molecular aspects in the pathophysiology of rosacea. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 15(1), 2-11.
- Steinhoff, M., Buddenkotte, J., Aubert, J., Sulk, M., Novak, P., Schwan, V. D., . . . Cevikbas, F. (2011, Dec). Clinical, cellular, and molecular aspects in the pathophysiology of rosacea. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 15(1), 2-11.
- Stephens, D., Aoki, K., Kosiba, W., & Johnson, J. (2001, Apr). Nonnoradrenergic mechanism of reflex cutaneous vasoconstriction in men. *The American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 280(4), 496-504.
- Stephens, D., Bennett, L., Aoki, K., Kosiba, W., Charkoudian, N., & Johnson, J. (2002, Jan). Sympathetic nonnoradrenergic cutaneous vasoconstriction in women is associated with reproductive hormone status. *The American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 282(1), 264-272.
- Stephens, D., Saad, A., Bennett, L., Kosiba, W., & Johnson, J. (2004, Sep). Neuropeptide Y antagonism reduces reflex cutaneous vasoconstriction in humans. *The American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 287(3), 1404-1409.
- Storch, C. H., & Hoeger, P. H. (2010, Aug). Propranolol for infantile haemangiomas: insights into the molecular mechanisms of action. *British Journal of Dermatology*, 163(2), 269-274.
- Sun, D., Huang, A., Mital, S., Kichuk, M. R., Marboe, C. C., Addonizio, L. J., . . . Kaley, G. (2002, Jul). Norepinephrine elicits beta2-receptor-mediated dilation of isolated human coronary arterioles. *Circulation*, 106(5), 550-555.
- Tan, J., Blume-Peytavi, U., Ortonne, J. P., Wilhelm, K., Marticou, L., Baltas, E., . . . Martel, P. (2013, Sep). An observational cross-sectional survey of rosacea: clinical associations and progression between subtypes. *British Journal of Dermatology*, 169(3), 555-562.
- Velasco , P., & Lange-Asschenfeldt, B. (2002, Nov). Dermatological aspects of angiogenesis. *British Journal of Dermatology*, 147(5), 841-852.
- Wilkin, J. K. (1983). Effect of Subdepressor Clonidine on Flushing Reactions in Rosacea: Change in Malar Thermal Circulation Index During Provoked Flushing Reactions. *Archives of Dermatology*, 119(3), 211-214.

- Wilkin, J., Dahl, M., Detmar, M., Drake, L., Liang, M. H., Odom, R., & Powell, F. (2004, Jun). Standard grading system for rosacea: Report of the National Rosacea Society Expert Committee on the Classification and Staging of Rosacea. *J. Am. Acad. Dermatol.*, *50*(6), 907-912.
- Yamasaki, K., Di Nardo, A., Bardan, A., Murakami, M., Ohtake, T., Coda, A., . . . Hov. (2007, Aug). Increased serine protease activity and cathelicidin promotes skin inflammation in rosacea. *Nature Medicine*, *13*(8), 975-980.
- Yuan, X., Li, J., Li, Y., Deng, Z., Zhou, L., Long, J., . . . Xie, H. (2019, Sept). Artemisinin, a potential option to inhibit inflammation and angiogenesis in rosacea. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *117*.

8. LISTA DE ABREVIATURAS

A: adrenalina

Ach: acetilcolina

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

ARN: ácido ribonucleico

ADRA: receptor alfa adrenérgico

ADRB: receptor beta adrenérgico

AlfaTNF: factor de necrosis tumoral alfa (Tumour Necrosis Factor)

ARN: ácido ribonucleico

BSA: albúmina sérica bovina

CEA: evaluación clínica de eritema (Clinician Erythema Assesment)

ClK: cloruro potásico

CO₂: dióxido de carbono

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DMSO: dimetil sulfóxido

EDTA: ácido etilendiaminatetraacético

EVE: escala visual de eritema

FBS: suero bovino fetal

GADPH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

HEPES: Ácido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazinetanosulfónico

ICAM: molécula de adhesión intercelular (Intercellular Adhesion Molecule)

IL: interleuquina

M: molar

NA: noradrenalina

NRS: National Rosacea Society

PAR: receptor activado por proteasa (protease activated receptor)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

SEM: error estándar de la media

TBST: Solución salina tamponada con Tris con detergente Tween[®] 20 al 0,1%

TLR: receptor tipo Toll (Toll Like Receptor)

TRPA: canal catiónico del potencial receptor transitorio (Transient Receptor Potential Cation Channel)

TRPV: receptor de potencial transitorio (Transient Receptor Potential Cation Channel)

UV: ultravioleta

UVA/B: ultravioleta A/B

VCAM: molécula de adhesión celular vascular (Vascular Cell Adhesion Molecule)

VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial (Vascular Endothelial Growth Factor)

9. LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

ÍNDICE IMÁGENES

FIGURA 1. ESTRUCTURA SECCIONAL DE LA PIEL.	17
FIGURA 2. CORTE LONGITUDINAL DE PIEL HUMANA.....	18
FIGURA 3. IMAGEN DERMATOLOGÍA GENERAL..	21
FIGURA 4. CORTE TRANSVERSAL DE UNA ARTERIA HUMANA.	22
FIGURA 5. ESQUEMA DE LOS DIFERENTES TIPOS DE ARTERIAS CON LAS DIFERENTES CAPAS QUE LAS COMPONEN.	23
FIGURA 6. ESQUEMA REPRESENTATIVO DE LA CIRCULACIÓN LINFÁTICA.	24
FIGURA 7. ESQUEMA SOBRE LA REGULACIÓN DE LA CIRCULACIÓN.	25
FIGURA 8. EFECTO DE LAS CATECOLAMINAS SOBRE LOS DIFERENTES RECEPTORES ADRENÉRGICOS.	29
FIGURA 9. VISIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS 4 SUBTIPOS DE ROSÁCEA.	33
FIGURA 10. VISIÓN CLÍNICA DE LOS 4 SUBTIPOS DE ROSÁCEA 34	
FIGURA 11. RESUMEN LOS DIFERENTES TIPOS DE ROSÁCEA, SUS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y EL TRATAMIENTO DERMATOLÓGICO PROPUESTO EN LA ACTUALIDAD.....	35
FIGURA 12. ESQUEMA DE LA PATOFISIOLOGÍA DE LA ROSÁCEA.....	39
FIGURA 13. HISTOLOGÍA DE UN CASO DE UN PACIENTE CON ROSÁCEA GRANULOMATOSA.	41
FIGURA 14. MONTAJE ESTUDIOS DE PERFUSIÓN SOBRE EL MICROSCOPIO INVERTIDO..	51
FIGURA 15. DETALLE DE UNA DE LAS IMÁGENES MICROARTERIALES OBTENIDAS CON EL SOFTWARE METAFLUOR© DURANTE LOS ESTUDIOS DE PERFUSIÓN.	53
FIGURA 16. SISTEMA MIÓGRAFO DE ALAMBRE DMT UTILIZADO EN LOS EXPERIMENTOS DE ARTERIAS (500-800 MM) AISLADAS CUTÁNEAS.	56
FIGURA 17. ESQUEMA DEL MONTAJE EN LA CÁMARA DEL SISTEMA MIOGRÁFICO.	57
FIGURA 18. EFECTOS CONTRÁCTILES DE LOS AGONISTAS ADRENÉRGICOS SOBRE LAS ARTERIOLAS CUTÁNEAS (<200MM).	68
FIGURA 19. EFECTOS CONTRÁCTILES DE LOS AGONISTAS ADRENÉRGICOS SOBRE LAS ARTERIOLAS CUTÁNEAS (<200MM) POR NOREPINEFRINA (NE), BRIMONIDINA (BR) Y CLORURO POTÁSICO 150 MM (CLK).....	70

FIGURA 20. EFECTO RELAJADOR DE LA NOREPINEFRINA SOBRE LAS ARTERIOLAS CUTÁNEAS (<200MM) PRECONTRAÍDAS CON CLORURO POTÁSICO 150 MM (CLK) EN PRESENCIA DE PRAZOSÍN (1MM) Y EN PRESENCIA DE PRAZOSÍN (1MM) + PROPRANOLOL (1MM) O EN PRESENCIA DE PRAZOSÍN (1MM) + TIMOLOL (1MM).	71
FIGURA 21. EL TRATAMIENTO DE LAS ARTERIOLAS CUTÁNEAS (<200MM) PRECONTRAÍDAS CON CLORURO POTÁSICO 150 MM (CLK) Y PRETRATADAS CON PRAZOSÍN, CON ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR ADRENÉRGICO B NO SELECTIVOS (PROPRANOLOL O TIMOLOL)	73
FIGURA 22. REGISTRO ORIGINAL DE LA CONTRACCIÓN MEDIADA POR NOREPINEFRINA (NE) EN ANILLOS DE PEQUEÑAS ARTERIAS CUTÁNEAS (500-800 MM) DE TEJIDO HUMANOS UTILIZANDO UN MICROBAÑO DE ÓRGANOS CON MIÓGRAFO.	74
<i>FIGURA 23. EFECTOS CONTRÁCTILES DE LOS AGONISTAS ADRENÉRGICOS SOBRE LOS ANILLOS DE PEQUEÑAS ARTERIAS CUTÁNEAS (500-800 MM). CURVA DOSIS-RESPUESTA DEL EFECTO CONTRÁCTIL DE LAS ARTERIOLAS CUTÁNEOS DEBIDA A NOREPINEFRINA (1nM, 100 nM, 10mM). LAVADO DE LAS PREPARACIONES Y PRETRATAMIENTO DE LAS ARTERIOLAS CON PRAZOSÍN 1 mM.....</i>	<i>75</i>
FIGURA 24. EFECTOS CONTRÁCTILES DE LOS AGONISTAS ADRENÉRGICOS SOBRE LOS ANILLOS DE PEQUEÑAS ARTERIAS CUTÁNEAS (500-800 MM). CURVA DOSIS RESPUESTA DEL EFECTO CONTRÁCTIL DE LAS ARTERIOLAS CUTÁNEOS DEBIDA A BRIMONIDINA (10nM, 100nM, 10mM). LAVADO DE LAS PREPARACIONES Y PRETRATAMIENTO DE LAS ARTERIOLAS CON PRAZOSÍN 1 mM Y POSTERIOR ADICIÓN DE BRIMONIDINA (10nM, 100nM, 10mM).	76
<i>FIGURA 25. EFECTO RELAJADOR DE LA NOREPINEFRINA SOBRE ANILLOS DE PEQUEÑAS ARTERIAS CUTÁNEAS (500-800 MM) DE TEJIDO HUMANOS PRECONTRAÍDOS CON CLORURO POTÁSICO 80 MM (CLK) EN PRESENCIA DE PRAZOSÍN (1MM) Y EN PRESENCIA DE PRAZOSIN (1MM) + PROPRANOLOL (1MM) O EN PRESENCIA DE PRAZOSÍN (1MM) + TIMOLOL (1MM).</i>	<i>77</i>
FIGURA 26 FIGURA 26. TRATAMIENTO DE LOS ANILLOS DE PEQUEÑAS ARTERIAS CUTÁNEAS (500-800 MM) DE TEJIDO HUMANOS PRECONTRAÍDAS CON CLORURO POTÁSICO 80 MM (CLK) Y PRETRATADAS CON PRAZOSÍN, CON ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR ADRENÉRGICO B NO SELECTIVOS (PROPRANOLOL O TIMOLOL)	79
FIGURA 27 FIGURA 27. EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS EN LAS ARTERIOLAS (<200MM) CUTÁNEAS.....	82
FIGURA 28. EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS DE LAS PEQUEÑAS ARTERIAS (500–800 MM) AISLADAS DE PREPUCIO.....	85

ÍNDICE TABLAS

TABLA 1 CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS	36
TABLA 2. TABLA EN LA QUE SE REPRESENTAN LOS DESENCADENANTES DE LA ROSÁCEA Y LAS VÍAS DE ACTIVACIÓN CON EL ACTUAL ESQUEMA TERAPÉUTICO.....	37
TABLA 3. ESCALAS DE LA CLINICIAN ERYTHEMA ASSESMENT (CEA): ESCALA VISUAL DE ERITEMA O EVE Y LA SUBJET SELF-ASSESMENT O SSA.	44
TABLA 4. REACTIVOS EMPLEADOS	48
TABLA 5. ANTICUERPOS POLICLONALES DE CONEJO ANTIHUMANO	62

