



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Facultad de Veterinaria

**Estudio fenotípico de ratones transgénicos con
sobreexpresión del receptor de
glucocorticoides**

José Luis Cascallana Álvarez

Lugo, Mayo de 2005

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE VETERINARIA

**“ESTUDIO FENOTÍPICO DE RATONES TRANSGÉNICOS CON
SOBREEXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES”**

Trabajo original presentado para optar al grado de Doctor
por la Universidad de Santiago de Compostela

Lugo, Mayo de 2005

Fdo. José Luis Cascallana Álvarez

Los abajo firmantes, directores de la presente memoria de investigación, autorizan su presentación en el organismo competente para su admisión previa a trámite de su lectura y defensa.

V.º B.º de los directores

Fdo. Ana M. Bravo del Moral

Fdo. Paloma Pérez Sánchez

Fdo. José Luis Jorcano Noval

Este trabajo ha sido realizado con el soporte económico de los siguientes proyectos de investigación:

XUGA-PGIDIT02BTF26103PR

SAF2002-04368-C02-01

SAF2002-04368-C02-02

ABREVIATURAS

%: Porcentaje.

11 β -HSD: 11 β hidroxí-esteroído-deshidrogenasa.

ACC: Aplasia Cutis Congénita.

ACTH: Del inglés, AdrenoCorticoTropic Hormona. Adenocorticotrofina.

AD-EDA-ID: Del inglés, Ectodermal Dysplasia, Anhidrotic, with Immune Deficiency Autosomal Dominant. Displasia ectodérmica anhidrótica autosómica dominante con inmunodeficiencia.

ADN: Ácido DesoxirriboNucleico.

ADNc: Ácido DesoxirriboNucleico complementario.

ADULT: Del inglés, Acro-Dermato-Ungual-Lacrimal-Tooth syndrome. Síndrome acro-dermato-ungueo-lacrimo-dental.

AEC: Del inglés, Ankyloblepharon-Ectodermal defects-Cleft lip/Palate. Anquilobléfaron, displasia ectodérmica y paladar/labio hendido.

AP: Del inglés, Activator Protein. Proteína Activadora.

ARN: Ácido RiboNucleico.

ARNm: Ácido RiboNucleico mensajero.

ATF: Del inglés, Activating Transcription Factor. Factor activador de la transcripción.

BAFF: Del inglés, B cell-Activating Factor. Factor activador de células B

bK: Del inglés, bovine Keratin. Queratina bovina.

BMP: Del inglés, Bone Morphogenetic Protein. Proteína morfogénica ósea.

BrdU: Bromo-deoxiUridina.

BSA: Del inglés, Bovine Serum Albumine. Seroalbúmina Bovina.

BTM: Del inglés, Basal Transcription Machinery. Maquinaria basal de la transcripción.

CBP: Del inglés, CREB-Binding Protein. Proteína de unión al CREB.

CLPED: Del inglés, Ectodermal Dysplasia with Cleft Lip/Palate. Displasia ectodérmica con paladar/labio hendido.

Cr: Del inglés, Crinkled.

CREB: Del inglés, Cyclic adenosine monophosphate (cAMP) Response Element-Binding protein. Proteína de unión al elemento de respuesta al adenosín monofosfato cíclico (cAMP).

- CRF, CRH: Del inglés, *Corticotropin Releasing Factor (Hormone)*. Hormona liberadora de la corticotropina.
- d.p.c.: *días postcoitum*.
- DAB: *DiAminoBencidina*.
- DEX, Dex: *Dexametasona*.
- DI, dl: Del inglés, *Downless*.
- ED: Del inglés, *Ectodermal Dysplasia*. Displasia Ectodérmica.
- EDA, ED1: Del inglés, *Anhidrotic Ectodermal Dysplasia*. Displasia ectodérmica anhidrótica.
- EDA-A1, EDA-A2: Del inglés, *Ectodysplasin - A1, -A2*. Ectodisplasia -A1, -A2.
- EDAR: Del inglés, *Ectodysplasin Receptor*. Receptor de la ectodisplasia.
- EDARADD: Del inglés, *EDAR-Associated Death Domain*. Dominio asociado a EDAR.
- ED-ID: Del inglés, *Ectodermal Dysplasia hypohidrotic, with Immune Deficiency*. Displasia ectodérmica hipohidrótica con inmunodeficiencia.
- EEC: Del inglés, *Ectrodactyly, Ectodermal dysplasia, and Cleft lip/palate syndrome*. Síndrome de ectrodactilia, displasia ectodérmica y labio/paladar hendido.
- EGF: Del inglés, *Epidermal Growth Factor*. Factor de crecimiento epidérmico.
- EGFR: Del inglés, *Epidermal Growth Factor Receptor*. Receptor del factor de crecimiento epidérmico
- ELKS: Del inglés, *glutamic acid, Leucine, lysine, Serine*. Ácido glutámico, leucina, lisina y serina.
- et al.*: Del latín, *et alias*. Y colaboradores.
- eu/pix: *Unidades de energía por píxel*.
- FGF: Del inglés, *Fibroblast Growth Factor*. Factor de crecimiento de fibroblastos.
- fos: Del inglés, *Finkel-Biskis-Jinkins murine osteosarcoma virus*. Oncogén aislado del virus FJB de osteosarcoma murino.
- FSH: *Hormona Folículo estimulante*.
- GC: *Glucocorticoides*.
- GH: Del inglés, *Growth Hormone*. Hormona del crecimiento.
- GHRH: Del inglés, *Growth Hormone-Releasing Hormone*. Hormona liberadora del factor de crecimiento.

GM-CSF:	Del inglés, <i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> . Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos.
GR:	Del inglés, <i>Glucocorticoid Receptor</i> . Receptor de glucocorticoides.
GRE:	Del inglés, <i>Glucocorticoid Response Element</i> . Elementos de respuesta a glucocorticoides.
GRIP:	Del inglés, <i>Glucocorticoid Receptor-Interacting Protein</i> . Proteína que interacciona con el receptor de glucocorticoides.
H:	<u>H</u> istona.
h:	<u>h</u> oras.
HAT:	Del inglés, <i>Histone Acetylase Activity</i> . Actividad acetiladora de histonas.
HAT:	Del inglés, <i>Histone AcetylTransferase</i> . Acetiltransferasa de histona.
HDACs:	Del inglés, <i>Histone DeAcetylases</i> . Deacetilasas de histonas.
HE:	<u>H</u> ematoxilina/ <u>e</u> osina.
HED:	Del inglés, <i>Hipohidrotic Ectodermal Dysplasia</i> . Displasia ectodérmica hipohidrótica.
Hh:	Del inglés, <i>HedgeHog</i> .
HPA:	Del inglés, <i>Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis</i> . Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal.
hsp:	Del inglés, <i>heat shock proteins</i> . Proteínas del shock térmico.
IGF-II:	Del inglés, <i>Insulin-like Grow Factor-II</i> . Factor de crecimiento II similar a la insulina.
IKK:	Del inglés, <i>I-Kappa-B Kinase</i> . Quinasa I-kappa-B.
IL:	<u>I</u> nter <u>L</u> eucina.
IRAK:	Del inglés, <i>Interleukin 1 Receptor-Associated Kinase</i> . Receptor de la quinasa asociada a la interleucina 1.
ISOL:	Del inglés, <i>In situ Oligo ligation</i> .
IκB:	Del inglés <i>Inhibitor-kappa-B</i> . Proteína inhibidora de kappa-B
JNK:	Del inglés, <i>c-Jun N-terminal Kinase</i> .
jun:	Del japonés, <i>ju-nana</i> . Oncogén aislado de un virus de sarcoma de aves.
K:	Del inglés, <i>Keratin</i> . Queratina.
LADD:	Del inglés, <i>LacrimoAuriculoDentoDigital síndrome</i> . Síndrome lacrimo-aurículo-dento-digital.
LH:	<u>H</u> ormona <u>L</u> uteinizante.
LMS:	Del inglés, <i>Limb-Mammary Síndrome</i> . Síndrome de la mama-miembro.

L-myc:	Oncogén similar a <i>myc</i> aislado de un carcinoma de pulmón (<u>L</u> ung).
LTβR:	Del inglés, <i>Lymphotoxin-beta Receptor</i> . Receptor de la linfotoxina β.
Maf :	Del inglés, <i>MusculoAponeurotic Fibrosarcoma oncogene</i> .
MAPK:	Del inglés, <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> . Proteína quinasa que se activa por mitógenos.
MKK, MEK, MAP2K:	Del inglés, <i>MAPK Kinase</i> . Proteína quinasa que activa MAPK.
MKP:	Del inglés, <i>Map Kinase Phosphatase</i> .
MKP-1:	Del inglés, <i>Mitogen-activated protein Kinase (MAPK) Phosphatase-1</i> .
myc:	Del inglés, <i>avian myelocytomatosis virus</i> . Oncogén identificado en tumores víricos.
NEMO:	Del inglés, <i>NFκB Essential Modulator</i> . Modulador Esencial de la molécula NFκB
NFκB:	Del inglés <i>Nuclear Factor kappa-B</i> . Factor nuclear kappa B.
NIK:	Del inglés, <i>NF-Kappa-B-Inducing Kinase</i> . Proteína quinasa inductora de NFκB.
NLS:	Del inglés, <i>Nuclear Localization Signals</i> , señales de localización nuclear.
NSCLP:	Del inglés, <i>Non Syndromic Cleft Lip/Palate</i> . Labio-paladar hendido no sindrómico.
OMIM:	Del inglés, <i>Online Mendelian Inheritance In Man</i> . Herencia mendeliana en el hombre a través del ordenador.
P:	<u>P</u> roteína.
PAS:	Método del <u>Á</u> cido <u>P</u> eryódico- <u>S</u> chiff.
pb:	pares de <u>b</u> ases.
PBS:	Del inglés, <i>Phosphate Buffered Saline</i> . Tampón fosfato salino.
PCAF:	Del inglés, <i>p300/CBP Associated Factor</i> . Factor asociado a p300/CBP.
PDGF :	Del inglés, <i>Platelet-Derived Growth Factor</i> . Factor de crecimiento derivado de plaquetas.
PI3K:	Del inglés, <i>Phosphatidylinositol 3-Kinase</i> .
PVRL:	Del inglés, <i>PolioVirus Receptor Like</i> . Similar al receptor del poliovirus.
q:	Brazo largo de cromosoma.
RANTES:	Del inglés, <i>Regulated on Activation, Normal T-cel Expressed and Secreted</i> . Regulado a través de activación, expresado y descargado por linfocitos T normalmente
SCLP:	Del inglés, <i>Syndromic Cleft Lip/Palate</i> . Labio-paladar hendido sindrómico.

Shh:	Del inglés, <i>Sonic HedgeHog</i> .
SRC:	Del inglés, <i>v-src avian Sarcoma (schmidt-ruppin a-2) viral oncogene</i> .
STAT:	Del inglés, <i>Signal Transducers and Activators of a Transcription</i> . Transductores de Señales y Activadores de la Transcripción
Ta:	Del inglés, <i>Tabby</i> .
TAJ:	Del inglés, <i>Toxicity And JNK inducer</i> . Inductor de JNK y tóxico.
<i>Tfap2</i> :	Del inglés, <i>TFAP2A gene</i> . Gen que codifica para TFAP2.
TFAP2:	Del inglés, <i>Transcription Factor Activating enhancer-binding Protein 2</i> . Factor de transcripción AP2.
TG, Tg:	Transgénico.
TIR:	Del inglés, <i>Toll/Interleukin-1 Receptor</i> .
TNF :	Del inglés, <i>Tumoral Necrosis Factor</i> . Factor de necrosis tumoral.
TRAF:	Del inglés, <i>Tumor necrosis Factor Receptor-Associated Factor</i> . Factor asociado al factor de necrosis tumoral.
TRIS:	Trihidroximetil animometano.
TSH:	Hormona estimulante del Tiroides.
TUNEL:	Del inglés, <i>TdT-mediated dUTP Nick End Labeling</i> . Marcaje de extremos con dUTP mediado por la enzima TdT.
VRE, v.r.e.:	Vaina Radicular Externa.
Wnt:	Del inglés, <i>Wingless</i> .
WT, wt:	Del inglés, <i>Wild Type</i> . Forma nativa.
XEDAR:	Del inglés, <i>X-linked Ectodysplasin Receptor</i> . Receptor de la ectodisplasina A2.
X-gal:	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosa.
XL-EDA-ID:	Del inglés, <i>Ectodermal Dysplasia, Anhidrotic, with Immune Deficiency X linked</i> . Displasia ectodérmica anhidrótica de herencia recesiva ligada al cromosoma X asociada a inmunodeficiencia.
β -gal:	β -galactosidasa.
μ g, μ m, mm:	Microgramo, micrometro, milímetro.
μ l:	Microlitro.

ÍNDICE	Página
INTRODUCCIÓN	1
1. ACCIONES DE LOS GLUCOCORTICOIDES	1
2. RECEPTORES DE GLUCOCORTICOIDES (GR)	4
2.1. Estructura del GR	5
2.2. GR: regulación transcripcional	6
2.3. Interacción entre GR y factores de transcripción: transrepresión	8
2.3.1. Acciones rápidas no-genómicas de GR	8
2.4. Factores de transcripción que interactúan con GR	9
2.4.1. Interacción GR/NF- κ B	9
2.4.2. Interacción GR/AP-1	16
2.4.3. Interacción GR/STAT	17
2.4.4. Interacción GR/CBP	18
2.5. Modelos animales que abordan el estudio funcional de GR	19
3. DERIVADOS ECTODÉRMICOS EN MAMÍFEROS	21
3.1. La piel	21
3.2. Los anejos cutáneos	25
3.2.1. Pelos	26
3.2.2. Glándulas sebáceas	27
3.2.3. Glándulas ecrinas	28
3.3. Los dientes	29
3.4. El ojo	31
4. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LAS QUERATINAS K5 Y K14	33
5. DISPLASIA ECTODÉRMICA	34
5.1. Concepto	34
5.2. Manifestaciones clínicas	35
5.3. Clasificación	36
5.3.1. Displasias ectodérmicas causadas por mutaciones en genes implicados en comunicación célula-célula y señalización	37
5.3.1.1. La displasia ectodérmica hipohidrótica	38

	<i>Página</i>
5.3.2. Displasias ectodérmicas causadas por mutaciones de genes implicados en la regulación de la transcripción	39
5.4. Modelos murinos de ED humana	40
5.4.1. El ratón “ <i>tabby</i> ”	40
5.4.2. El ratón “ <i>downless</i> ”	41
5.4.3. El ratón “ <i>crinkled</i> ”	41
5.4.4. Ratones deficientes en NFκB/REL	42
5.4.5. Ratones deficientes en TRAF6	43
OBJETIVOS	45
MATERIALES Y MÉTODOS	47
1. RATONES TRANSGÉNICOS K5-GR	47
2. MANEJO DE LOS ANIMALES Y TRATAMIENTOS	49
3. NÚMERO DE ANIMALES UTILIZADOS	50
4. NECROPSIA Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS	50
5. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE LAS GLÁNDULAS ADRENALAS EN NEONATOS	53
6. PROCESADO DE LAS MUESTRAS	53
7. ESTUDIO MORFOMÉTRICO DE LA PIEL	54
8. ESTUDIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS	55
9. CUANTIFICACIÓN DEL MARCAJE INMUNOHISTOQUÍMICO	57
9.1. Cálculo de la intensidad de cromógeno	57
9.2. Cálculo del número de células cromógeno-positivas	58
10. CARTOGRAFÍA DE LA HIPÓFISIS	59
11. DETECCIÓN DE APOPTOSIS MEDIANTE HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i> COLORIMÉTRICA	59
12. ESTUDIOS RADIOLÓGICOS	61

	<i>Página</i>
RESULTADOS	63
1. GENERACIÓN DE RATONES TRANSGÉNICOS. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL TRANSGÉN	63
2. ALTERACIONES DE LA PIEL Y FOLÍCULOS PILOSOS EN TRANSGÉNICOS K5-GR	64
2.1. Alteraciones de la piel y folículos pilosos en embriones y neonatos	64
2.2. Alteraciones de la piel y folículos pilosos en adultos	71
3. EFECTOS SOBRE LA PIEL DE NEONATOS DEL TRATAMIENTO CON DEX O METOPIRONA <i>IN ÚTERO</i>	77
4. ALTERACIONES DE LAS GLÁNDULAS CUTÁNEAS EN TRANSGÉNICOS ADULTOS K5-GR	80
4.1. Alteraciones en las glándulas ecrinas	80
4.2. Alteraciones en las glándulas prepuciales	81
4.3. Alteraciones en las glándulas linguales	83
4.4. Alteraciones de las glándulas de Meibomio	83
5. ALTERACIONES OCULARES	85
5.1. Alteraciones oculares en embriones y neonatos	85
5.2. Alteraciones oculares en adultos	94
6. EFECTOS SOBRE EL OJO EN NEONATOS DEL TRATAMIENTO CON DEX O METOPIRONA <i>IN ÚTERO</i>	97
7. ALTERACIONES EN EL PALADAR EN EMBRIONES Y NEONATOS K5-GR	99
8. ALTERACIONES DENTALES EN TRANSGÉNICOS K5-GR	101
8.1. Alteraciones dentales en embriones y neonatos	101
8.1.1. Alteraciones histopatológicas durante la odontogénesis	101
8.1.2. La tasa de proliferación está disminuida en los molares de transgénicos recién nacidos K5-GR.	104
8.1.3. Alteración de la expresión de las proteínas de la vía IKK/NFkB	106
8.2. Alteraciones dentales en adultos	109

	<i>Página</i>
9. EFECTOS EN LA ODONTOGÉNESIS DEL TRATAMIENTO CON DEXAMETASONA O METOPIRONA <i>IN ÚTERO</i>	110
10. EXPRESIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN AP-2 EN TRANSGÉNICOS K5-GR	115
11. ALTERACIONES EN ÓRGANOS ENDOCRINOS EN TRANSGÉNICOS K5-GR	117
11.1. Alteraciones en las glándulas suprarrenales en recién nacidos	117
11.2. Estudio inmunohistoquímico de las hormonas hipofisarias	120
11.2.1. Expresión de ACTH en la hipófisis	120
11.2.2. Expresión de GH en la hipófisis	123
12. ALTERACIONES EN LOS ÓRGANOS LINFOIDES EN TRANSGÉNICOS K5-GR	126
12.1. Incremento de la apoptosis en el timo	126
12.2. Otros órganos linfoides	127
13. ESTUDIO RADIOLÓGICO EN TRANSGÉNICOS ADULTOS K5-GR	128
DISCUSIÓN	131
1. El fenotipo observado en los transgénicos K5-GR es dependiente de los niveles de expresión del transgén	131
2. Alteraciones en la piel y folículos pilosos en los transgénicos K5-GR	132
2.1. Alteraciones cutáneas durante el desarrollo	133
2.2. Alteraciones cutáneas en adultos	135
2.3. Defectos en los folículos pilosos	136
3. Hipoplasia o aplasia de glándulas ectodérmicas	138
3.1. Ausencia o disminución de glándulas ecrinas	139
3.2. Ausencia de glándulas holocrinas	140
3.3. Mecanismos moleculares implicados en alteraciones de piel y glándulas ectodérmicas	141
4. Malformaciones letales	144
4.1. Mecanismos moleculares implicadas en malformaciones craneoencefálicas y gastrosquisis	145

	<i>Página</i>
5. Malformaciones oculares	146
5.1. Malformaciones oculares durante el desarrollo	146
5.2. Secuelas oculares en ratones adultos	149
5.3. Posibles mecanismos moleculares implicados en el fenotipo ocular	150
6. Alteraciones en la cavidad oral	151
6.1. Anomalías en el desarrollo del paladar secundario	151
6.2. Posibles mecanismos moleculares implicadas en el fenotipo del paladar	153
6.3. Retraso en la odontogénesis y agenesia dental	154
6.4. Mecanismos moleculares implicadas en el fenotipo dental	157
6.5. Mecanismos moleculares de interferencia GR-NFκB en los transgénicos K5-GR	158
7. Tratamientos con Dexametasona o Metopirona <i>in útero</i>	159
8. Alteraciones en la proliferación y diferenciación epitelial. Interferencia con p63	161
8.1. Disminución de la proliferación epitelial en epitelios	161
8.2. Retraso en la diferenciación de epitelios	161
8.3. Mecanismos de interferencia GR-ΔNp63	162
9. Órganos linfoides	163
9.1. Aumento de la apoptosis de linfocitos T en el timo	164
10. Menor desarrollo corporal en los transgénicos K5-GR	166
11. Densitometría ósea	168
12. Eje hipotálamo-hipófisis-adrenales en los transgénicos K5-GR	168
13. Fenotipo de los ratones K5-GR comparado con otros modelos murinos	172
14. Posibles mecanismos adaptativos en los transgénicos K5-GR adultos	172
14.1. Disminución de la sensibilidad a glucocorticoides	173
14.2. Modulación a nivel de pre-receptor mediante la enzima 11β-HSD	174
CONCLUSIONES	177
BIBLIOGRAFÍA	179

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

INTRODUCCIÓN

Figura 1. <i>Estructura del receptor de glucocorticoides</i>	5
Figura 2. <i>Ampliación de parte del dominio de unión del GR al ADN</i>	6
Figura 3. <i>Vía NFκB canónica</i>	11
Figura 4. <i>Vía NFκB no canónica</i>	13
Figura 5. <i>Función nuclear de IKKα</i>	14
Figura 6. <i>La activación y represión génica están reguladas por la acetilación de histonas</i>	19
Figura 7. <i>Estratificación epidérmica en el desarrollo embrionario del ratón</i>	22
Figura 8. <i>Representación esquemática de la piel madura</i>	24
Figura 9. <i>Fases del desarrollo de los dientes</i>	30

MATERIAL Y MÉTODOS

Figura 10. <i>Northern blot e immunoblotting de las líneas transgénicas K5-GR generadas</i>	48
---	----

RESULTADOS

Figura 11. <i>Inmunolocalización del GR en secciones de piel de ratones recién nacidos</i>	64
Figura 12. <i>Aspecto macroscópico de embriones 18.5 d.p.c. de la línea 72</i>	65
Figura 13. <i>Vista lateral de embriones de 15.5 d.p.c. de la línea 72</i>	65
Figura 14. <i>ACC de la cabeza en ratones recién nacidos K5-GR</i>	66
Figura 15. <i>Microscopia electrónica de barrido sobre cabezas de embriones de 18.5 d.p.c. de la línea 72</i>	67
Figura 16. <i>Exencefalia en embriones K5-GR</i>	68
Figura 17. <i>Secciones de embriones de 18.5 d.p.c transgénicos con ACC</i>	69
Figura 18. <i>Hipoplasia de la piel craneal en embriones K5-GR</i>	71
Figura 19. <i>Ratones transgénicos adultos de la línea 285 mostrando las áreas de alopecia más características</i>	72
Figura 20. <i>Secciones de piel de ratones adultos</i>	73
Figura 21. <i>Sección longitudinal de vibrisas</i>	75
Figura 22. <i>Aspecto macroscópico de las vibrisas</i>	75

	<i>Página</i>
Figura 23. <i>Incontinencia pigmentaria en adultos K5-GR</i>	76
Figura 24. <i>Efectos en la piel de los tratamientos con Dex o metopirona</i>	78
Figura 25. <i>Efectos sobre la expresión de $\Delta Np63$ en piel tras el tratamiento con Dex o metopirona</i>	79
Figura 26. <i>Escaso desarrollo de las glándulas sudoríparas en ratones K5-GR</i>	81
Figura 27. <i>Menor desarrollo de las glándulas prepuciales en adultos K5-GR</i>	82
Figura 28. <i>Menor desarrollo de las glándulas linguales en adultos K5-GR</i>	83
Figura 29. <i>Ausencia de glándulas de Meibomio en ratones K5GR</i>	84
Figura 30. <i>Aspecto macroscópico de los ojos en ratones recién nacidos</i>	85
Figura 31. <i>Detalles del ojo de embriones vistos con el microscopio electrónico de barrido</i>	86
Figura 32. <i>Primeras fases de los defectos oculares encontrados en embriones transgénicos de 15.5 d.p.c.</i>	87
Figura 33. <i>Graves lesiones oculares en embriones transgénicos K5-GR</i>	89
Figura 34. <i>Anomalías oculares en ratones transgénicos K5-GR recién nacidos</i>	91
Figura 35. <i>Inmunomarcaje frente a $\Delta Np63$ en secciones del ojo de ratones P1</i>	93
Figura 36. <i>Patología ocular en ratones adultos K5-GR</i>	95
Figura 37. <i>Defectos corneales en adultos K5-GR</i>	96
Figura 38. <i>Fenotipo ocular en P0 tratados con Dex o Metopirona</i>	98
Figura 39. <i>Paladar hendido en ratones K5-GR recién nacidos</i>	99
Figura 40. <i>Defectos en la palatogénesis en ratones K5-GR recién nacidos</i>	100
Figura 41. <i>Secciones mediasagitales de la cabeza de embriones de 18,5 d.p.c., inmunomarcadas frente a K5</i>	101
Figura 42. <i>Secciones coronales de la cabeza de ratones recién nacidos a nivel del primer molar</i>	102
Figura 43. <i>Marcaje inmunohistoquímico frente a K5, mGR y ratGR de primeros molares en recién nacidos</i>	104
Figura 44. <i>Incorporación de BrdU en primeros molares de recién nacidos</i>	105
Figura 45. <i>Alteraciones en la vía NF-kB durante la odontogénesis en embriones K5GR de 18.5 d.p.c.</i>	107
Figura 46. <i>Vista frontal de los molares en ratones adultos</i>	110
Figura 47. <i>Efectos sobre la odontogénesis del tratamiento con Dex o Metopirona</i>	112

	<i>Página</i>
Figura 48. <i>Efectos del tratamiento con Dex o Metopirona en la expresión de $\Delta Np63$ en los epitelios dentales y linguales en ratones de un día de edad</i>	114
Figura 49. <i>Expresión de AP-2α en epitelios estratificados</i>	116
Figura 50. <i>Hiperplasia adrenal en ratones recién nacidos transgénicos K5-GR</i>	119
Figura 51. <i>Inmunomarcaje y cartografía de las células ACTH positivas en hipófisis de recién nacidos</i>	121
Figura 52. <i>Expresión de ACTH en la hipófisis de ratones adultos</i>	123
Figura 53. <i>Expresión de GH en hipófisis de recién nacidos y efectos del tratamiento con Dex o Metopirona</i>	124
Figura 54. <i>Detección de apoptosis “in situ” en la zona cortical del timo en ratones de 4 semanas</i>	127
Figura 55. <i>Imágenes radiográficas del esqueleto en ratones de 18 meses de edad</i>	129

INTRODUCCIÓN

1. ACCIONES DE LOS GLUCOCORTICOIDES.

Los glucocorticoides (GCs) son hormonas esteroideas sintetizadas en la zona fascicular y reticular de la corteza adrenal y liberados a la circulación en respuesta a un amplio abanico de estímulos estresantes, tales como la inanición, dolor, cirugía, traumatismos, estrés emocional, situaciones extremas de calor o frío y daño celular.

Su liberación está regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA), que estimula la liberación de GCs mediante una cascada de hormonas reguladoras (McKay and Cidlowski, 1999). Determinadas células neuronales hipotalámicas, una vez estimuladas, sintetizan y secretan la hormona liberadora de la corticotropina (CRF). Esta hormona es inmediatamente absorbida por el sistema portal hipotalámico-hipofisario y transportada directamente a los senos de la hipófisis anterior, en donde se encarga de estimular la síntesis de adrenocorticotropina (ACTH) por las células corticotropas.

Los GCs tienen un carácter lipídico, y por lo tanto se encuentran en la circulación asociadas a un transportador: una *globulina* (globulina transportadora del cortisol o transcortina) en el caso de los esteroideos endógenos o la *albúmina* en el caso de ambos, esteroideos endógenos y esteroideos de síntesis (Rang *et al.*, 1995).

Si bien el mecanismo de difusión simple a través de la bicapa lipídica de la membrana es el más aceptado, hay evidencias de que su ingreso a la célula está regulado a través de receptores de membrana distintos al receptor de glucocorticoides (GR). Utilizarían como señales proteínas G y este mecanismo sería responsable de las acciones rápidas de estas hormonas, por ejemplo la inhibición de la secreción de ACTH hipofisaria (Iwasaki *et al.*, 1997)

Los GCs poseen una importante y amplia gama de funciones, de tal forma que el organismo no puede sobrevivir sin ellos (Schimmer *et al.*, 1996). La más importante de ellas, es su actividad como reguladores del metabolismo intermediario.

El principal papel de los GCs como reguladores del metabolismo, y motivo por el cual recibieron su nombre, es el de estimular la gluconeogénesis en el hígado y músculo esquelético, lo que determina un aumento de la glucemia. Otro efecto importante consiste en la reducción de los depósitos de proteínas en casi todas las células corporales a excepción de las hepáticas (Guyton-Hall, 1999).

Sobre el metabolismo lipídico, el cortisol promueve la movilización de ácidos grasos del tejido adiposo; ello aumenta la concentración de ácidos grasos libres en el plasma, lo que también aumenta su utilización para obtener energía. Por otra parte el cortisol posee un efecto directo favorecedor de la oxidación de los ácidos grasos en las células. El aumento de la movilización de grasas por el cortisol, combinado con la mayor oxidación de ácidos grasos, ayudan a desplazar los sistemas metabólicos de la célula, en épocas de inanición o frente a otras tensiones, de modo que se sustituye la utilización de glucosa por la de ácidos grasos como fuente energética. Este mecanismo del cortisol, precisa varias horas hasta estar completamente desarrollado, y no es un efecto tan rápido ni tan poderoso como el desplazamiento similar provocado por la disminución de insulina.

Los GCs ejercen múltiples funciones, no solo en el organismo adulto sino también durante el crecimiento embrionario y el desarrollo, siendo especialmente importantes en la maduración pulmonar del feto. Actúan como teratógenos potentes cuando se administran durante la gestación, provocando diversas anomalías como paladar hendido. En el ratón, la inducción de paladar hendido se correlaciona con los niveles de expresión de GR en el paladar (Abbott *et al.*, 1994).

Entre otros efectos terapéuticos, los GCs son compuestos con actividad antiinflamatoria, inmunomoduladora, vasoconstrictora, gluconeogénica y antimitótica (McKay and Cidlowski, 1999). La mayoría de estos efectos contribuyen a la eficacia terapéutica de estas sustancias en el tratamiento de enfermedades cutáneas, siendo la droga de elección en la mayoría de los procesos inflamatorios cutáneos (Ahluwalia, 1998).

Los GCs actúan sobre la inflamación por distintas vías. Por ejemplo, reducen el número y activación de eosinófilos, desencadenando la apoptosis de los mismos y disminuyendo algunos de sus factores quimiotácticos, que incluyen las IL-3, IL-5, el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), eotaxina y RANTES,

entre otros. También reducen la proliferación de linfocitos T e inducen la apoptosis de los mismos, al disminuir la acción de la IL-2, principal factor trófico de éstos. Disminuyen también la cantidad de monocitos (células presentadoras de antígeno), células dendríticas, mastocitos y otras células inflamatorias (Newton *et al.*, 2000).

La apoptosis inducida por los GCs puede servir para eliminar timocitos o células T que estén sufriendo una diferenciación inadecuada (Nieto *et al.*, 1992). Los GCs son potentes supresores de la respuesta inmune y la inflamación. Esta característica ha determinado que los GCs de síntesis tengan un gran espectro de indicaciones terapéuticas en infinidad de enfermedades autoinmunes e inflamatorias. El beneficio de los GCs en el tratamiento de la artritis reumatoide ha sido reconocido hace ya 60 años. Una gran variedad de GCs se emplean habitualmente en el tratamiento del lupus eritematoso sistémico, psoriasis, eczema y asma (Kirkham *et al.*, 1991; Barnes *et al.*, 1995). También son utilizados para suprimir la respuesta inmune y el rechazo en pacientes con trasplantes de órganos.

La amplia utilización de los GCs en la clínica se basó en el pasado en la evidencia empírica de su eficacia, a pesar de no disponer de un conocimiento en profundidad de los mecanismos de su acción antiinflamatoria e inmunosupresora. El descubrimiento en los últimos 10 años de las principales vías moleculares implicadas en la inflamación, como son la del factor de transcripción nuclear de κ B (NF- κ B) y de la proteína activadora -1 (AP-1), ha permitido evidenciar que, a nivel molecular, las acciones antiinflamatorias e inmunosupresoras de los GCs se realizan a través de la interferencia con proteínas que pertenecen a las grandes vías inflamatorias NF- κ B y AP-1 (McKay and Cidlowski, 1999).

Es cierto que, hasta la fecha, se han publicado muchos mecanismos de acción, pero la importancia relativa de cada uno de ellos no está suficientemente aclarada, por lo cual es posible que existan mecanismos de acción adicionales todavía por descubrir.

2. EL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES.

GR pertenece a la subfamilia de receptores de hormonas esteroideas, la cual comprende proteínas estructuralmente similares, tales como GR, el receptor de la progesterona (PR), el receptor de los mineralocorticoides (MR) y el receptor de andrógenos (ER), todos los cuales pertenecen a la familia de los receptores nucleares. Dentro de esta gran familia se incluyen los receptores de la hormona tiroidea y el del ácido retinoico. Los receptores nucleares actúan como factores transcripcionales activados por ligando (la hormona o vitamina correspondiente), alterando, por diversos mecanismos, la transcripción génica. Su expresión es ubicua pero desempeñan funciones específicas en diversos tipos celulares (McKay and Cidlowsky, 1999; Robinson-Rechavi, 2001).

Las dos isoformas más relevantes de GR se denominan GR α y GR β , ambas idénticas en sus primeros 727 aminoácidos, pero diferentes en la región carboxilo terminal. Sólo el GR α es capaz de unirse a la hormona o de regular la transcripción de los genes diana de la acción de los GCs.

La existencia de la forma β , así como su acción biológica, es muy controvertida (Yudt and Cidlowski, 2002). La forma β de GR está aumentada en el asma córtico-resistente y asma nocturna. Existe un solo gen de GR, si bien el truncamiento del preARNm del mismo da origen a una forma de receptor denominada β , que tiene 50 aminoácidos menos en su extremo carboxilo terminal, reemplazados por una secuencia diferente de 15 aminoácidos que no es capaz de modular la transcripción de genes, pero puede afectar a otras acciones de los esteroides actuando como inhibidor competitivo, formando homodímeros β o heterodímeros α - β , que pueden ocupar los sitios de los elementos de respuesta a GCs (GRE) e impedir la acción del GR α . Sin embargo, para que esta acción se concrete, es necesario que esta forma β sea la predominante, por lo que no está claro cuál es su acción biológica. (Bamberger *et al.*, 1995; Oakley *et al.*, 1999; Leung *et al.*, 2000; Sousa *et al.*, 2000). Por otra parte, diversas especies animales como el ratón carecen de GR β (Otto *et al.*, 1997).

2.1. Estructura del GR.

El GR α es una proteína formada por tres dominios (Figura 1), el dominio de transactivación N-terminal incluye el dominio de activación AF-1, requerido para mejorar la transcripción asociándose con factores basales de transcripción (Kumar and Tompson, 2003). El dominio central, denominado dominio de unión al ADN (DBD), es común a la mayoría de receptores nucleares, constituido por dos dedos de anillos de zinc, imprescindibles para la dimerización del receptor y su unión al ADN (Figura 2). El extremo C-terminal es el lugar para la unión a la hormona y también sirve como un lugar de unión para las proteínas de choque (“*shock*”) térmico hsp; este dominio de unión hormonal contiene señales de localización nuclear, así como el dominio de activación dependiente de ligando (AF-2) (Kumar and Thopson, 1999; Coghlan *et al.*, 2003).

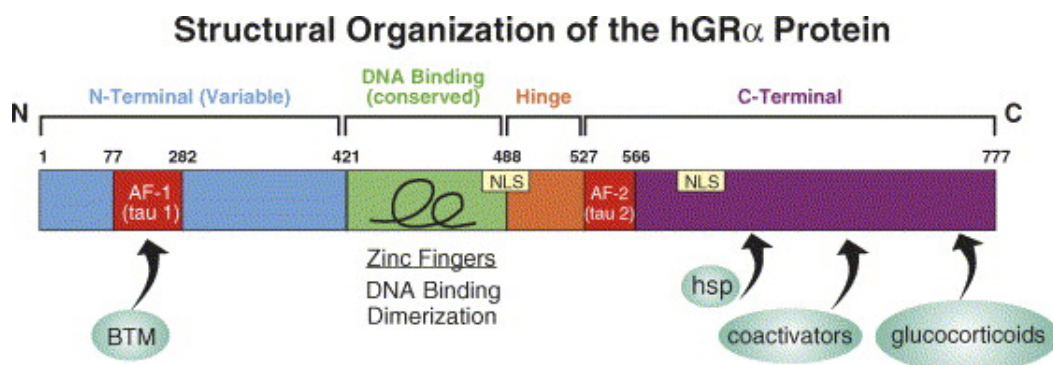


Figura 1. Estructura del receptor de glucocorticoides. GR está compuesto por tres dominios funcionales. El dominio de transactivación N-terminal contiene el dominio de activación AF-1 o *tau1*, necesario para la mejora transcripcional y su asociación con la maquinaria basal de transcripción (BTM). El dominio de unión al ADN (DBD), contiene dos dedos de zinc y es necesario para la dimerización del receptor y para el reconocimiento de las secuencias específicas del ADN. El dominio de unión a la hormona C-terminal sirve como lugar de unión para las proteínas del shock térmico (hsp) y coactivadores, y contiene señales de localización nuclear (NLS), así como el dominio de activación ligando-dependiente (AF-2 o *tau2*). Tomado de Smoak and Cidlowski, 2004.

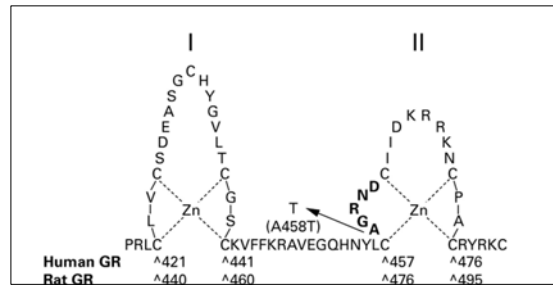


Figura 2. Ampliación de parte del dominio de unión del GR al ADN. Se muestra la secuencia de aminoácidos de los dos dedos de zinc y la zona de dimerización formada por 5 aminoácidos marcados en negrita. Tomado de Newton, 2000.

En el citoplasma, GR está secuestrado de forma inactiva formando un complejo multiproteico con proteínas del shock térmico hsp90, hsp70, hsp56, hsp40, una proteína de bajo peso molecular (p23) y varias inmunofilinas (Dittmar *et al.*, 1997, 1998). Cuando el GR se une a la hormona (GCs), se convierte en un factor de transcripción activo que se disocia del complejo proteico multimérico, particularmente de hsp90, mediante la exposición de sus señales de localización nuclear, permitiendo su rápida translocación al núcleo. Aquí, el complejo ligando-receptor modula (estimula o inhibe) respuestas transcripcionales de genes inflamatorios, bien a través de su unión directa al ADN, o bien a través de interacciones indirectas sobre otros factores de transcripción que regulan genes proinflamatorios.

2.2. GR: regulación transcripcional.

En el citoplasma celular los GCs se unen a su receptor específico, el GR. La unión GC-GR determina la activación de éste y su dimerización, en forma de homo o heterodímeros.

Los homodímeros de GR se translocan al núcleo, donde ejercen su acción sobre el ADN, uniéndose a secuencias específicas de bases, denominados elementos de respuesta a GCs (GRE), cuyo motivo consenso es AGA ACA nnn TGT TCT, que inducirán la formación del complejo transcripcional (Almawi and Melemedjian, 2002). La unión de GR a los GRE ocasiona un cambio conformacional en el GR que promueve el reclutamiento de varios coactivadores hacia el complejo GR-ADN (Barnes, 1998; Kassel *et al.*, 2001). Estos coactivadores, tales como CBP/p300, P/CAF y SRC-1, presentan

actividad enzimática de acetiltransferasa (HAT), acetilando histonas, la cual parece ser crucial para el remodelamiento de la estructura de la cromatina y la completa manifestación de los efectos de los GCs. La acetilación de histonas da lugar a una reconfiguración y un desenrollamiento del ADN que permite a la maquinaria basal de la transcripción (BTM) acceder al promotor. Las modificaciones nucleosomales y el acceso al promotor también pueden producirse por mediación de otros cofactores que no acetilan histonas (non-HAT), como son el complejo de remodelación de cromatina SWI/SNF, el pCtF y GRIP (De Bosscher *et al.*, 2003). Los GCs incrementan la síntesis de varias proteínas anti-inflamatorias, incluyendo la lipocortina-1, el inhibidor de la proteasa secretora leucocitaria, el antagonista del receptor de la IL-1, la endopeptidasa neural y la proteína quinasa mitógeno-activada fosfatasa-1 (MKP-1) (Barnes, 1998; Kassel *et al.*, 2001), presumiblemente a través de la activación de genes GRE-dependientes. Sin embargo, está claro que la activación de estos genes lleva a cabo solo una porción de los efectos antiinflamatorios de los GCs.

La inducción de la síntesis de estas proteínas es generalmente lenta. Se demora entre 24 y 48 horas, por lo que parecen tener un papel en el efecto antiinflamatorio a largo plazo.

Los homodímeros de GR también pueden ocasionar una represión transcripcional mediante la interacción directa con determinados sitios del ADN denominados elementos de respuesta negativos a GCs (nGRE), cuya secuencia de bases no está muy bien definida. Este mecanismo de acción se ha propuesto para explicar la represión ejercida por GR sobre el gen de la osteocalcina y sobre el gen de la proopiomelanocortina (POMC, un precursor de la ACTH) (Newton, 2000), cuyos promotores disponen de nGREs. Los promotores de los genes que codifican para varias queratinas, entre las que se encuentra el promotor de la queratina K5, también poseen nGREs; en este caso, la acción represora de la transcripción se realiza a través de dos mecanismos independientes, uno de ellos por interacción directa de los nGREs con cuatro monómeros GR y el otro mecanismo, por bloqueo indirecto de la inducción de la expresión de los genes de las queratinas llevado a cabo por AP-1 (Radoja *et al.*, 2000).

2.3. Interacción entre GR y factores de transcripción: transrepresión.

Los GCs regulan negativamente la expresión de numerosos genes implicados en inflamación, como IL-2, IL-6 y TNF- α , entre otros. Dichos genes no contienen nGRE en sus promotores, sin embargo, contienen elementos de unión para los factores de transcripción NF- κ B y AP-1 (De Bosscher *et al.*, 2003). GR regula negativamente la expresión de estos genes pro-inflamatorios mediante un mecanismo denominado "transrepresión", que tiene lugar a través de interacciones proteína-proteína entre GR/NF- κ B y GR/AP-1. Para estas interacciones con la subunidad p65/NF- κ B, o la subunidad c-Jun/AP-1, es suficiente GR en su forma monomérica. De hecho, la demostración *in vivo* en estudios con receptores mutantes que no tienen capacidad para dimerizar y, por consiguiente, no pueden unirse a los GRE, de que los corticoides mantienen la mayor parte de su actividad antiinflamatoria, constituye un punto de inflexión en el estudio de los mecanismos de acción de los glucocorticoides y posee una enorme relevancia terapéutica (Reichardt *et al.*, 1998). Además, existen mecanismos adicionales por los que GR inhibe la función NF- κ B, por ejemplo, a través de la inducción transcripcional del inhibidor I κ B α , como ya veremos más adelante.

2. 3. 1. Acciones rápidas no-genómicas de GR.

Los mecanismos de actuación de GR descritos más arriba se denominan genómicos, ya que actúan sobre el genoma, lo cual implica que el tiempo requerido para activar completamente esta vía es relativamente largo (los genes diana empezarían a expresarse una hora después de la adición del esteroide, a lo que se debe sumar el tiempo de la síntesis de cantidades significativas de proteínas, por lo que los efectos aparecen después de horas o incluso días); por el contrario, las acciones mediadas a través de la vía no genómica aparecen en un periodo muy corto de tiempo (segundos o minutos). También existen efectos inducidos por los esteroides que se producen en células sin núcleo funcional, tal y como los eritrocitos, plaquetas o espermatozoides, células todas ellas capaces de responder a la estímulos generados por esteroides, por lo que se postula la existencia de receptores para esteroides en la membrana plasmática (Ralf *et al.*, 2003).

En base a publicaciones recientes (revisado en Losel and Wehling, 2003), se admite la importancia de las denominadas acciones rápidas no genómicas de los esteroides, y en particular de los glucocorticoides, en procesos patológicos que cursan con inflamación.

Recientemente, se ha propuesto la existencia de vías no genómicas mediadoras de acciones rápidas sensibles a GCs, en procesos patológicos que cursan con inflamación. De forma resumida, el GR interacciona con la subunidad p85 α del complejo quinasa fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K), cuya actividad se encuentra implicada en diversas respuestas celulares activadas por receptores de superficie celular, regulando de esta manera la actividad de la proteína quinasa AKT. A través de estas interacciones, GR ejerce una función anti-tumoral en carcinogénesis de piel inducida por la sobreexpresión de AKT (Leis *et al.*, 2004).

2.4. Factores de transcripción que interaccionan con GR.

Los factores transcripcionales son complejos proteicos que se unen a secuencias reguladoras del ADN, habitualmente en regiones promotoras ubicadas hacia el extremo 5' de la cadena, en aquellos genes que son blanco de su acción, aumentando, o disminuyendo, su tasa de transcripción. En consecuencia, el receptor esteroideo se ajusta a esta descripción y la familia de receptores con "dedos de zinc", pertenece a una de las cuatro clases de factores transcripcionales descritos (alfa hélice, dedos de zinc, cremalleras de leucina y hoja plegada).

GR interacciona con otros factores de transcripción. Desde el punto de vista terapéutico, los más importantes son NF- κ B y AP-1, dado que estos factores de transcripción son cruciales en la regulación de los procesos celulares de proliferación, inflamación y carcinogénesis.

2.4.1. Interacción GR/NF- κ B.

El factor de transcripción NF- κ B se identificó como un complejo proteico presente en el promotor génico de las cadenas ligeras *kappa* en células B murinas (Sen and Baltimore, 1986). Más tarde se comprobó que su distribución era ubicua. La familia de

proteínas NF- κ B/REL está compuesta por: p65 (REL-A), c-REL, REL-B, NF- κ B1 (p50 y su precursor p105), NF- κ B2 (p52 y su precursor 100). Todas estas proteínas tienen en común una región de la molécula de aproximadamente 300 aminoácidos, responsable de su unión al ADN, dimerización y translocación nuclear, denominada dominio de homología REL (RHD).

NF- κ B está formada por dos subunidades iguales (homodímero) o diferentes (heterodímero) y existen múltiples combinaciones homo- y hetero-diméricas de estos factores para unirse a secuencias consenso denominadas κ B en los promotores de los genes regulados, que derivan en patrones únicos de regulación génica. En células no estimuladas, NF- κ B está localizado en el citoplasma asociado a una familia de proteínas inhibidoras denominadas I κ B que contienen un número variable de repeticiones de anquirina en su extremo carboxi-terminal (Silverman *et al.*, 2001; Ghosh *et al.*, 1998 y 2002).

Una amplia variedad de estímulos como citoquinas, quimioquinas, productos víricos o bacterianos, rayos ultravioleta o radicales libres pueden activar la vía NF- κ B induciendo la fosforilación de las proteínas I κ B; tras la fosforilación, se produce la ubiquitinación y la degradación proteosómica de I κ B. Este proceso libera las proteínas NF- κ B de I κ B posibilitando su dimerización, translocación al núcleo y su unión a elementos κ B, lo que determinará la transactivación transcripcional de muchos genes (Silverman *et al.*, 2001; Ghosh *et al.*, 1998 y 2002), tales como aquellos que codifican para la síntesis de citoquinas, factores de crecimiento, proteínas de respuesta de fase aguda, moléculas de adhesión, reguladores de apoptosis celular y otros factores de transcripción (Chen *et al.*, 1999). La actividad transcripcional NF- κ B se controla, adicionalmente, mediante modificaciones post-traduccionales tales como fosforilación y acetilación, aunque se desconocen los mecanismos exactos implicados.

Un paso esencial para la activación de la vía clásica (o canónica) de NF- κ B es la fosforilación de las proteínas I κ B. El complejo quinasa encargado de esta fosforilación, se denomina I κ B quinasa (IKK). IKK es un multímero formado por dos subunidades catalíticas, IKK α (IKK1) e IKK β (IKK2) y por dos subunidades reguladoras: la proteína IKK γ /NEMO (May *et al.*, 2002) y la proteína recientemente clonada ELKS. Aunque

IKK γ /NEMO y ELKS no tienen funciones catalíticas, son indispensables para la activación del complejo IKK (Yamaoka *et al.*, 1998; Rudolph *et al.*, 2000; Ducut *et al.*, 2004).

A pesar de que IKK α e IKK β tienen una estructura molecular muy similar, juegan papeles funcionales diferentes, y dan lugar a diferentes fenotipos animales.

Así, IKK β es el principal responsable de la inducción de las citoquinas proinflamatorias a través de la estimulación de esta vía clásica de NF- κ B, ocupando un papel de quinasa dominante en la fosforilación de I κ B unida en complejo al heterodímero REL A-p50 (Yamamoto and Gaynor, 2004) (Figura 3). IKK β también juega, a través de NF- κ B, un papel decisivo sobre la actividad de los queratinocitos epidérmicos, regulando mecanismos que mantienen la homeostasis inmune de la piel ya que, los ratones deficientes en IKK β en la epidermis generados mediante el sistema Cre/loxP desarrollan, en el momento del nacimiento, graves lesiones inflamatorias en la piel, mediadas por el factor de necrosis tumoral (TNF); curiosamente, estas lesiones no se asocian a hiperproliferación epidérmica, ni a diferenciación alterada de los queratinocitos (Pasparakis *et al.*, 2002).

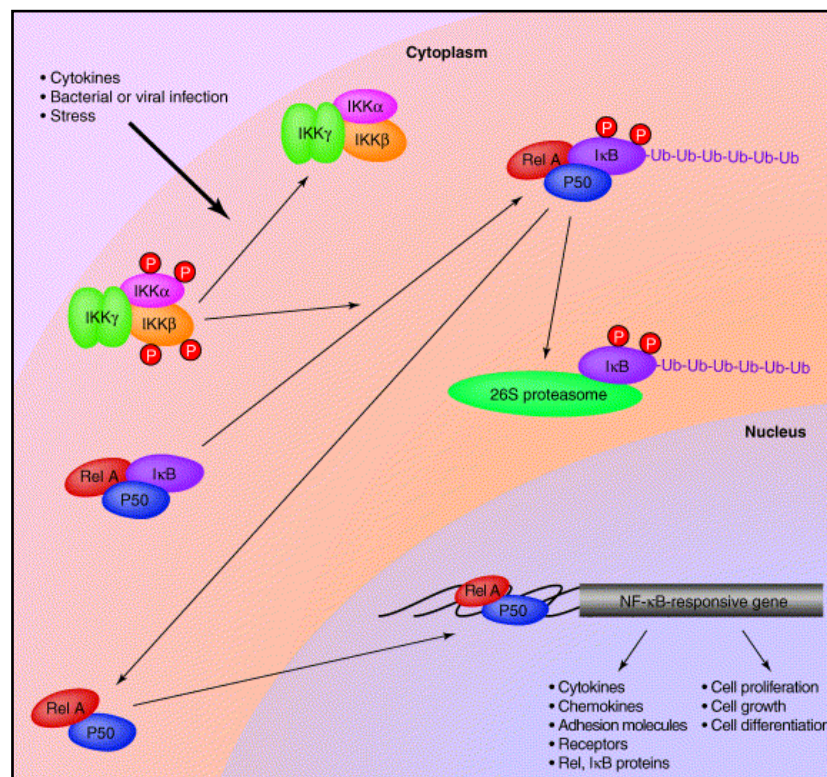


Figura 3. Vía NF- κ B canónica. Tomado de Yamamoto and Gaynor, 2004.

IKK α juega un papel relevante en la diferenciación de los queratinocitos siendo imprescindible para la adecuada diferenciación de la epidermis (Hu *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999; Takeda *et al.*, 1999). Así, los animales deficientes en IKK α mueren perinatalmente y exhiben hiperplasia y falta de diferenciación epidérmica, siendo ésta más gruesa, brillante, tersa y carente de vibrisas; las extremidades y la cola no se desarrollan adecuadamente por lo que los recién nacidos presentan las cuatro extremidades y del rabo muy acortados, además de presentar otras malformaciones graves tales como hendidura del paladar secundario y deformidades en los incisivos (Kaufman *et al.*, 2000). Parece ser que el fenotipo de los ratones knockout IKK α no depende de la activación de la vía canónica de NF- κ B y, aunque el mecanismo preciso de regulación de la diferenciación epidérmica por IKK α no se conoce, puede que IKK α controle la producción de un factor soluble que induzca la diferenciación de los queratinocitos (Hu *et al.*, 2001).

IKK α es también imprescindible para el desarrollo de la conjuntiva y la córnea en mamíferos (Yoshida *et al.*, 2000).

La activación de NF- κ B por la vía no canónica está mediada por la proteína quinasa inductora de NF- κ B (NIK). NIK estimula a IKK α la fosforilación y consiguiente ubiquitinación de la subunidad p100 de NF κ B, lo cual induce su procesado hacia p52, formación de heterodímeros REL B-p52, translocación de los mismos al núcleo y activación de la expresión génica. Se ha descrito que IKK α es necesario para el procesamiento de p100 inducido por NIK (Coope *et al.*, 2002; Yilmaz *et al.*, 2003) (Figura 4).

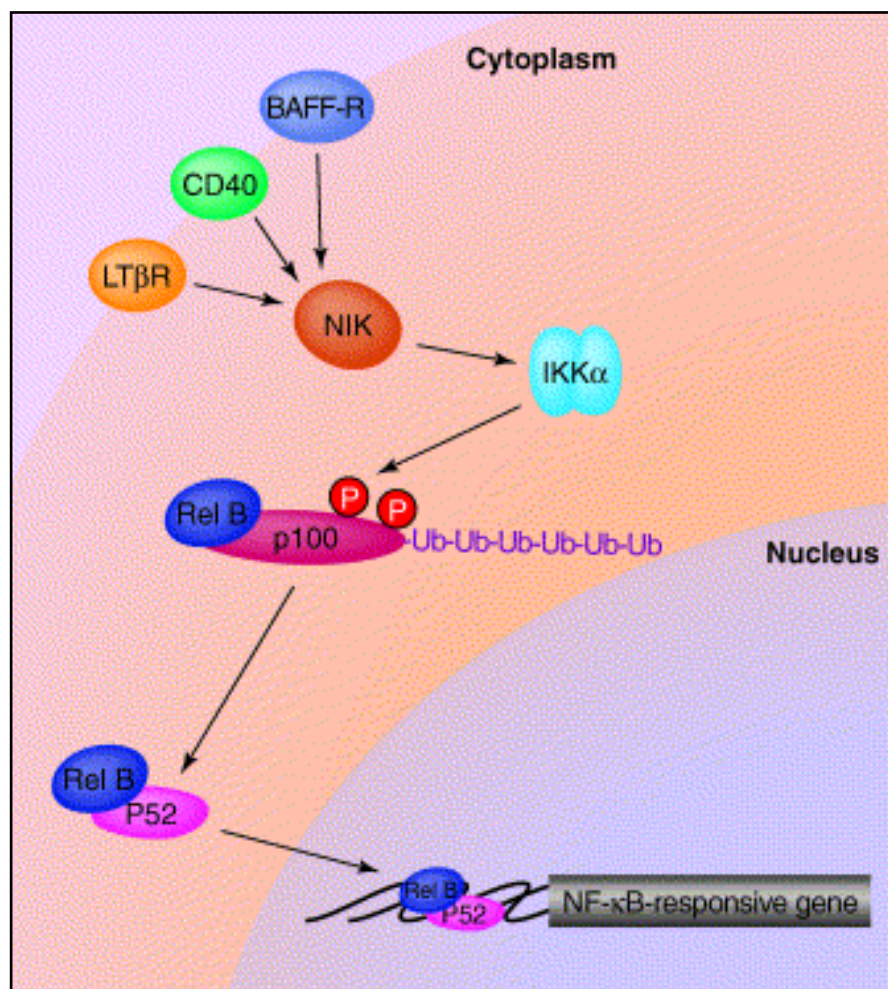


Figura 4. Vía $NF-\kappa B$ no canónica. La vía no canónica de $NF\kappa B$ está regulada por la quinasa inductora de $NF-\kappa B$ (NIK) y por $IKK\alpha$. Esta vía se activa en respuesta a estímulos procedentes de ligandos de receptores tales como el receptor del factor de activación de células B (BAFF), el receptor CD40 y el receptor de linfotóxina β (KTβR). Tomado de Yamamoto and Gaynor, 2004.

Recientemente se ha demostrado que, en respuesta a citoquinas tales como el factor de necrosis tumoral (TNF), $IKK\alpha$, en conjunción con p65, es reclutado en el núcleo uniéndose al coactivador CBP (proteína de unión al CREB) lo cual facilita primero la fosforilación y, posteriormente, la acetilación de la proteína histona H3, lo que induce la expresión de genes diana de $NF-\kappa B$ (Yamamoto *et al.*, 2003; Yamamoto and Gaynor, 2004) (Figura 5).

similar al observado en los ratones knockout para p65, o los deficientes en IKK β ; las hembras heterocigotas deficientes en NEMO tienen un fenotipo muy similar a la IP humana, incluyendo incontinencia pigmentaria, infiltrado de polimorfonucleares y la presencia de queratinocitos no diferenciados en estratos suprabasales de la epidermis (Yamamoto and Gaynor, 2004).

Recientemente se ha demostrado que IKK γ es capaz de translocarse desde el citoplasma hasta el núcleo y de interactuar con CBP. En el núcleo, IKK γ compite con p65 y con IKK α por la unión al CBP, lo que inhibiría la activación transcripcional. Por lo tanto, IKK γ no solo juega un papel en el citoplasma como regulador de la actividad IKK sino que, además, esta capacidad de “saltar” entre citoplasma y núcleo puede llevar a una represión transcripcional de la vía NF- κ B (Verma *et al.*, 2004)

GR y NF- κ B ejercen un antagonismo recíproco, siendo cada uno capaz de inhibir la actividad transcripcional del otro (McKay *et al.*, 1999).

GR puede interferir con NF- κ B a varios niveles:

- A través de la interacción proteína-proteína entre GR y p65 o GR y p50 en el núcleo, interfiriendo con la formación de complejos activos NF- κ B con secuencias κ B (Mukaida *et al.*, 1994; Scheinman *et al.*, 1995; De Bosscher *et al.*, 2003; Widen *et al.*, 2003). Recientemente, se ha demostrado que la interacción GR/NF- κ B puede ocurrir también en el citoplasma incluso en ausencia de ligando, impidiendo así la translocación nuclear de NF- κ B (Widen *et al.*, 2003). La interacción entre GR y NF- κ B está mediada por el DBD de GR y el RHD de NF- κ B.
- Induciendo transcripcionalmente al inhibidor I κ B α , bloqueando así la activación de NF- κ B (Auphan *et al.*, 1995; Newton *et al.*, 1998); sin embargo, esta regulación es específica de tipo celular y no parece ocurrir en queratinocitos (De Bosscher *et al.*, 2003; Pérez *et al.*, 2001).
- Otro mecanismo frecuentemente descrito es el de “secuestro” o “squelching” de cofactores generales de la transcripción, como CBP/p300 que, mediante la acetilación/deacetilación de histonas, dan lugar a una remodelación de la cromatina como veremos más adelante. Sin embargo, este

mecanismo se debate actualmente puesto que se han descrito mutantes de GR, así como agonistas de GR, capaces de discriminar la transrepresión entre GR y NF- κ B o GR y AP-1 (De Bosscher *et al.*, 2000; Vlaeminck-Guillem *et al.*, 2003).

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

Existe un acuerdo general en que las acciones antiinflamatorias de los GCs están mediadas, principalmente, a través de la interferencia entre GR/NF- κ B y GR/AP-1 (Tuckermann *et al.*, 1999; Reichardt *et al.*, 2001). En el modelo transgénico K5-GR, la sobreexpresión de GR en queratinocitos basales ejerce un claro efecto anti-proliferativo y anti-inflamatorio como respuesta al TPA, conocido efector proliferativo y pro-inflamatorio. Esta acción de GR está mediada, al menos en parte, a través de la interferencia entre GR y NF- κ B (Pérez *et al.*, 2001). Además, se ha demostrado mediante experimentos de tumorigénesis cutánea, que la sobreexpresión de GR en transgénicos K5-GR ejerce un potente efecto anti-tumoral, a través de la inhibición parcial de la actividad NF- κ B y de la vía de señalización PI3K/AKT (Budunova *et al.*, 2003; Leis *et al.*, 2004)

2.4.2. Interacción GR/AP-1.

AP-1 es un factor de transcripción formado por proteínas de las familias c-Jun y c-Fos, unidas por cremalleras de leucina, las cuales pueden dimerizar también con otros factores de transcripción de las familias ATF y Maf. Las proteína-quinasa que se activan por mitógenos (MAPKs) son una familia de serina-treonina quinasa que coordinan la transmisión de diversos estímulos al núcleo, una vez activadas, translocándose del citoplasma al núcleo, donde fosforilan factores de transcripción específicos, como AP-1, y modulan la expresión génica (Chang and Karin, 2001). c-Jun se activa mediante fosforilación por la MAPK denominada Jun N-terminal (JNK). En algunos tipos celulares, se ha descrito que los GCs regulan negativamente AP-1 a través de la inhibición de la fosforilación mediada por JNK (Caelles *et al.*, 1997), y que este mecanismo está mediado por una interacción directa entre GR y JNK que impide su fosforilación/activación por MKK7 (Bruna *et al.*, 2003). Además, en algunos tipos celulares, los GCs regulan

transcripcionalmente MKP-1, que inhibe la fosforilación/activación de JNK, ERK y p38 (De Bosscher *et al.*, 2003).

En procesos inflamatorios crónicos como el asma, la artritis reumatoide o la enfermedad inflamatoria intestinal, está aumentada la expresión de genes inmunes e inflamatorios que dependen de los factores de transcripción AP-1 y NF- κ B (Mak *et al.*, 1995). En estos procesos inflamatorios AP-1 y NF κ B se encuentran muy aumentados.

GR unido a su ligando interacciona directamente con la subunidad c-Jun de AP-1, dando lugar a una inhibición funcional mutua (Yang-Yen *et al.*, 1990). Dicha interacción está mediada a través de un sitio de la molécula del GR distinto del utilizado para interaccionar con NF- κ B (Tao *et al.*, 2001). Además, también se ha descrito la regulación mediante competición por cantidades limitantes de coactivadores como CBP y SRC-1, aunque igual que en el caso de NF- κ B, esta forma de regulación es materia de debate (De Bosscher *et al.*, 2003).

Otro mecanismo adicional, descrito en algunos genes, es el de la unión del complejo hormona-receptor a AP-1 directamente sobre el ADN, bloqueando el acceso de los factores de transcripción o a la maquinaria transcripcional.

2.4.3. Interacción GR/STAT.

Numerosas citoquinas tienen en su dominio citoplasmático actividad de fosforilación de residuos de tirosina denominadas Janus quinasas. Estas actúan como sitio de anclaje para los factores transcripcionales STAT (Transductores de Señales y Activadores de la Transcripción), que al fosforilarse se dimerizan, pasan al núcleo y aumentan la transcripción de ciertos genes. Existen varias Janus quinasas y varios STAT y la combinación de los mismos da la especificidad de acción de las citoquinas que actúan por este mecanismo (Barnes *et al.*, 1998). Esta vía de expresión es importante para la acción de los interferones IL-4 e IL-12.

Los corticoides inhiben la acción de algunos STAT por interacción directa o antagonizando su actividad sobre moléculas co-activadoras como el CBP (Stocklin *et al.*, 1996).

2.4.4. Interacción GR/CBP.

CBP (proteína de unión al CREB) es un coactivador que regula la actividad transcripcional, entre otros, de genes proinflamatorios. CBP, junto con p300 y con PCAF (p300/CBP associated factor), forma parte de las moléculas coactivadoras (Torchia *et al.*, 1997). Cuando el GR y otros factores transcripcionales (CREB, AP-1, STAT, NFκB), se unen a las mismas en sitios específicos para cada uno de ellos, activan su función enzimática de acetiltransferasa (HAT), produciendo la acetilación de residuos de lisina en la región N terminal de las histonas.

El CBP puede asociarse con el pCAF (Yang *et al.*, 1996). Éste contiene dominios con importante actividad acetiladora de histonas.

Cuando factores de transcripción proinflamatorios -como NF-κB y otros- son activados, se unen a secuencias específicas de ADN y, posteriormente, interaccionan con un amplio número de moléculas co-activadoras, tales como p300/CBP y PCAF. Estas moléculas co-activadoras actúan como un conmutador que controla la transcripción génica (Ogryzko *et al.*, 1996; Roth *et al.*, 2001) que, en definitiva, va a iniciar la transcripción de genes. Este mecanismo molecular es común a todos los genes proinflamatorios, incluso a aquellos que están implicados en la diferenciación, proliferación y activación de células (Barnes *et al.*, 2003). Por lo tanto, los HATs actúan como coactivadores que “encienden” la expresión génica, mientras que las deacetilasas de histonas (por ej. HDACs) “apagan” dicha expresión. La deacetilación es, de esta manera, un proceso activo que requiere la unión del receptor hormonal a moléculas co-represoras. Esta acción condensa el ADN y evita su copiado, reprimiendo la expresión de genes inflamatorios (De Bosscher *et al.*, 2000) (Figura 7).

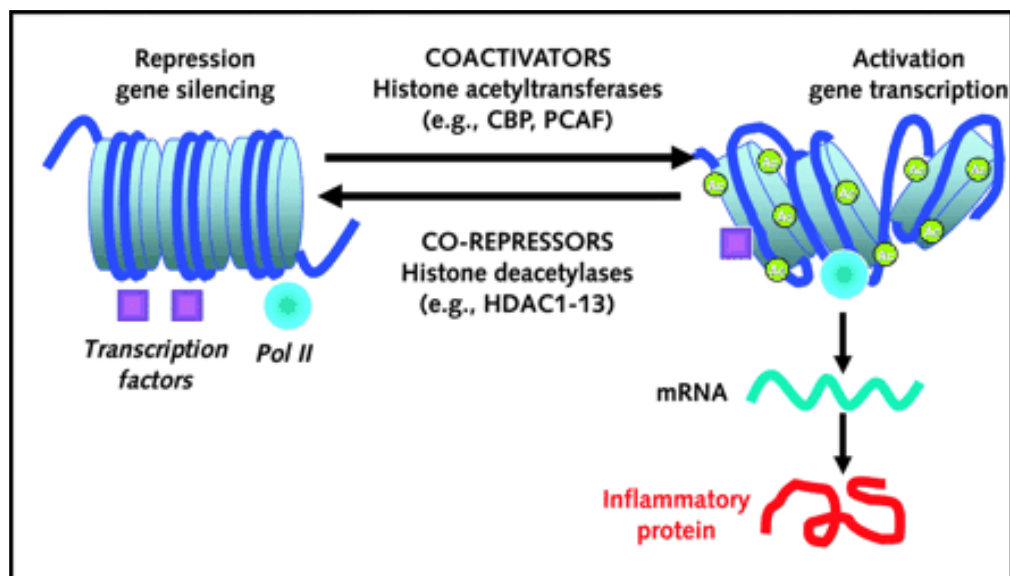


Figura 6. La activación y represión génica están reguladas por la acetilación de histonas. La acetilación de histonas está mediada por co-activadores, los cuales tienen una actividad acetiltransferasa intrínseca, mientras que la represión está inducida por deacetilasas de histonas (HDACs), las cuales reversion esta acetilación. **CBP** = proteína de unión al CREB (*cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein*); **PCAF** = p300/CBP-associated factor. Tomado de Barnes *et al.*, 2003.

2.5. Modelos animales que abordan el estudio funcional de GR.

Para definir el papel de GR en la endocrinología de mamíferos, se han desarrollado modelos murinos mutantes que conducen a una pérdida total de función de dicha proteína, ocasionando letalidad al nacimiento, lo que impide el estudio de su función en el animal adulto. Para evitar esta situación, se han generado mutaciones más refinadas en el gen de GR que limitan el efecto de la mutación a un tejido específico o a un tipo celular específico, lo que posibilita el estudio del animal mutante en la vida adulta. Utilizando estrategias de *targeting* genético mediante el sistema Cre/loxP, ha sido posible generar mutaciones específicas de célula u órgano así como alteraciones selectivas de función (Nagy, 2000).

Líneas germinales mutantes GR. Los ratones portadores de una mutación que inactiva el GR mueren inmediatamente después del nacimiento y sufren atelectasia pulmonar, demostrando que GR es imprescindible para la supervivencia; los recién nacidos presentan un deterioro en la síntesis de enzimas encargadas de la gluconeogénesis hepática;

así mismo, la regulación de la síntesis de GCs, a través del eje HPA, se encuentra deteriorada, lo que determina un incremento de los niveles plasmáticos de corticosterona y ACTH. Los timocitos derivados de ratones *knock-out* en GR resisten la apoptosis inducida por GCs (Cole *et al.*, 1995; Tronche *et al.*, 1998).

Mutantes GR para función-selectiva: GR^{dim}. Los ratones mutantes obtenidos mediante la tecnología Cre-lox P, que presentan un defecto en la dimerización de GR permiten el estudio de los mecanismos de acción de GR independientes de la unión al ADN *in vivo*, ya que la mutación impide que los homodímeros GR se puedan unir al ADN, mientras que la actividad de regulación génica producida por interacciones proteína-proteína permanecen intactas. El ratón GR^{dim} es viable y no presenta atelectasias pulmonares al nacimiento, conservando una importante actividad antiinflamatoria mediada a través de GR (Reichardt *et al.*, 1998, 2001).

Mutaciones condicionales del gen de GR: GR^{floxed}. Para analizar las funciones de GR en varias células y/o tejidos se generaron mutaciones que ocasionan una pérdida de la función de GR específica de tejido (GR^{null}). La pérdida de función de GR en el sistema nervioso central deteriora la regulación del eje HPA, ocasionando un incremento de los niveles de GCs que lleva a unos síntomas que recuerdan a los observados en el síndrome de Cushing (Tronche *et al.*, 1999).

Ratones transgénicos que sobreexpresan GR: YGR. Los ratones transgénicos YGR (*yeast GR*) portadores de dos copias extra del gen que codifica para GR, presentan una alteración en la regulación basal del eje HPA, mostrando una expresión reducida de CRH y ACTH, lo que determina una reducción, en cuatro veces, del nivel basal de GCs circulantes y un aumento, en diez veces, de la sensibilidad de los timocitos a la apoptosis inducida por GCs (Reichardt *et al.*, 2000).

3. DERIVADOS ECTODÉRMICOS EN MAMÍFEROS.

A grandes rasgos, se distinguen tres etapas en la organogénesis: a) *la iniciación*, en la cual un conjunto de células reciben e interpretan información posicional para iniciar la formación de un órgano en el lugar y momento correctos; b) *la morfogénesis*, durante la cual las células construyen el rudimento de un órgano, y c) *la diferenciación*, en la que las células forman estructuras específicas de ese órgano (Peters and Balling, 1999).

Del ectodermo primitivo en el ratón deriva el sistema nervioso, los órganos sensitivos (ojo, oído, nariz), la cola y extremidades, la boca, el ano y la piel y anejos cutáneos tales como pelos, vibrisas y glándulas anejas (mama, Meibomio, prepuciales, etc.) (Rough, 1990).

3.1. La piel.

La piel es el órgano más extenso en mamíferos que recubre toda la superficie corporal. Se divide en tres capas: epidermis, dermis e hipodermis, cada una de ellas con estructura y función diferentes. La epidermis deriva del ectodermo primitivo y la dermis e hipodermis del mesodermo.

La epidermis deriva de una única capa de células ectodérmicas embrionarias. En esta capa de células comienza una estratificación regional el día E9 del desarrollo embrionario para producir una capa de células aplanadas: el peridermo (b en Figura 7, Theiler, 1989; Kaufman, 1992). Más adelante (E12) en el proceso de estratificación epidérmica se produce una nueva capa de células proliferativas denominada estrato intermedio (c en Figura 7) (Hanse, 1947; Sengel, 1976), también de forma regional. En el desarrollo y mantenimiento de un epitelio estratificado como la epidermis juega un papel determinante p63, un homólogo del supresor tumoral p53 al que se considera marcador de células troncales epiteliales (Koster *et al.*, 2004). En este momento del desarrollo embrionario, las mitosis están presentes en la capa basal, el estrato intermedio y en el peridermo. Es probable que en las primeras fases del embrión la estratificación se logre por una actividad mitótica, más que por la vía de la migración celular, como ocurre en la epidermis madura (Smart, 1970; Sengel, 1976). Por lo tanto, el proceso de proliferación en la estratificación epidérmica embrionaria difiere radicalmente de la estratificación asociada

a la diferenciación terminal, donde la salida de células del ciclo celular precede a la estratificación. Durante esta fase de desarrollo (E12-E15), en la piel, la actividad proliferativa de los estratos basal e intermedio transcurre en paralelo con la expresión de las queratinas K5 y K14 (Byrne *et al.*, 1994); estas queratinas son normalmente consideradas como marcadores de la capa basal en la epidermis madura (Fuchs, 1996) por lo tanto, la expresión de K5/K14 en las capas suprabasales demuestra la naturaleza única de la piel en el embrión, en la cual se producen cambios en la expresión de diferentes queratinas que no tienen probablemente un significado funcional hasta el nacimiento (Fuchs *et al.*, 1996; Magin *et al.*, 1998).

Hacia el día E15 las células del estrato intermedio comienzan la diferenciación terminal y las queratinas K1 y K10 hacen su aparición convirtiéndose en marcadores del proceso (d en Figura 7).

Hacia el día E16 de la gestación, la diferenciación terminal casi se ha completado, al aparecer el estrato córneo (e en Figura 7).

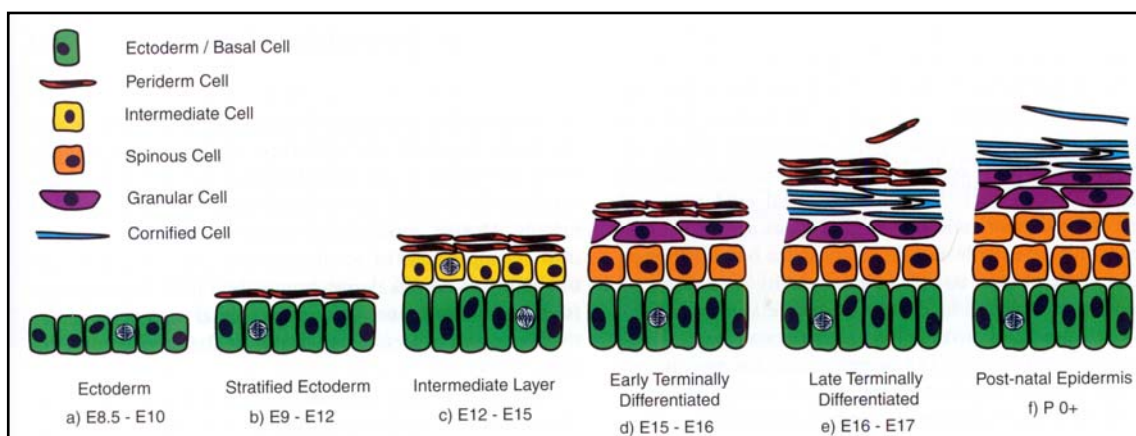


Figura 7. Estratificación epidérmica en el desarrollo embrionario del ratón. Desarrollo epidérmico desde una sola capa de células ectodérmicas hasta la epidermis postnatal estratificada. Tomado de Byrne and Hardman, 2002.

La primera finalidad de la piel madura es proporcionar una barrera, física e inmunológica, para la protección del medio interno frente al medio ambiente. Además, en mamíferos, la piel tiene apéndices (pelos, uñas, glándulas) que proporcionan sensibilidad y favorecen la termorregulación.

La epidermis madura está constituida por dos tipos de células, los queratinocitos, que constituyen el 90% de la población, y las células dendríticas; la diferencia entre ambos tipos de células estriba en que los queratinocitos poseen citoplasma amplio y uniones intercelulares muy fuertes. A medida que se diferencian a células queratinizadas, los queratinocitos se disponen en 4 capas o estratos: basal, espinoso, granuloso y córneo; un estrato adicional, el estrato lúcido, aparece en las áreas de piel que poseen un estrato granuloso y córneo muy grueso (Murphy, 2005). En el ratón, la piel fina se localiza en las regiones cubiertas de pelo, mientras que la piel gruesa se localiza en zonas sin pelos como la región palmar y plantar, la cola, pezones, ano, vulva y prepucio (Gude *et al.*, 1982).

En la piel madura, los queratinocitos derivan de las células madre localizadas en la capa basal o proliferativa de la epidermis (Watt and Hogan, 2000; Fuchs and Segré, 2000). Los queratinocitos derivados de la división de estas células troncales o *stem cells*, denominados células de proliferación transitoria (*transit amplifying cells*) experimentan una proliferación limitada en la capa basal y, finalmente, se retiran del ciclo celular. En respuesta a señales no identificadas, los queratinocitos de la capa basal en fase G₀/G₁ pierden el contacto con la membrana basal actuando sobre los receptores de integrina y se desplazan hacia el exterior. En este momento, los queratinocitos alteran su programación de expresión génica y producen proteínas y lípidos característicos de la epidermis y del estrato córneo protector. La queratina, el principal producto proteico de los queratinocitos protege la epidermis del estrés mecánico (Fuchs *et al.*, 1996) y participa en la formación del estrato córneo (Candi *et al.*, 1998).

Las células del estrato córneo son anucleadas y planas, conteniendo en su interior una matriz de agregados de queratinas, rodeadas por una envoltura corneal, resistente e impermeable, que contiene lípidos. Los queratinocitos que migran desde la capa basal reemplazan las células perdidas mediante la descamación progresiva de las células del estrato córneo al medio ambiente. Este ciclo dinámico de producción de queratinocitos, diferenciación y descamación es denominado *diferenciación terminal* o *queratinización*. Uno de los desafíos en el campo de la dermatología es entender como se logra este equilibrio entre proliferación y diferenciación.

Las células epidérmicas se adhieren las unas a las otras mediante uniones intercelulares muy fuertes –desmosomas- y a la membrana basal vía hemidesmosomas y

receptores de integrina. La membrana basal se encuentra anclada a la dermis subyacente merced a un anclaje fibrilar (Figura 9). Las principales células dérmicas, los fibroblastos, se encuentran dispuestas entre una matriz de colágeno, fibras elásticas y fibronectina. Epidermis y dermis interactúan durante el desarrollo de tal manera que en el adulto dan lugar a los apéndices de la piel: uñas, glándulas pilosebáceas y folículos pilosos.

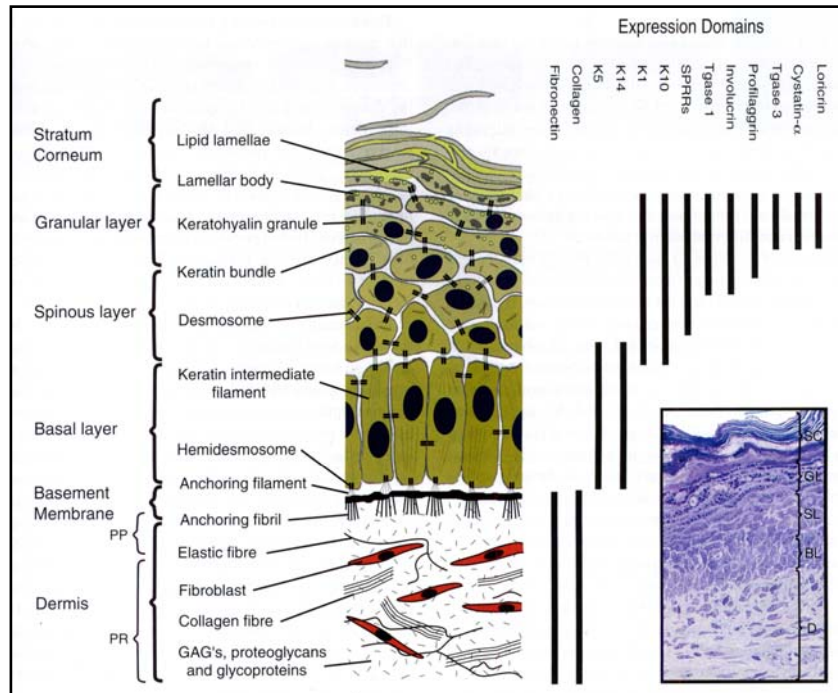


Figura 8. Representación esquemática de la piel madura. Se muestran los dominios de expresión de las proteínas estructurales específicas en cada estrato celular. Tomado de Byrne and Hardman, 2002.

Las conexiones epidermis-dermis comprenden una serie de puentes y nexos especialmente en las zonas de piel que carecen de vello. Las protusiones dérmicas en la epidermis se conocen como papilas dérmicas y las protusiones epidérmicas en la dermis se denominan puentes reticulares (*rete ridges*). La arquitectura macroscópica de la piel es importante porque se cree que las papilas dérmicas y los puentes reticulares proporcionan un microambiente para las *stem cells* epidérmicas y para las células *transient amplifying* (Cotsarelis *et al.*, 1990). En los últimos años se ha propuesto que las células madres de la epidermis se encuentran en los folículos pilosos (Lavker and Sun, 2000; Taylor *et al.*, 2000). Las células madre foliculares residen en la zona del *bulge* (Cotsarielis *et al.*, 1990; Morris and Potten, 1999) y son bipotentes o capaces de diferenciarse entre ambas líneas

celulares, epidérmicas o foliculares. Las células madre foliculares que derivan del *bulge* pueden migrar horizontalmente a la epidermis interfolicular, donde proporcionan una fuente de renovación epidérmica.

3.2. Los anejos cutáneos.

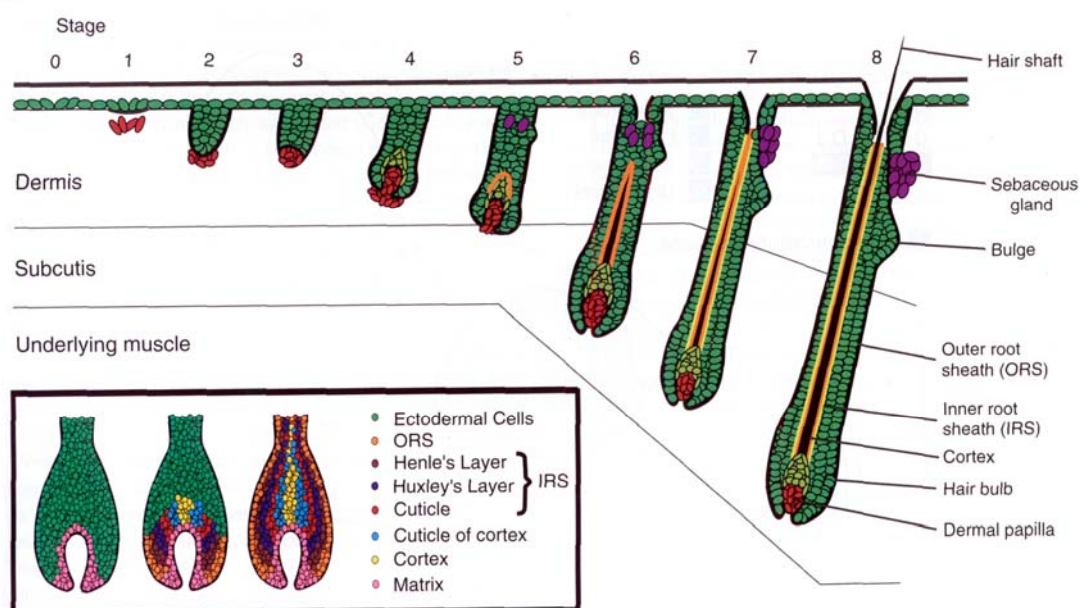
El desarrollo de cualquier anejo epidérmico implica una decisión binaria llevada a cabo por células epidérmicas, respecto al destino del apéndice al que le sigue su morfogénesis y diferenciación.

Durante el período de estratificación de la piel en los ratones, los anejos cutáneos (pelos, uñas y glándulas sebáceas y ecrinas) se forman a partir del ectodermo y del mesénquima, gracias a un programa muy bien caracterizado de movimientos celulares y cambios proliferativos; los cambios iniciales de todos los apéndices en desarrollo (por ejemplo los estadios de 0-3 del desarrollo del folículo según Davidson and Hardy, 1952) son similares, mientras que las fases más tardías dan lugar a cambios muy distintos que originan los diferentes tipos de apéndices (Byrne and Hardman, 2002).

Diferentes estudios han mostrado que en la morfogénesis de los apéndices epidérmicos se encuentran implicados una serie de interacciones recíprocas o señales entre el mesénquima (dermis) y el epitelio (Paus and Cotsarelis, 1999; Paus *et al*, 1999). Parece ser que las señales iniciales que codifican el mensaje “haz un apéndice” proceden del mesénquima y que cualquier tejido ectodérmico es competente para responder (Byrne and Hardman, 2002). El ectodermo responde a este primer mensaje formando una placoda ectodérmica o un grupo de células con forma alargada. Esta placoda ectodérmica se vuelve parcialmente autónoma y a su vez envía señales a una dermis inespecífica para que se vuelva morfogenéticamente activa. Las células mesenquimales se condensan bajo la placoda y forman un centro de señales que persisten en algunos apéndices cutáneos, como en el folículo piloso maduro en forma de papila dérmica (Wessells, 1965). Ulteriormente un “segundo” mensaje dérmico enviado al ectodermo puede incluir información, e instrucciones detalladas, sobre el tipo de apéndice específico según la región donde se encuentren.

3.2.1. Pelos.

Una característica común a los mamíferos es que presentan la superficie corporal cubierta de pelo. La función principal de los folículos pilosos es la de producir fibras o pelos. En el esquema inferior se describe la morfogénesis de los folículos pilosos durante el desarrollo embrionario, a partir del ectodermo, siguiendo la clasificación en 8 fases propuesta por Davidson y Hardy (1952). En la fase 0 se forma la placoda ectodérmica; en la fase 1, los fibroblastos de la dermis se acumulan por debajo de la placoda; en la fase 2 las células de la placoda se invaginan hacia la dermis formando el germen folicular; en la fase 3 se forma la cavidad folicular por la invasión del germen folicular por parte del agregado de fibroblastos de la dermis; la fase 4 se caracteriza por la aparición del cono de la vaina radicular interna; en la fase 5 se alarga la vaina radicular interna y aparece el *bulge*; en la fase 6 aparecen las glándulas sebáceas y el tallo del pelo y se cierra la papila dérmica; en la fase 7 se alargan todas las estructuras; finalmente, en la fase 8 se completa el desarrollo del folículo piloso cuando emerge el tallo del pelo al exterior. Postnatalmente, por la migración y diferenciación de células desde la matriz germinativa (células en rosa en el rectángulo del esquema inferior) se producen las distintas capas del folículo piloso maduro: matriz, corteza, cutícula cortical, vaina radicular interna constituida por 3 capas – cutícula, capa de Huxley y vaina de Henle- y vaina radicular externa.



El folículo piloso desarrollado se localiza en la dermis y se acompaña de glándulas sebáceas y un músculo liso piloerector. Tras el nacimiento, los mamíferos presentan un número fijo de folículos pilosos que no suele aumentar a lo largo de la vida (Stenn and Paus, 2001).

En el ratón existen ocho tipos de pelo: pelos corporales o del tronco, pelos sensitivos, pestañas, pelos de la cola, pelos auriculares, pelos alrededor de los pies, pelos de la región pudenda y pelos de los pezones (Sundberg, 1994). Los pelos corporales son los mayoritarios y se dividen en cuatro tipos principales: los pelos *guard* y *awl*, que son más largos y gruesos y los *auchene*, y *zigzag* que son más cortos y finos (Sundberg, 1994).

Los pelos sensitivos en el ratón, con funciones táctiles, son abundantes en los labios, mejillas y en el interior de la boca. Estos pelos son muy largos y se denominan vibrisas. Aunque su estructura es similar a la de los folículos pilosos corporales, las vibrisas son más largas y están rodeadas por senos venosos y terminaciones nerviosas; también se acompañan de glándulas sebáceas, pero el músculo piloerector no es liso sino estriado (Gude *et al.*, 1982).

Todos los folículos pilosos maduros siguen un ciclo de crecimiento en cuatro fases: fase de crecimiento o *anagén*, fase de regresión o *catagén*, fase de reposo o *telogén* y fase de caída o *exogén*; ésta regeneración cíclica del pelo se produce a lo largo de toda la vida de los mamíferos y requiere la intervención de vías de señalización comunes a otros sistemas morfogénéticos (glándulas salivares, riñón, mama y dientes) en los cuales existe intercomunicación entre el epitelio y el mesénquima (Stenn and Paus, 2001).

3.2.2. Glándulas sebáceas.

En la piel del ratón hay cinco tipos de glándulas sebáceas o glándulas sebáceas modificadas: las glándulas pilosebáceas que acompañan a los folículos pilosos, las glándulas de Meibomio adyacentes a las pestañas en los párpados, las glándulas prepuciales en los machos y clitoriales en las hembras, adyacentes al prepucio y vulva, respectivamente, las glándulas ceruminosas del oído externo y las glándulas perianales (Sundberg, 1994).

La función de las glándulas sebáceas es la de producir una cubierta lipídica que suaviza la superficie cutánea a la vez que constituye una barrera química frente a los microorganismos (Strauss *et al.*, 1991).

Las glándulas sebáceas son glándulas holocrinas, lobuladas, formadas por unidades secretoras o acinos. La periferia de los acinos secretores contiene a las células germinativas, de forma plana o cuboide con citoplasma basófilo, que constituyen las células de reserva para la renovación de la glándula, ya que las células maduras se pierden al excretarse en un todo para liberar su contenido oleoso. Las células secretoras diferenciadas, o sebocitos, tienen el núcleo central y el citoplasma típicamente multivacuolar por la acumulación de gotas de lípidos. A medida que maduran, las células pierden el núcleo y se desintegran, descargando los restos celulares, o sebo, al conducto excretor (Urmacher, 1997).

Las glándulas sebáceas modificadas más desarrolladas son las de Meibomio y las prepuciales. Las glándulas de Meibomio o parpebrales son adyacentes a las pestañas pero no se relacionan con ellas, ya que éstas poseen sus propias glándulas pilosebáceas. (Sundberg, 1994). Estas glándulas parpebrales drenan su secreción directamente, a través de un conducto largo, en la unión mucocutánea de los párpados, con el fin de ofrecer una cobertura lipídica, protectora, a la córnea. Las glándulas prepuciales poseen conductos muy grandes, revestidos de un epitelio estratificado escamoso y drenan su secreción al saco prepucial, con el fin de lubricar la superficie del glande (Gude *et al.*, 1982).

3.2.3. Glándulas ecrinas.

Las glándulas ecrinas son las glándulas sudoríparas que en los roedores se localizan, exclusivamente, en la dermis de las almohadillas palmares y plantares (Sundberg, 1994).

Las glándulas sudoríparas están formadas por células cuboides, dispuestas en islotes pequeños, con un conducto largo y tortuoso que atraviesa la epidermis de la almohadilla y se abre a la superficie externa. La secreción de estas glándulas ecrinas lubrica la piel gruesa de las regiones palmar y plantar y regula la temperatura corporal (Munger and Brusilow, 1971).

Los acinos secretores de estas glándulas presentan una capa de células secretoras, rodeadas de células mioepiteliales que, al contraerse, favorecen la eliminación de la secreción (Hurley and Witkowski, 1962).

3.3. Dientes.

Los ratones poseen una dentición tecodonta, es decir, que los dientes ocupan alvéolos óseos, con heterodoncia o dientes de formas diferentes; concretamente poseen dos incisivos con crecimiento continuo a lo largo de la vida, y seis molares en cada maxilar. Los ratones no tienen caninos ni premolares y, entre los incisivos y molares hay una separación amplia, o diastema carente de dientes; a diferencia del hombre, sólo desarrollan una dentición (Depew *et al.*, 2002).

El avance realizado en los últimos años en el conocimiento de los aspectos moleculares de la odontogénesis permite afirmar que el desarrollo de la dentición está bajo un estricto control genético, que determina la posición, número y forma de las diferentes piezas dentarias (Arte *et al.*, 2001).

Los dientes se desarrollan en las superficies orales de los procesos faciales (mandibular, maxilar y frontonasal) a partir de interacciones entre el epitelio oral y el mesénquima subyacente derivado de la parte craneal de la cresta neural. El desarrollo de las piezas dentales es el resultado de un proceso complejo, en el cual se producen interacciones recíprocas y secuenciales entre células epiteliales y mesenquimales (Jernvall and Thesleff, 2000). La formación de brotes o yemas epiteliales es un rasgo común del desarrollo de varios órganos como el pelo, pulmón, riñón y glándulas sudoríparas y, no es sorprendente que en su formación se encuentren implicadas las mismas vías de señalización. Así, en los mamíferos, la posición en la cual una yema dental se invagina en el interior del ectomesénquima, determina el tipo específico de diente que se va a desarrollar (Depew *et al.*, 2002).

La capacidad para iniciar el desarrollo del diente recae en el epitelio (Mina and Kollar, 1987; Lumsden, 1988). El día E10-E11 del desarrollo del embrión del ratón, las células epiteliales comienzan a proliferar en los lugares de futura formación dental, generando un engrosamiento epitelial, o placoda, que se invaginará en el mesénquima

condensado a su alrededor (Figura 9). En esta fase del desarrollo del diente, el potencial odontogénico va dirigido desde el epitelio hacia el mesénquima (Kollar and Baird, 1969).

Alrededor del día E14,5 (fase de caperuza) la odontogénesis está dirigida por dos grupos específicos de células epiteliales conocidas como nudos de esmalte, que funcionan como dos centros de señalización temporales; en primer lugar actúa el nudo de esmalte primario durante la fase de caperuza y, en segundo lugar, el nudo de esmalte secundario, que sustituye al nudo primario en la fase de campana (Figura 9).

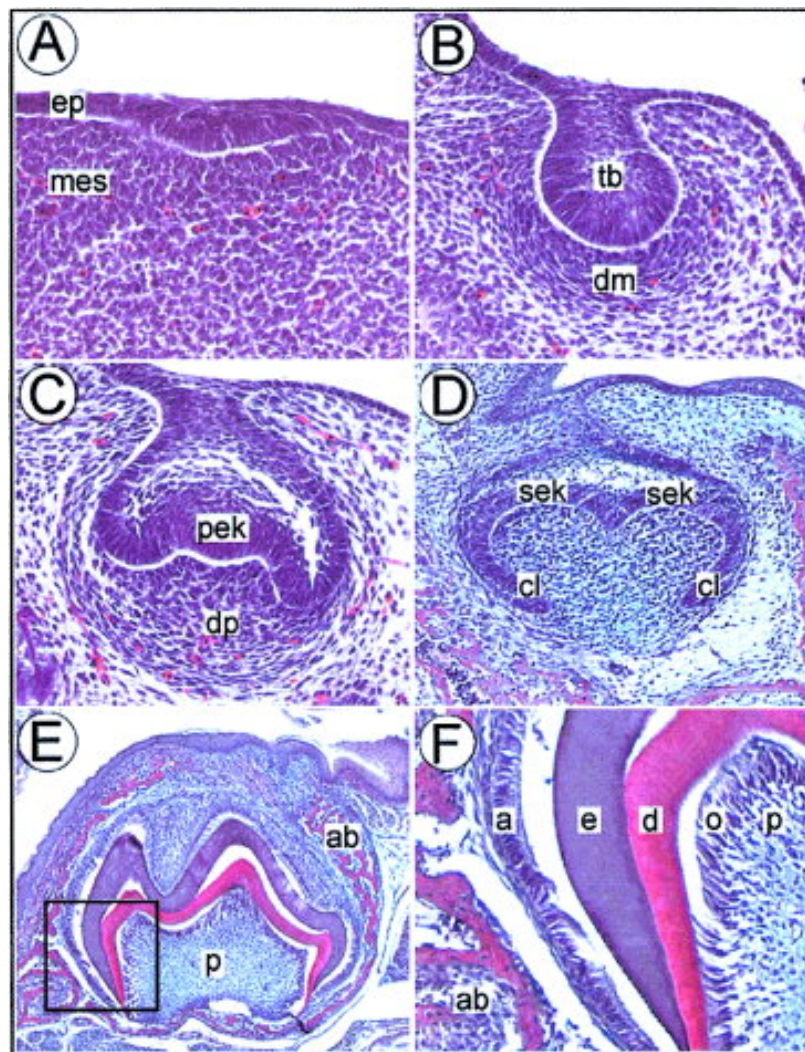


Figura 9. Fases del desarrollo de los dientes. **A:** Fase de placoda. El desarrollo del diente se inicia en el epitelio. **B:** Fase de yema. El potencial odontogénico pasa del epitelio al mesénquima. **C:** fase de caperuza. **D:** Fase inicial de campana del primer molar inferior. **E:** Fase tardía de campana del primer molar inferior. **F:** Imagen aumentada del área enmarcada en E. **a**, ameloblastos; **ab**, hueso alveolar; **cl**, lazo cervical; **d**, dentina; **dm**, mesénquima dental; **dp**, papilla dental; **e**, esmalte; **ep**, epitelio; **mes**, mesénquima; **o**, odontoblastos; **p**, pulpa; **pek**, nudo de esmalte primario; **sek**, nudo de esmalte secundario; **tb**, yema dental. Tomado de Miletich and Shape (2004).

Las células epiteliales de los nudos de esmalte no proliferan pero expresan una amplio espectro de moléculas (Jernvall and Thesleff, 2000) cuyo objetivo es lograr un equilibrio entre la proliferación celular y la apoptosis, necesario para la morfogénesis de las cúspides (Matalova *et al.*, 2004).

Los nudos de esmalte son centros de señalización clave donde se expresan varias moléculas de señalización como Shh y miembros de las familias FGF, GMP y Wnt. Estas moléculas estimulan el crecimiento de la caperuza epitelial y de la papila dental. El nudo de esmalte primario aparece en la fase de caperuza tardía y es responsable de los cambios morfológicos que ocurren durante la transición de caperuza a campana. El nudo de esmalte secundario determina la posición de las cúspides bucal y lingual en los dientes con varias cúspides.

3.4. El ojo.

El ojo está formado por tres capas de tejidos que rodean al humor vítreo, al cristalino y a las cámaras anterior y posterior. La capa más externa del ojo está compuesta anteriormente por la córnea transparente y, posteriormente, por la esclerótica opaca. La capa media está formada por el iris, el cuerpo ciliar y la coroides. La capa más interna está formada por la retina, en contacto con el humor vítreo (Klintworth and Scroggs, 1997).

Del ectodermo primitivo derivan el cristalino, la córnea, la conjuntiva y los párpados y glándulas de Meibomio (Apple and Rabb, 1998; Kaufman and Bard, 1999).

El cristalino es una lente biconvexa localizada entre la pupila y el vítreo, rodeado por una cápsula acelular PAS positiva. Solamente en la cara anterior del cristalino existe una capa de células cúbicas que rodean interiormente a la cápsula externa; al llegar al ecuador de la lente estas células se alargan y proliferan hasta desplazarse al centro o núcleo del cristalino, donde quedan retenidas de por vida. Este proceso se produce a lo largo de la vida y las células elongadas se denominan fibras del cristalino, que solamente mantienen el núcleo en la periferia y, a medida que se desplazan al centro, lo pierden por desintegración, con el fin de preservar la transparencia de la lente (Klintworth and Scroggs, 1997).

La córnea ocupa la parte visible de la cámara anterior del globo ocular cuando los párpados están abiertos. Está formada por seis capas distintas: 1) el epitelio escamoso no queratinizado, 2) la membrana basal PAS positiva, 3) la capa de Bowman, acelular, localizada justo debajo de la membrana basal, 4) el estroma corneal, que supone el 90% del grosor de la córnea, formado por haces de fibra colágenas de diámetro uniforme y disposición regular, con muy pocos fibroblastos, o queratocitos, lo que contribuye a la transparencia corneal, 5) la membrana de Descemet y 6) el endotelio corneal. Para preservar su transparencia, la córnea carece de vasos y se nutre por contacto directo con el humor acuoso de la cámara anterior y por las arterias del limbo corneal (Klintworth and Scroggs, 1997).

La conjuntiva es una membrana mucosa continua que delimita la superficie interna de los párpados y la parte anterior del ojo alrededor de la córnea. Ejerce una función protectora y permite que los párpados se deslicen suavemente por la superficie del ojo. Está formada por un epitelio cilíndrico pseudoestratificado con abundantes células caliciformes que secretan mucina, la cual se incorpora a la secreción lagrimal. Se distinguen tres áreas conjuntivales: 1) la conjuntiva parpebral, unida a la superficie interna de los párpados, 2) la conjuntiva bulbar, unida a la superficie externa de la esclerótica y 3) la conjuntiva de los fórnicies, o zona de confluencia de las dos primeras. Las células caliciformes del epitelio son más abundantes en los fórnicies.

Los párpados presentan una superficie cutánea, o externa, y otra conjuntival, o interna. La superficie cutánea está formada por epidermis y dermis bajo la cual subyace el músculo estriado orbicular de los párpados; posee glándulas sebáceas que depositan su secreción en los pelos y pestañas. La superficie conjuntival de los párpados contiene glándulas de Meibomio, el tarso y la conjuntiva parpebral. Las glándulas de Meibomio, cuyo conducto no está relacionado con folículos pilosos, drenan directamente a los bordes parpebrales.

Los ratones nacen con los párpados cerrados, que no se abren hasta los 8-10 días de desarrollo postnatal (Kaufman and Bard, 1999).

Durante el periodo embrionario, a partir del ectodermo superficial comienza la evaginación de los futuros párpados, que se hace evidente en embriones de 13,5-14,5

d.p.c.; los párpados en crecimiento se alargan sobre la superficie corneal del ojo hasta llegar a contactar el uno con el otro a los 15,5 d.p.c. (Kaufman and Bard, 1999). El párpado superior se desarrolla más precozmente que el inferior (Rugh, 1990).

La fusión de los párpados a partir de los 15,5 d.p.c. forma el saco conjuntival, que se mantiene cerrado hasta los 8-10 días tras el nacimiento, proporcionando un microambiente protector y aislante imprescindible para la maduración corneal; el cierre de los párpados protege así a la cornea de potenciales sustancias dañinas, presentes en el líquido amniótico, hasta que no se completan las fases más críticas de su diferenciación (Addison and How, 1999).

4. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LAS QUERATINAS K5 Y K14.

Las queratinas son los filamentos intermedios característicos de las células epiteliales; se caracterizan por ser heteropolímeros obligados, lo que implica que, para la formación de filamentos se requieren cantidades equimolares de una combinación de una queratina de tipo I con una del tipo II. (Steiner *et al.*, 1976). Así, pares específicos de queratinas se expresan en diferentes tipos de células epiteliales.

El par de queratinas formado por la queratina K5 perteneciente al grupo de queratinas básicas (tipo II) y la queratina K14, perteneciente al grupo de las queratinas ácidas (grupo I), aparecen característicamente en los epitelios estratificados de revestimiento, como la piel, tracto digestivo y otras partes del cuerpo donde se necesitan unas cualidades defensivas (Nelson *et al.*, 1983).

La expresión de K5 (y K14) en epitelios poliestratificados ocurre predominantemente en el estrato basal, donde se encuentran los queratinocitos con capacidad proliferativa en contacto con la membrana basal (Lersch *et al.*, 1988; Rentrop *et al.*, 1986; Schweizer *et al.*, 1984 y 1988), aunque esta proteína también puede encontrarse en capas suprabasales (Stoler *et al.*, 1988).

Además de aparecer en los epitelios escamosos, K5 y K14 también pueden expresarse en otras células epiteliales como en las células reticulares del timo, en el

epitelio glandular de la tráquea y en las células mioepiteliales (Moll *et al.*, 1982a; Purkis *et al.*, 1990; Ramírez *et al.*, 1994).

Epidermis	+++	Paladar	+++
Folículos pilosos	+++	Lengua	+++
Vibrisas	+++	Esófago	+++
Epitelio oral	+++	Estómago	+++
<i>Otros tejidos</i>			
Hígado	-	Bazo	-
Músculo	-	Páncreas	-
Cerebro	-	Vejiga de la orina	++
Duodeno	-	Fosas nasales	+++
Colon	-	Glándulas salivares	++
Timo	++	Tráquea	++
Pelvis renal	++	Pulmón	-

Tabla 1. Patrón de expresión de la queratina K5 endógena murina. (Tomado de Ramírez *et al.*, 1994).

5. DISPLASIA ECTODÉRMICA.

5.1. Concepto.

Las displasias ectodérmicas (EDs) representan un numeroso y complejo grupo de enfermedades hereditarias y no progresivas que comprenden más de 170 diferentes entidades clínicas (Pinheiro *et al.*, 1994; Priolo *et al.*, 2000).

Todas ellas están causadas por una alteración en el desarrollo de los apéndices epidérmicos y se caracterizan por un defecto primario en, al menos, uno de los siguientes tejidos: uñas (distrofia, hipertrofia, queratinización anormal), dientes (ausentes o deformados) y glándulas sudoríparas (hipoplasia o aplasia).

Las EDs son enfermedades raras que se presentan en general con una prevalencia estimada de 7 casos por 10.000 nacimientos (McKusick *et al.*, 1994).

Siguen todos los posibles modos de herencia mendeliana (autosómica dominante o recesiva y ligada al cromosoma X dominante o recesiva) y además se han descrito casos esporádicos.

5.2. Manifestaciones clínicas.

Las manifestaciones clínicas de las EDs son muy variadas (Itin and Fistarol, 2004):

Alteraciones cutáneas

- Descamación superficial, seca, de la piel al nacimiento
- Piel seca y, con frecuencia, hipopigmentada
- Dermatitis semejante a la atopia cutánea

Alteraciones en la función de las glándulas sudoríparas

- Ausencia o disminución en la sudoración
- Hipertermia en clima cálido

Anomalías en los folículos pilosos

- Pelo claro, ralo y rizado
- Alopecia por hipotricosis o por mayor fragilidad capilar
- Cejas y pestañas ausentes, escasas o malformadas

Alteraciones ungueales

- Uñas blanquecinas
- Uñas distróficas y malformadas

Alteraciones dentales

- Hipodoncia o anodoncia
- Dientes malformados con forma cónica
- Predisposición a caries dental por defectos en el esmalte o por malfunción de las glándulas salivales

Alteraciones faciales

- Dismorfía
- Malformaciones faciales múltiples

Anomalías oculares

- Displasias corneales
 - Cataratas
 - Desplazamiento o estenosis del orificio de desembocadura lacrimal
 - Secreción lagrimal defectuosa o disminuida
-

5.3. Clasificación.

Se han propuesto varias clasificaciones de EDs; Pinheiro y Freire-Maia clasificaron las EDs desde un punto de vista clínico (Pinheiro *et al.*, 1994); Priolo *et al.*, en el 2000 integraron en la clasificación los datos genético-moleculares con sus correspondientes hallazgos clínicos. Hasta el momento tan solo 30 EDs han sido explicadas a nivel molecular, al identificar el gen causante, lo cual llevó a Lamartine (2003) a proponer una nueva clasificación según la función de los genes que causan estas alteraciones.

Lamartine clasifica los genes implicados en EDs en cuatro grupos atendiendo a su implicación en las siguientes funciones moleculares: comunicación célula-célula y señalización (Tabla 2), adhesión celular, regulación de la transcripción génica y desarrollo.

ENFERMEDAD	OMIM	HERENCIA	GEN CAUSAL	PROTEÍNA	POSIBLE FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA
ED Anhidrótica (ED1)	305100	XR	EDA	Ectodisplasina	Ligando soluble, activa NF-κB
ED Hipohidrótica (ED3)	129490	AD	DL	EDAR	Receptor EDA
ED hipohidrótica	224900	AR	DL	EDAR	Receptor EDA
ED hipohidrótica	224900	AR	EDARADD	EDARADD	Interacciona con EDAR
ED Hipohidrótica (ED2, Síndrome Clouston)	129500	AD	GJB6	Cx30	Forma canales en las uniones gap
Queratoderma palmoplantar con sordera	148350	AD	GJB2	Cx26	Forma canales en las uniones gap
Incontinentia pigmenti tipo 2	308300	XD	NEMO	IKK-gamma	Regulador de la quinasa que fosforila IκB
ED Hipohidrótica/ Inmunodeficiencia	300291	XR	NEMO	IKK-gamma	Regulador de la quinasa que fosforila IκB
Síndrome OLEDAID	300301	XD	NEMO	IKK-gamma	Regulador de la quinasa que fosforila IκB

Tabla 2. Clasificación de EDs, genes y proteínas afectados e implicados en la señalización y comunicación celular. AD, Autosómica dominante; AR, Autosómica recesiva; XR, ligada al cromosoma X recesiva; XD, ligada al cromosoma X dominante. OMIM, Online Mendelian Inheritance in Man (Lamartine, 2003).

5.3.1. Displasias ectodérmicas causadas por mutaciones en genes implicados en comunicación célula-célula y señalización.

Se han encontrado mutaciones en diferentes genes que codifican para proteínas que permiten la comunicación intracelular y la señalización célula-célula que determinan diferentes formas de ED.

La displasia ectodérmica anhidrótica (EDA o ED1), es la forma más frecuente de ED en humanos. Se trata de una enfermedad ligada al cromosoma X, y se caracteriza por la ausencia de glándulas sudoríparas, de folículos pilosos y por una alteración en la formación normal de los dientes (McKusick *et al.*, 1994).

El gen responsable de EDA fue aislado en 1996 (Kere *et al.*, 1996). Este gen codifica para dos isoformas de una proteína transmembrana de clase II denominada ectodisplasina, la cual pertenece a la familia de proteínas del factor de necrosis tumoral (TNF) (Ezer *et al.*, 1999).

La ectodisplasina, al igual que otras proteínas del colágeno, forma homotrímeros antes de ser liberada por un mecanismo proteolítico (Ezer *et al.*, 1999; Elomaa *et al.*, 2001).

Las dos isoformas de la ectodisplasina EDA-A1 y EDA-A2 se unen a dos receptores diferentes: EDA-A1 se une a la proteína denominada EDAR, codificada por el gen humano homólogo al del gen murino *downless* (Elomaa *et al.*, 2001); y EDA-A2 se une a otro receptor denominado XEDAR. Una vez los trímeros se han formado en la membrana, la proteína se libera e interacciona con su receptor, induciendo la activación de la vía NF- κ B a través de la proteína adaptadora EDARADD (Headon *et al.*, 2001). Además, JNK/AP-1 es una segunda vía dependiente de EDA y de otras señales reguladoras, particularmente del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Cui *et al.*, 2002). Por consiguiente, la ectodisplasina actúa como un ligando soluble que vehicula una señal positiva para la supervivencia celular, su crecimiento y diferenciación. Esta vía de señalización está íntimamente asociada con las interacciones entre tejidos epiteliales y mesenquimatosos, y también regula la morfogénesis de los folículos pilosos (Laurikkala *et al.*, 2002).

Varios genes que codifican diferentes moléculas de la vía EDA se encuentran mutados también en otras EDs: mutaciones del gen que codifica para el receptor EDAR (DL) causan en el hombre una displasia ectodérmica hipohidrótica autosómica dominante (ED3) (Monreal *et al.*, 1999) y una displasia ectodérmica hipohidrótica autosómica recesiva (Headon *et al.*, 2001). Sin embargo, alteraciones en la proteína adaptadora EDARADD son responsables de displasia ectodérmica hipohidrótica de características autosómicas recesivas (Smahi *et al.*, 2002).

El gen NEMO codifica la subunidad reguladora del complejo quinasa IKK denominada IKK γ , un regulador clave de la vía NF- κ B. Mutaciones en la pauta de lectura del gen (*frameshift*) y mutaciones terminadoras (*nonsense mutations*) en el gen NEMO causan ED hipohidrótica con inmunodeficiencia en humanos (HED-ID) (Zonana *et al.*, 2000) mientras que deleciones severas, inserciones o mutaciones puntuales en el mismo gen producen *incontinentia pigmenti* familiar tipo II (Berlin *et al.*, 2002); otra mutación puntual en el gen NEMO es responsable de una tercera enfermedad, la ED anhidrótica con inmunodeficiencia, osteopetrosis y linfedema (Doffinger *et al.*, 2001).

Mutaciones en los genes EDA, EDAR, XEDAR, EDARADD y NEMO confirman la noción de que NF- κ B juega un papel importante en el desarrollo y homeostasis de los apéndices de la piel.

5.3.1.1. La displasia ectodérmica hipohidrótica.

La displasia ectodérmica hipohidrótica, también denominada *síndrome de Christ-Siemens-Touraine* o ED1, es la más común de las ED en el hombre; se trata de una enfermedad hereditaria recesiva ligada al cromosoma X causada por una mutación en el gen que codifica para la ectodisplasina-A1 (deleción parcial en Xq12-q13.1; Zonana *et al.*, 1993).

Este síndrome se caracteriza por hipotricosis, con un pelo fino y de lento crecimiento en la cabeza y en el cuerpo, pelo ralo en las cejas, anomalías en las uñas e hipodoncia (Gilgenkrantz *et al.*, 1989). Es típica la forma coniforme en los dientes en la dentición temporal y permanente, observándose en estudio radiológico taurodontismo o coronas con formas anómalas (Crawford *et al.*, 1991). La disminución en la sudoración de

los pacientes afectados por la enfermedad produce intolerancia al calor e incrementa la sequedad de la piel. Cuando este síndrome no es diagnosticado a tiempo, puede dar lugar a un 30% de mortalidad durante los 2 primeros años de vida (Clarke *et al.*, 1987). Sybert (1989) enfatizó que la descamación rojiza en la piel de un neonato podría ser una pista importante para el diagnóstico precoz de este síndrome. Los niños padecen intolerancia al calor, sufriendo episodios de hiperpirexia, los cuales pueden producir crisis epilépticas y daño neurológico. Las personas afectas tienen una *facies* típica, frente y labios prominentes, hipoplasia maxilar, nariz en silla de montar y arrugas lineales alrededor de los ojos. Con poca frecuencia se observa la aparición de opacidades en la córnea y cristalino, y obstrucción del conducto auditivo externo.

En mujeres portadoras se ha descrito una distribución anormal de las glándulas sudoríparas siguiendo las líneas de Blaschko, evidenciables clínicamente mediante el test del yodo-almidón (Happle and Frosch, 1985; Cambiaghi *et al.*, 2000).

Se han descrito dos formas de este síndrome: una forma “mayor” en varones, y una forma “menor” en mujeres (Pinheiro *et al.*, 1979 y 1981; Nakata *et al.* 1980).

El diagnóstico prenatal precoz de esta enfermedad puede ser realizado durante el primer trimestre de la gestación a partir de una muestra de vellosidad coriónica desde las 9 semanas de gestación (Zonana, *et al.*, 1990).

5.3.2. Displasias ectodérmicas causadas por mutaciones de genes implicados en la regulación de la transcripción.

Varios genes importantes en la regulación de la transcripción se encuentran implicados en algunos síndromes de displasia ectodérmica. p63 es un factor de transcripción estructuralmente relacionado con el supresor tumoral p53. Sin embargo, mientras p53 se expresa de forma ubicua, p63 se expresa específicamente en las superficies ectodérmicas de las placodas de los miembros, en los arcos branquiales, en los apéndices epidérmicos del embrión y en la capa basal, regenerativa, de los epitelios en el adulto.

Varios síndromes de carácter dominante, descritos en pacientes humanos, se han cartografiado en el cromosoma 3q27 y se deben a mutaciones en el gen p63. El síndrome

familiar p63 incluye displasia ectodérmica, ectrodactilia, paladar/labio hendido (EEC), anquiloblefaron y displasia ectodérmica y paladar hendido (AEC), el síndrome acrodermato-ungueo-lacrimo-dental (ADULT) y el síndrome mama-miembro (LMS) (Itin and Fistarol, 2004).

Se han generado dos modelos murinos, independientes, deficientes en p63 (Yang, 1999; Mills, 1999) que presentan características fenotípicas superponibles. Los embriones p63 $-/-$ carecen total o parcialmente de extremidades, la piel no es capaz de diferenciarse adecuadamente, lo que determina una ausencia de todo tipo de epitelios escamosos y sus derivados, incluyendo las glándulas mamarias, lagrimales y salivares; teniendo en cuenta la alteración de estructuras que dependen de las interacciones epidermo-mesenquimales durante el desarrollo embrionario, se considera que p63 es decisivo para el mantenimiento de la población de células progenitoras necesarias para sustentar un desarrollo epitelial y una morfogénesis adecuadas (Yang, 1999; Mills, 1999).

5.4. Modelos murinos de ED humana.

5.4.1. El ratón “*tabby*”.

En 1952 Falconer descubrió que una mutación espontánea del gen que codifica para EDA-A1 y que fue denominado gen “*tabby*” (*Ta*) homólogo de un gen humano localizado en el cromosoma X (Xq12-q13.1) ocasionaba defectos en los dientes, el pelo y otras glándulas exocrinas; hallazgos todos ellos similares a los encontrados en el síndrome de *Christ-Siemens-Touraine*. Por lo tanto el ratón *tabby* representa el equivalente murino de la ED1 (Srivastava *et al.* 1997). Como en humanos, las hembras homocigotas (*Ta/Ta*) y los machos heterocigotos (*Ta/Y*) de ratones *tabby* presentan ausencia de glándulas sudoríparas, un menor número de folículos pilosos (de los cuatro tipos de pelo que los ratones tienen normalmente, los ratones *tabby* pierden tres; el pelo que permanece se parece a un anormal awl), y muestran defectos en el desarrollo de los dientes y oligodoncia (Grüneberg 1965, 1966; Blecher, 1986; Pispá *et al.*, 1999). Varias glándulas se encuentran ausentes, o reducidas en número, como las glándulas sudoríparas, el sistema de las glándulas lacrimales y las glándulas salivales (Grüneberg, 1971). El fenotipo del ratón *tabby* ha sido casi completamente revertido en ratones *tabby* transgénicos que expresan la proteína EDA-A1 (Srivastava *et al.*, 2001).

El EGF inyectado de forma exógena es capaz de revertir el fenotipo del ratón *tabby* (Blecher *et al.*, 1990; Kapalanga and Blecher, 1990). Vargas *et al.* (1996) estudiaron la vía de señalización de EGF en HED/*Ta*, observando una disminución en la expresión del receptor para este factor (EGFR) en algunas membranas, tanto en pacientes con HED como en ratones *tabby*, por lo que este autor propone que la disminución de la expresión de EGFR juega un papel causal en el fenotipo de HED/*Ta* que estaría implicado en la patogenia de esta enfermedad.

5.4.2. El ratón “*downless*”.

En el ratón mutante *downless* (*dl*) se ha encontrado un fenotipo similar. Se trata de una mutación espontánea recesiva que afecta a tres tipos de tejidos: dientes, pelo y glándulas. Los incisivos y molares pueden estar deformados o ausentes (Sofaer, 1969), el desarrollo de los folículos pilosos es defectuoso, ya que se forma uno solo de los 4 tipos de pelo en el ratón y, algunas glándulas exocrinas, desaparecen o tienen un tamaño reducido, como es el caso de las glándulas sudoríparas y las de Meibomio.

El gen *downless* se encuentra en el cromosoma 10 y codifica para EDAR (Headon and Overbeek, 1999), el cual se unirá solamente con EDA-A1 que a su vez activarán la vía NF- κ B (Yan *et al.*, 2000).

El gen *dl* humano homólogo al murino es el gen EDA3 situado en el cromosoma 2q13. Este gen es responsable de las formas de displasia ectodérmica humana transmitidas de forma autosómica dominante y recesiva (Baala *et al.* 1999; Monreal *et al.*, 1999).

5.4.3. El ratón “*crinkled*”.

En 1949, Auerbach and Falconer indujeron con una mostaza nitrogenada una deleción de la región genómica que codifica para EDARADD, lo que dio lugar al ratón *crinkled* (*cr*). El gen mutado murino se encuentra en el cromosoma 13 y tiene un gen homólogo humano situado en el cromosoma 1q42 (Headon *et al.*, 2001; Thesleff and Mikkola, 2002).

El fenotipo del ratón *crinkled* se parece al ratón *tabby* y al *downless*, encontrándose afectados los dientes, pelo y algunas glándulas. Los incisivos pueden estar ausentes o reducidos en tamaño y los molares son más pequeños de lo normal con un tercer molar a menudo ausente (Gruneberg, 1965, 1966). El pelo es más fino que en los no transgénicos, apareciendo solo uno de los cuatro tipos de pelo normalmente presentes. Entre las glándulas afectadas se incluyen al menos las glándulas sudoríparas y las glándulas de Meibomio (Rao *et al.*, 1994).

Se ha sugerido que el ratón mutante *crinkled* puede ser un homólogo de una forma de displasia ectodérmica hipo/anhidrótica humana transmitida a través de una herencia autosómica recesiva (Muñoz *et al.*, 1997).

Headon *et al.* (2001) han encontrado que EDARADD y EDAR se coexpresan en células epiteliales durante la formación de los folículos pilosos y dientes. La sobreexpresión de EDARADD en células HEK293T ocasiona una activación de los genes diana de NF- κ B de forma dosis dependiente.

EDAR es activado por EDA y utiliza EDARADD como un dispositivo que ocasiona una señal intracelular de activación de la vía NF- κ B (Headon *et al.*, 2001). Esta vía longitudinal explica los fenotipos idénticos de los ratones *tabby*, *downless* y *crinkled* y también la heterogeneidad de la displasia ectodérmica humana.

5.4.4. Ratones deficientes en NF- κ B/REL.

Teniendo NF- κ B un papel protagonista de primer orden en el desarrollo de los derivados ectodérmicos que nos ocupan, no es de extrañar que ratones deficientes en NF- κ B/REL sirvan como modelo de esta enfermedad. Así, Schmidt-Ullrich *et al.* (2001) han generado (mediante *targeting*) unos ratones modificados genéticamente en los cuales se reprime la función NF- κ B en la edad adulta. Estos ratones presentan un fenotipo idéntico a *tabby* y *downless*: son mas pequeños y delgados que los no transgénicos, el pelaje es desgredado y fino presentando zonas alopecicas en mosaico en los animales viejos en la cola y detrás de las orejas, pocas vibrisas y defectos en la morfogénesis de los folículos pilosos, con un único tipo de pelo presente parecido al awl. Estos ratones también

presentan ausencia de glándulas sudoríparas y de Meibomio con atrofia de las glándulas hardenianas y retraso en el desarrollo de incisivos y molares, ocupando los incisivos posiciones anormales (Schmidt-Ullrich *et al.*, 2001).

Los derivados ectodérmicos afectados desarrollan una alta actividad NF- κ B; la supresión de esta actividad ocasiona un incremento de la apoptosis, indicando que NF- κ B actúa como un factor de supervivencia común por debajo de EDAR. Además, NF- κ B es necesario para la formación de los nódulos linfoides y para la adecuada función de los macrófagos (Schmidt-Ullrich *et al.*, 2001).

5.4.5. Ratones deficientes en TRAF6.

Ratones deficientes en el factor TRAF6 (*TNFR-associated factor 6*) presentan un fenotipo similar a la displasia ectodérmica humana. TRAF6 es una proteína adaptadora citoplasmática que se encuentra asociada al XEDAR y TROY/TAJ ambos receptores pertenecientes a la superfamilia de receptores TNF. TRAF6 por lo tanto se encarga de activar factores transcripcionales como NF- κ B (a través de la activación de IKK) y AP-1 (Cao *et al.*, 1996).

Naito *et al.*, (2002) describieron que ratones TRAF6 *-/-* presentan defectos en el desarrollo de apéndices epidérmicos, incluyendo folículos pilosos, glándulas sudoríparas, glándulas sebáceas de la piel y glándulas sebáceas modificadas como las de Meibomio, las anales o las prepuciales. Excluyendo el deterioro de las glándulas sebáceas, este fenotipo es idéntico al observado en los ratones *tabby*, *downless* y *crinkled*, por lo que es considerado como otro modelo de ED. TRAF6 asociado con XEDAR y TAJ se expresa ampliamente en los apéndices epidérmicos. TRAF6 puede transducir señales que partiendo de XEDAR o TAJ se encuentran implicadas con el desarrollo de los apéndices epidérmicos.

Una mutación en el gen que codifica para XEDAR ha sido recientemente identificado en un paciente con displasia ectodérmica hipo/anhidrótica (Smahi *et al.*, 2002).

OBJETIVOS

La generación de ratones modificados genéticamente posibilita abordar estudios funcionales *in vivo* de un producto génico determinado mediante aproximaciones de ganancia o pérdida de función. La inactivación de un gen o la sobreexpresión del gen y su proteína pueden dar lugar a cambios en la función de las células, en el desarrollo de tejidos y órganos y en la diferenciación tisular. En multitud de ocasiones estos cambios dan lugar a una patología visible en la apariencia clínica del animal y en la presencia de lesiones macro y microscópicas. Son estas anormalidades las que constituyen el fenotipo específico en el ratón.

La caracterización fenotípica de los ratones modificados genéticamente exige la realización de estudios longitudinales muy específicos de estos animales en comparación con sus hermanos de camada, de la misma edad, que tienen un genotipo normal, comenzando por la necropsia, utilizando un estereomicroscopio para descubrir la patología macroscópica, y la toma de muestras y procesado de todos los órganos del animal para el estudio histopatológico ya que, con frecuencia, aparecen lesiones totalmente inesperadas. El estudio de la patología en desarrollo exige el procesado de camadas enteras en distintas fases del desarrollo embrionario, con una orientación muy específica del embrión para su procesado, dependiendo de los órganos y tejidos a analizar. Una vez diagnosticadas las lesiones, su caracterización exige la aplicación de métodos de diagnóstico especializados tales como la inmunohistoquímica, microscopía electrónica, microscopía confocal, hibridación *in situ*, estereología celular, cuantificación, etc.

En este trabajo nos planteamos como objetivo general la caracterización fenotípica del ratón transgénico K5-GR, en el cual el cDNA que codifica para el receptor de glucocorticoides (GR) de rata se encuentra bajo el control de elementos reguladores del promotor génico de la queratina K5 (Pérez *et al.*, 2001). La sobreexpresión del GR provoca una ganancia de función en las células basales y proliferativas de la epidermis, de los folículos pilosos y de otros epitelios estratificados. En este trabajo, nos planteamos confirmar si la acción antiproliferativa de GR, que da lugar a hipoplasia de la piel y displasia de folículos pilosos en los transgénicos, se mantenía en otros tejidos corporales dianas del transgén.

Dado que las displasias ectodérmicas (EDs) humanas constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades que afectan a 7 por cada 10.000 habitantes y la importante morbilidad y mortalidad que estas enfermedades ocasionan, unido al hecho de que en los ratones transgénicos K5-GR, los tejidos de expresión de la queratina K5 tienen, en su mayoría un origen ectodérmico, nos planteamos determinar si el fenotipo de estos animales podría constituir un nuevo modelo para el estudio de la ED.

En la última década se ha descrito el antagonismo funcional mutuo entre GR y el factor de transcripción NF- κ B (Mukaida *et al.*, 1994; Scheinman *et al.*, 1995; McKay and Cidlowski, 1999; De Bosscher *et al.*, 2000; Vlaeminck-Guillem *et al.*, 2003), desempeñando este último funciones importantes en la morfogénesis embrionaria (Yamamoto *et al.*, 2004). Teniendo en cuenta que los modelos murinos de ED conocidos convergen a nivel molecular en interacciones que inhiben la actividad NF- κ B (Mikkola and Thesleff, 2003), nos planteamos confirmar desde el punto de vista inmunohistoquímico, la posible implicación de NF- κ B en la patogenia de las alteraciones presentes en los transgénicos K5-GR.

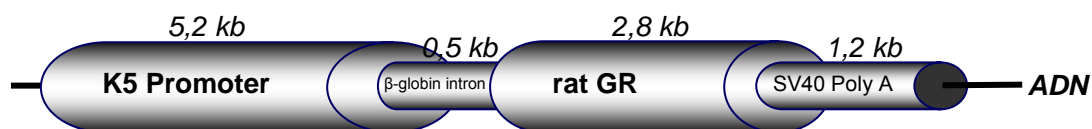
Como objetivos secundarios y, ya avanzada la investigación, tras haber confirmado la consistencia del fenotipo, nos planteamos corroborar si dicho efecto fenotípico está mediado directamente por la ganancia de función de GR en los tejidos diana. Para ello, estudiamos las modificaciones fenotípicas causadas por la exposición *in útero* al análogo sintético de los glucocorticoides, dexametasona, y al inhibidor de la síntesis de glucocorticoides metopirona, los cuales deberían agravar o rescatar, respectivamente, las manifestaciones fenotípicas patológicas descritas en los transgénicos K5-GR.

Por último, tras descubrir una insospechada hiperplasia adrenal durante el desarrollo embrionario, nos planteamos profundizar en el estudio de las alteraciones del eje hipotálamo-hipófisis-adrenales y la repercusión de su desequilibrio sobre el fenotipo presente en los ratones K5-GR.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. RATONES TRANSGÉNICOS K5-GR.

Los ratones transgénicos, denominados K5-GR, se obtuvieron mediante microinyección de la construcción K5-GR en pronúcleos de embriones (C57Bl/6xDBA/2) F2 (Pérez *et al.*, 2001). La construcción K5-GR consta de la secuencia completa de cDNA que codifica para el receptor de glucocorticoides de rata (rat GR, Miesfeld *et al.*, 1986) bajo el control de 5,3 Kb de la región reguladora de la queratina K5 bovina (K5 promoter), 0.5 Kb del intrón 5' β -globina 2 (β -globin intron) y 1.2 Kb de las secuencias 3' de poliadenilación (SV40 polyA). Los transgénicos fundadores y su progenie fueron identificados mediante análisis de transferencia de DNA a soporte sólido (*Southern blot*) a partir de muestras de biopsias de cola digeridas con el enzima de restricción EcoRI, utilizando una sonda específica para la región reguladora del gen bovino de la queratina K5 o por PCR mediante la utilización de los oligonucleótidos β -globina 5'-TGC ATA TAA ATT CTG GCT GGC G-3' y GR380 5'-GTA GCC CAA GTC ATT CCC CAT C-3' que amplifican un fragmento de 650 bp utilizando las siguientes condiciones: 94°C 2min, (94°C 1min, 55°C 1min, 72°C 1min) 30 ciclos), 72°C 5min.



Un primer paso, previo al estudio del fenotipo de los animales generados, fue la demostración de que los niveles de transcripción/traducción del transgén eran los adecuados y que se producían en los tejidos esperados, es decir, en aquellos en los que se expresa la queratina K5. Para ello, la expresión del transgén fue analizada en todas las líneas transgénicas generadas mediante *Northern blot*, *immunoblotting* e inmunolocalización histológica.

El análisis *Northern blot* de la figura 10 muestra los niveles de mRNA de ambos receptores de glucocorticoides, el transgénico (rat GR, en la figura 10 indicado como rGR) y el endógeno (mGR), a partir de piel de cola de tres ratones fundadores y de piel del lomo

de ratones transgénicos recién nacidos y adultos de la generación F1. La banda de peso molecular alto que corresponde a mGR fue detectada en todas las muestras, mientras que el mRNA correspondiente al transgén rat GR, aparece exclusivamente en los ratones transgénicos. En todas las muestras, el fundador de la línea 285 y, sobre todo, el fundador de la línea 72, expresaron mayor cantidad de mRNA transgén. Como control interno para la carga de RNA se utilizó 7S ribosómico.

Mediante SDS-PAGE *immunoblotting* se detectó que ambos GR, endógeno y transgén, migraban como una única banda de 94 kd, incrementándose los niveles de proteína en la piel del lomo de los transgénicos en comparación con los no transgénicos. El que hayamos llevado a cabo nuestros estudios en las líneas 72 y 285 se debe a que ambas presentaban la mayor expresión del transgén, tanto en niveles de mRNA como en niveles de proteína.

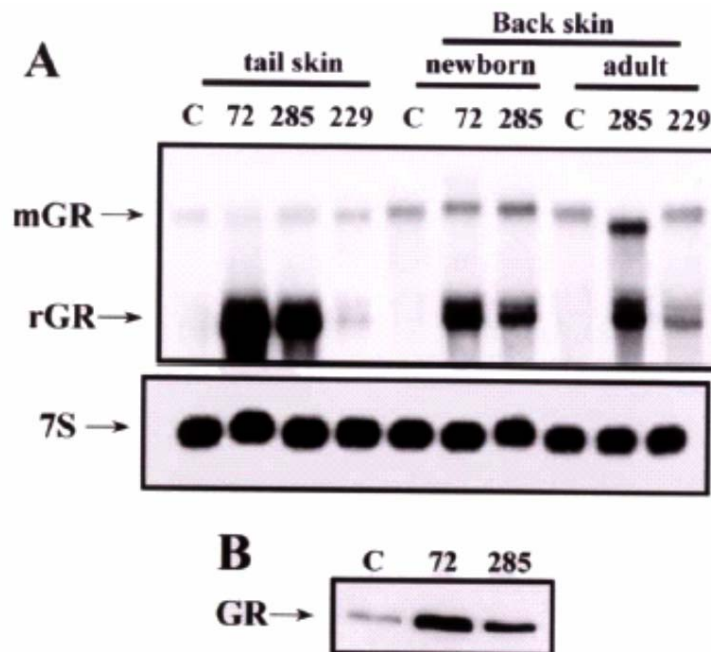


Figura 10. Northern blot e immunoblotting de las líneas transgénicas K5-GR generadas. A) Análisis *Northern blot* usando RNA de piel de no transgénicos y tres líneas transgénicas. El ARN obtenido de la piel de la cola o lomo fue hibridado usando cDNA de GR como sonda, y se detectaron el GR de ratón (mGR) y el GR transgén de rata (rGR). 7S ribosómico fue utilizado como control para la carga de RNA. **B)** *Immunoblotting* utilizando extractos de células procedentes de piel del lomo de recién nacidos no transgénicos y transgénicos de la línea 72 y 285 frente al anticuerpo anti-GR. Tomado de Pérez *et al.*, 2001.

En este trabajo, hemos utilizado dos líneas de ratones transgénicos K5-GR: la línea 72 (con 12 copias integradas del transgén) y la línea 285 (con 10 copias integradas del transgén). La línea 72, de mayor expresión, presenta un fenotipo letal perinatal que limita el estudio histopatológico al desarrollo en embriones y neonatos, permitiendo el análisis como adulto exclusivamente del macho fundador. La línea 285, de expresión intermedia, se mantiene mediante cruces con ratones no transgénicos B6D2/F2 para la obtención de ratones transgénicos hemocigotos viables. La generación de ratones homocigotos de la línea 285 da lugar a ratones que mueren perinatalmente, con un fenotipo muy similar al observado en la línea 72.

2. MANEJO DE LOS ANIMALES Y TRATAMIENTOS.

En los tratamientos experimentales se utilizaron embriones en distintos estadios de la gestación, recién nacidos y ratones adultos K5-GR de la línea 285 y ratones no transgénicos (B6D2/F2) de la misma edad (siempre que fue posible hermanos de camada).

Para aquellos experimentos que evalúan los efectos del análogo sintético de los glucocorticoides, dexametasona (Dex) en el desarrollo de los dientes y piel, ratones hembras gestantes no transgénicas (B6D2/F2) fueron inyectadas intraperitonealmente a días alternos con una dosis de 1 µg/gestante de Dex (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) o con suero salino, comenzando el día 12,5 d.p.c. (d.p.c. = días post-concepción; la mañana del día en que fue visto el tapón vaginal es considerada como el 0.5 d.p.c.) hasta el día del parto o cesárea. Para evaluar el efecto del GR en ausencia de ligando endógeno, fueron administrados 500 µg/ml del inhibidor de la síntesis de esteroides, incluyendo los GCs, metopirona (“*Metyrapone*”, BIOMOL Research Laboratories, Inc, Plymouth Meeting, PA) en el agua de bebida a las madres gestantes (Smith y Waddell, 2000). La metopirona inhibe la actividad enzimática 11β-hidroxilasa, codificada por el gen *CYP11B*, responsable de la conversión del 11-desoxicortisol hacia cortisol y de la 11-deoxi-corticosterona hacia corticosterona. El tratamiento con metopirona reduce los niveles de GCs y altera además la biosíntesis de otros esteroides (mineralocorticoides y andrógenos) por mecanismos complejos aún no completamente elucidados (Nussey and Whitehead, 2001).

Toda la experimentación animal fue realizada en los animalarios autorizados de CIEMAT y del Instituto de Biomedicina de Valencia, en conformidad con los estándares de atención y cuidado animal descritas en los reglamentos internacionales.

3. NÚMERO DE ANIMALES UTILIZADOS.

El número total de ratones transgénicos K5-GR y no transgénicos examinados histopatológicamente fue de 216, de los cuales 44 fueron embriones y neonatos (P0) de la línea 72 (31 transgénicos y 13 no transgénicos), y 178 pertenecían a la línea 285 (n=149 transgénicos y n=29 no transgénicos).

Los ratones estudiados de la línea 285 fueron: 36 embriones de 18.5 d.p.c., 32 P0 sin ningún tratamiento, 20 P0 resultantes de los tratamientos con Dex, 22 P0 resultantes de los tratamientos con metopirona y 68 fueron ratones adultos.

4. NECROPSIA Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS.

Los ratones adultos y recién nacidos fueron sacrificados mediante inhalación en una atmósfera saturada a más del 90% de CO₂. Los embriones se obtuvieron por cesárea los días 15,5, 16,5, 17,5 y 18,5 d.p.c.

A los cadáveres se les practicó una necropsia reglada, aunque especialmente orientada hacia aquellos órganos diana del transgén (Ramírez *et al.*, 1994). Utilizamos para ello un microscopio estereoscópico *Olympus SZX12* que nos permitió la observación continua desde 0,5 hasta 60X de todo el proceso de disección, así como la realización de fotografías digitales de las alteraciones macroscópicas observadas mediante una cámara digital *Olympus E-20p* acoplada al sistema.

De forma resumida el protocolo de necropsia empleado comenzaba con la inspección externa, que incluyó el registro del peso, determinación del estado de nutrición y desarrollo músculo-esquelético, características del pelaje, examen de las alteraciones en la piel y de las alteraciones presentes en orificios naturales: ojo, boca, oídos, nariz y ano; se determinó el número de dientes presentes y ausentes (fórmula dental) y sus alteraciones morfológicas, se examinó el paladar duro/blando y la mucosa oral. Se arrancaron muestras

de pelo del lomo y vibrisas que se mantuvieron en *ependorf* con etanol 70° para su posterior análisis y cuantificación. Tras la inspección externa, se tomaron muestras de piel de la cabeza, lomo, cola, hocico, pabellón auricular y regiones palmar y plantar, teniendo especial cuidado en disecar junto, con la piel, las glándulas sudoríparas localizadas en el tejido subcutáneo.

A continuación, disecamos ambos ojos realizando una incisión circular en la piel de la región periorbitaria, seccionando después las inserciones de los músculos periorbitales hasta liberar cada uno de los ojos junto con los párpados, las estructuras tarsales y glándulas Harderiana y lacrimal.

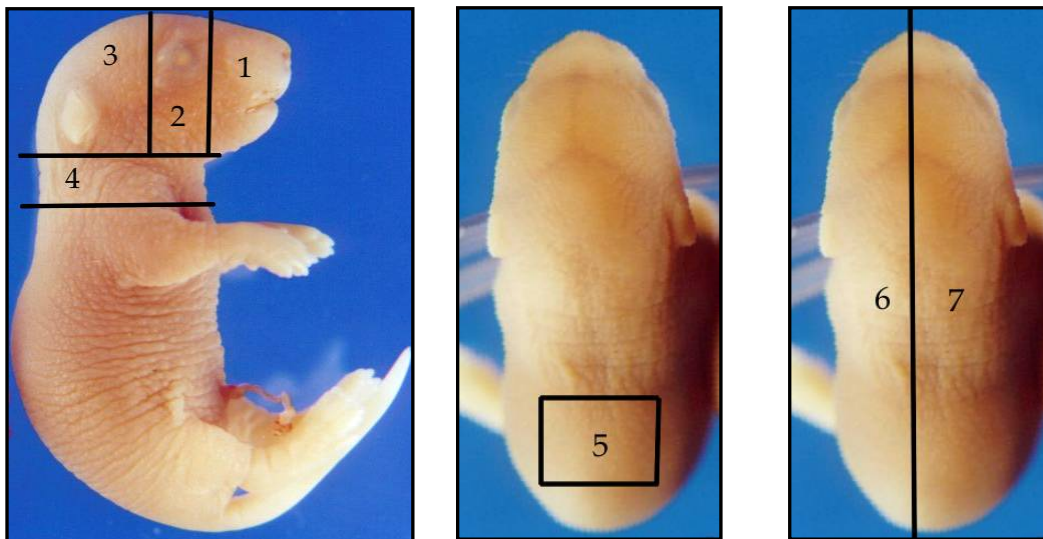
El examen interno comenzaba con la incisión longitudinal en la piel desde el pubis hasta la barbilla y la separación adecuada de la piel de la musculatura subyacente lo que permitió examinar, fotografiar y la toma de muestras de las alteraciones del tejido subcutáneo, los nódulos linfáticos y glándulas mamarias. En los machos disecamos y fijamos a continuación las glándulas prepuciales, que se extrajeron y procesaron unidas al pene. Después se procedía a la apertura de la cavidad abdominal mediante una incisión medio sagital en la pared muscular lo que permitió la observación macroscópica de las vísceras antes de su remoción al exterior. Seccionando el tubo digestivo a nivel del recto y en el esófago a nivel del cardias y disecando progresivamente el mesenterio, la totalidad del tubo digestivo pudo ser estirada, facilitando su examen, anotando en este momento el número de placas de Peyer presentes a lo largo del intestino, el aspecto y tamaño de la tonsila cecal y de los ganglios linfáticos mesentéricos. Se tomaron muestras para el estudio histopatológico de estómago, duodeno, colon, ciego, linfonodos mesentéricos, hígado, bazo, páncreas, riñones, glándulas adrenales, estructuras vasculares abdominales y aparato genital femenino y masculino. Los riñones y glándulas adrenales de los ratones recién nacidos fueron procesados como se indicará en el siguiente apartado. Antes de la apertura de la cavidad torácica disecamos y tomamos muestras de las glándulas salivares parótida, submaxilar y sublingual.

El timo fue el primer órgano examinado, disecado y extraído una vez abierta la cavidad torácica en animales jóvenes. Los órganos torácicos, corazón, pulmones, tráquea, tiroides y vasos sanguíneos principales fueron removidos simultáneamente, examinados y procesados.

Abriendo una de las articulaciones témporo-mandibulares disecamos y removimos la lengua y la totalidad de la mucosa que recubre el paladar duro y blando.

Para completar la autopsia abrimos la cavidad craneal mediante un corte transversal a nivel del septo nasal y otros dos cortes longitudinales en el hueso occipital y en los parietales, así, la bóveda craneal era removida exponiendo el cerebro, el cual era levantado, disecado y extraído cuidadosamente lo que permitió el examen y remoción de la hipófisis intacta de la silla turca.

Para la necropsia de los embriones utilizamos los mismos materiales y metodología que en adultos, prescindiendo de la disección interna y practicando secciones diferentes según el órgano a estudiar:



- 1.- Sección coronal de la cabeza para el estudio del desarrollo del paladar.
- 2.- Sección coronal de la cabeza para el estudio del desarrollo del ojo y los molares.
- 3.- Sección coronal de la cabeza para el estudio del desarrollo de la hipófisis.
- 4.- Sección transversal del cuello para el estudio del desarrollo del timo.
- 5.- Sección tangencial de la región lumbar para el estudio del desarrollo de riñones y glándulas adrenales.
- 6.- Sección longitudinal completa del lado izquierdo.
- 7.- Sección longitudinal completa del lado derecho.

5. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE LAS GLÁNDULAS ADRENALES EN NEONATOS.

Durante la necropsia de los ratones recién nacidos y después de retirar el aparato digestivo, ambos riñones y sus respectivas glándulas adrenales fueron disecados en bloque junto con la pared abdominal posterior circundante (sección 5 del punto 5 obtención de muestras), con objeto de no distorsionar la morfología anatómica. Los bloques con los riñones se fotografiaron con una lupa digital *Olympus* MIC-D, aplicando similares aumentos y parámetros ópticos en todas las muestras.

El área de la superficie renal y adrenal se midió en las fotografías digitales utilizando el software informático *Micro Image 4.0* para Windows, *Olympus Optical CO* (Europa) GMBH. Mediante este analizador de imágenes digitales medimos el área de superficie del riñón derecho y de la glándula adrenal derecha en ratones no transgénicos y transgénicos, determinando así el tamaño proporcional de la glándula con relación al tamaño del riñón.

Para el estudio comparado de los datos obtenidos realizamos la prueba *t-Student* para diferencias de medias con igualdad de varianza. La homocedasticidad de los datos fue estimada a través de la prueba de Levene. El criterio de significación estadística fue para valores menores o iguales al 5% ($P < 0,05$). Los análisis se realizaron utilizando el software estadístico SPSS, versión 11.5.1 (Inc. Chicago 1998-2002).

6. PROCESADO DE LAS MUESTRAS.

Las muestras recogidas durante la necropsia se procesaron con una metodología diferente en función del estudio a realizar.

Para el estudio histopatológico de rutina, los embriones enteros y las muestras de adultos se fijaron en una solución de formaldehído al 10% en PBS, durante 48 horas, tras lo cual se introdujeron en una solución de etanol al 70%. Para su inclusión, se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol, se incubaron en dos soluciones de xileno y se embebieron en parafina *Gurr* o *Vogel* con punto de fusión 56-57°C. Los bloques de parafina con las muestras se cortaron en un microtomo *Leica* RM 2115 en

secciones de 4-5 μm de grosor. Las secciones se adhirieron a portaobjetos tratados con poli-L-lisina (*Sigma*) o *Vectabond* (*vector laboratories*). Tras desparafinar e hidratar las secciones, se colorearon con las siguientes técnicas de tinción:

- Hematoxilina-Eosina (Hematoxilina de *Harris*, HE).
- Ácido periódico de *Schiff* (P.A.S) y P.A.S-Azul Alcían para diferenciar histoquímicamente los mucopolisacáridos ácidos y neutros.

Para el estudio inmunohistoquímico, los embriones enteros y las muestras de adultos se fijaron en una solución de etanol al 70%, siendo procesadas con la misma metodología descrita para el estudio histopatológico.

Para el estudio con el microscopio electrónico de barrido, las cabezas de embriones no transgénicos y transgénicos de 18,5 d.p.c. fijadas en glutaraldehído al 2.5% en PBS se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol, se secaron mediante punto crítico (*Balcers* CPD 020), se metalizaron con oro-paladio en un sombreador *Jeol* JFC-11000 y se examinaron y fotografiaron en el microscopio electrónico de barrido JSM-T220A del Servicio de Investigación Agrobiológica del Campus de Lugo.

7. ESTUDIO MORFOMÉTRICO DE LA PIEL.

La cuantificación de la alopecia en los ratones transgénicos adultos fue realizada contando el número de folículos pilosos por milímetro en secciones de parafina teñidas con HE. Para contar el número de folículos pilosos, las muestras fueron obtenidas de la piel del lomo de ratones de 5 semanas de edad durante la fase de crecimiento o anagén del segundo ciclo del pelo después del nacimiento (n=7, 4 transgénicos y 4 ratones no transgénicos) y a las 20 semanas de edad, durante la fase de reposo o telogén (n=8, 4 transgénicos y 4 ratones no transgénicos). Fueron analizadas cinco secciones representativas de cada animal. El número total de folículos pilosos por milímetro fue determinado contando sobre un ocular milimetrado; solo se contaron aquellos folículos del pelo con al menos una tercera parte de su tamaño incluida en la sección; en cada animal se contaron 30 secciones a unos aumentos totales de 100X. El número medio de folículos pilosos en ratones transgénicos y no transgénicos se compararon mediante la prueba *t-Student*, utilizando el programa informático *Systat* 11.0 (SPSS Inc. Chicago, IL).

8. ESTUDIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS.

Para el análisis inmunohistoquímico las muestras, una vez desparafinadas e hidratadas, se sumergieron en peróxido de hidrógeno al 3% en PBS (0,1M a pH 7,4) para eliminar la actividad de las peroxidasas endógenas, tras lo cual, se bloquearon por incubación a temperatura ambiente durante 30 min con suero de caballo al 5% en PBS a fin de reducir el marcaje inespecífico. A continuación, se incubaron durante 1 hora a 37° C ó 18 horas a 4° C, con el anticuerpo primario correspondiente (ver tabla anexa) diluido en albúmina sérica bovina al 0,05% en PBS o en PBS-BSA 0,05%-0,001% Tx100.

Posteriormente la muestras se lavaron tres veces durante 5 minutos con PBS y se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente, con el anticuerpo secundario marcado con biotina y seleccionado de acuerdo con el origen del anticuerpo primario utilizado (dilución 1:1000 en PBS-BSA 0,05%); los anticuerpos secundarios utilizados procedían de *Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.* (West Grove, PA).

A continuación, las muestras se lavaron 3 veces durante 5 minutos con PBS. La detección del anticuerpo se realizó mediante el sistema biotina-estreptavidina-peroxidasa, utilizando la estreptavidina-peroxidasa de *Zymed* (San Francisco, CA). Como sustrato para la peroxidasa utilizamos una solución de 10 mg/ml de 3-3' Diaminobenzidina (DAB, *Sigma Aldrich Inc.*) en agua milli-Q. La reacción química se paró con agua corriente, controlando el revelado con el microscopio óptico. Posteriormente, se realizó una tinción de contraste con HE (1 min.) o con Azul de metileno (5 min.).

NOMBRE	ANTÍGENO RECONOCIDO	CARÁCTER/ ESPECIE/CLON	PROCEDENCIA	DILUCIÓN
Anti-BrdU	5-Bromodeoxi-uridina	mo/M (BMC9318)	Roche Diagnostics Corp	1:50
Anti-FSH	FSH	po/Rb	NIDDK, Torrance, CA	1:200
Anti-human ACTH	ACTH	po/Rb	Sigma Aldrich, Inc	1:2000
Anti-LH	LH	po/Rb	NIDDK, Torrance, CA	1:500
Anti-rat GR	GR rata	mo/M	Cedido por S. Okret (<i>Karolinska Institute Sweden</i>)	1:100 *
AP-2 α (h-79):sc-8975	AP-2 alfa	po/Rb	Santa Cruz, CA	1:50
GR (M-20): sc-1004)	GR	po/Rb	Santa Cruz, CA	1:100 *
IKK α (M-280): sc-7182	IKK α	po/Rb	Santa Cruz, CA	1:50
IKK β /IKK2	IKK β	mo/M (10AG2)	Imgenex, CA	1:50
IKK γ (FL-419): Sc-8330	IKK γ	po/Rb	Santa Cruz, CA	1:50
Ki67 Antigen	Ki67	mo/M (MM1)	Novocastra Lab. UK	1:200
MK5	K5	po/Rb	Babco, Berkeley, CA	1:1000
NF κ B p65 (F-6): sc-8008	p65 (relA)	mo/M (rel A p65)	Santa Cruz, CA	1:50
p63 (4A4): sc-8431	Δ Np63	mo/M (4 A 4)	Santa Cruz, CA	1:50 *
α -Growth hormone	GH	po/Rb	ICN biomedical	1:500
α -Prolactin	Prolactina	po/Rb	ICN biomedical	1:500
α -TSH	TSH	po/Rb	UCB Bioproduct (Brussels, Belgium)	1:500

← *Anticuerpos primarios utilizados*

mo: monoclonal, **po:** policlonal, **M:** ratón, **Rb:** conejo. (*): Anticuerpos diluidos en PBS-BSA 0,05%-0,001% Tx100; los demás se diluyeron en PBS-BSA 0.05%. **NIDDK:** National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease.

Para medir el grado de incorporación de BrdU en los molares de los ratones recién nacidos, se inyectó una solución de BrdU 10 mg/ml en un total de 0,1 mg/gramo de peso del animal intra-peritonealmente, una hora antes del sacrificio del animal. Los cortes histológicos desparafinados se pre-trataron una hora en HCl 2N para favorecer la desnaturalización del ADN. Tras este pre-tratamiento, el protocolo de inmunomarcaje se realizó del mismo modo que el descrito anteriormente, incubando las secciones con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-BrdU (*Roche*) diluido 1:50 (en PBS-BSA 0.05%).

En todos los marcajes realizados se utilizó un control negativo, constituido por una sección consecutiva del control positivo en la cual se realizó el mismo protocolo pero, sustituyendo el anticuerpo primario por diluyente (PBS-BSA 0.05%).

9. CUANTIFICACIÓN DEL MARCAJE INMUNOHISTOQUÍMICO.

Para cuantificar los resultados de las tinciones inmunohistoquímicas hemos utilizado las siguientes metodologías:

9.1. Cálculo de la intensidad de cromógeno.

Hemos utilizado los programas informáticos *Adobe Photoshop 7* y *Matlab 7* siguiendo el protocolo descrito por Matkowskyj KA *et al.* 2000, para determinar la intensidad de cromógeno presente en una determinada sección inmunomarcada, lo que nos permite calcular la fuerza de señal acumulada, o energía acumulada en un archivo digital que representa una porción de una imagen digital. Un algoritmo permite determinar la cantidad absoluta de cromógeno por píxel, correspondiente a una región celular o estructura determinada. Las imágenes digitales se realizaron a 1000 aumentos totales con una cámara digital *Olympus E-20p* unida a un microscopio óptico *Olympus BX61*. La riqueza de cromógeno se cuantificó calculando la fuerza de señal acumulada en 10 áreas

seleccionadas al azar (25 x 25 píxeles) por cada sección investigada. En el caso de la cuantificación inmunohistoquímica sobre secciones de molares, las áreas se colocaron sobre la capa de ameloblastos o preameloblastos, según el caso, de primeros molares superiores, tanto en no transgénicos como en transgénicos. En el caso de la cuantificación sobre secciones de hipófisis las áreas se situaron sobre el citosol de células hipofisarias (células somatotropas) al azar. Para un archivo de imagen de dimensiones N_1 por N_2 pixels, y donde n_1 y n_2 identifica la posición específica de los datos en el archivo de la imagen digital, la fuerza de señal acumulada (o energía matemática, E) se define como:

$$E = \left\{ \sum_{n_1=1}^{N_1} \sum_{n_2=1}^{N_2} [f_{red}(n_1, n_2)]^2 \right\}^{1/2} + \left\{ \sum_{n_1=1}^{N_1} \sum_{n_2=1}^{N_2} [f_{green}(n_1, n_2)]^2 \right\}^{1/2} + \left\{ \sum_{n_1=1}^{N_1} \sum_{n_2=1}^{N_2} [f_{blue}(n_1, n_2)]^2 \right\}^{1/2}$$

La cantidad de cromógeno por píxel se determinó substrayendo la energía de la sección usada como control negativo (no expuesta al anticuerpo primario) de la energía de la misma región en una sección experimental (expuesta al anticuerpo primario) consecutiva a la sección anterior. La cantidad de cromógeno se expresa en términos arbitrarios de “unidades de energía por píxel” (ue/pix) ya que se utilizan solo para comparar grupos.

Los resultados se presentan en medias y desviaciones estándar ($M \pm DS$); se utilizó la prueba del *t-Student* para el análisis estadístico; considerando significativo un valor de P menor de 0.05.

9.2. Cálculo del número de células cromógeno-positivas.

El número de células con presencia de cromógeno en el citosol y, por lo tanto positivas frente al anticuerpo utilizado, se calculó utilizando algunas de las funciones del equipo de estereología *Stereo Investigador MicroBrighField*. Este equipo utiliza un ordenador que controla una pletina motorizada (*Biopoint 2-LEP-*) en los tres ejes XYZ de un microscopio *Olympus BX61*. El software permite navegar, a tiempo real, a través de las secciones de tejidos y realizar sobre ellos barridos sistemáticos.

Para cuantificar el número de células positivas a cada una de las hormonas hipofisarias estudiadas (ACTH, TSH, LH, FSH y Prolactina), teniendo en cuenta la poca uniformidad en su expresión, se establecieron 60 pequeñas áreas de recuento, a 1000

aumentos totales, en cada una de tres secciones de distintos niveles de cada hipófisis, por lo que al final se contaron no menos de 300 células por sección (900 células por cada glándula hipofisaria). El ordenador asignaba al azar y sistemáticamente las 60 áreas de recuento sobre la muestra. Una vez identificadas y marcadas las células positivas y negativas según el criterio del investigador, el resultado para cada análisis se presentaba automáticamente por el ordenador. Se realizó el mismo protocolo de recuento en hipófisis de embriones y de ratones adultos no transgénicos y transgénicos. Los resultados se mostraron como promedios de células positivas con relación al total de células, junto a sus desviaciones estándar ($M \pm DS$); las medias se compararon mediante la prueba del *t-Student*, considerando significativo un valor de $P < 0.05$.

10. CARTOGRAFÍA DE LA HIPÓFISIS.

Para el cartografiado anatómico (*anatomical mapping*) de las células hipofisarias ACTH positivas, realizamos secciones seriadas de 5 μm de la totalidad de la hipófisis de embriones y ratones adultos no transgénicos y transgénicos que se inmunomarcaron frente a ACTH.

Utilizando el programa informático *Stereo Investigator* 6.01.2 del equipo de estereología descrito en el apartado anterior, identificamos y marcamos en un mapa cartográfico todas y cada una de las células ACTH positivas presentes en 8 secciones de cada hipófisis, utilizando para ello una de cada tres secciones realizadas e inmunomarcadas, por lo que la separación entre las secciones representadas en profundidad (eje Z) fue de 15 μm . El investigador decide si una célula es o no positiva bajo un aumento total de 1000 aumentos. Para el ensamblado final de las 8 secciones cartografiadas en una sola imagen tridimensional se utilizó el programa *Neuroexplorer* 4.01 (*MicroBrighField Inc.*).

11. DETECCIÓN DE APOPTOSIS MEDIANTE HIBRIDACIÓN *IN SITU* COLORIMÉTRICA.

Para los estudios de apoptosis de linfocitos T en el timo se utilizaron ratones transgénicos hemicigotos K5-GR (n=2) y ratones no transgénicos hermanos de camada (n=2) de un mes de edad. Después del sacrificio, se disecaron las glándulas del timo y se

fijaron no más de 24 horas en formaldehído tamponado al 10%. Las muestras se embebieron en parafina y fueron seccionadas a 5 µm de espesor.

Para la detección de células apoptóticas, utilizamos el método de Hibridación *in situ* denominado ISOL, que utiliza la ligasa de DNA T4 para ligar específicamente los fragmentos resultantes de la actividad DNasa tipo I a oligonucleótidos marcados con biotina. Para identificar el núcleo apoptótico se utilizó el *Kit ApopTagTM Peroxidase In Situ Oligo Ligation Kit (Intergen Company)*. El procedimiento utilizado, en concordancia con el protocolo indicado en el manual del *Kit* mencionado, consistió de forma resumida en: desparafinación de las secciones de 5 µm con xileno y su rehidratación gradual en diluciones decrecientes de etanol en agua; las secciones se trataron a continuación con una solución al 3% de H₂O₂; posteriormente los tejidos fueron digeridos con proteasa K durante 15 min a temperatura ambiente, lavados en PBS y sumergidos en una solución tampón (*Equilibration Buffer*) durante 5 min. Después de eliminar el exceso del líquido, cada sección se incubó con una mezcla que contenía la enzima T4 DNA ligasa y cada uno de los dos oligonucleótidos suministrados (oligo A u oligo B) en una cámara húmeda a 20°C durante 16 horas. En los controles negativos el oligonucleótido fue excluido de la mezcla. Como control positivo utilizamos secciones de tejidos humanos proporcionados por el fabricante. La reacción se detuvo lavando las secciones en PBS; después los tejidos se incubaron con un conjugado de estreptavidina-peroxidasa durante 30 min en cámara húmeda a temperatura ambiente. El producto final se visualizó utilizando como cromógeno una solución de 10 mg/ml de 3-3'-Diaminobencidina (*Sigma Aldrich Inc.*) en agua milli-Q. Como tinción de contraste se utilizó el colorante verde metilo al 0.5% en acetato de sodio 0.1M, pH 4, durante 10 min a temperatura ambiente, deshidratando posteriormente con 3 pases de n-butanol 100°.

El índice apoptótico se determinó utilizando el equipo de estereología descrito en el apartado 11.2. Se establecieron 30 pequeñas áreas de recuento, a 1000 aumentos, para la zona cortical y otras tantas para la zona medular, por lo que finalmente se contaron no menos de 500 células por sección y tejido. El ordenador asignó al azar y sistemáticamente las 30 áreas de recuento sobre cada una de las muestras. Una vez identificados y marcados los núcleos en apoptosis y los núcleos vegetativos según el criterio del investigador, el resultado para cada análisis fue mostrado por el ordenador automáticamente. Este

procedimiento se aplicó tanto a la zona medular como a la zona cortical del timo en los ratones no transgénicos y transgénicos.

12. ESTUDIOS RADIOLÓGICOS.

Para observar posibles anomalías en el esqueleto y en la osificación de los transgénicos, en comparación con los no transgénicos, se radiografiaron un total de 12 ratones transgénicos K5-GR y 4 ratones no transgénicos, todos ellos de 18 meses de edad, que previamente se habían desollado y eviscerado para minimizar la pérdida de definición de la imagen del esqueleto (densidad hueso) causada por la superposición de los tejidos blandos (densidad agua). Las radiografías se tomaron en grupos de cuatro ratones por placa, incluyendo un ratón no transgénico en cada grupo. Las tres placas radiográficas se realizaron en el Servicio de Radiología del Hospital Clínico Veterinario Rof Codina, sobre una mesa con Tubo y Telemando *Philips Diagnost 90S*, controlando los parámetros con un generador trifásico *Philips Super 80* cp. Las radiografías se realizaron en placas de mamografía AD *Mammography AD-M* de *Fujifilm*, de tamaño 18x24cm, utilizando los mismos parámetros -40 kilovoltios, 30 miliamperios y un tiempo de disparo de 320 milisegundos- en las tres ocasiones.

RESULTADOS

1. GENERACIÓN DE RATONES TRANSGÉNICOS. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL TRANSGÉN.

Los ratones transgénicos K5-GR sobreexpresan el cDNA del GR de rata bajo el control de la región reguladora 5' del gen de la queratina K5 bovina. En estudios previos se demostró que el promotor de la queratina K5 bovina es capaz de dirigir la expresión de un gen “*reporter*” hacia las células de la capa basal de la epidermis y varios epitelios estratificados, así como hacia la vaina radicular externa de los folículos pilosos (Ramírez *et al.*, 1994).

Tras la generación de los ratones transgénicos, se establecieron dos líneas de transgénicos con sobreexpresión de GR, utilizadas en este estudio, la línea 72 y la línea 285 (Pérez *et al.*, 2001). El análisis de la expresión del transgén en ambas líneas se realizó mediante técnicas de *Northern blot*, *Western blot* e inmunolocalización histológica. Como la mayor parte de nuestro estudio se refiere a la línea 285, en lo sucesivo, al hablar de “transgénicos K5-GR” nos referiremos a esta línea, a no ser que se especifique lo contrario.

Para la inmunolocalización de GR utilizamos secciones de piel incluidas en parafina de ratones recién nacidos no transgénicos y transgénicos, las cuales marcamos frente a un anticuerpo específico anti-GR (mouse GR o mGR) (Figura 11). Este anticuerpo reconoce tanto el GR endógeno como el transgénico.

En la piel de los recién nacidos no transgénicos el GR endógeno se detectó en el citoplasma y en las células suprabasales de la epidermis (Figura 11A) mientras que en la piel transgénica las células de la capa basal interfolicular y de la vaina radicular externa de los folículos pilosos aparecían, no solamente con marcaje citoplasmático, sino también con expresión nuclear muy intensa (Figura 11B), lo cual sugiere que el transgén GR se encontraba translocado en el núcleo.

La utilización de un anticuerpo específico para GR de rata (rat GR o rGR), mostró un marcaje positivo en el núcleo de las células de la capa basal de la epidermis y de la vaina radicular externa de los folículos pilosos (Figura 11C).

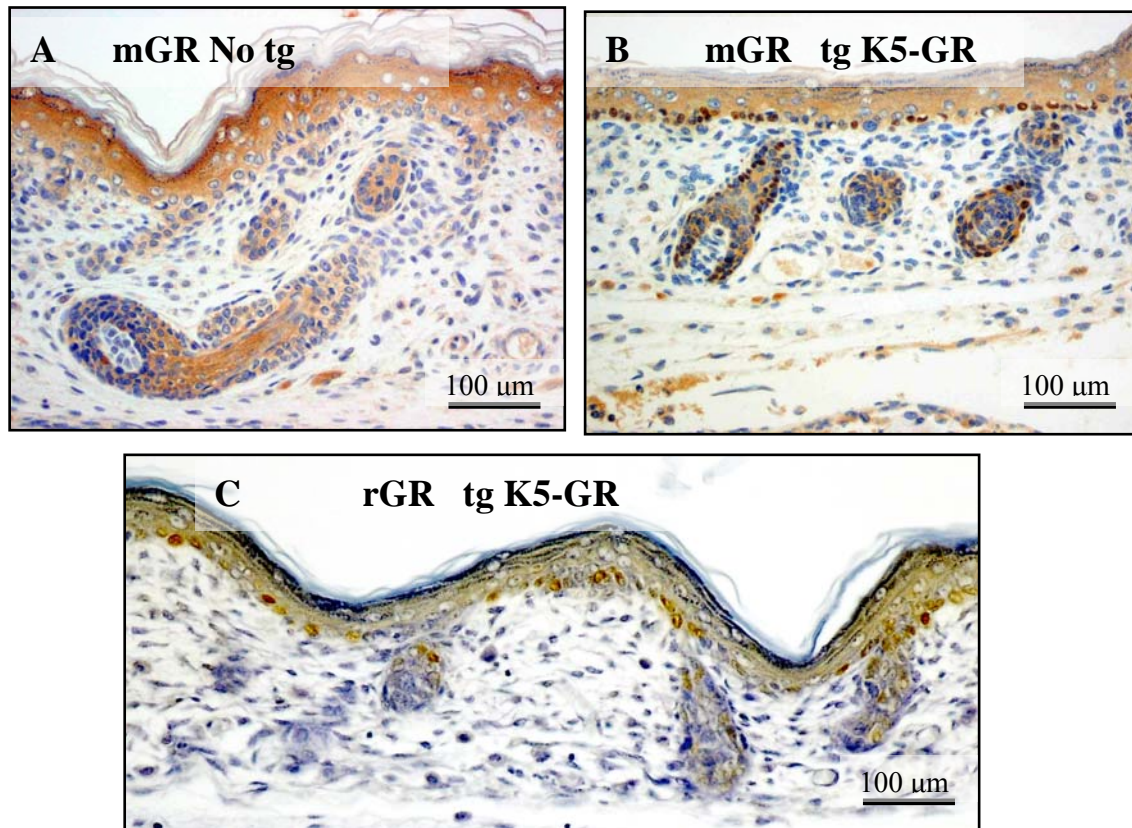


Figura 11. *Inmunolocalización del GR en secciones de piel de ratones recién nacidos no transgénico (A) y transgénico (B, C). Nótese la localización nuclear de GR en la capa basal de la epidermis y en la v.r.e. de los folículos pilosos. C) Inmunomarcaje frente a GR específico de rata.*

2. ALTERACIONES DE LA PIEL Y FOLÍCULOS PILOSOS EN TRANSGÉNICOS K5-GR.

2.1. Alteraciones de la piel y folículos pilosos en embriones y neonatos.

Los ratones K5-GR mostraron diferentes grados de severidad fenotípica en relación con los niveles de expresión del transgén, no obstante, el fenotipo era heterogéneo incluso entre animales de una misma camada. Los ratones transgénicos de la línea 72 morían pocas horas después del nacimiento mientras que los animales de la línea 285 sobrevivían hasta la madurez manteniendo la fertilidad. No obstante, los ratones homocigotos de la línea 285 también morían perinatalmente.

Macroscópicamente, todos los embriones transgénicos de la línea 72 mostraron a los 18,5 d.p.c. un retraso en el desarrollo embrionario paralelo a la severidad del fenotipo: su tamaño era más pequeño, los ojos presentaron falta de desarrollo palpebral por defectos en el desarrollo de uno o ambos párpados, la piel era anormalmente fina y delgada, sobre todo en la región craneal, estando ésta ausente en la calota y en la región umbilical en los animales más severamente afectados (Figuras 12 y 13). En algunos embriones el cerebro aparecía fuera de la cavidad craneal (exencefalia) debido a ausencia de la piel, tejido subcutáneo y hueso (acrania); en ocasiones las vísceras abdominales (intestino, hígado, etc.) se encontraban en el exterior de la cavidad abdominal debido a cierre incompleto de la pared abdominal (gastrosquisis). Algunos embriones presentaron flexión permanente de las cuatro extremidades (artrogriposis).

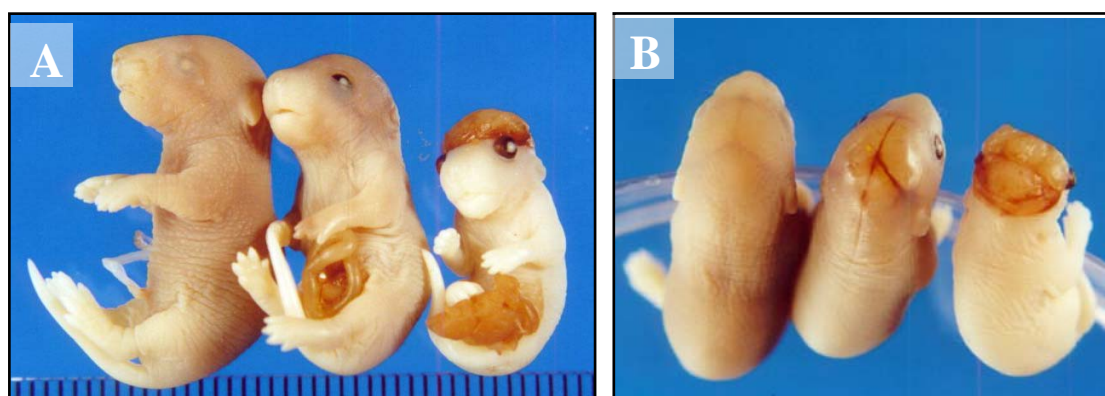
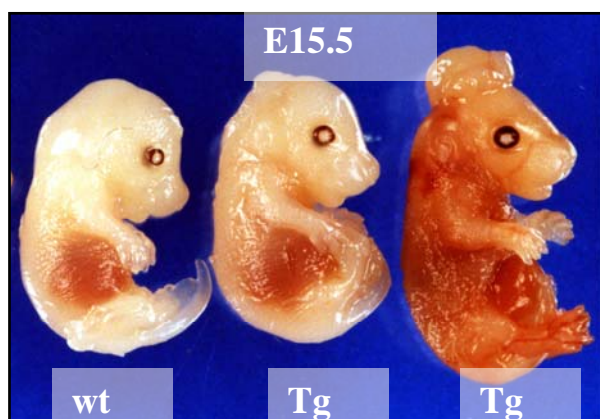


Figura 12. Aspecto macroscópico de embriones 18.5 d.p.c. de la línea 72. A) Vista lateral de un embrión no transgénico (izquierda) y dos embriones transgénicos con fenotipo intermedio (centro) y fenotipo grave (derecha). B) Los mismos embriones vistos desde arriba mostrando ausencia de piel con cierre incompleto de la fontanela y venas de la calota dilatadas (centro) y acrania y exencefalia (derecha). Los tres embriones eran hermanos de camada.



← **Figura 13. Vista lateral de embriones de 15.5 d.p.c. de la línea 72.** Embrión no transgénico (izquierda) y dos embriones K5-GR con fenotipo intermedio (centro) en el que se aprecia aplasia cutis y discreta exencefalia, y fenotipo grave (derecha), en el cual observamos acrania, exencefalia y gastrosquisis.

En los ratones de la línea 285 heterocigotos, las anomalías cutáneas macroscópicas no eran tan severas, afectando sobre todo a la piel de la región superior de la cabeza, donde la piel era tan fina que permitía, en algunos animales recién nacidos, la visualización de las estructuras subyacentes (Figura 14). Unos días después del nacimiento, esta piel anormal se regeneraba, llegando a presentar una apariencia macroscópica normal. Los transgénicos de la línea 285 homocigotos, sin embargo, presentaron un fenotipo similar al descrito en la línea 72.

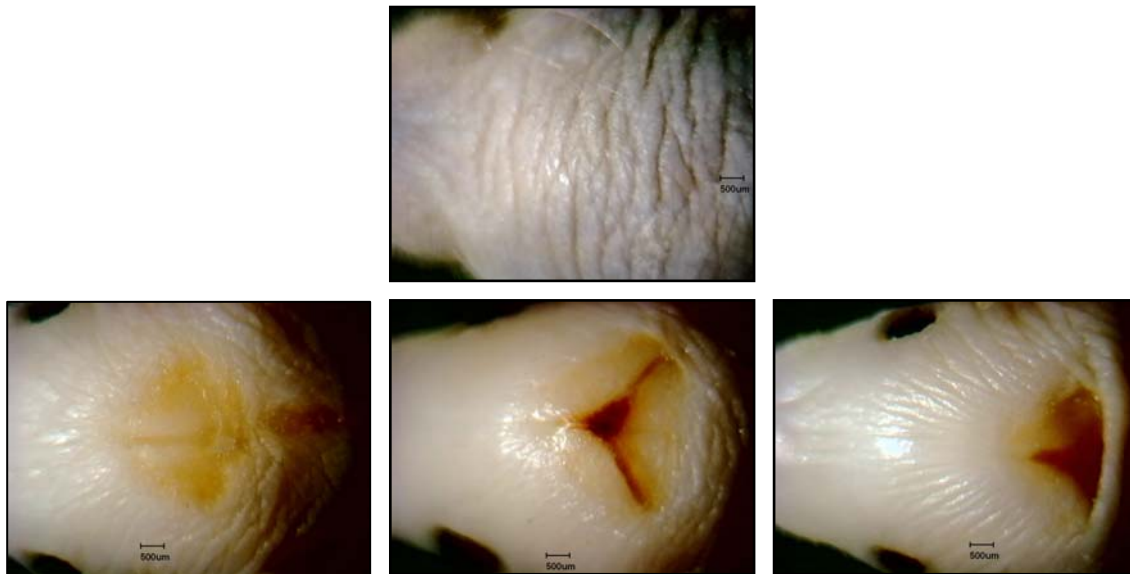


Figura 14. ACC de la cabeza en ratones recién nacidos K5-GR. No transgénico (arriba) y transgénicos heterocigotos K5-GR de la línea 285 (abajo). En algunos ratones la piel de la región bregmática es más fina y tersa que el no transgénico (izquierda); en ocasiones esa delgadez de la piel transluce las suturas craneales y la fontanela (centro) y en casos más graves la piel transluce una fontanela agrandada (derecha).

El análisis de la piel de la cabeza y sus apéndices bajo el microscopio electrónico de barrido en embriones de 18.5 d.p.c. no transgénicos y transgénicos (Figura 15) mostró en las cabezas no transgénicas, una epidermis sin lesiones, con vibrisas y cejas abundantes, largas y rectas, y ambos ojos con los párpados completamente cerrados a esta edad. Por el contrario, las cabezas de los embriones K5-GR de la línea 72 mostraban una intensa descamación epidérmica, las vibrisas y cejas eran cortas, retorcidas y escasas, siendo evidente la ausencia de párpados y la ausencia del hueso supraoccipital a nivel de la sutura del *calvarium* (Figura 15B).

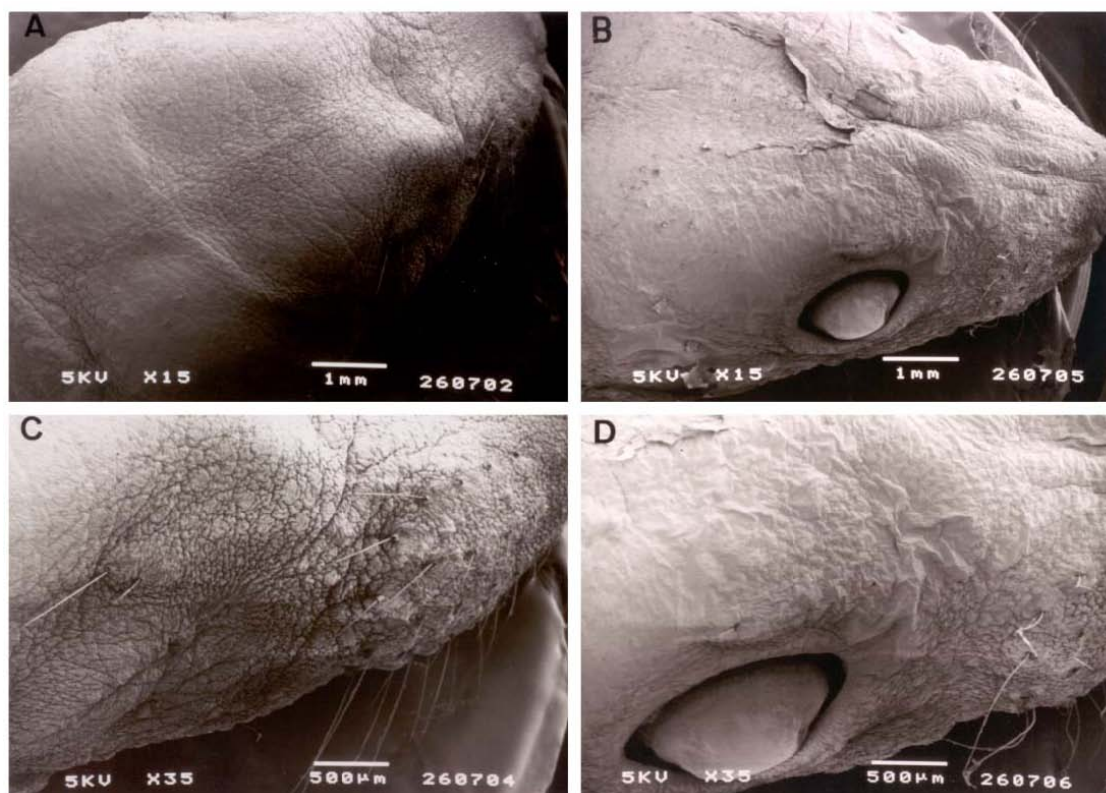


Figura 15. Microscopia electrónica de barrido sobre cabezas de embriones de 18.5 d.p.c. de la línea 72. A, C) Embriones no transgénicos. B, D) Embriones transgénicos K5-GR. La abundante descamación epidérmica, las escasas y anormales cejas/vibrisas y la ausencia de párpados caracterizan a los transgénicos comparados con sus hermanos no transgénicos.

El examen histológico de embriones transgénicos de la línea 72 de 15,5 d.p.c. mostraba ya áreas de aplasia cutis congénita (ACC) grave. Las zonas de ACC afectaban con mayor frecuencia a la cabeza. La Figura 16 muestra una sección sagital de uno de estos embriones teñida con HE en la que se apreciaba una aplasia severa de piel, de hueso y membranas meníngeas en la parte superior del cráneo, lo que determinaba la evisceración de parte de la masa encefálica. Por el contrario, en el ratón no transgénico la piel recubría por completo la fontanela, estaba formada por una capa de células basales y suprabasales bien definidas, la duramadre no presentaba soluciones de continuidad y el tejido membranoso óseo cubría la totalidad del encéfalo.

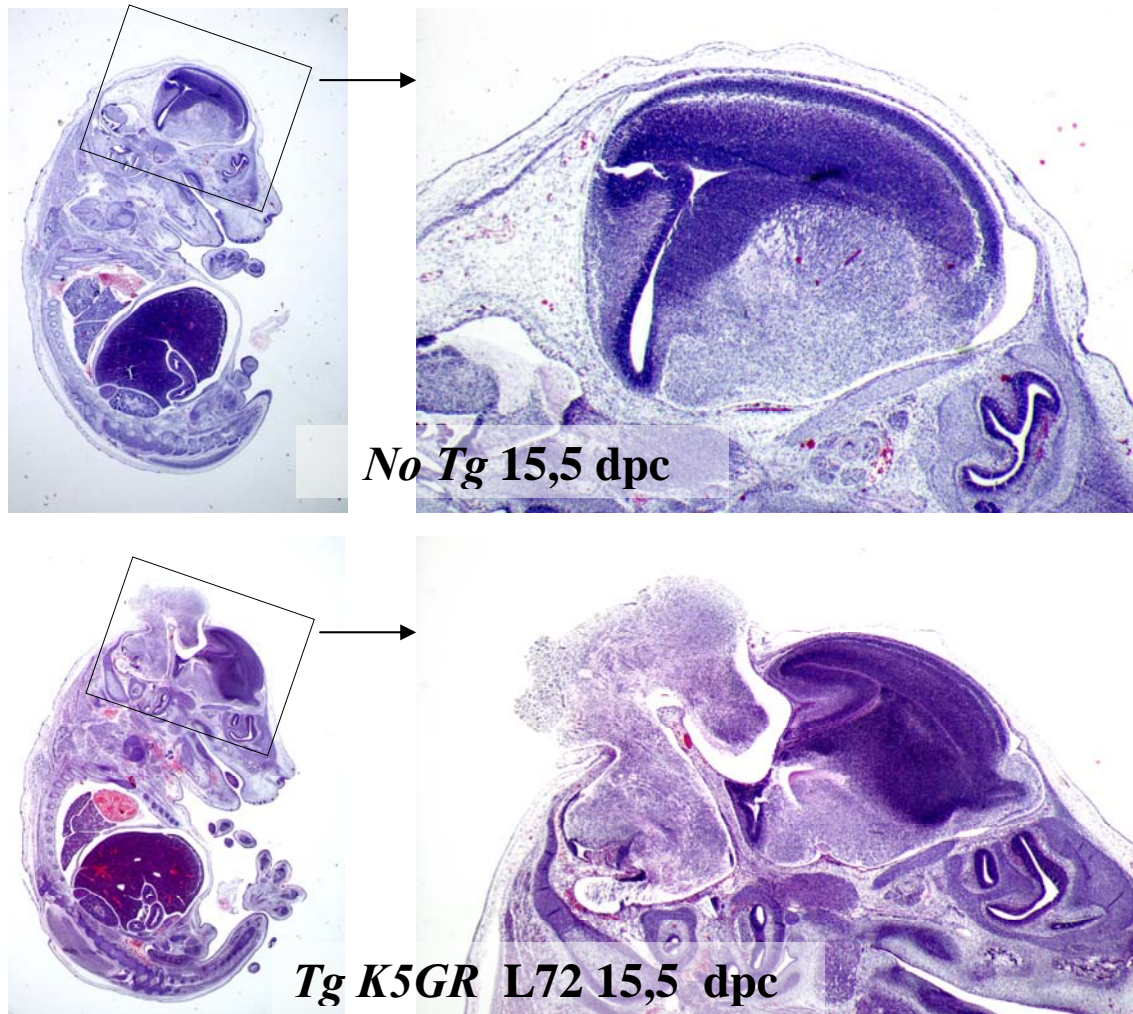


Figura 16. Exencefalia en embriones K5-GR. Sección medio-sagital de un embrión de 15,5 d.p.c transgénico de la línea 72 que muestra aplasia cutis cutánea con exencefalia (abajo) y su hermano de camada no transgénico (arriba), ambos teñidos con HE. Obsérvese el normal adelgazamiento que sufre la epidermis que recubre el vértice craneal en el embrión no transgénico. Ampliaciones: izquierda 2,5X, derecha 20X.

Las zonas de ACC también se observaron en animales con fenotipo intermedio. La Figura 17 muestra las secciones de dos embriones, transgénico y no transgénico, de 18.5 d.p.c. En este caso no observamos exencefalia pero sí aplasia de piel y membranas en el cráneo (Figura 17A y B).

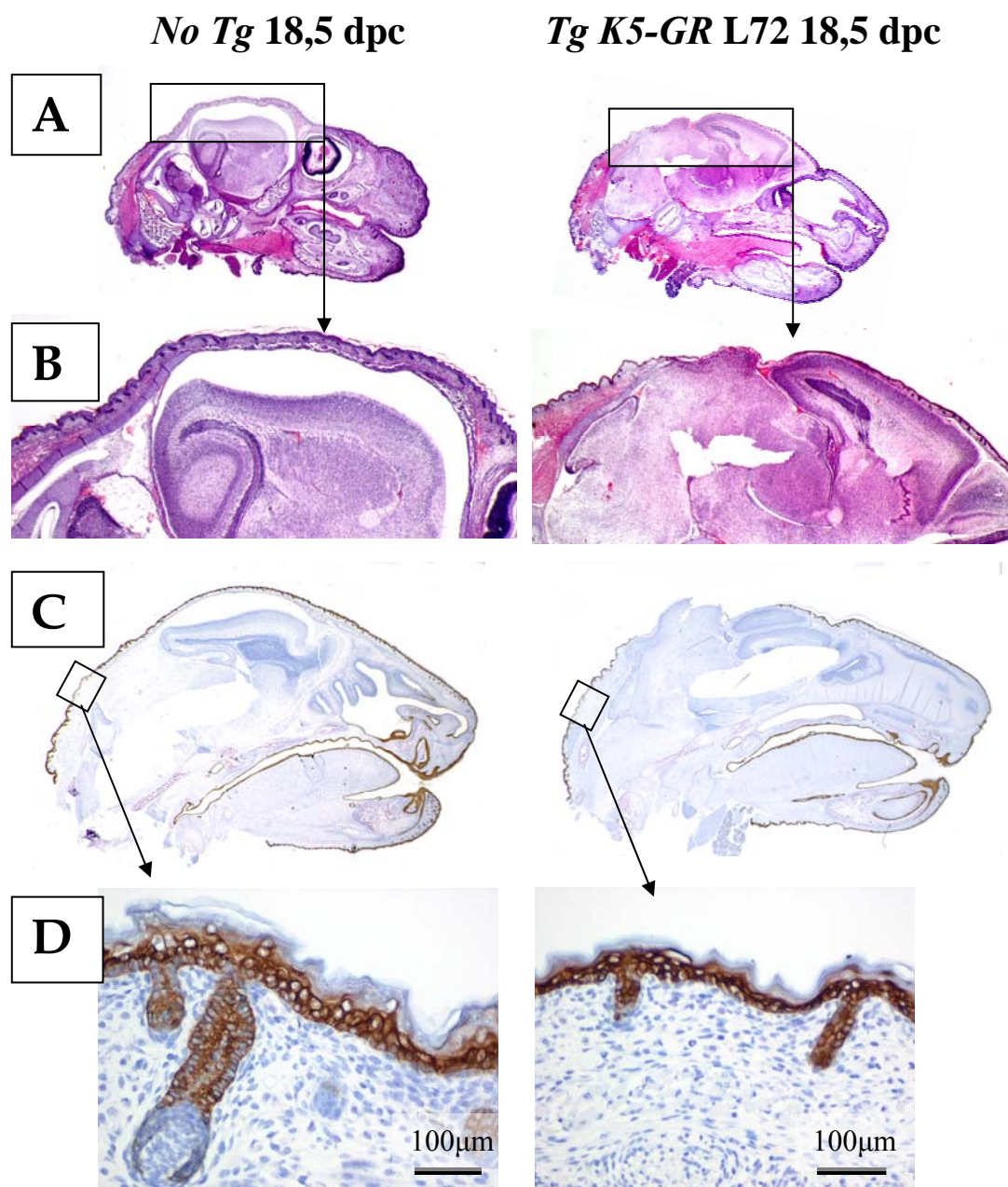


Figura 17. Secciones de embriones de 18.5 d.p.c transgénicos con ACC. Transgénicos (fila derecha) y no transgénico (fila izquierda). **A y B:** Aplasia cutis congénita en secciones sagitales de cabezas teñidas con HE. **C y D:** Expresión de queratina K5 en los mismos animales de la figura anterior. Ampliaciones: A: 3X, B: 20X, C: 4,5X.

El inmunomarcaje frente a la queratina K5 de estos embriones mostraba una expresión discontinua de la proteína en la epidermis de la cabeza y, en casos graves, la falta de expresión de K5 demostraba la ausencia de piel sobre la región de la fontanela anterior, al ser esta queratina un marcador del estrato basal y primeros estratos suprabasales de la epidermis en embriones tardíos (Figura 17C).

No solo la piel de la cabeza mostraba lesiones; la piel del resto del cuerpo de los embriones transgénicos K5-GR presentaba distintos grados de hipoplasia y retraso en el desarrollo de la epidermis y folículos pilosos (Figura 17D). La piel de los embriones de 18,5 d.p.c. no transgénicos, marcados frente a K5, mostraba una diferenciación epidérmica normal, con varias capas de células suprabasales y una adecuada queratinización; la mayoría de los folículos pilosos se encontraban en fase 6 (Davidson y Hardy, 1952) apreciándose en ellos el *bulge* y la papila dérmica completamente cerrada. Las células de la vaina radicular externa de los folículos pilosos, de la capa basal y primeras capas suprabasales de la epidermis expresaban la queratina K5. En los embriones transgénicos (Figura 17D) observamos como la queratina K5 se expresaba en la capa basal y suprabasal de una epidermis menos desarrollada, con menor número de capas de células en los estratos espinoso y granuloso; el proceso de diferenciación terminal o queratinización estaba incompleto y retrasado en comparación con el no transgénico; los folículos pilosos se encontraban menos desarrollados, no siendo posible distinguir el *bulge* en la mayoría de ellos, perteneciendo, por lo tanto, a una fase o estadio 4 de Davidson y Hardy.

En los embriones transgénicos de la línea 285, con menos fenotipo, también observamos histológicamente un retraso en el desarrollo de la piel de la cabeza, sobre todo en la región del vértice, que aparecía muy fina y con apenas desarrollo de folículos pilosos, en comparación con la de sus hermanos no transgénicos (Figura 18), si bien esta región de la calota en no transgénicos muestra la piel más fina y un menor número de folículos pilosos, que aparecen en un estadio más retrasado del desarrollo, con respecto al resto de la epidermis.

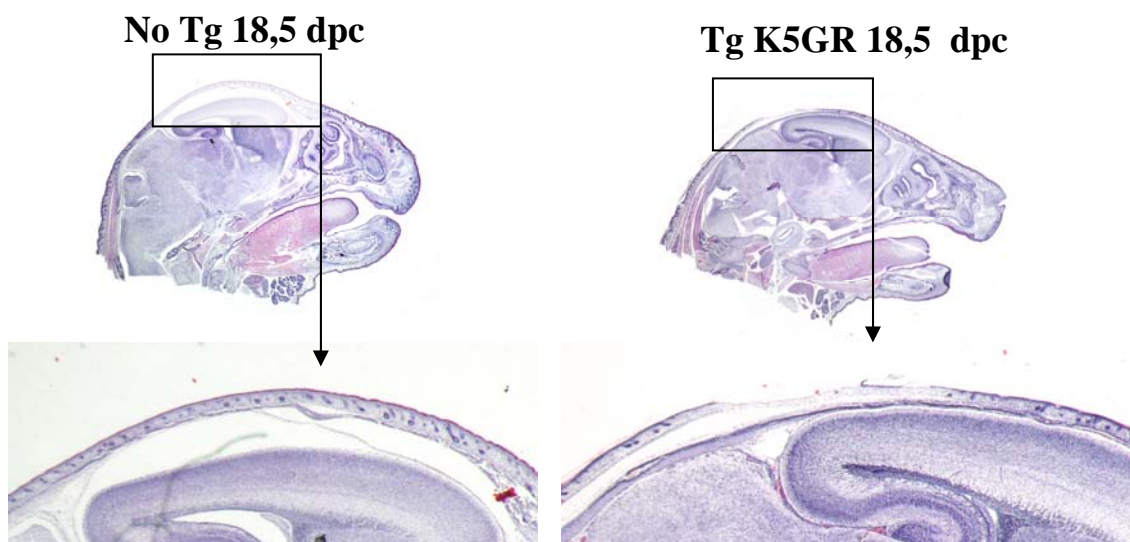


Figura 18. *Hipoplasia de la piel craneal en embriones K5-GR.* Secciones medio-sagitales de embriones de 18,5 d.p.c. teñidas con HE mostrando la hipoplasia de piel craneal en el ratón transgénico de la línea 285 (derecha) y piel normal en el ratón no transgénico (izquierda). Ampliaciones: arriba 3X, abajo: 20X.

2.2. Alteraciones de la piel y folículos pilosos en adultos.

Los ratones transgénicos adultos presentaban una alopecia difusa, mostrando un pelo ralo, dando un aspecto general de pelaje menos tupido a la inspección macroscópica, en comparación con sus hermanos de camada no transgénicos; con la edad la alopecia de los transgénicos se hacía más severa en localizaciones concretas como la piel de la región periorbitaria, periauricular y el hocico, que podían aparecer casi sin pelo; en transgénicos viejos era frecuente la alopecia severa afectando a toda la cara y a regiones focales del dorso (Figura 19).

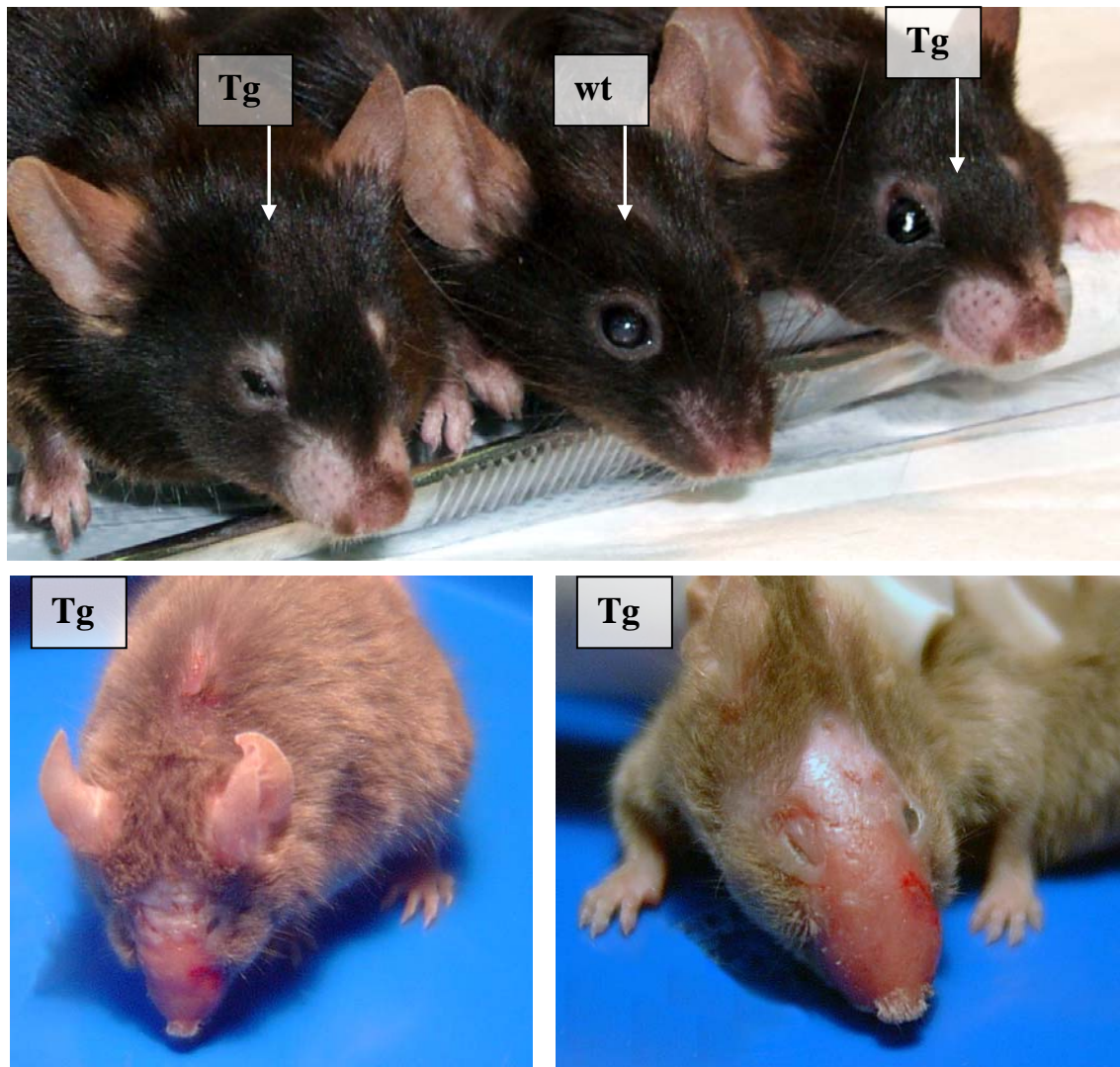


Figura 19. Ratones transgénicos adultos de la línea 285 mostrando las áreas de alopecia más características. El ratón no transgénico está situado en el centro de la imagen superior, flanqueado por animales transgénicos: el de la derecha presenta un ojo prolapsado con aspecto glaucomatoso; nótese la alopecia periorbitaria, periauricular y en el hocico en los transgénicos. Los ratones de la imagen inferior son transgénicos viejos con alopecia difusa por toda la superficie corporal y focos de alopecia grave en la cara, región periauricular y en el dorso.

Histológicamente, las secciones de la piel de ratones adultos transgénicos mostraban una epidermis más fina que la de los no transgénicos, un menor número de folículos pilosos y, los que permanecían, se encontraban en mayor proporción en fase de reposo o telogén y/o con características distróficas, a diferencia de los no transgénicos, en los que existían multitud de folículos anagénicos o en fase de crecimiento activo. Estos folículos atróficos acababan desapareciendo, originando la presencia de glándulas sebáceas huérfanas (Figura 20).

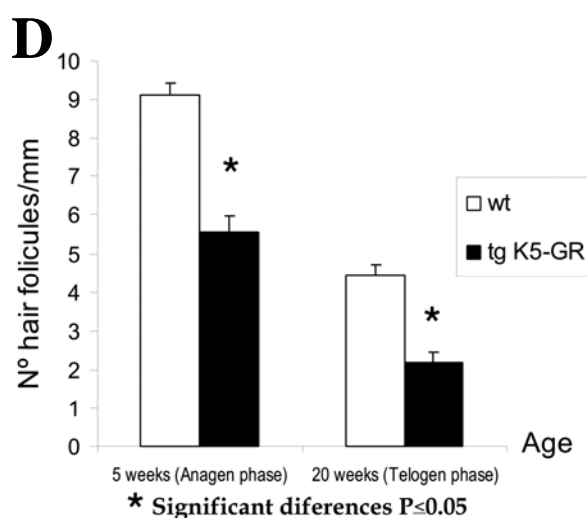
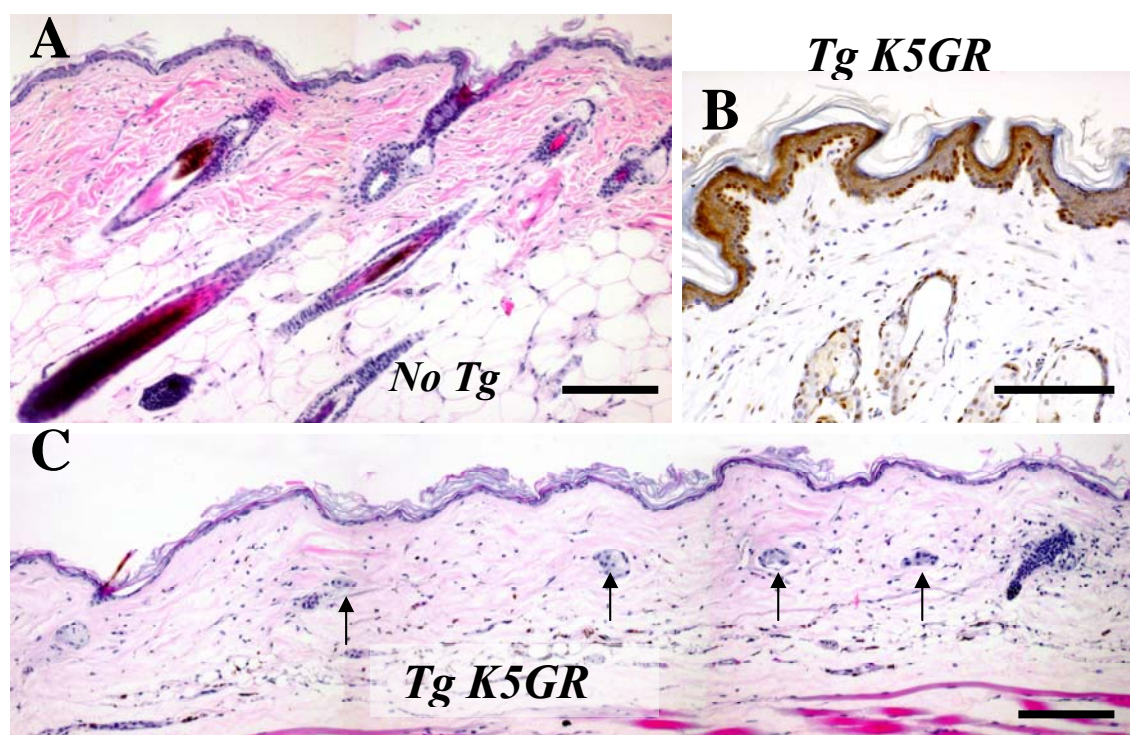


Figura 20. A-C: *Secciones de piel de ratones adultos.* A: piel no transgénica teñida con HE mostrando folículos en anagén B: piel de un ratón transgénico adulto inmunomarcada frente a mGR C: HE de una sección de piel procedente de un ratón adulto transgénico mostrando glándulas sebáceas huérfanas (flechas) y un folículo piloso en fase de telogén. D: *Cuantificación de folículos pilosos por mm de piel,* a las 5 y a las 20 semanas de edad, en piel del lomo de ratones transgénicos (barras negras) y no transgénicos (barras blancas). Barras de escala: A y C: 200 μ m. B: 50 μ m

Evaluamos la gravedad de la alopecia en los transgénicos mediante la cuantificación del número de folículos pilosos por milímetro de piel, sobre muestras de piel del lomo de ratones adultos; en los transgénicos adultos la disminución de folículos pilosos fue del 50% en comparación con los no transgénicos, tanto a las 5 semanas de edad, en la cual el ciclo del pelo se encuentra en fase de anagén, como a las 20 semanas de edad, en la cual la mayoría de los folículos pilosos se encuentran en fase de telogén (Figura 20D).

El inmunomarcaje frente a GR de ratón, al igual que observamos en embriones y neonatos, seguía mostrando una fuerte expresión en los núcleos de los queratinocitos de la capa basal y vaina radicular externa de los folículos pilosos en la piel de los transgénicos adultos (Figura 20B).

A pesar de la alopecia del 50% observada en los ratones adultos K5-GR, el estudio de los pelos presentes mostró la existencia de los cuatro tipos de pelo típicos del ratón (*zig-zag*, *awl*, *guard* y *auchene*), sin anomalías en cuanto a la forma y con características morfológicas y porcentajes similares a los observados en los ratones adultos no transgénicos.

Porcentajes observados de los cuatro tipos de pelos corporales

	NO TRANSGÉNICOS (n=4)	TG K5-GR (n=10)
Pelos <i>zig-zag</i>	72,52 ± 6,07	76,92 ± 3,12
Pelos <i>awl</i>	21,98 ± 2,81	19,01 ± 3,12
Pelos <i>guard</i>	2,30 ± 1,90	1,25 ± 1,16
Pelos <i>auchene</i>	3,23 ± 2,40	2,82 ± 1,01

En la zona del hocico, en transgénicos viejos, la alopecia era más acentuada. El estudio histológico de esta región mostraba en los no transgénicos las vibrisas o pelos sensitivos en fase anagénica, con un bulbo piloso bien desarrollado, unas vainas radiculares externa e interna alrededor del pelo bien formado, un seno anular venoso y unas glándulas pilosebáceas estructuralmente normales localizadas en la región del cuello (Figura 21); los folículos pilosos no sensitivos flanqueando las vibrisas también se encontraban en fase de anagén. La sección longitudinal del hocico en los transgénicos viejos mostraba los folículos de las vibrisas con un grado avanzado de displasia y atrofia, apreciándose todavía restos de la glándula pilosebácea y de las vainas radiculares desestructuradas, con ausencia de pelo en su interior, asociado a edema y congestión del seno anular (Figura 21); los folículos pilosos no sensitivos que flanqueaban la vibrisa se encontraban atróficos y

dilatados, ocupados en su interior por una gran glándula sebácea huérfana. Estas lesiones son las responsables de la alopecia en mosaico.

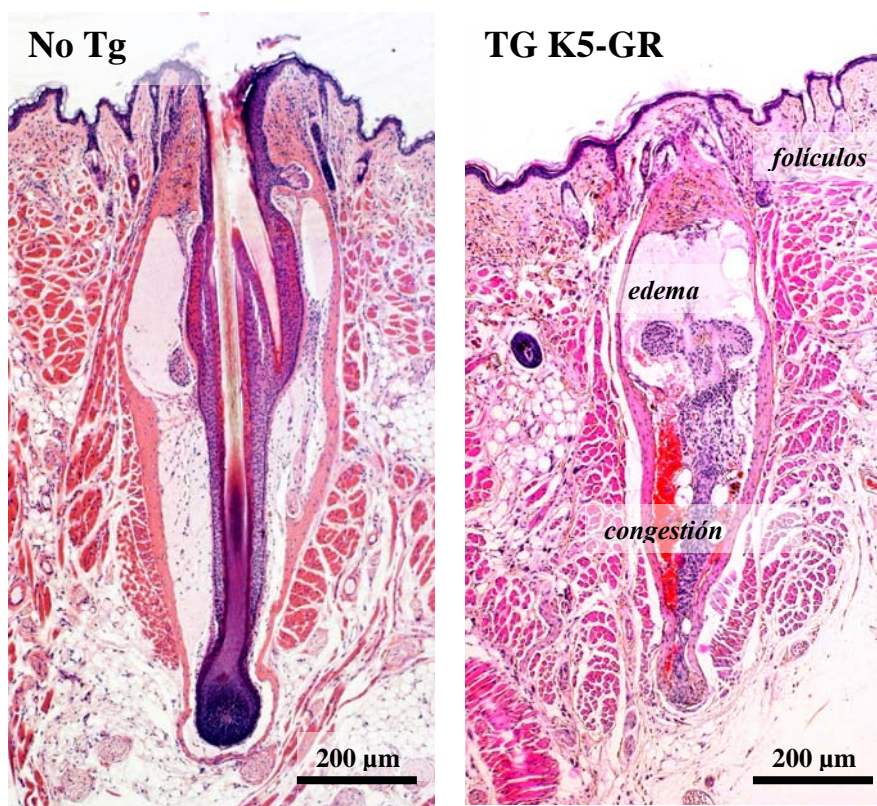


Figura 21. Sección longitudinal de vibrisas no transgénica y transgénica teñidas con HE.

El análisis de las pocas vibrisas que permanecían en el hocico de ratones transgénicos adultos mostraba su morfología displásica, anormal, presentando un menor grosor y un perfil retorcido en el extremo (Figura 22).

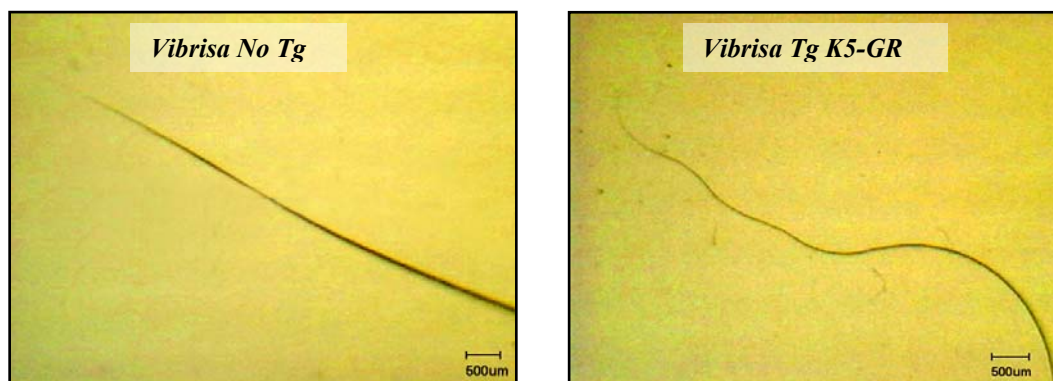


Figura 22. Aspecto macroscópico de las vibrisas de un ratón transgénico adulto (derecha) y no transgénico (izquierda).

Algunos ratones transgénicos desarrollaron áreas de incontinencia pigmentaria moderada, fácilmente detectables como regiones de piel fuertemente pigmentadas, en diferentes zonas del cuerpo, como la cola y la región palmar y plantar (Figura 23).

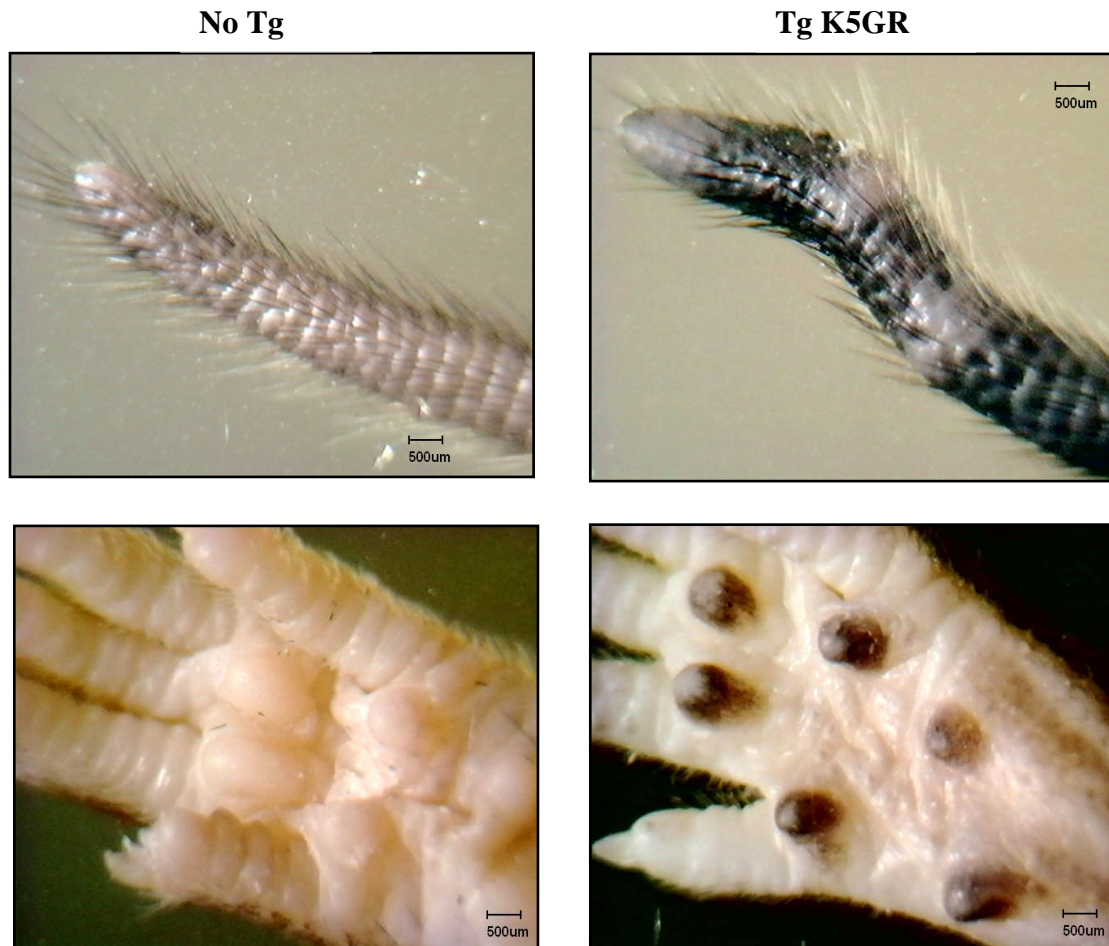


Figura 23. Incontinencia pigmentaria en adultos K5-GR. Cola y planta del pie en los transgénicos de la línea 285 (fila derecha) y cola y región plantar normal en un no transgénico (fila izquierda). El tamaño de las almohadillas plantares y palmares era casi siempre menor y los relieves cutáneos o dermatoglifos se encontraban menos pronunciados en los ratones K5-GR en comparación con los no transgénicos.

3. EFECTOS SOBRE LA PIEL DE NEONATOS DEL TRATAMIENTO CON DEX O METOPIRONA *IN ÚTERO*.

Para confirmar que el fenotipo en piel se debía específicamente a la sobreexpresión del GR, se realizaron experimentos en los cuales ratones no transgénicos y transgénicos fueron expuestos, bien a Dex, o bien al inhibidor de la síntesis de esteroides metopirona, durante el desarrollo embrionario, por tratamiento de la madre gestante desde el día 12,5 d.p.c. hasta el nacimiento.

Al analizar la piel de los ratones recién nacidos sometidos a tratamientos experimentales observamos como la Dex inducía en ratones no transgénicos una discreta hipoplasia epidérmica y un retraso en el desarrollo de los folículos pilosos que se encontraban, mayoritariamente, en la fase 4 de Davidson y Hardy, distribuyéndose uniformemente por la piel (Figura 24B). Este retraso en el desarrollo era equivalente al observado en los neonatos transgénicos K5-GR con fenotipo intermedio (Figura 24C) aunque, en éstos últimos, el retraso en la foliculogénesis no era tan homogéneo, presentando algunas áreas de piel sin folículos. La administración *in utero* de Dex a ratones transgénicos K5-GR ocasionó un retraso grave en la foliculogénesis, presentando amplias zonas de la piel con ausencia de folículos pilosos, estando los presentes en fases muy iniciales del desarrollo (fase 2-4 de Davidson y Hardy) (Figura 24D). Por el contrario, los transgénicos K5-GR tratados con metopirona mostraron una reversión del fenotipo en piel, que aparecía semejante a los no transgénicos en el desarrollo de los folículos y en la maduración de la epidermis (Figura 24 E).

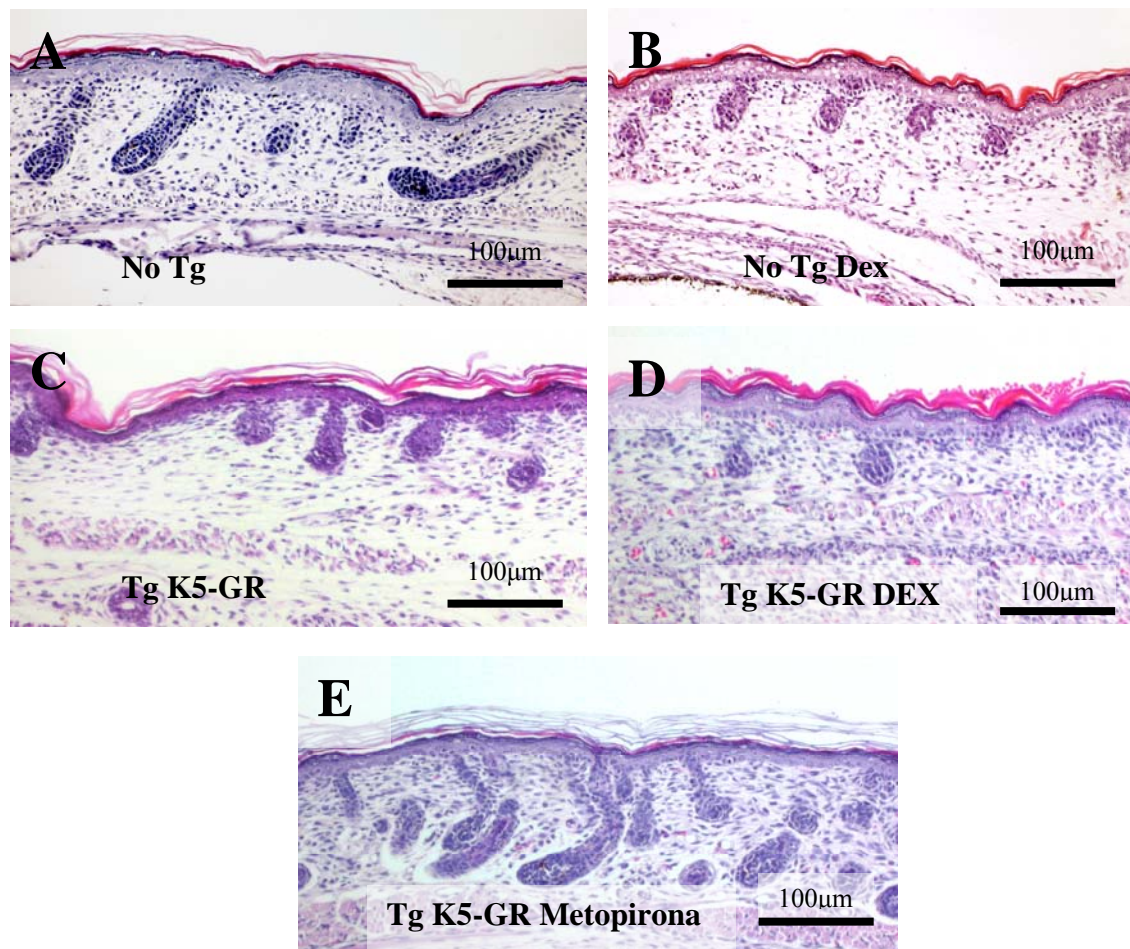


Figura 24. Efectos en la piel de los tratamientos con Dex o metopirona. Secciones de piel de la cabeza de ratones recién nacidos no transgénicos (A), no transgénicos tratados con Dex (B), transgénicos K5-GR (C), transgénicos K5-GR tratados con Dex (D) y transgénicos K5-GR tratados con metopirona (E), teñidas con HE.

El gen p63, un homólogo del supresor tumoral p53, se activa en la capa basal o germinativa de muchos tejidos epiteliales (Yang, *et al*, 1998). Como las alteraciones fenotípicas encontradas en ratones K5-GR se parecen a las descritas en pacientes humanos con displasia ectodérmica y, existiendo referencias de la implicación de p63 en EEC, hemos estudiado la expresión de $\Delta Np63$ en la piel de ratones no transgénicos y transgénicos K5-GR, de un día de edad, mediante la utilización de un anticuerpo específico para esta proteína (Figura 25).

En la piel de los recién nacidos K5-GR existía una disminución apreciable de células positivas a $\Delta Np63$, en localización nuclear, en la capa basal de la epidermis y vaina

radicular externa de los folículos pilosos (Figura 25B), en comparación con sus hermanos de camada no transgénicos (Figura 25A). Esta disminución fue mucho más evidente en los transgénicos K5-GR tratados *in útero* con Dex (Figura 25C), mientras que en los tratados con metopirona se observó reversión del fenotipo y una expresión de Δ Np63 (Figura 25D) equivalente a la de los no transgénicos.

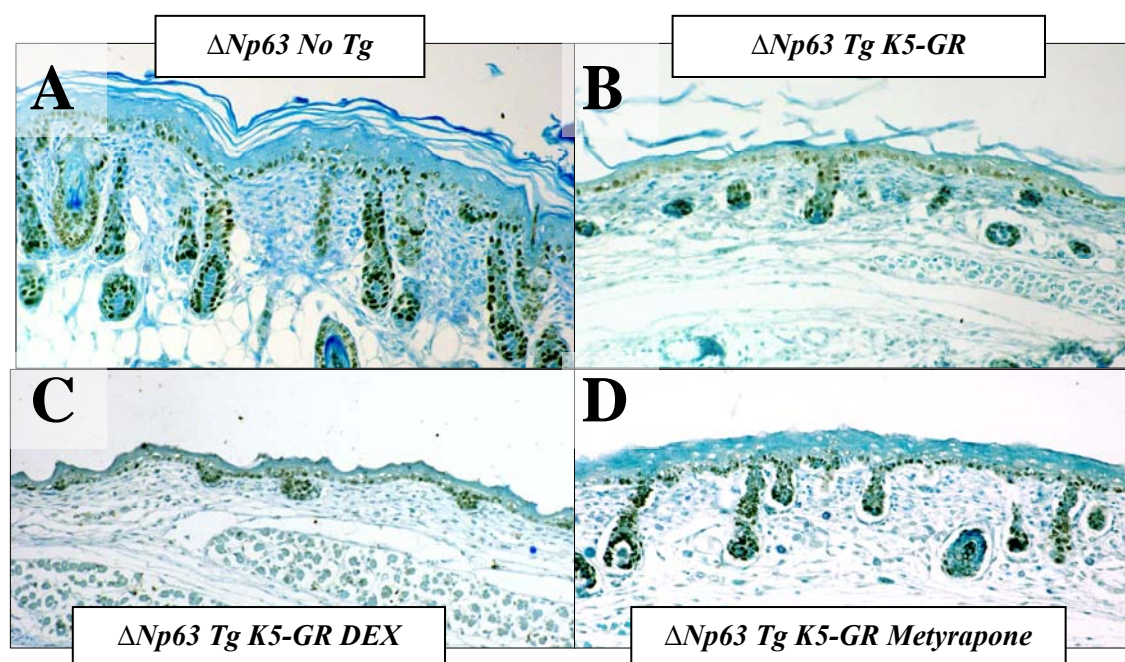


Figura 25. Efectos sobre la expresión de Δ Np63 en piel tras el tratamiento con Dex o metopirona. Secciones de ratones de un día de edad inmunomarcadas con un anticuerpo específico anti- Δ Np63. Como tinción de contraste se utilizó azul de metileno. **A:** no transgénico. **B-D:** transgénicos K5-GR. La disminución en la expresión de Δ Np63 en los transgénicos sin tratamiento (B) se acentúa cuando se tratan *in útero* con Dex (C), mientras que el tratamiento con metopirona (D) revierte el fenotipo e iguala la expresión de Δ Np63 a los no transgénicos. Ampliaciones: 200 aumentos.

4. ALTERACIONES EN LAS GLÁNDULAS CUTÁNEAS EN TRANSGÉNICOS ADULTOS K5-GR.

Las alteraciones en las glándulas cutáneas se estudiaron en los adultos K5-GR, ya que son glándulas que se desarrollan poco en la época embrionaria, completando su diferenciación en el periodo postnatal.

4.1. Alteraciones en las glándulas ecrinas.

En el hombre las glándulas ecrinas o sudoríparas se distribuyen uniformemente por toda la superficie corporal. En el ratón, estas glándulas se localizan exclusivamente en la región de las almohadillas palmares y plantares, alojadas profundamente en la dermis. Macroscópicamente, las almohadillas plantares y palmares de los ratones transgénicos adultos eran casi siempre más pequeñas que las observadas en no transgénicos (Figura 23). Los dermatoglifos, o eminencias cutáneas de palmas y plantas, se encontraban presentes en los transgénicos, pero eran menos profundos y marcados que en los no transgénicos de la misma edad.

Tras realizar cortes seriados de las almohadillas plantares en ratones adultos, observamos que algunas almohadillas transgénicas carecían de glándulas sudoríparas, siempre presentes en todas las almohadillas de los ratones no transgénicos; no obstante, en secciones equivalentes, la mayoría de las almohadillas transgénicas presentaban glándulas sudoríparas caracterizadas por un menor desarrollo glandular en comparación con sus hermanos de camada no transgénicos (puntas de flechas en Figura 26A, B).

La tinción con el anticuerpo anti-K5 de secciones procedentes de ratones no transgénicos, reveló positivas a las células la capa basal y suprabasal de la epidermis de la región palmar/plantar, así como a las células ductales de los conductos excretores y a las células mioepiteliales que rodean a los acinos secretores de las glándulas sudoríparas (Figura 26C, C'). En los transgénicos, los escasos acinos ecrinos presentes en las almohadillas mostraban una desorganización de las células secretoras y un número muy reducido de células mioepiteliales en comparación con secciones equivalentes en no transgénicos (Figura 26D, D').

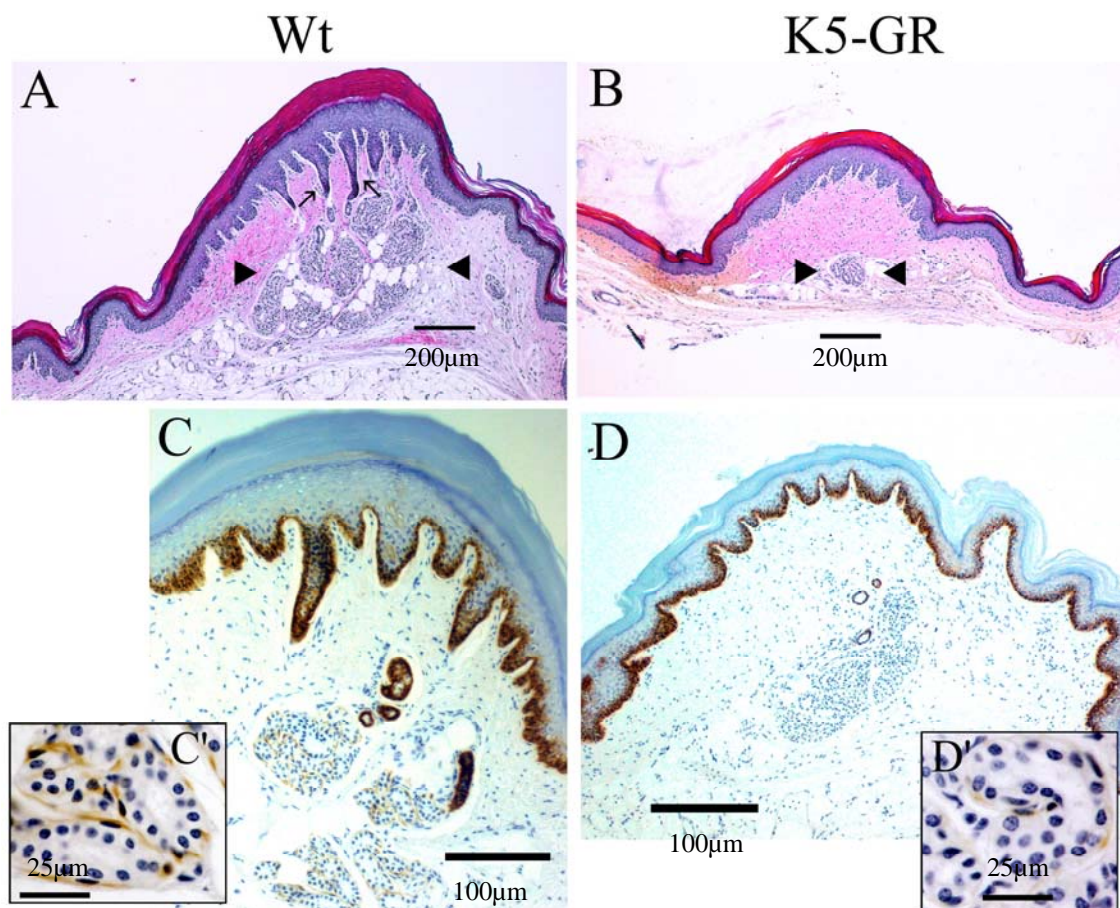


Figura 26. Escaso desarrollo de las glándulas sudoríparas en ratones K5-GR. A-D': Secciones de almohadillas plantares en ratones adultos no transgénicos (A, C, C') y adultos K5-GR (B, D, D'). **A, B:** Secciones teñidas con HE que muestran un gran desarrollo de las glándulas sudoríparas ecquinas (puntas de flecha) y los conductos excretores (flechas) en la dermis de la almohadilla no transgénica en comparación con el transgénico que sólo muestra 5 ó 6 acinos secretorios (puntas de flecha). **C, D':** Expresión de K5 en la capa basal de la epidermis y *ductus* (C, D) así como en las células mioepiteliales que rodean a los acinos secretorios (C', D'). En el transgénico se aprecia una desorganización de las células epiteliales secretoras en los acinos ecquinas y una disminución de las células mioepiteliales que los rodean (D').

4.2. Alteraciones en las glándulas prepuciales.

Las glándulas prepuciales son idénticas en apariencia y función a las glándulas sebáceas y drenan su secreción al espacio prepucial (Gude *et al.*, 1982).

Como muestra la Figura 27A la sobreexpresión del GR inducía un menor desarrollo de estas glándulas, visible macroscópicamente, en los machos adultos transgénicos en comparación con los machos no transgénicos de la misma edad. El estudio histopatológico e inmunohistoquímico de estas glándulas confirmó, no solamente un menor desarrollo de estas glándulas en transgénicos, sino también un retraso en la

maduración de los sebocitos, o células secretoras maduras que se eliminan a través de los conductos (Figura 27C flechas), y esclerosis del tejido conjuntivo intersticial (Figura 27C asteriscos).

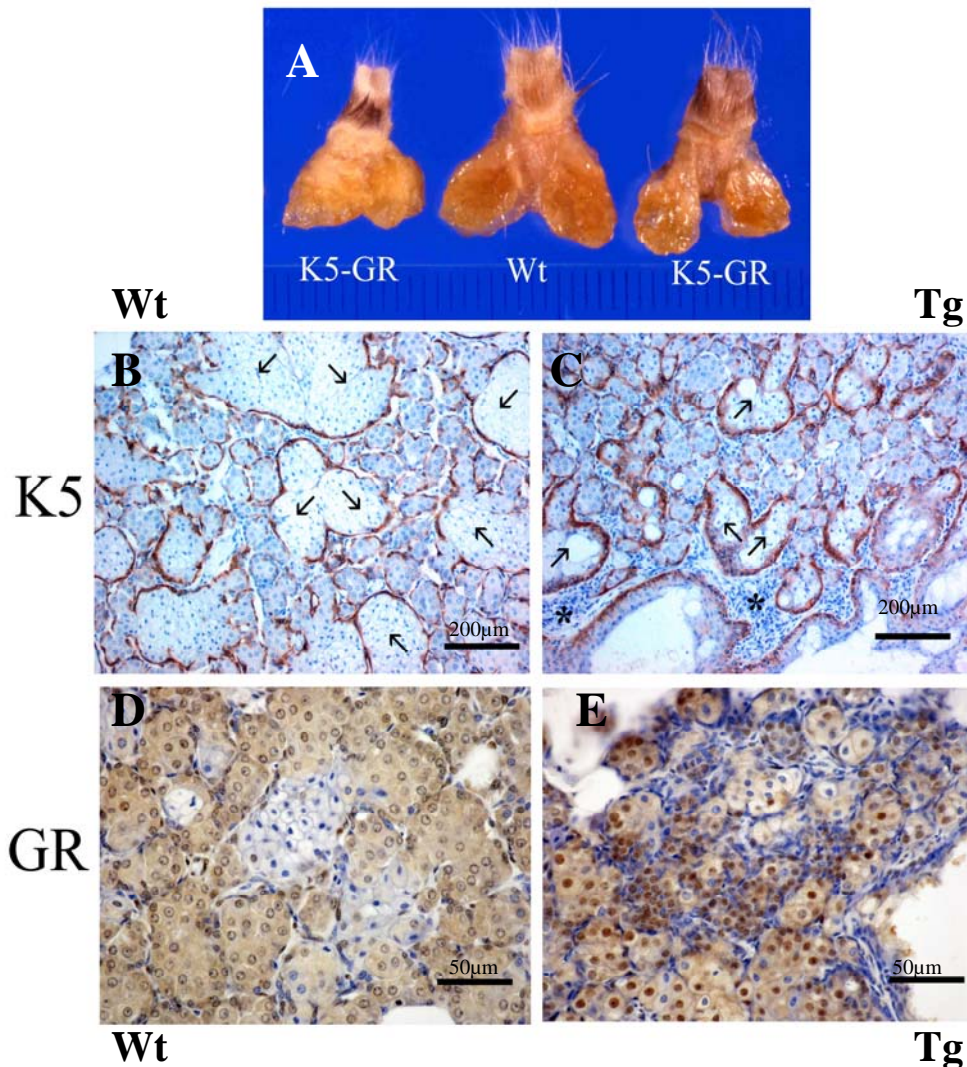


Figura 27. Menor desarrollo de las glándulas prepuciales en adultos K5-GR. En los transgénicos K5-GR estas glándulas alcanzan, aproximadamente, la mitad del tamaño que en los machos no transgénicos de la misma edad (A). El inmunomarcaje frente a K5 muestra expresión en el epitelio ductal y en las células mioepiteliales que rodean a los acinos secretores en no transgénicos (B) y transgénicos (C). Se aprecia un retraso en la diferenciación de los sebocitos (flechas) y esclerosis intersticial en los transgénicos (asteriscos). La inmunotinción utilizando el anticuerpo mGR muestra que GR es citoplasmático en el no transgénico (D) y citoplasmático y nuclear en el ratón transgénico (E).

La diferenciación anormal de las glándulas prepuciales en los machos transgénicos se correlacionaba con una fuerte expresión del GR transgénico en el núcleo de las células mioepiteliales y secretoras (Figura 27E), que en los no transgénicos aparecía limitada al citoplasma de dichas células (Figura 27 D).

4.3. Alteraciones en las glándulas linguales.

Las glándulas salivares menores localizadas en la lengua, también estaban afectadas en los ratones transgénicos K5-GR adultos, mostrando un menor desarrollo de las glándulas serosas y, en casi todos los animales, una ausencia de glándulas mucosas, las cuales se encontraban muy desarrolladas en los no transgénicos (Figura 28).

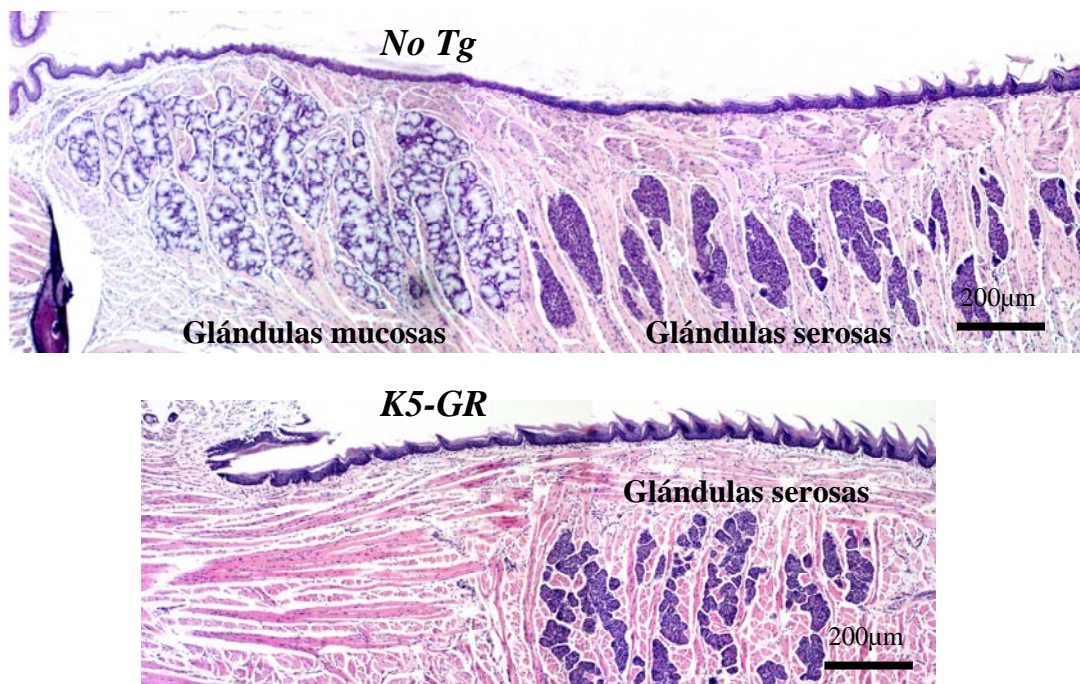


Figura 28. Menor desarrollo de las glándulas linguales en adultos K5-GR. Secciones medio-sagitales teñidas con HE de la lengua. Ratón adulto no transgénico (arriba) y ratón transgénico K5-GR (abajo). La lengua transgénica muestra una menor cantidad de glándulas serosas y ausencia casi total de glándulas mucosas.

4.4. Alteraciones de las glándulas de Meibomio.

Los ratones transgénicos K5-GR adultos presentaban ausencia del tarso palpebral que contiene las glándulas de Meibomio, situadas normalmente entre el epitelio conjuntival y el músculo orbicular de los párpados. Los ratones no transgénicos mostraban un patrón de expresión de la queratina K5 discontinuo ya que se marcaban específicamente las células mioepiteliales alrededor de los acinos holocrinos de la glándula de Meibomio mientras que la inmunotinción del ojo en los transgénicos mostraba una ausencia en la expresión de la queratina K5 en la región situada por debajo del epitelio conjuntival, debido a la ausencia de los acinos secretores y de las células mioepiteliales (Figura 29).

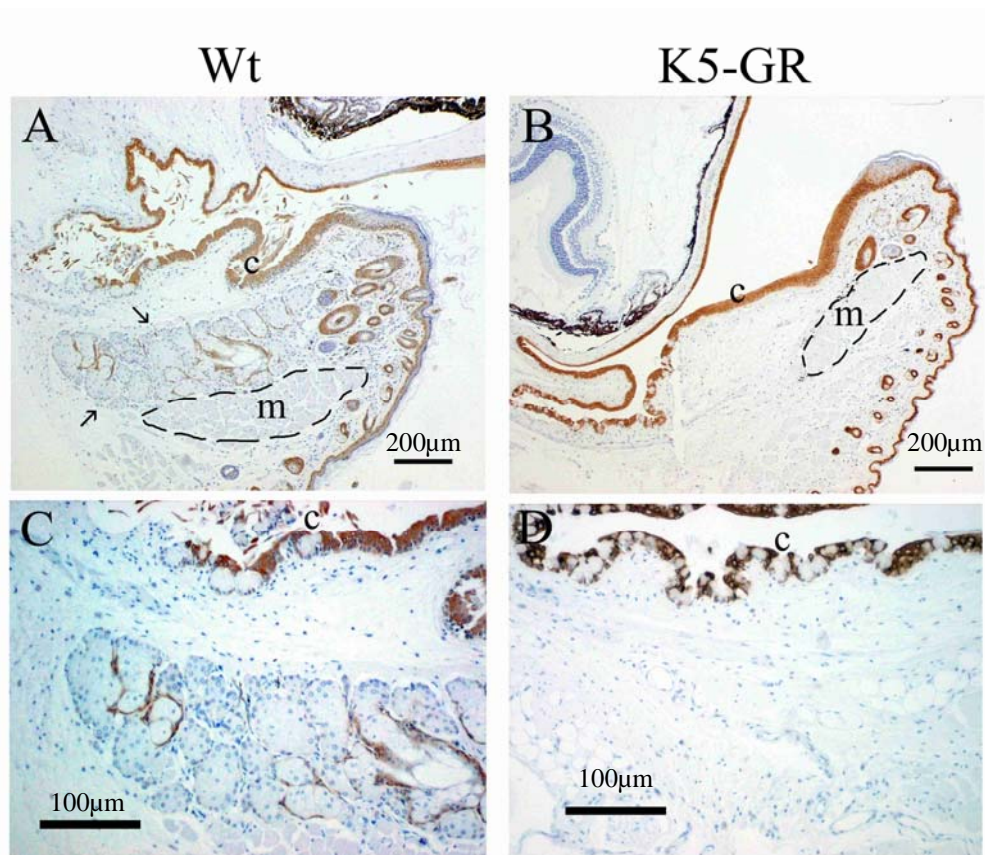


Figura 29. Ausencia de glándulas de Meibomio en ratones K5GR. Inmunomarcajes de secciones del ojo con el anticuerpo anti-K5. A-D: Secciones de los párpados en ratones no transgénicos (A, C) y en ratones K5-GR (B, D) donde se muestra la expresión de la queratina K5 en las células mioepiteliales de las glándulas de Meibomio localizadas entre el epitelio conjuntival (**c**) y el músculo orbicular (**m**, la línea punteada indica la extensión del músculo) en el no transgénico. Se aprecia una ausencia de glándulas de Meibomio y células mioepiteliales en el párpado transgénico. (A-B): 40X; (C, D): 200X.

5. ALTERACIONES OCULARES.

5.1. Alteraciones oculares en embriones y neonatos.

Los ratones transgénicos K5-GR presentaron, al nacimiento, un defecto en el desarrollo del párpado superior o de ambos párpados (Figura 30), indicativo de un defecto en el cierre y que determinaba la exposición parcial, o total, del ojo; este defecto en la formación de los párpados ya se hacía patente en embriones transgénicos a partir de los 16,5 d.p.c, época en la que los embriones no transgénicos presentaban el cierre completo de ambos párpados. Dado que las células basales del epitelio de los futuros párpados y córnea expresan queratina K5 y, por lo tanto, son un órgano diana para la expresión del transgén (Ramírez *et al.*, 1994), hemos estudiado en detalle los defectos oculares encontrados en los ratones K5-GR durante el desarrollo.

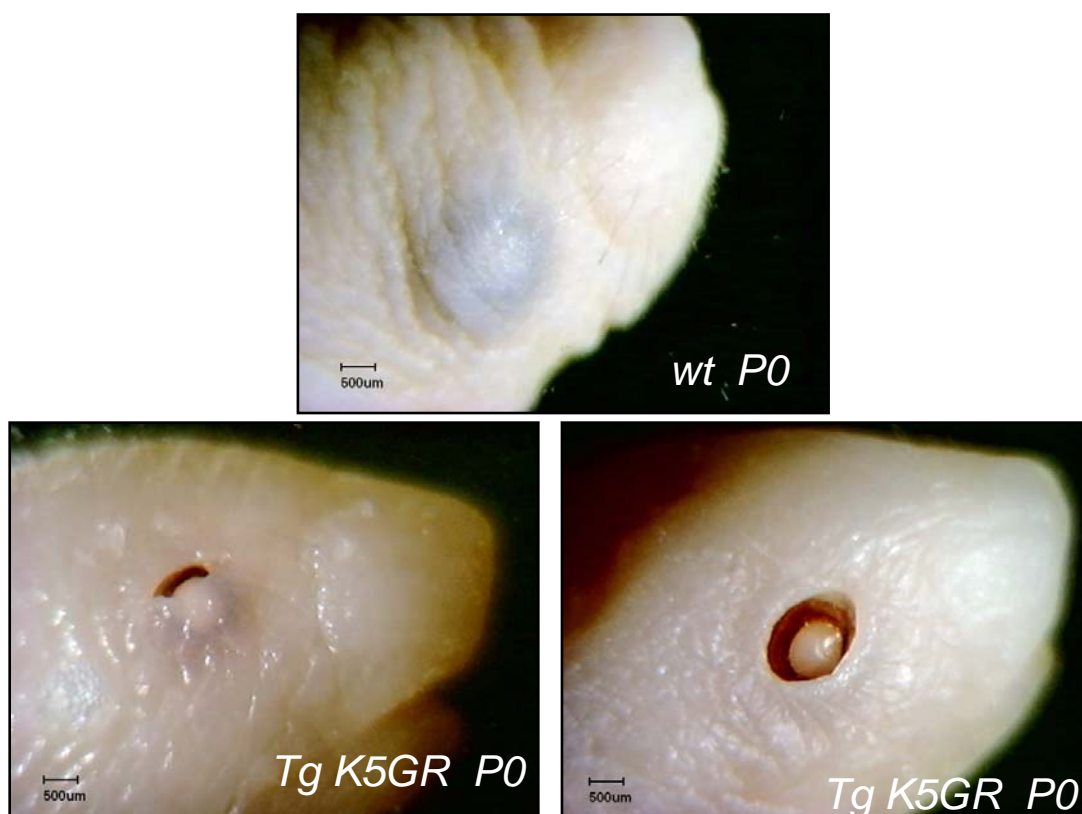


Figura 30. Aspecto macroscópico de los ojos en ratones recién nacidos. El no transgénico (arriba) muestra el ojo totalmente cubierto por la fusión de ambos párpados y los transgénicos K5-GR (abajo) presentan falta de fusión parpebral por desarrollo defectuoso de uno (izquierda) o ambos párpados (derecha).

Utilizando el microscopio electrónico de barrido, observamos el ojo en embriones no transgénicos y transgénicos de 17,5 d.p.c. (Figura 31). En los no transgénicos ya se había producido la fusión completa de ambos párpados (Figura 31B). En contraposición, los embriones transgénicos mostraron un desarrollo de uno o ambos párpados muy deficiente que provocaba la exposición de la superficie anterior del globo ocular y pseudoproptosis del ojo (Figura 31A). En embriones transgénicos de 18,5 d.p.c., los estudios de microscopía electrónica de barrido evidenciaron la presencia de defectos epiteliales de la córnea que afectaban tanto a la región central (Figura 31C, y la ampliación D) como a la práctica totalidad de su superficie (Figura 31E y la ampliación F).

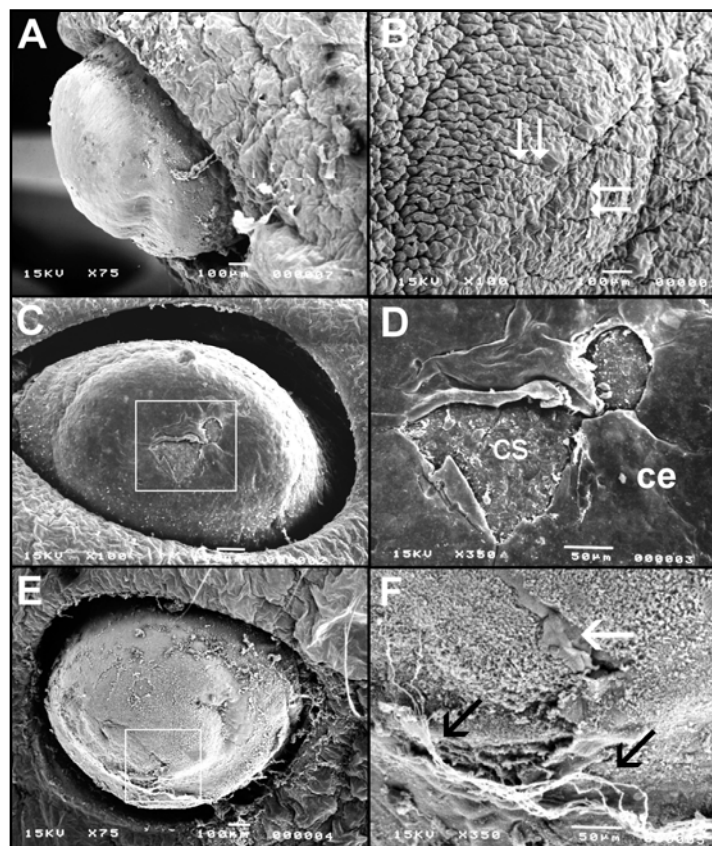


Figura 31. *Detalles del ojo de embriones vistos con el microscopio electrónico de barrido.* **A:** Ojo de un embrión transgénico de 17,5 d.p.c a 75X mostrando un fallo en el cierre de los párpados y pseudoproptosis del globo ocular. **B:** Ojo no transgénico a 100X mostrando los párpados completamente cerrados (dobles flechas). **C-F:** Ojos de embriones transgénicos de 18,5 d.p.c. **C:** Úlcera en la parte central de la córnea a 100X. **D:** Ampliación (350X) del defecto epitelial de la córnea; nótase que el estroma corneal (cs) aparece expuesto a través del epitelio corneal (ce) desgarrado. **E:** La descamación epitelial afecta casi a la totalidad de la superficie corneal (75X). **F:** Ampliación (350X) de la región encuadrada en E mostrando el borde inferior de la gran úlcera; se aprecia la exposición de las fibras del estroma (flechas negras) y un pequeño resto de epitelio corneal (flecha blanca).

Para conocer en detalle las alteraciones oculares, realizamos el estudio histológico de secciones de cabezas de ratones transgénicos y no transgénicos en diferentes fases de la ontogénesis (Figuras 32, 33 y 34). Las primeras diferencias observadas entre los ojos transgénicos y no transgénicos es aparecieron en embriones de 15,5 d.p.c (Figura 32), de forma que, en los transgénicos, el epitelio de la parte central de la córnea y de los bordes de los párpados aparecía más delgado y vacuolizado (Figura 32J, K y O) en comparación con los no transgénicos (Figura 32A, B, F).

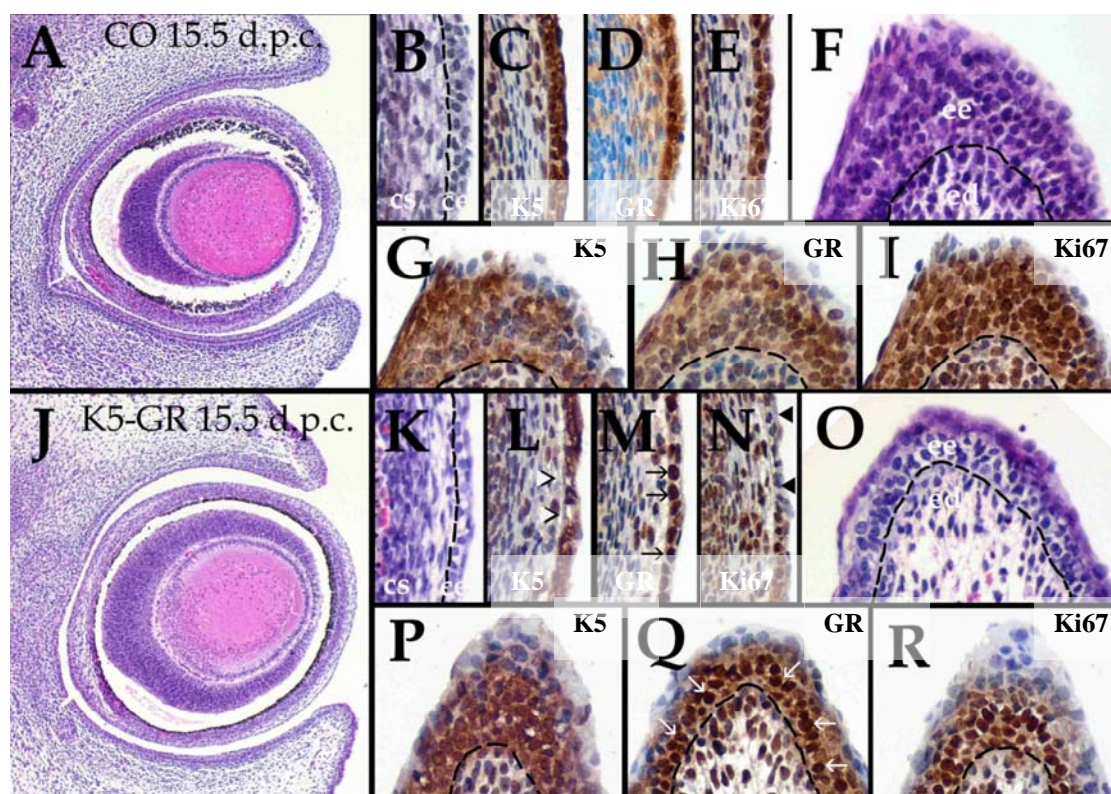


Figura 32. Primeras fases de los defectos oculares encontrados en embriones transgénicos de 15,5 d.p.c. (A-I): Secciones de ojo no transgénico. **(J-R):** Secciones de ojo K5-GR. Tinción con HE del globo ocular y anejos (A, J), cornea (B, K) o párpados (F, O). (B, F, K, O) La línea punteada indica la membrana basal. Inmunotinción de la córnea (C-E, L-N) o el párpado (G-I, P-R) utilizando un anticuerpo anti-queratina K5 (C, G, L, P), un anticuerpo anti-GR (D, H, M, Q), o un anticuerpo anti-Ki67 (E, I, N, R). Se aprecia una ligera discontinuidad en la expresión de K5 en el epitelio de la parte central de la córnea que se corresponde con las células vacuolizadas (L, puntas de flecha, comparar con C). La localización de mGR en el epitelio de la parte central de la córnea y párpados es tanto citoplasmática como nuclear en no transgénicos (D, H) pero es predominantemente nuclear en ratones transgénicos (M, Q, flechas). La expresión de Ki-67 decrece notablemente en la parte central de la córnea (N, puntas de flecha) y borde parpebral (R) en comparación con los embriones no transgénicos (E, I). Abreviaturas: **ce**, epitelio corneal; **cs**, estroma corneal; **ee**, epitelio del borde parpebral; **ed**, dermis del borde parpebral. Ampliaciones: (A, J), 40X; (B-I, K-R) 200X.

El inmunomarcaje de estas secciones con el anticuerpo anti-K5 reveló una expresión continua de esta queratina en la córnea (Figura 32C) y en el epitelio del párpado (Figura 32G) en los embriones no transgénicos de 15,5 d.p.c. En sus hermanos de camada transgénicos, se mantenía todavía la expresión continua de la queratina K5 en el epitelio del borde del párpado (Figura 32P) pero, el epitelio de la parte central de la córnea, presentaba pequeñas áreas de discontinuidad que se correspondían con áreas en las que las células epiteliales aparecían con el citoplasma vacuolizado (Figura 32L, puntas de flecha).

En este estadio embrionario, la localización de GR en el epitelio de la córnea y párpados fue tanto nuclear como citoplasmática en los embriones no transgénicos (Figura 32D y H, respectivamente), mientras que fue predominantemente nuclear en los transgénicos hermanos de camada (Figura 32M, córnea y Q, párpado).

Como el GR ejerce un papel antiproliferativo en algunos epitelios poliestratificados, tales como la epidermis, hemos evaluado si la sobreexpresión de GR afectaba al índice proliferativo de los epitelios de la córnea y párpado. Con este propósito, realizamos inmunotinciones en secciones de ojo de embriones de 15,5 d.p.c. utilizando un anticuerpo contra el antígeno nuclear Ki-67, que se expresa en todas las células en proliferación y no se expresa en las células en fase de reposo (Figura 32). La determinación del índice proliferativo en ratones no transgénicos (n=3) mostró unos valores del 42,17% en la córnea y del 42,06% en el epitelio del borde del párpado (Figura 32E e I, respectivamente). Esta proporción de células en proliferación estaba claramente disminuida en los hermanos de camada transgénicos (n=3) que presentaron un índice proliferativo del 26,31% en el epitelio corneal y del 26,60% en el epitelio del párpado (Figura 32N y R, respectivamente).

A partir de los 15,5 d.p.c, etapa embrionaria en la que observamos las primeras lesiones oculares en los transgénicos, realizamos el estudio histopatológico de embriones de 16,5 d.p.c, 17,5 d.p.c y 18,5 d.p.c y de neonatos, con el fin de caracterizar la evolución de dichas lesiones iniciales a lo largo del desarrollo de los embriones tardíos. Así, en los ratones no transgénicos observamos que, desde los 16,5 d.p.c hasta los neonatos (P0), el ojo apenas mostraba cambios morfológicos, ya que los párpados se encontraban ya fusionados a los 16,5 d.p.c., manteniéndose así hasta el nacimiento, formando el saco conjuntival ciego que favorecía la maduración de la córnea; como ejemplo se muestra un

ojo no transgénico de 17,5 d.p.c en la Figura 33A. Sin embargo, en los hermanos de camada transgénicos fue evidente el defecto en la fusión de los párpados a los 16,5 d.p.c., manteniéndose así a lo largo del desarrollo hasta el nacimiento, no llegando a formarse el saco conjuntival (Figura 33B.1, C.1, D.1).

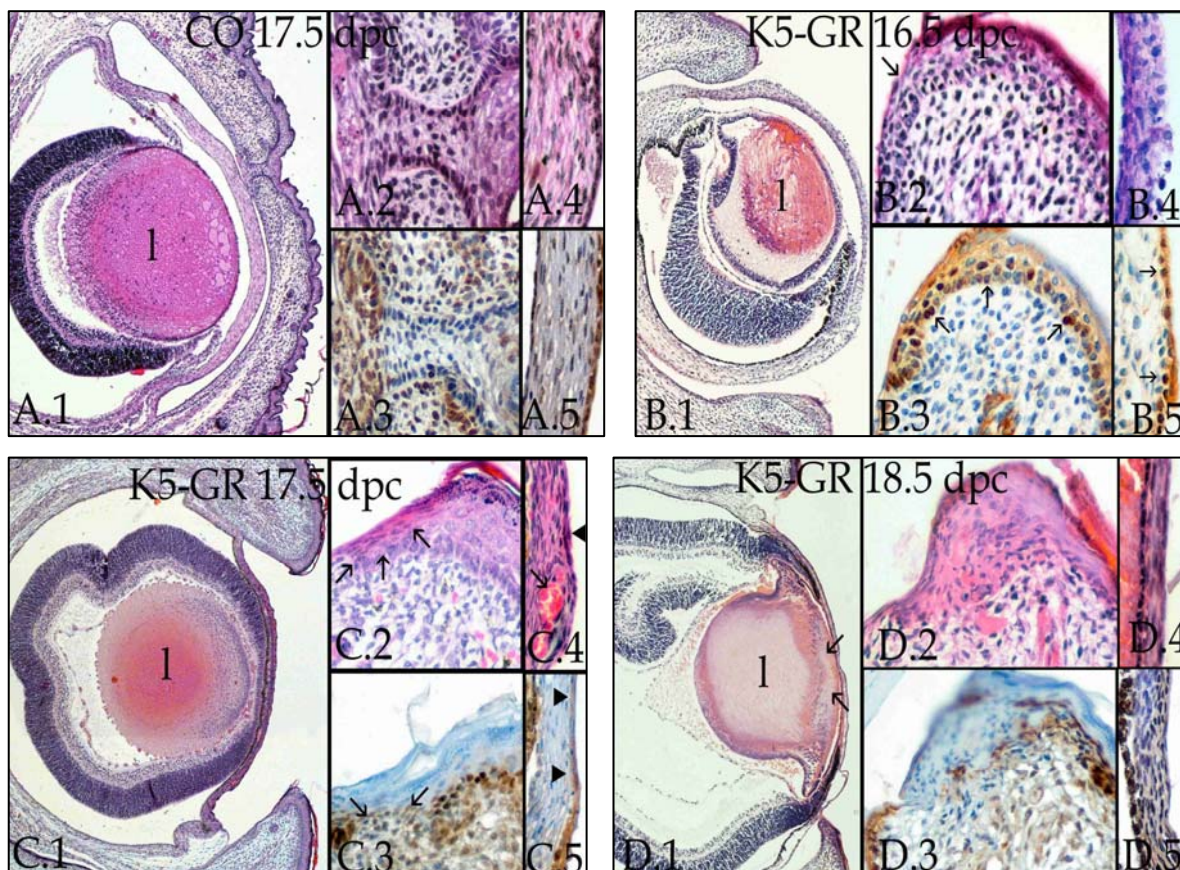


Figura 33. Graves lesiones oculares en embriones transgénicos K5-GR. Secciones de ojo no transgénico de 17,5 d.p.c. (A.1-A.5) y secciones de ojos transgénicos de embriones de 16,5 d.p.c. (B.1-B.5), 17,5 d.p.c. (C.1-C.5), y 18,5 d.p.c. (D.1-D.5). Secciones teñidas con HE del ojo entero (A.1, B.1, C.1, D.1), del borde de los párpados (A.2, B.2, C.2, D.2) y de la córnea (A.4, B.4, C.4, D.4). I: Cristalino. Las alteraciones en el desarrollo del ojo progresan desde una atrofia asociada a vacuolización del epitelio del borde interno de los párpados (B.2, flecha), y de la parte central de la córnea (B.4) hasta una necrosis coagulativa de este epitelio (C.2, Flechas; C.4 punta de flecha) con vascularización patológica del estroma corneal (C.4, flecha). En embriones transgénicos de 18,5 d.p.c. la necrosis se extiende a todo el borde parpebral (D.2), a la parte anterior del cristalino (D.1, flechas) y la córnea presenta ausencia de epitelio y atrofia del estroma corneal (D.4). Inmunotinción utilizando el anticuerpo anti-mGR en los párpados (A.3, B.3, C.3, E.3) y en la córnea (A.5, B.5, C.5, D.5). Se aprecia localización nuclear del GR en la capa basal del epitelio parpebral (B.3, flechas) y en el epitelio corneal (B.5, flechas) en embriones transgénicos de 16,5 d.p.c. Las áreas necróticas en los párpados (C.3 flechas; D.3) y en la córnea (C.5, puntas de flecha; D.5) no expresan GR por ausencia del epitelio. Ampliaciones: A.1, B.1, C.1, D.1: 40X; A.2-A.5, B.2-B.5, C.2-C.5, D.2-D.5: 200X.

En embriones transgénicos de 16,5 d.p.c, además del defecto en el cierre de los párpados observamos atrofia y vacuolización del epitelio del borde interno del párpado (Figura 33, comparar B.2 y A.2). La región central de la córnea presentaba lesiones similares, con vacuolización y aplanamiento atrófico del epitelio (Figura 33, comparar B.4 y A.4). El inmunomarcaje con el anticuerpo anti-GR demostraba la expresión de GR en los núcleos de las células basales del epitelio de los párpados (Figura 33B.3, flechas) y de la córnea (Figura 33B.5, flechas).

En los embriones transgénicos de 17,5 d.p.c., la atrofia corneal se extendía a toda su superficie, provocando su contacto con un cristalino correctamente posicionado, obliterando la cámara anterior del globo ocular (Figura 33, la córnea atrófica en C.1 tiene la mitad del grosor que la córnea normal a esa misma edad en A.1). Durante esta fase del desarrollo embrionario los primeros cambios necróticos aparecen en el epitelio de los bordes parpebrales y de parte central de la córnea en los transgénicos (Figura 33C.2 y C.4, respectivamente). El epitelio del borde interno, o conjuntival, de los párpados presentaba signos de necrosis por coagulación, apareciendo las células condensadas, con el citoplasma eosinofílico y con pérdida de los detalles celulares (Figura 33C.2, flechas). El epitelio de la parte central de la córnea aparecía con las mismas características (Figura 33C.4 punta de flecha, comparar con A4 en el no transgénico) y el estroma corneal presentaba un desarrollo patológico de vasos sanguíneos (Figura 33C.4, flecha). Las áreas necróticas de la porción interna del borde de los párpados y de la parte central de la córnea carecían de expresión de GR (Figura 33C.3, flechas y C.5, puntas de flecha, respectivamente).

A medida que avanzaba el desarrollo, los cambios necróticos que afectaban al borde de los párpados y a la parte central de la córnea en los animales transgénicos se hacían más dramáticos. Así, en embriones transgénicos a término (18,5 d.p.c.), la necrosis afectaba no solo al epitelio, sino a todo el borde del tarso parpebral (Figura 33 D2); la parte central de la córnea carecía de cobertura epitelial debido a un proceso de desprendimiento de las células necróticas (Figura 33D4) y la necrosis corneal se extendía por contigüidad hasta la cara anterior del cristalino (Figura 33D.1 flechas). La mayor pérdida de la expresión del GR era paralela a la mayor amplitud de la necrosis epitelial en los párpados (Figura 33D.3) y en la córnea (Figura 33D.5).

En algunos transgénicos recién nacidos, el proceso necrótico de la córnea provocaba la necrosis y desprendimiento de la parte anterior del cristalino (Figura 34B flechas) e incluso progresaba hacia la perforación corneal con destrucción del cristalino (Figura 34C, puntas de flecha) y desprendimiento de la retina sensorial por pérdida de la presión ocular de la cámara posterior (Figura 34C, flechas). Todo el epitelio ocular derivado de la superficie ectodérmica estaba destruido en estos ratones transgénicos, excepto en el epitelio conjuntival del los fórnicos (Figura 34B y C, asteriscos).

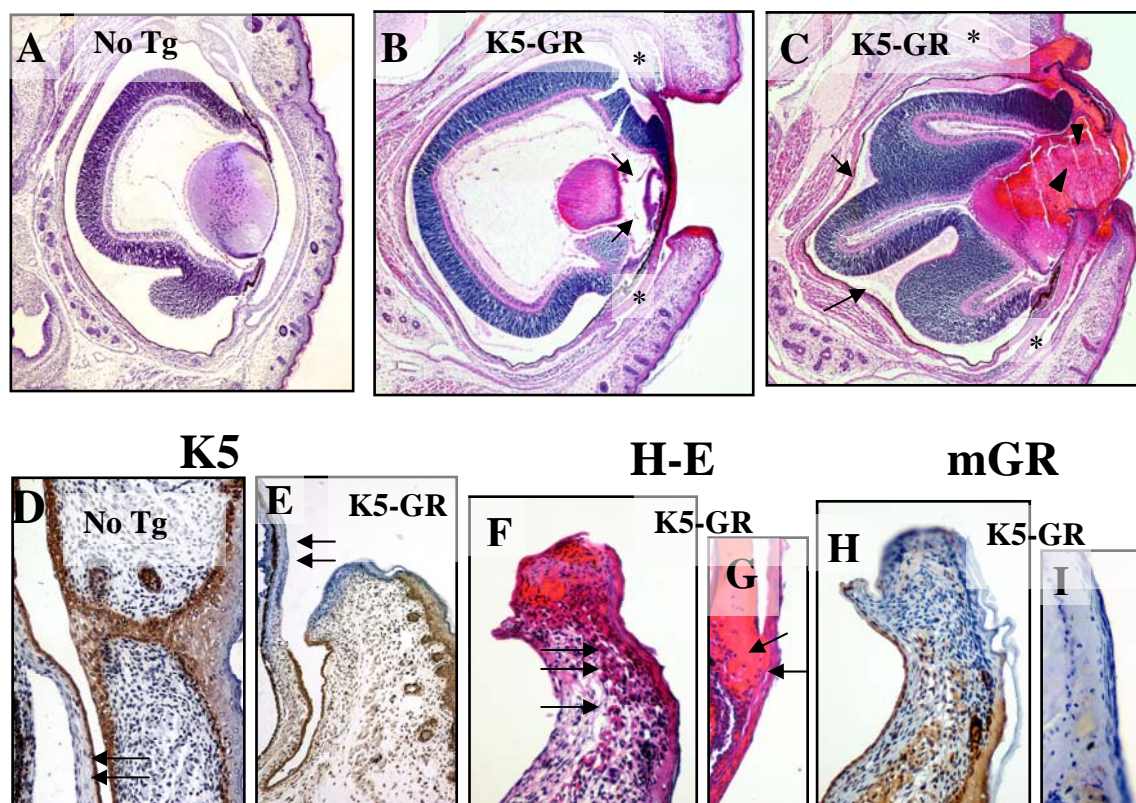


Figura 34. Anomalías oculares en ratones transgénicos K5-GR recién nacidos. A-C: Secciones teñidas con HE del ojo entero de ratones recién nacidos no transgénicos (A) y transgénicos (B, C). Nótese la necrosis de la parte anterior del cristalino (C, puntas de flecha) y el desprendimiento de la retina (C, flechas). Los asteriscos en B y C indican las zonas no afectadas del epitelio del fornix conjuntival. F, G: H-E borde del párpado inferior (F) y córnea (G) de un ojo de recién nacido K5-GR. Las áreas necróticas afectan a la totalidad del tarso parpebral (las flechas en F señalan el infiltrado de macrófagos). La córnea aparece con el epitelio desprendido y el estroma hialinizado (G, flechas). D, E, H, I: Inmunotinción del borde parpebral y córnea usando los anticuerpos anti-queratina K5 en no transgénicos (D) y transgénico K5GR (E) y el anticuerpo anti-mGR en párpado (H) y córnea (I). A diferencia del no transgénico (D), se aprecia una falta de expresión de la queratina K5 por necrosis del epitelio anterior de la córnea (E, flechas) y en el borde del párpado en los recién nacidos transgénicos. La expresión de GR está ausente en las zonas necróticas del borde del párpado (H) y en la córnea (I) donde se ha perdido el epitelio anterior. Ampliaciones: A-C: 40X; D-I: 200X.

Todos los transgénicos recién nacidos presentaron al menos uno de los ojos afectado por necrosis coagulativa del tarso parpebral en uno o ambos párpados (Figura 34F); la necrosis también afectaba a la región central de la córnea que perdía el epitelio necrosado y mostraba el estroma corneal hialinizado (Figura 34G, flechas). Debido a la amplitud del tejido necrosado, se observaba un elevado número de macrófagos en el tarso parpebral (Figura 34F flechas) que, normalmente, son atraídos a los tejidos muertos con la finalidad de liberar enzimas para digerir los restos celulares (Slauson and Cooper, 2002). La pérdida de la expresión de K5 se limitaba a las áreas epiteliales destruidas en los bordes parpebrales y la córnea (Figura 34E, flechas) y, paralelamente a la pérdida de expresión de K5, se observaba la pérdida de expresión de GR en estas localizaciones (Figura 34H e I).

La penetrancia del fenotipo ocular descrito en embriones a término y ratones recién nacidos transgénicos (n=22) fue la siguiente: el 27,27% presentaban defectos en el párpado superior y cambios necróticos en la parte central de la córnea, el 50% mostraban defectos en ambos párpados y cambios necróticos que afectaban a la córnea y a la parte anterior del cristalino y el 22,73% de los ratones transgénicos mostraban el fenotipo más grave (defectos en ambos párpados, necrosis de la córnea y cristalino con perforación corneal y desprendimiento de la retina sensorial).

El factor de transcripción p63 es imprescindible para el mantenimiento del potencial proliferativo adecuado en los queratinocitos de la capa basal de la epidermis madura, y para la iniciación de la estratificación epitelial de los epitelios estratificados y derivados ectodérmicos. Teniendo en cuenta que p63 es también un marcador de la población de células madre en esos epitelios, hemos estudiado su expresión en secciones coronales de los ojos en ratones transgénicos y no transgénicos de un día de edad (P1), utilizando un anticuerpo específico anti- Δ Np63, isoforma que carece de dominios de transactivación.

En ratones no transgénicos la proteína Δ Np63 marcaba intensamente las células de la capa basal de la piel de los párpados, las células de la vaina radicular externa de los folículos pilosos, las células basales del epitelio conjuntival bulbar y palpebral y las células basales del epitelio corneal (Figura 35A, D).

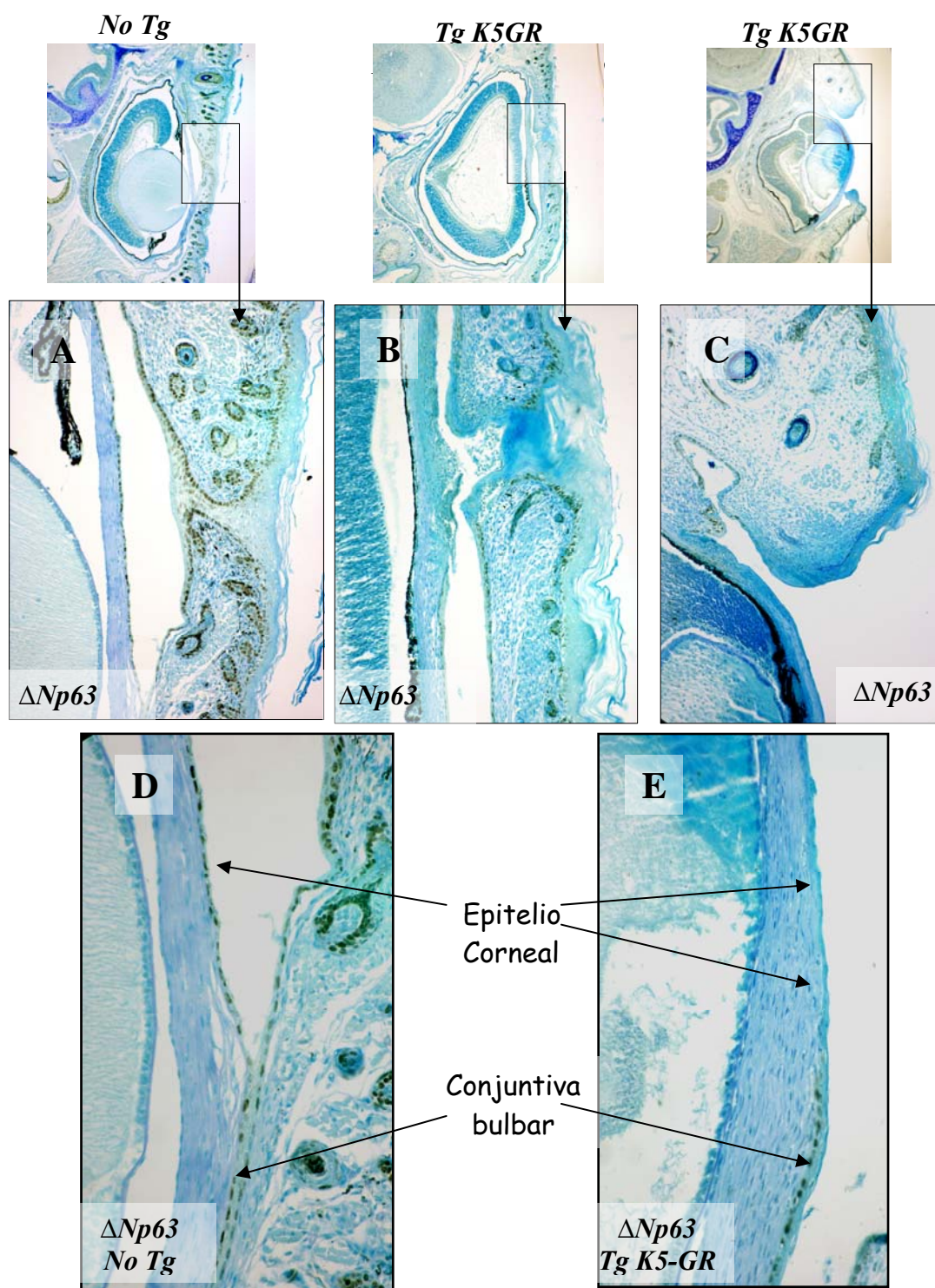


Figura 35. Inmunomarcaje frente a $\Delta Np63$ en secciones del ojo de ratones P1. Secciones de no transgénicos (A, D) y de transgénicos K5-GR (B, C, E) Obsérvese la ausencia de marcaje en los bordes parpebrales y en el epitelio corneal en los animales transgénicos. Ampliaciones: arriba: 40X; A-C: 100X; D-E: 200X.

Por el contrario, en los ratones transgénicos K5-GR existía una menor expresión de Δ Np63 en la capa basal de la epidermis y de la conjuntiva ocular (Figura 35B); el marcaje de esta proteína desaparecía en los bordes de los párpados. La pérdida de la expresión de Δ Np63 fue muy evidente en los animales que presentaban el fenotipo ocular más grave (Figura 35C). En las células de la capa basal del epitelio corneal la disminución de Δ Np63 era más dramática, llegando a desaparecer el marcaje de esta proteína en los animales con fenotipo intermedio y grave (Figura 35E).

5.2. Alteraciones oculares en adultos.

En coherencia con las graves anomalías oculares observadas en embriones a término y recién nacidos transgénicos, los ratones adultos presentaban, diversos grados de ceguera por microftalmía grave o por opacidad y esclerosis corneal, pudiendo existir una total epidermalización de la córnea que aparecía unida mediante una sinequia con el epitelio conjuntival (Figura 36A).

El estudio histopatológico de las secciones de ojos en ratones adultos no transgénicos mostraba un cristalino bien desarrollado (Figura 36B, l) separado de la córnea y de la cámara anterior del ojo por el iris pigmentado (Figura 36B, i). Los bordes de los párpados mostraban un desarrollo abundante de glándulas sebáceas modificadas, o de Meibomio (Figura 36B, m), ocupando el eje central del tarso parpebral; aproximadamente observamos el doble de desarrollo de las glándulas de Meibomio en el párpado superior que en el inferior.

En los adultos K5-GR la microftalmía se debía a la ausencia del cristalino (afaquia) (Figura 36C) o a su tamaño pequeño (microfaquia) asociado a catarata anterior por licuefacción y degeneración de sus fibras (Figura 36D). En ausencia del cristalino los ojos aparecían dismórficos, ocupados por restos de la retina desprendida, con atrofia del nervio óptico (Figura 36C, r). La córnea, muy engrosada, presentaba amplias zonas de calcificación distrófica (Figura 36D, c) con aumento de la celularidad del estroma y abundantes células gigantes de cuerpo extraño alrededor de los depósitos cristalinos, intentando fagocitarlos (Figura 36E, flechas). Los párpados aparecían más cortos y gruesos, a modo de muñones, con ausencia del tarso parpebral y de las glándulas de Meibomio (Figura 36C, E, el).

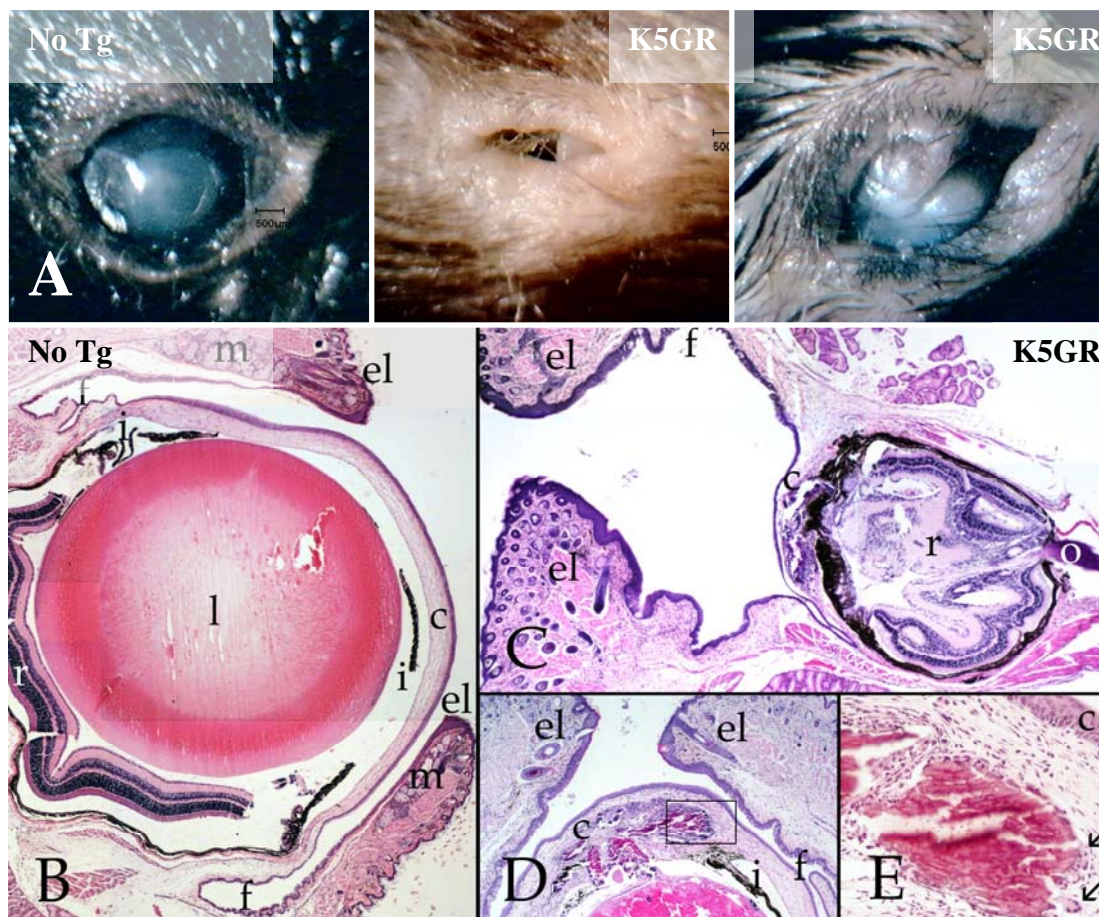
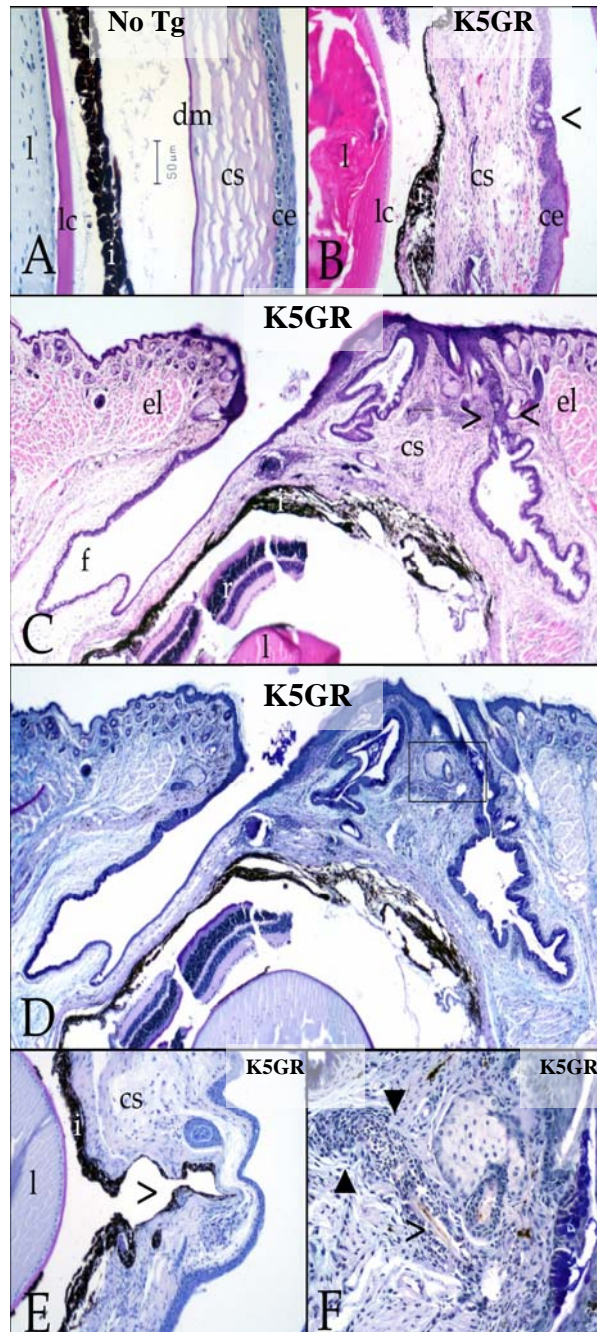


Figura 36. Patología ocular en ratones adultos K5-GR. A: Vista lateral del ojo de un ratón no transgénico (izquierda) y de hermanos de camada transgénicos (centro y derecha). Los transgénicos adultos muestran ceguera por microftalmía grave (imagen central) o por epidermalización de la córnea (imagen de la derecha). B-E: Tinciones con HE de secciones de ojo no transgénico (B) y transgénicos (C-E). c: cornea, el: párpado, f: saco conjuntival, i: iris, l: cristalino, m: glándulas sebáceas de Meibomio, o: nervio óptico, r: retina. C: Microftalmía grave por ausencia del cristalino, desprendimiento de retina y atrofia de nervio óptico. El iris se encuentra totalmente adherido al estroma de la parte posterior de la córnea D: Microftalmía acompañada de un cristalino pequeño (microfaquia) que muestra licuefacción y degeneración de sus fibras (catarata anterior). El iris se encuentra parcialmente adherido al estroma corneal que muestra amplias zonas de calcificación distrófica. Los párpados son más cortos y gruesos; el tarso parpebral y las glándulas de Meibomio están ausentes (véase también C). E: Ampliación de una zona de calcificación distrófica de la figura anterior; las flechas indican células gigantes multinucleadas alrededor de los depósitos cristalinos. Ampliaciones: A-D: 40X, E: 200X.

El estudio pormenorizado de los epitelios de la mitad anterior del ojo, en los ratones adultos no transgénicos, mostraban a la córnea constituida por un epitelio estratificado escamoso no queratinizado, con una lámina basal y con unas capas suprabasales bien definidas (Figura 37A, ce), mientras que el estroma corneal contenía relativamente pocos fibroblastos, o queratocitos, rodeados de láminas de colágeno, ordenadas en paralelo con la membrana basal del epitelio (Figura 37A, cs). Este estroma corneal carecía de vasos

sanguíneos y estaba recubierto por la membrana de Descemet (Figura 37A, dm), una auténtica membrana basal, PAS positiva, elaborada por las células endoteliales corneales subyacentes. El iris separaba las cámaras anterior y posterior (Figura 37A, i) y el cristalino aparecía cubierto por la cápsula (Figura 37A, lc), PAS-positiva, sintetizada por las células del endotelio subyacente.



← **Figura 37. Defectos corneales en adultos K5-GR.** Secciones de ojos teñidas con PAS-Azul Alcian (A, D-F) o con H-E (B, C) en no transgénicos es (A) y transgénicos (B-F). **ce:** epitelio corneal, **cs:** estroma corneal, **dm:** membrana de Descemet, **el:** párpado, **f:** saco conjuntival, **i:** cristalino, **lc:** cápsula del cristalino. **B:** Catarata anterior, vascularización del estroma corneal, queratinización del epitelio corneal y diferenciación de células mucosas (punta de flecha). **C** y **D** secciones seriadas del mismo ojo con sinbléfaron o sinequia entre el párpado y la córnea (puntas de flecha en **C**). Hay epidermalización de la córnea con desarrollo de folículos pilosos y glándulas sebáceas en el estroma corneal. **(B-E): leucoma adherens** por adherencia entre el tejido iridal y el estroma corneal posterior. **E:** Descematocele que destruye la casi totalidad del grosor del estroma corneal, a partir de la rotura de la membrana de Descemet (flecha abierta). **F:** Ampliación del campo enmarcado en **D**, glándula pilosebácea y pelo roto (punta de flecha abierta) rodeado de neutrófilos y células gigantes multinucleadas (puntas flecha). Ampliaciones: (**C, D**): 100X; (**A, B, E**): 200X; **F**: 400X.

Las secciones de ojo de ratones transgénicos K5-GR mostraban las lesiones más graves localizadas en la córnea, que presentaba un aumento de la densidad del estroma,

abundante vascularización y adherencias del iris al estroma corneal posterior (*leucoma adherens*) (Figura 37B-E, i), lo que determinaba la obliteración de la cámara anterior del globo ocular. El epitelio corneal frecuentemente aparecía queratinizado y con diferenciación de células mucosas en su interior, similares a las observadas en el epitelio del *fórnix* conjuntival de los ratones no transgénicos (Figura 37B, punta de flecha abierta).

Algunos ratones transgénicos adultos mostraron una amplia sinequia entre los párpados y la córnea (sinbléfaron) (Figura 36A; Figura 37C, puntas de flecha huecas y 37D). En estos casos, el epitelio corneal mostraba epidermalización, al presentar una morfología semejante a la epidermis, con formación de queratina e incluso con el desarrollo de unidades pilosebáceas en el interior del estroma corneal (Figura 37D, F). La eclosión del pelo en estas condiciones determinaba su ruptura y la aparición de frecuentes furunculosis (Figura 37F, punta de flecha hueca), por la respuesta inflamatoria desencadenada frente a las proteínas extrañas de los fragmentos de pelo, apareciendo células gigantes multinucleadas y polimorfonucleares neutrófilos (puntas de flecha en Figura 37F).

En algunos casos, la destrucción masiva del estroma corneal provocaba descematocele con evaginación de la membrana de Descemet, y del iris adherido a ella, hacia el epitelio corneal (Figura 37E, punta hueca).

6. EFECTOS SOBRE EL OJO EN NEONATOS DEL TRATAMIENTO CON DEX O METOPIRONA *IN ÚTERO*.

Para confirmar que el fenotipo ocular se debía específicamente a la activación de GR producida por su sobreexpresión, se realizaron experimentos en los cuales ratones no transgénicos y transgénicos fueron expuestos, bien a Dex, o bien al inhibidor de la síntesis de GCs metopirona, durante el desarrollo embrionario, por tratamiento de la madre gestante desde el día 12,5 d.p.c. hasta el nacimiento.

El ojo de los recién nacidos transgénicos K5-GR tratados con dexametasona presentaba lesiones más graves que las descritas en los transgénicos no tratados, apareciendo dismórfico, con restos necróticos de la córnea, el cristalino y la retina y ausencia de cierre parpebral y de respuesta inflamatoria (Figura 38 C). Por el contrario, en

los transgénicos K5-GR tratados con metopirona el fenotipo ocular revertió parcialmente, ya que el desarrollo de los párpados era casi completo, sin llegar a hacer contacto, presentando necrosis limitada a los bordes parpebrales y asociada a un intenso infiltrado inflamatorio; las lesiones corneales eran leves y el cristalino no presentaba anomalías (Figura 38 D).

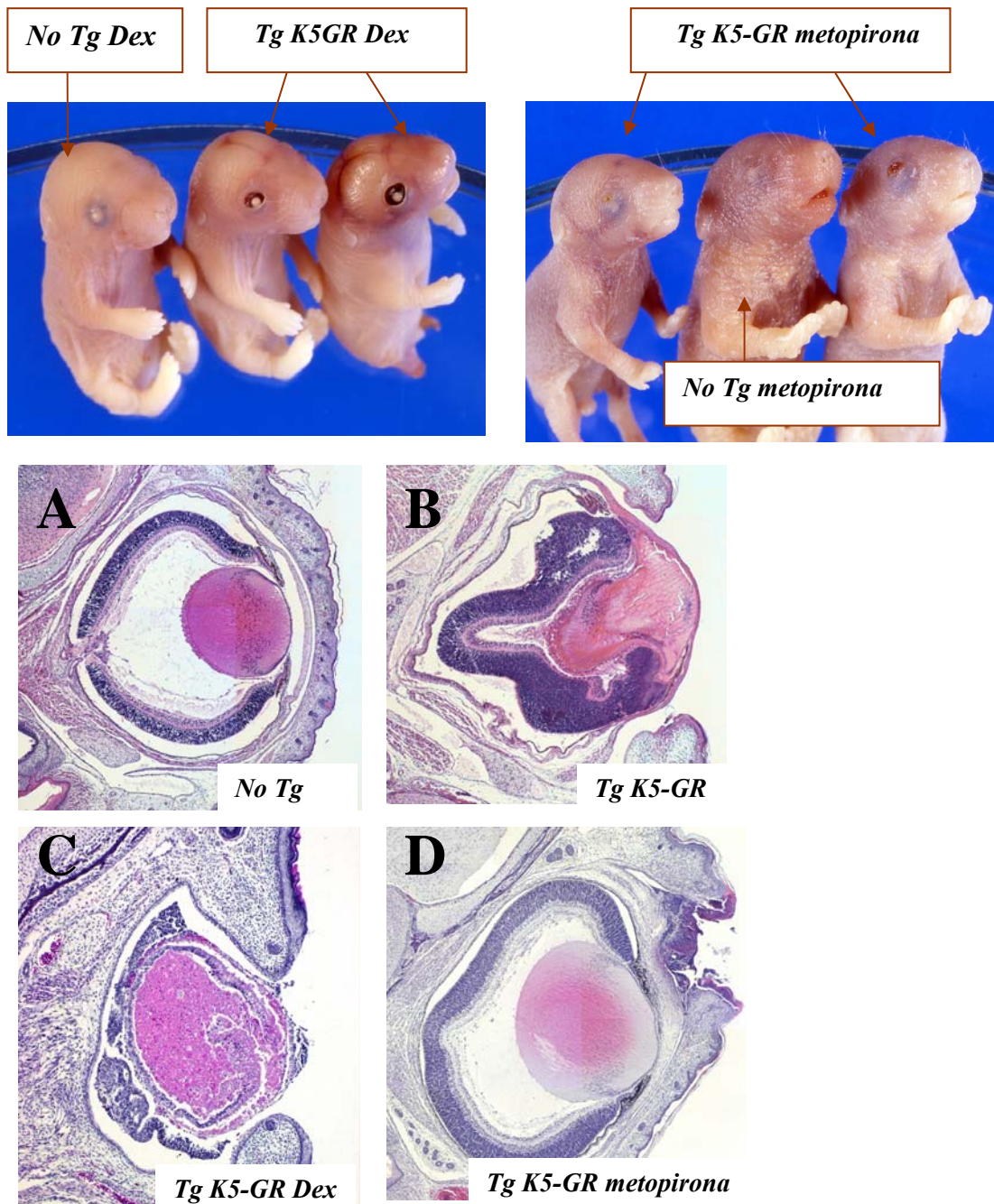


Figura 38. Fenotipo ocular en P0 tratados con Dex o metopirona. Imágenes macroscópicas (arriba) de la reversión parcial del fenotipo con cierre casi completo de los párpados en transgénicos K5-GR tratados *in utero* con metopirona. **A-D** Secciones coronales del ojo teñidas con HE. **A:** No transgénico. **B:** Transgénico K5-GR con las lesiones típicas. **C:** Agravamiento de las lesiones oculares en un transgénico K5-GR tratado con Dex. **D:** reversión parcial del fenotipo en un transgénico K5-GR tratado con metopirona.

7. ALTERACIONES EN EL PALADAR EN EMBRIONES Y NEONATOS K5-GR.

Los ratones transgénicos K5-GR recién nacidos mostraron defectos en el desarrollo y fusión del paladar secundario ya que el 13,5% de los recién nacidos transgénicos estudiados (n=32) presentaron paladar hendido que afectaba solamente al paladar blando (Figura 39B) o al paladar blando y al paladar duro hasta la fosa incisiva (Figura 39C, D). No se observó ningún animal con hendiduras del paladar anterior (primario); tampoco encontramos animales con hendiduras de labio.

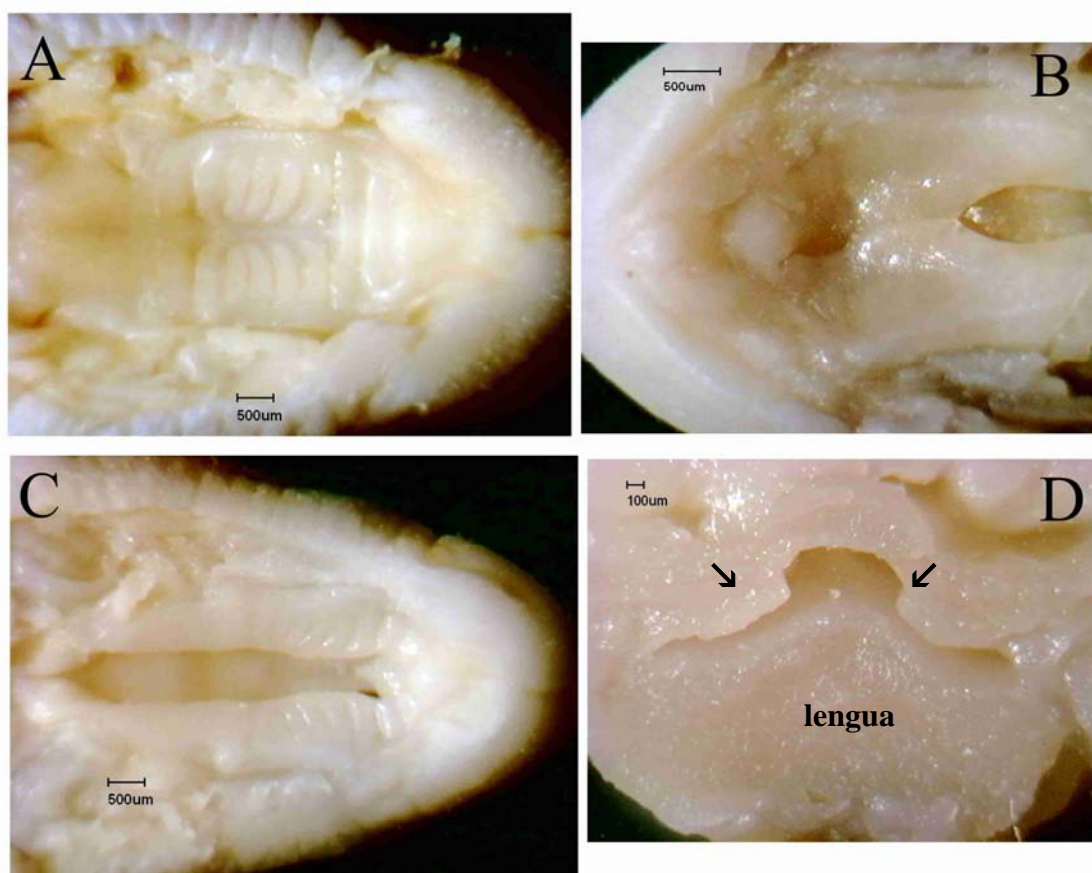


Figura 39. Paladar hendido en ratones K5-GR recién nacidos. A-C: Vista frontal de la superficie oral del maxilar superior en un ratón recién nacido no transgénico (A) y en dos transgénicos hermanos de camada que presentan hendidura palatina afectando al paladar blando (B) o a todo el paladar (C). D representa la sección coronal de la cabeza en un transgénico K5-GR con paladar hendido completo, para evidenciar la amplitud de la fisura palatina (flechas).

El estudio histopatológico de las secciones de la boca en los ratones transgénicos K5-GR recién nacidos, de la línea 285, reveló hipoplasia del epitelio del paladar, que aparecía muy fino, a veces constituido por una sola capa de células, muchas de ellas con el

citoplasma vacuolizado (Figura 40B, flechas), a diferencia del paladar en los no transgénicos que presentaba un epitelio estratificado escamoso, no queratinizado, muy bien diferenciado y con ausencia de vacuolización celular. (Figura 40A).

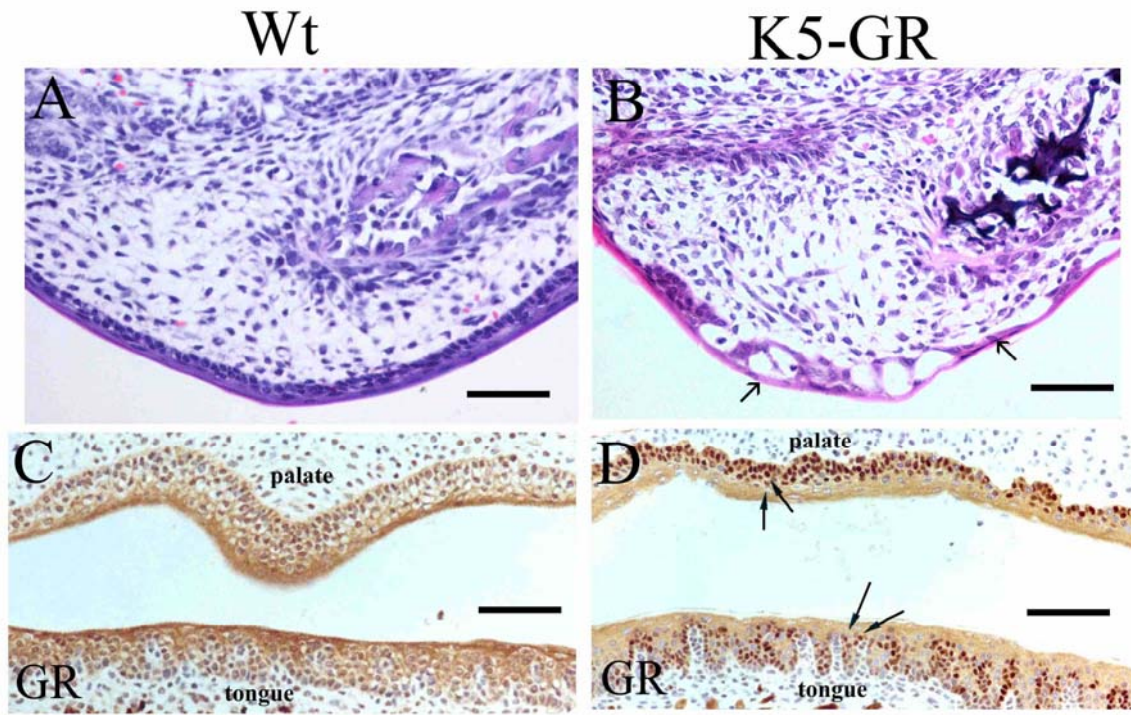


Figura 40. Defectos en la palatogénesis en ratones K5-GR recién nacidos. A, B: Sección del epitelio del paladar teñida con HE en un no transgénico (A) y un ratón transgénico K5-GR (B) que muestra un menor desarrollo y vacuolización de las células epiteliales (flechas). C, D: Mediante inmunomarcaje utilizando el anticuerpo mGR, determinamos la expresión de GR en el epitelio del paladar y lengua en el ratón no transgénico es citoplasmática (C) mientras que en transgénicos (D) es a la vez citoplasmática y nuclear. Ampliaciones: A-B: 200X; C-D: 100X

El epitelio del dorso de la lengua y el del paladar son órganos diana de expresión del trasgén; la tinción con el anticuerpo anti-GR (mGR) demostró una localización citoplasmática del GR endógeno en animales no transgénicos (Figura 40C) mientras que en transgénicos, la diferenciación alterada del epitelio oral se correlacionaba con una fuerte expresión del GR en el núcleo y en el citoplasma de los queratinocitos basales (Fig. 40D, flechas).

Los ratones transgénicos K5-GR con mayor penetrancia del fenotipo presentaban alteraciones en la morfología del paladar duro, en los cuales, el retraso en la osteogénesis en aquellas zonas más próximas al epitelio oral, determinaba la desaparición de la escala

palatina, adquiriendo el paladar un aspecto aplanado, tal y como se muestra en la Figura 41.

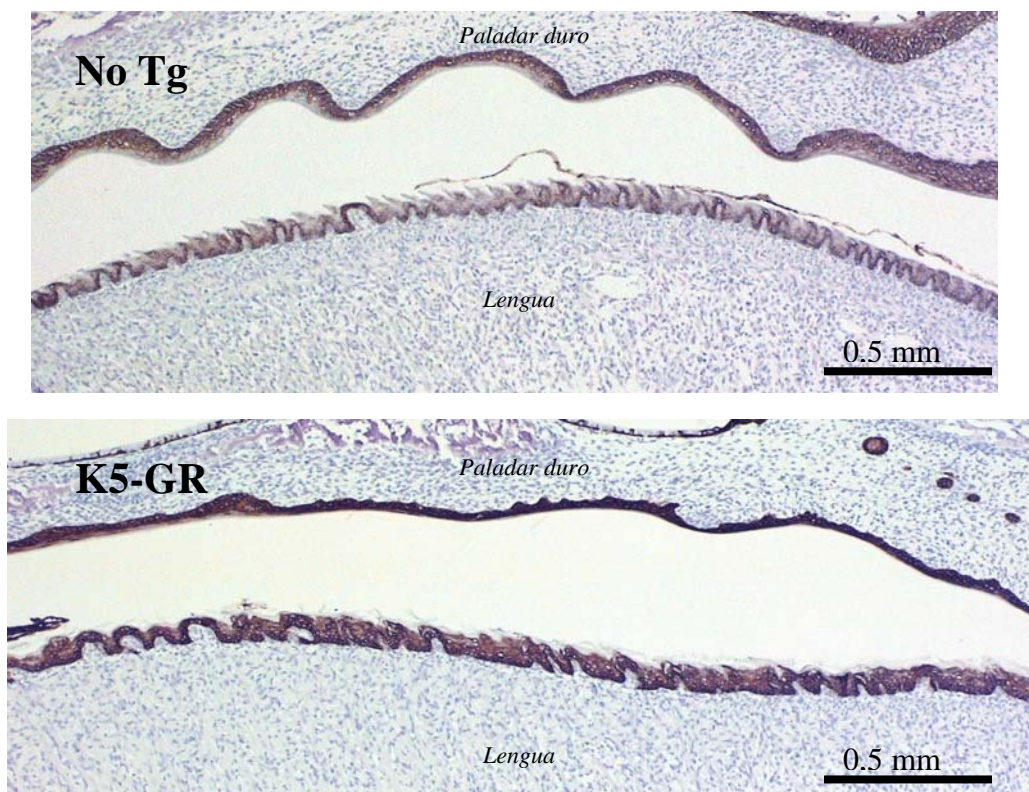


Figura 41. Secciones mediosagitales de la cabeza de embriones de 18,5 d.p.c., inmunomarcadas frente a K5. En el transgénico (abajo) es evidente el aplanamiento del epitelio del paladar duro por desaparición de la escala palatina, muy manifiesta en la sección del embrión no transgénico (arriba). Ampliaciones: 100X.

En los ratones adultos K5-GR no observamos alteraciones macroscópicas ni histológicas en el paladar.

8. ALTERACIONES DENTALES EN TRANSGÉNICOS K5-GR.

8.1. Alteraciones dentales en embriones y neonatos.

8.1.1. Alteraciones histopatológicas durante la odontogénesis.

Los ratones transgénicos K5-GR presentaron alteraciones en la odontogénesis, con un marcado retraso en la formación de los molares, así como una diferenciación anormal de las células epiteliales de los primordios dentales. Para el estudio histopatológico

comparado entre recién nacidos, no transgénicos y transgénicos, utilizamos secciones coronales de la cabeza a nivel de los primeros molares.

En el ratón recién nacido no transgénico, el germen dental de los molares se encontraba en la fase tardía de campana (*late bell stage*) (Figura 42A-B); en esta fase, las células del epitelio interno del esmalte ya se habían diferenciado a ameloblastos y secretaban matriz del esmalte y, las células de la papila dental, ya se habían diferenciado a odontoblastos, disponiéndose en empalizada y comenzando a sintetizar pre dentina.

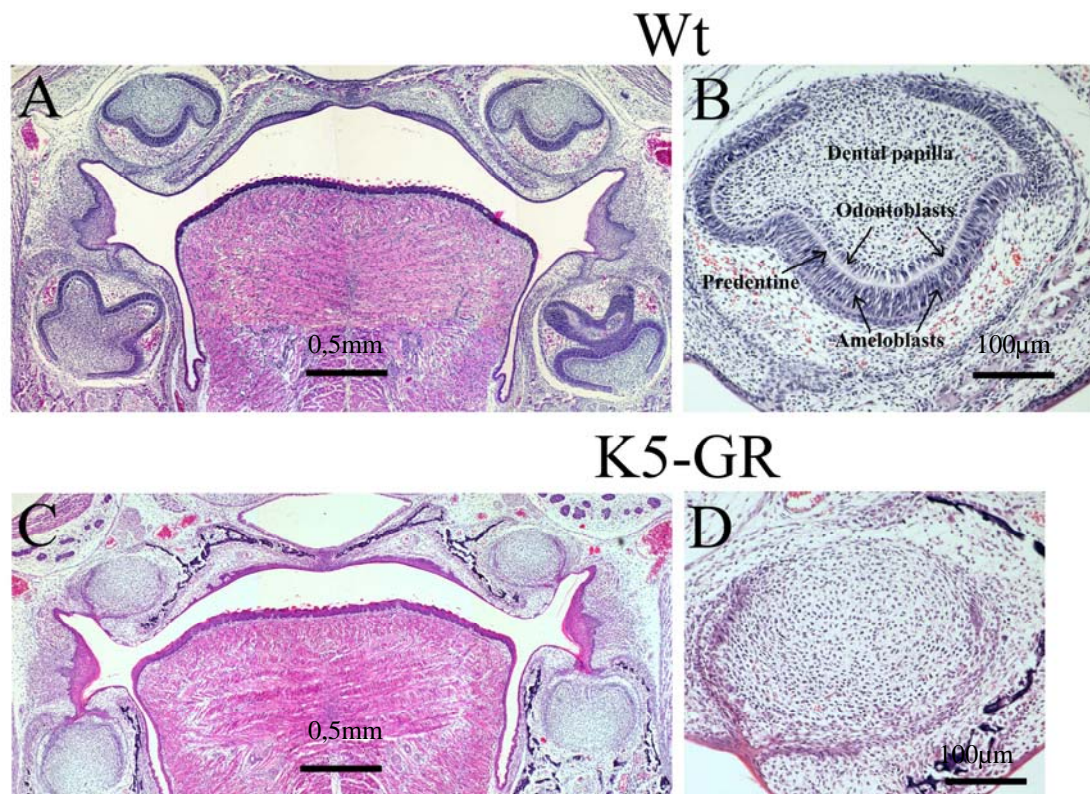


Figura 42. Secciones coronales de la cabeza de ratones recién nacidos a nivel del primer molar. No transgénicos (A, B) y transgénicos K5-GR (C, D); secciones teñidas con HE. B: ampliación del primer molar superior izquierdo en A; el molar superior no transgénico se encuentra en la fase tardía de campana (*late bell stage*). D: Ampliación del primer molar superior izquierdo en C; en el transgénico se encuentra en el inicio de la fase de caperuza (*early cap stage*). Ampliaciones: A, C: 40X; B, D: 200X.

En los ratones recién nacidos transgénicos K5-GR aparecía un importante retraso en el desarrollo dental (Figura 42C); encontrándose los gérmenes dentales de los primeros molares en el inicio de la fase de caperuza (*early cap stage*), una fase de desarrollo anterior a la fase de campana, en la cual ni las células del epitelio interno del esmalte ni las de la

papila dental se han diferenciado todavía a ameloblastos y odontoblastos, respectivamente, no existiendo, por lo tanto, ni matriz del esmalte ni predentina. Este retraso en el desarrollo de los primeros molares no afectaba por igual a todos los animales; así, en el 50% de los ratones transgénicos estudiados se encontraban en los inicios de la fase de caperuza (*early cap stage*), siguiendo la clasificación del desarrollo dental en el ratón propuesta por Depew (2000) (Figura 42D). Otro 50% de los molares de ratones transgénicos K5GR mostraron un menor retraso en el desarrollo dental al encontrarse en la fase tardía de caperuza (*late cap stage*), en la cual ya se pueden reconocer las células del retículo estrellado y las del estrato intermedio.

El inmunomarcaje de los primeros molares en recién nacidos, frente a la queratina K5, mostró en los no transgénicos, una expresión positiva en los epitelios del órgano del esmalte (epitelio externo del esmalte, epitelio interno del esmalte ya diferenciado a ameloblastos y retículo estrellado) a partir del cual se formará el esmalte. Las células mesodérmicas de la papila dental, que no expresaban queratina K5, comenzaban a diferenciarse a odontoblastos (Figura 43A).

Los recién nacidos transgénicos mostraban esta misma expresión de la queratina K5 en los epitelios del órgano del esmalte, lo que identifica a estas células ectodérmicas como un órgano diana del transgén, aunque en los transgénicos el epitelio interno del esmalte todavía no se había diferenciado a ameloblastos con la típica disposición en empalizada (Figura 43B). Este marcado retraso en el desarrollo de los molares en los transgénicos se correlacionaba con una intensa expresión nuclear del transgén en las células ectodérmicas del órgano del esmalte, sobre todo en las células del epitelio interno del esmalte (Figura 43D) comparadas con la expresión citoplásmica del GR en el no transgénico (Figura 43C). En los transgénicos las células mesodérmicas de la papila dental, negativas frente a la queratina K5, tampoco expresaban el transgén GR (ratGR) (Figura 43D); a diferencia de los no transgénicos, no encontramos diferenciación de células mesodérmicas hacia odontoblastos.

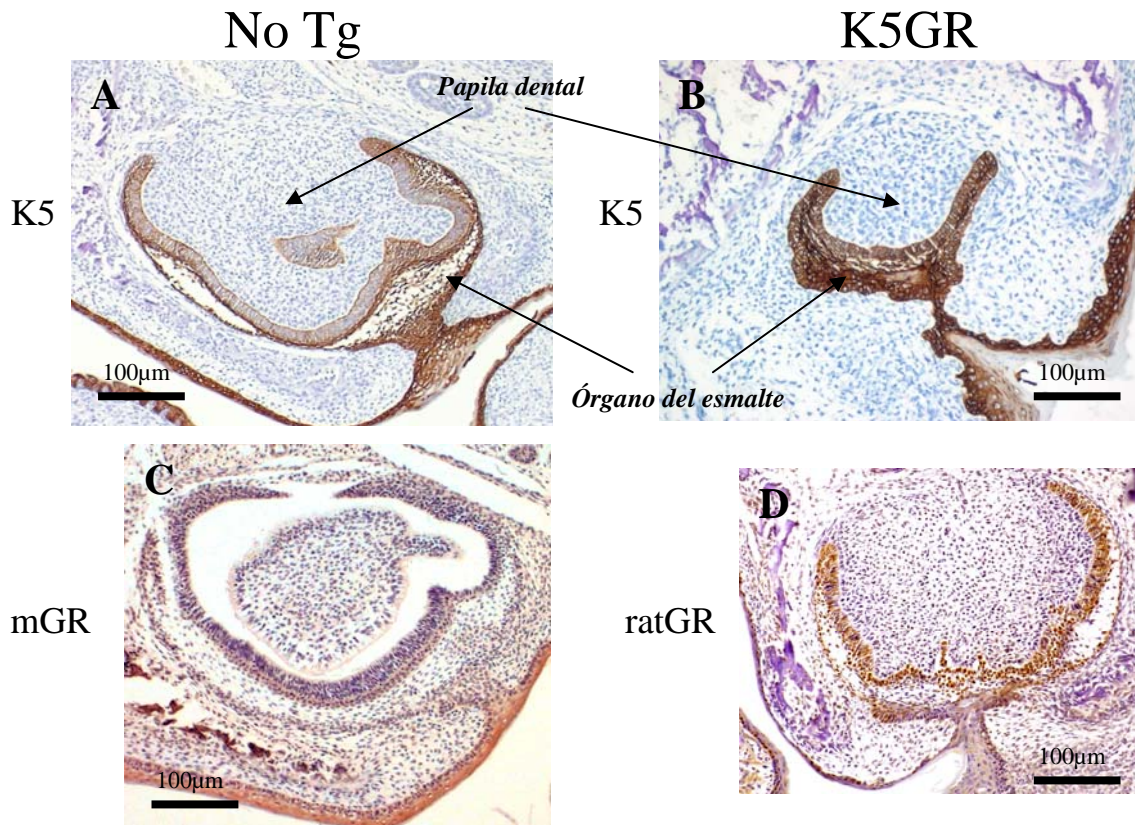


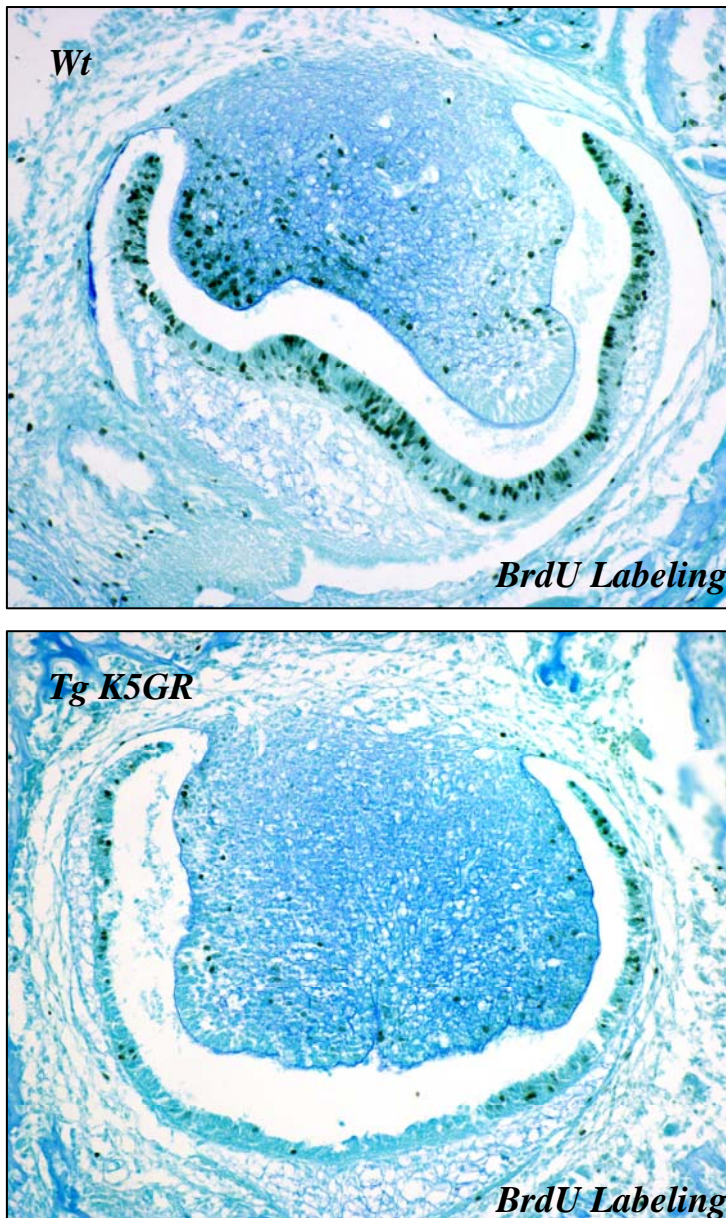
Figura 43. Marcaje inmunohistoquímico frente a K5, mGR y ratGR de primeros molares en recién nacidos. (A, C) No transgénicos. (B, D) transgénicos K5-GR. **A:** Expresión normal de la queratina K5 en las células del órgano del esmalte. **B:** Expresión de la queratina K5 en un primer molar inferior en un ratón transgénico K5-GR con fenotipo severo, que presentaba al mismo tiempo agenesia de ambos primeros molares superiores. **C:** La inmunotinción con GR endógeno demuestra una expresión citoplasmática en los epitelios del órgano del esmalte. **D:** Células del epitelio interno del esmalte en un ratón transgénico K5-GR mostrando expresión nuclear positiva frente al transgén GR (ratGR).

8.1.2. La tasa de proliferación está disminuida en los molares de transgénicos recién nacidos K5-GR.

Para comparar el índice de proliferación celular en los molares de recién nacidos no transgénicos y transgénicos, llevamos a cabo el estudio inmunohistoquímico de secciones coronales, a nivel del primer molar, con el anticuerpo anti-BrdU, en neonatos que habían sido inyectados, una hora antes del sacrificio, con bromodeoxiuridina (BrdU), un análogo de la timidina que se incorpora al ADN durante la fase S del ciclo celular.

Como se muestra en la Figura 44, el índice de incorporación de BrdU en los molares de los recién nacidos K5-GR se encontraba muy disminuido. En los ratones recién nacidos no transgénicos, el alto grado de incorporación de BrdU en la capa de

ameloblastos es indicativo de una intensa actividad mitótica en esta etapa del desarrollo; esta actividad proliferativa también era elevada en algunas zonas de la papila dental. Por el contrario, en el epitelio interno del esmalte –todavía no diferenciado a ameloblastos en empalizada- del primer molar, en los ratones transgénicos, la expresión de BrdU se encontraba drásticamente disminuida, así como en las células de la papila dental precursoras de los odontoblastos.



← **Figura 44. Incorporación de BrdU en primeros molares de recién nacidos.** Secciones inmunomarcadas con el anticuerpo anti-BrdU. En los transgénicos existe una disminución drástica en la incorporación de BrdU en el epitelio interno del esmalte, precursor de la capa de ameloblastos, y en la papila dental precursora de la capa de odontoblastos. Ampliación: 200X.

8.1.3. Alteración de la expresión de las proteínas de la familia IKK/NF- κ B.

Como la señalización de NF- κ B juega un papel importante en el desarrollo normal de los órganos de los derivados ectodérmicos (revisado por Smahi *et al.*, 2002) y conocido el antagonismo funcional entre GR y NF- κ B en epitelios (Pérez *et al.*, 2001, Leis *et al.*, 2004) nos propusimos estudiar si las alteraciones en la diferenciación de los dientes, en los transgénicos K5-GR, se correlacionaba con alteraciones en la expresión de las proteínas que forman parte de la familia IKK/ NF- κ B. Para ello llevamos a cabo el marcaje inmunohistoquímico utilizando anticuerpos contra IKK α , IKK β , IKK γ y p65 sobre secciones coronales de la cabeza, a nivel del primer molar, en embriones de 18.5 d.p.c. (Figura 45). No observamos expresión de IKK β ni en los molares de los embriones no transgénicos ni en los de los transgénicos, a esta edad del desarrollo embrionario.

En embriones no transgénicos, las células del epitelio interno del esmalte aparecían completamente diferenciadas a ameloblastos columnares, que mostraban una expresión abundante de IKK γ , p65 e IKK α (Figura 45A, C y E, respectivamente).

Experimentos previos han demostrado que la sobreexpresión del GR en epidermis se correlacionaba con niveles reducidos de IKK γ y, por lo tanto, con una actividad reducida de IKK γ y NF- κ B (Leis *et al.*, 2004). En concordancia con estos resultados, observamos una importante reducción de la expresión de IKK γ en la zona medial del primordio dental del primer molar, en los embriones transgénicos K5-GR de 18,5 d.p.c., coincidiendo con que en esa zona no existía diferenciación del epitelio interno del esmalte a ameloblastos (Figura 45B, flechas).

Esa misma región medial del primordio del molar en los transgénicos, con menor expresión de IKK γ , presentaba también una expresión disminuida de p65 e IKK α (Figura 45D, F, flechas).

Esta disminución de la expresión de estas tres proteínas en los molares de los embriones K5-GR, no afectaba por igual a todas las regiones, siendo mucho más acentuada en la zona del nudo del esmalte.

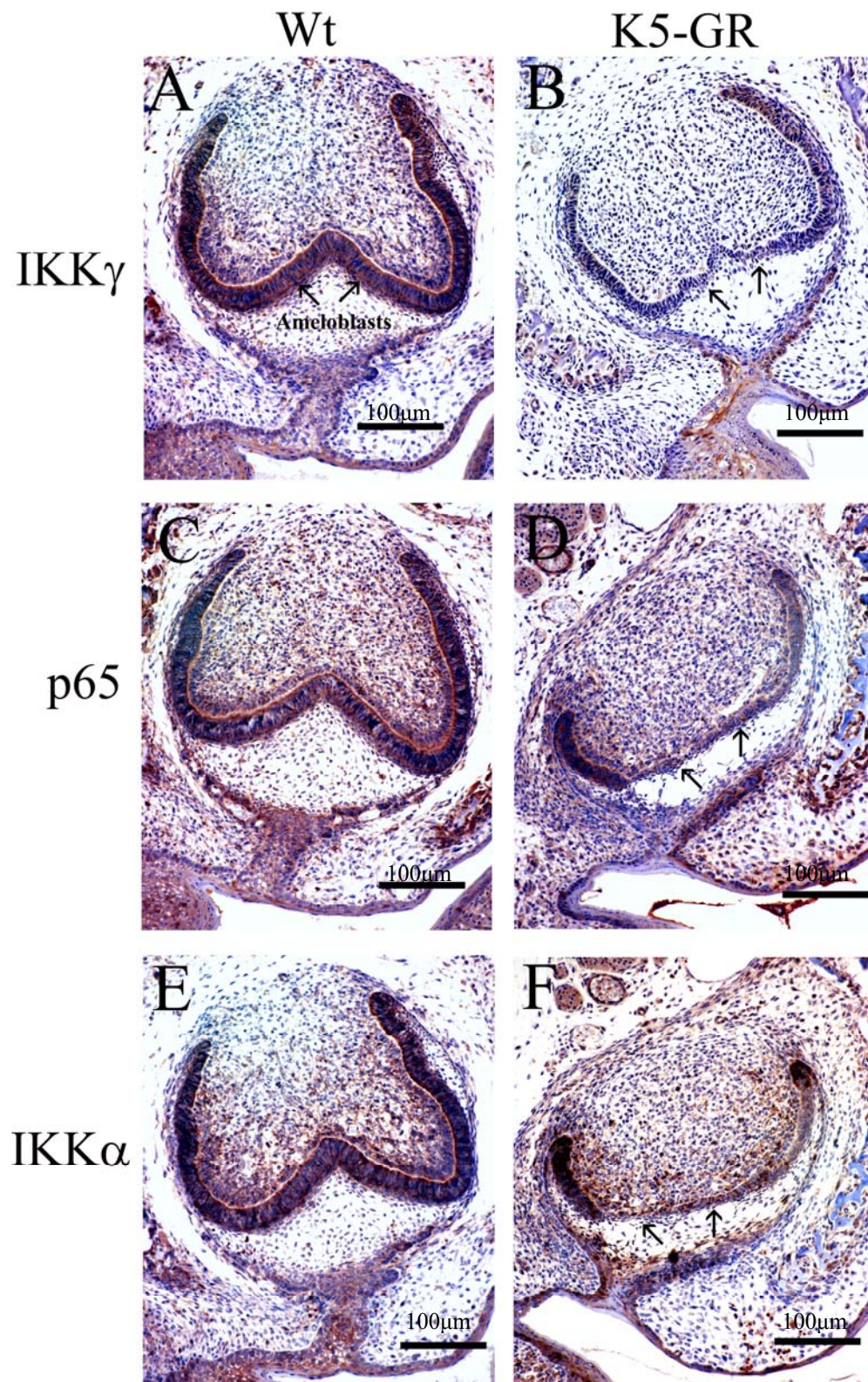


Figura 45. Alteraciones en la vía NF- κ B durante la odontogénesis en embriones K5-GR de 18,5 d.p.c. A-F: Secciones del primer molar inferior en no transgénicos (A, C, E) y transgénicos (B, D, F) que muestran una reducida expresión de IKK γ , p65 e IKK α en la zona medial del primordio dental en los transgénicos. La reducida expresión de IKK γ , p65 e IKK α se correlaciona con un grave retraso en la diferenciación de las células del epitelio interno del esmalte hacia ameloblastos (flechas en B, D y F respectivamente). Ampliaciones: A-F: 200X.

Para determinar los niveles de disminución de las proteínas de la familia IKK/NF- κ B en los transgénicos K5-GR, llevamos a cabo la cuantificación de los marcajes inmunohistoquímicos de los molares, siguiendo el método de Matkowskyj *et al.* 2000, el cual nos permitió calcular la intensidad de la señal acumulada por píxel, provocada por el cromógeno vinculado al anticuerpo específico utilizado. Los valores obtenidos se refirieron arbitrariamente como unidades de energía por píxel (eu/pix).

La región de los primeros molares elegida para las cuantificaciones, tanto en no transgénicos como en transgénicos, fue la capa de ameloblastos de la parte lateral del órgano del esmalte (*cervical loop*), la cual formará en el adulto la pared vestibular del primer molar superior, dada la gran disminución o ausencia de expresión de estas proteínas en las zonas mediales de los molares.

La cuantificación de la inmunohistoquímica mostró que la expresión de IKK α , IKK γ y p65 estaba reducida 3,4, 3,8 y 1,5 veces, respectivamente, en la capa de ameloblastos de los primeros molares de los embriones K5-GR de 18,5 d.p.c., en comparación con los no transgénicos. Al realizar la comparación estadística entre los valores medios de expresión en embriones no transgénicos y transgénicos, mediante la prueba *t-Student*, utilizando el programa informático SPSS 11.5.1 (SPSS Inc. Chicago, IL), comprobamos que la disminución en la expresión de las tres proteínas en los transgénicos era estadísticamente significativa ($P < 0,01$).

	No Tg (n=4)	Tg K5-GR (n=7)
IKKα	174.04 \pm 23.68	51.57 \pm 26.98
IKKγ	130.93 \pm 22.99	34.26 \pm 10.30
p65	139.28 \pm 15.39	91.05 \pm 11.03

Cuantificación de la expresión de IKK α , IKK γ y p65 en el primer molar superior de embriones transgénicos K5-GR y no transgénicos de 18,5 d.p.c, expresados en términos de unidades de energía por píxel (eu/pix). La cantidad de cromógeno fue determinada utilizando solamente la región citoplasmática de los ameloblastos/preameloblastos.

8.2. Anomalías dentales en adultos.

La fórmula dental en el ratón está compuesta por dos incisivos y 6 molares en cada maxilar, con una amplia separación o diastema entre ambos, carente de dientes.

El 62% (n=45) de los ratones transgénicos adultos de la línea 285 presentaban alteraciones en la fórmula dental asociadas, en ocasiones, a otras anomalías odontológicas. Los porcentajes de las distintas anomalías dentales se muestran en la tabla inferior:

Fenotipo dental en adultos	
Adultos sin fenotipo	17 (37,77%)
Agenesia de dos o más molares *	17 (37, 77%)
Agenesia de un molar	6 (13,33%)
Microdoncia	10 (22,22%)
Otras alteraciones	5 (11,11%)
Total animales estudiados	45 (100%)

* Seis ratones adultos presentaron agenesia de 4 piezas dentales y, en un animal, se observó ausencia de 6 gérmenes dentales. En ocasiones, la agenesia de alguno de los molares coexistía con la microdoncia de otros.

Las anomalías odontológicas más frecuentes consistieron en agenesia dental y/o microdoncia de uno o varios molares (Figura 46B); siendo la ausencia del tercer molar y, a veces, del segundo molar, la situación más frecuente. La malposición dental (Figura 46C) y la necrosis pulpar (Figura 46D), fueron hallazgos menos habituales. A pesar de las anomalías observadas, el tamaño y número de las cúspides dentales de cada molar en los transgénicos fue similar al de los no transgénicos.

En los incisivos no se encontraron anomalías numéricas ni morfológicas.

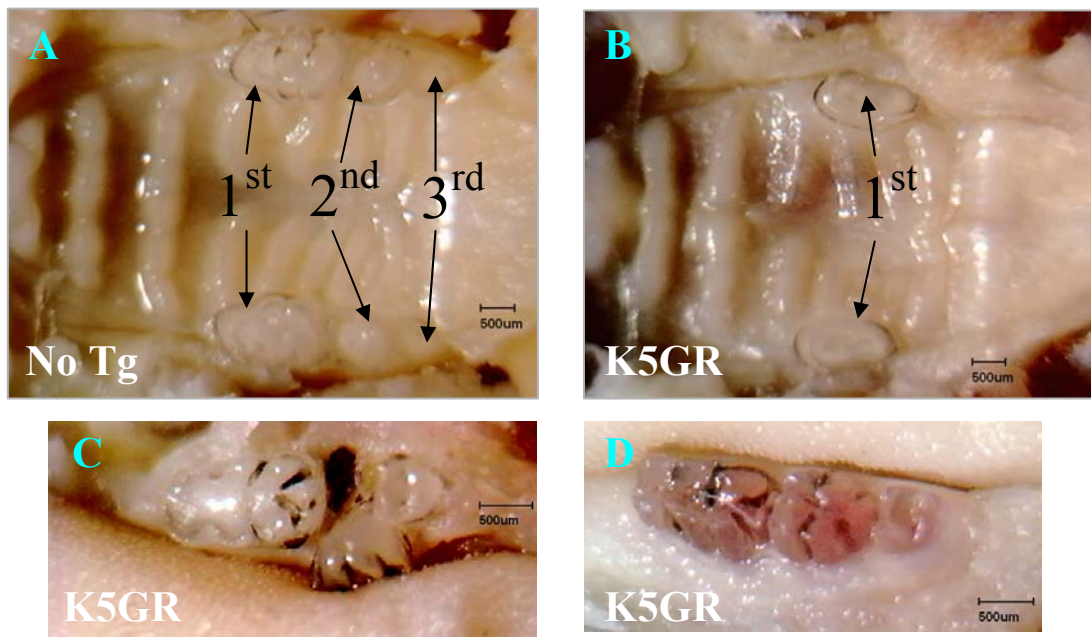


Figura 46. Vista frontal de los molares en ratones adultos. No transgénico (A) y transgénicos K5-GR (B, C y D). **A:** La fórmula dentaria murina normal está compuesta por un incisivo y tres molares en cada arcada. **B:** Oligodontia por ausencia bilateral del primer y segundo molares en el maxilar superior. **C:** Hemimandíbula derecha con malposición dental. **D:** Necrosis pulpar del segundo molar inferior izquierdo.

9. EFECTOS EN LA ODONTOGÉNESIS DEL TRATAMIENTO CON DEXAMETASONA O METOPIRONA *IN ÚTERO*.

Para confirmar que el retraso en la odontogénesis era un efecto directo de la sobreexpresión del GR, se llevó a cabo el estudio histopatológico del desarrollo de los molares en ratones no transgénicos y transgénicos recién nacidos, expuestos *in utero* al tratamiento con Dex o con metopirona, desde el día 12,5 d.p.c. hasta el nacimiento.

En los ratones recién nacidos no transgénicos tratados con Dex se observó un retraso en el proceso de diferenciación de las células del epitelio interno del esmalte hacia ameloblastos y un retraso en la diferenciación de las células mesenquimales de la papila dental hacia odontoblastos, rasgos que en conjunto nos permitieron incluir a estos molares en el inicio de la fase de campana (*early bell stage*) (Figura 47A, B, comparar con la Figura 38A, B). El retraso y las anomalías en la odontogénesis eran más acentuados en los ratones transgénicos K5-GR expuestos a Dex, los cuales se encontraban en fases más precoces del desarrollo dental (Tabla 3) observándose, en ocasiones, ausencia de uno o varios molares: así el 58,33% de estos molares se encontraban en la fase precoz de

caperuza mientras que el 41,66% se encontraban en fase tardía de caperuza, como se muestra en la Figura 47C y D, en la cual se observa además agenesia de uno de los molares inferiores y paladar hendido bilateral.

Por el contrario, los ratones recién nacidos transgénicos K5-GR tratados con metopirona mostraron una reversión parcial del fenotipo dental al nacimiento puesto que presentaron una diferenciación y organización ameloblástica y odontoblástica que consideramos normal en el 33,33% de los animales de este grupo (n=21) mostrando molares superiores en fase tardía; un 28,57% de ellos se encontraban en los inicios de la fase de campana y un 38,09% mostraron molares superiores en fase tardía de caperuza (Figura 47E, F y Tabla 3). La administración de metopirona a los ratones no transgénicos apenas ocasionaba modificaciones en la odontogénesis (Figura 47G, H).

Fase de desarrollo 1 ^{er} molar	Wt (n=7)	Tg K5-GR (n=16)	No Tg Dex (n=3)	Tg K5-GR Dex * (n=12)	No Tg metopirona (n=6)	Tg K5-GR metopirona (n=21)
Caperuza precoz		50%		58,33%		
Caperuza tardío		50%		41,66%		38,09%
Campana precoz			100%			28,57%
Campana tardío	100%				100%	33,33%

Tabla 3. Influencia de los tratamientos con Dex o metopirona en las fases del desarrollo del primer molar superior en neonatos no transgénicos y transgénicos.

* Tres ratones recién nacidos K5-GR tratados con Dex *in utero* mostraron ausencia de los dos primeros molares superiores y no fueron incluidos en los datos estadísticos.

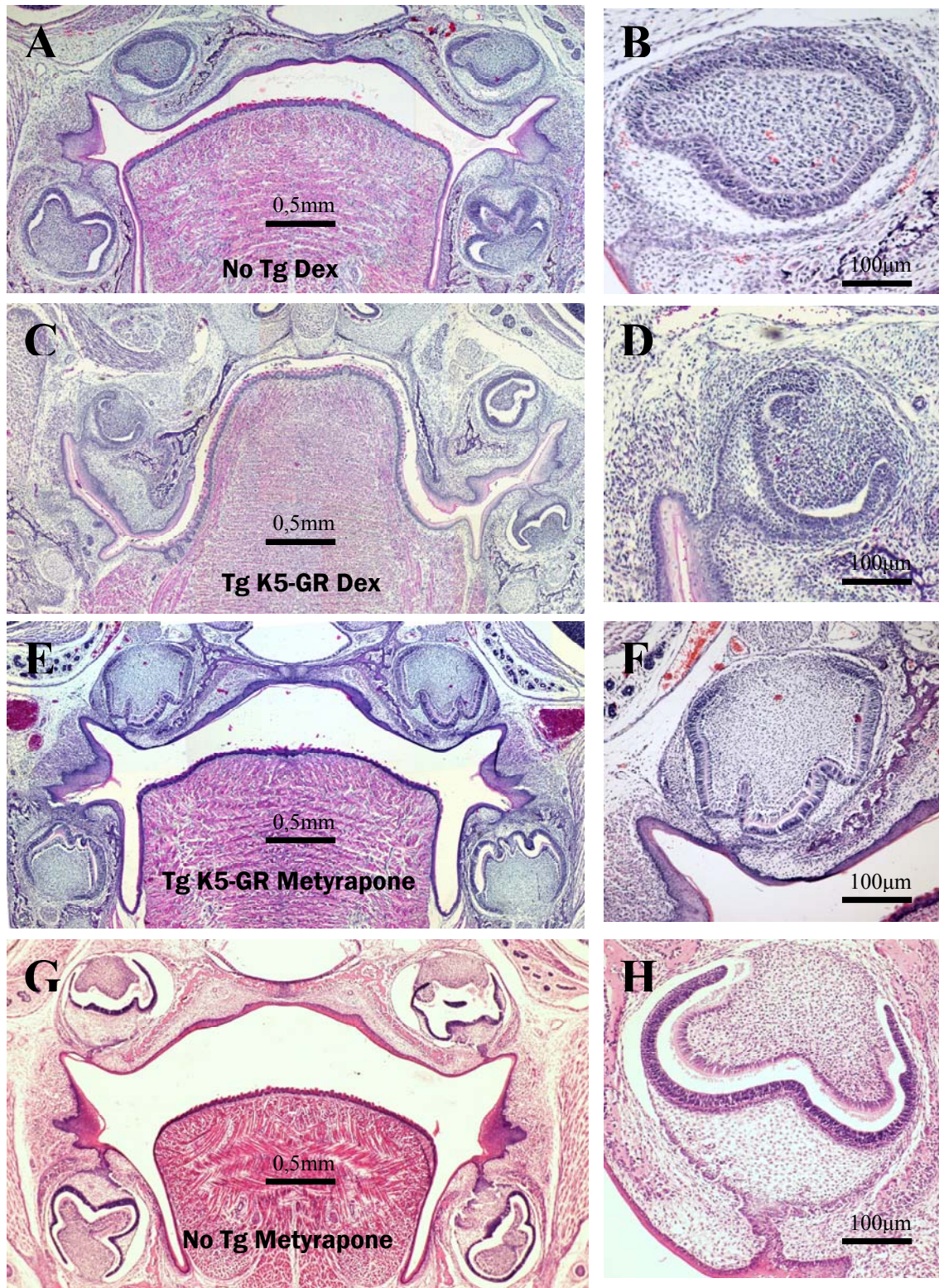


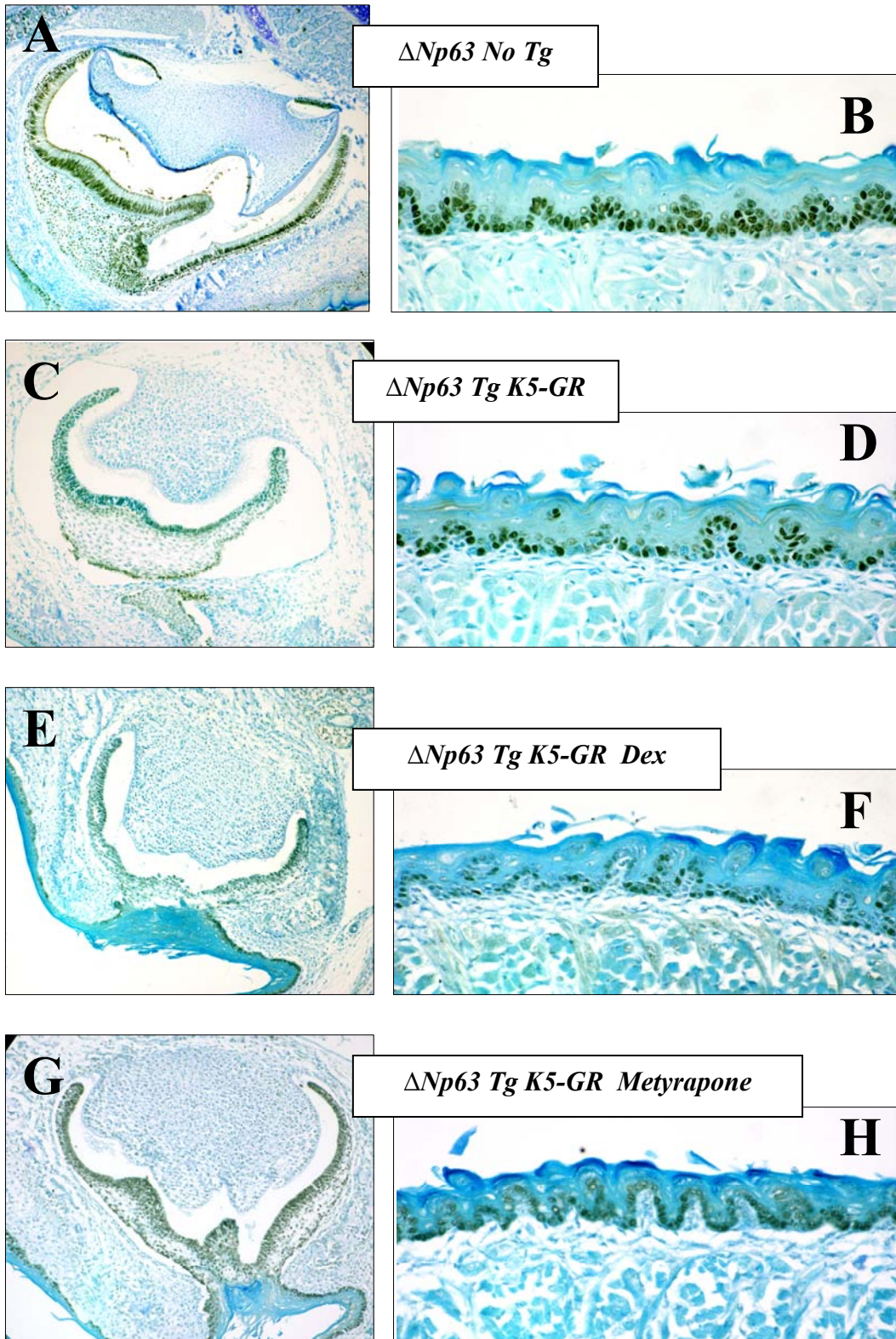
Figura 47. Efectos sobre la odontogénesis del tratamiento con Dex o metopirona. A, C, F, G: Secciones coronales de la cabeza a nivel del primer molar en recién nacidos, teñidas con HE. No transgénicos tratados con Dex (A, B) o con metopirona (G, H). Transgénicos K5-GR, línea 285, tratados con Dex (C, D) o con metopirona (E, F). B, D, F y H son ampliaciones de un molar superior de A, C, E y G respectivamente. El tratamiento con Dex retrasa más el desarrollo de los molares en los transgénicos K5-GR (C, D), mientras que el tratamiento con metopirona revierte el fenotipo (E, F). Ampliaciones: A, C, E, G: 40X; B, D, F, H: 200X.

Como las alteraciones dentales encontradas en ratones K5-GR se parecen a las descritas en pacientes humanos con displasia ectodérmica y, existiendo referencias de la implicación de p63 en la enfermedad EEC perteneciente al síndrome ED, hemos estudiado la expresión de Δ Np63 en la cavidad oral en ratones no transgénicos y transgénicos K5-GR, de un día de edad, mediante la utilización de un anticuerpo específico para esta proteína.

En los ratones no transgénicos, comprobamos que Δ Np63 se expresaba en las células de origen ectodérmico del órgano del esmalte, es decir, en las células del epitelio externo del esmalte, en las células del retículo estrellado que todavía permanecían y en la capa de ameloblastos, siendo el marcaje más intenso en esta última (Figura 48A); en el epitelio oral en no transgénicos la expresión de Δ Np63 era muy intensa en los núcleos de los queratinocitos de la capa basal del epitelio estratifica (Figura 48 B, lengua).

La expresión de Δ Np63 en ratones transgénicos K5-GR, de un día de edad, estaba muy disminuida en el órgano del esmalte del primer molar, presentando los epitelios menos diferenciados que en los no transgénicos (Figura 48C); en la mucosa oral y lingual, también existía un menor número de núcleos de células basales positivos al anticuerpo anti- Δ Np63 (Figura 48D).

El tratamiento *in útero* con dexametasona en los transgénicos K5-GR producía una disminución dramática en la expresión de Δ Np63 tanto en los núcleos de las células epiteliales del órgano del esmalte (Figura 48E) como en las células basales del epitelio oral y lingual (Figura 48F). Por el contrario, los transgénicos K5-GR tratados *in útero* con el inhibidor de la síntesis de GC metopirona, mostraron unos niveles de expresión de Δ Np63 semejantes a los observados en no transgénicos, tanto en el esbozo dental del primer molar (Figura 48G) como en los epitelios de la boca (Figura 48H).



10. EXPRESIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN AP-2 EN TRANSGÉNICOS K5-GR

Habida cuenta de las similitudes fenotípicas observadas entre los ratones transgénicos K5-GR y los ratones deficientes en el factor de transcripción TFAP-2 α (Zhang *et al.*, 1996; Schorle *et al.*, 1996; West-Mays *et al.*, 1999) iniciamos un estudio para definir los niveles de expresión de esta proteína en distintos epitelios de los ratones transgénicos K5-GR *in vivo*.

Las tinciones inmunohistoquímicas con un anticuerpo específico anti AP-2 α en ratones no transgénicos y transgénicos K5-GR de 18.5 d.p.c. han mostrado una menor expresión de esta proteína en los epitelios poliestratificados de los ratones transgénicos donde se sobreexpresa GR. En los ratones no transgénicos de 18.5 d.p.c, TFAP-2 α se expresa en los núcleos de los queratinocitos de la capa basal de la epidermis y en algunos queratinocitos de la capa granulosa, así como en los núcleos de las células de la VRE de los folículos pilosos inmaduros, en los núcleos de los ameloblastos del órgano del esmalte; el marcaje de TFAP-2 α era también muy intenso en los queratinocitos basales y suprabasales del epitelio lingual.

En los ratones transgénicos K5-GR, TFAP-2 α tenía una inmunolocalización nuclear en los mismos tejidos que los no transgénicos, pero existía un menor número de células positivas y la intensidad de marcaje era claramente menor en todos los epitelios descritos desapareciendo totalmente su expresión en las zonas mediales de los molares que se correspondían con los nudos de esmalte (Fig. 49).

← **Figura 48. Efectos del tratamiento con Dex o metopirona en la expresión de $\Delta Np63$ en los epitelios dentales y linguales en ratones de un día de edad.** No transgénicos (A-B), transgénicos K5-GR sin tratamiento (C, D), tratados con Dex (E, F) o con metopirona (G, H). La expresión de p63 disminuye en los epitelios del órgano del esmalte y de los epitelios de la boca en los transgénicos K5-GR, potenciando tal disminución el tratamiento con Dex, y normalizando la expresión mediante el tratamiento con metopirona. Ampliaciones: A, C, E, G: 100X; B, D, F, H: 200X.

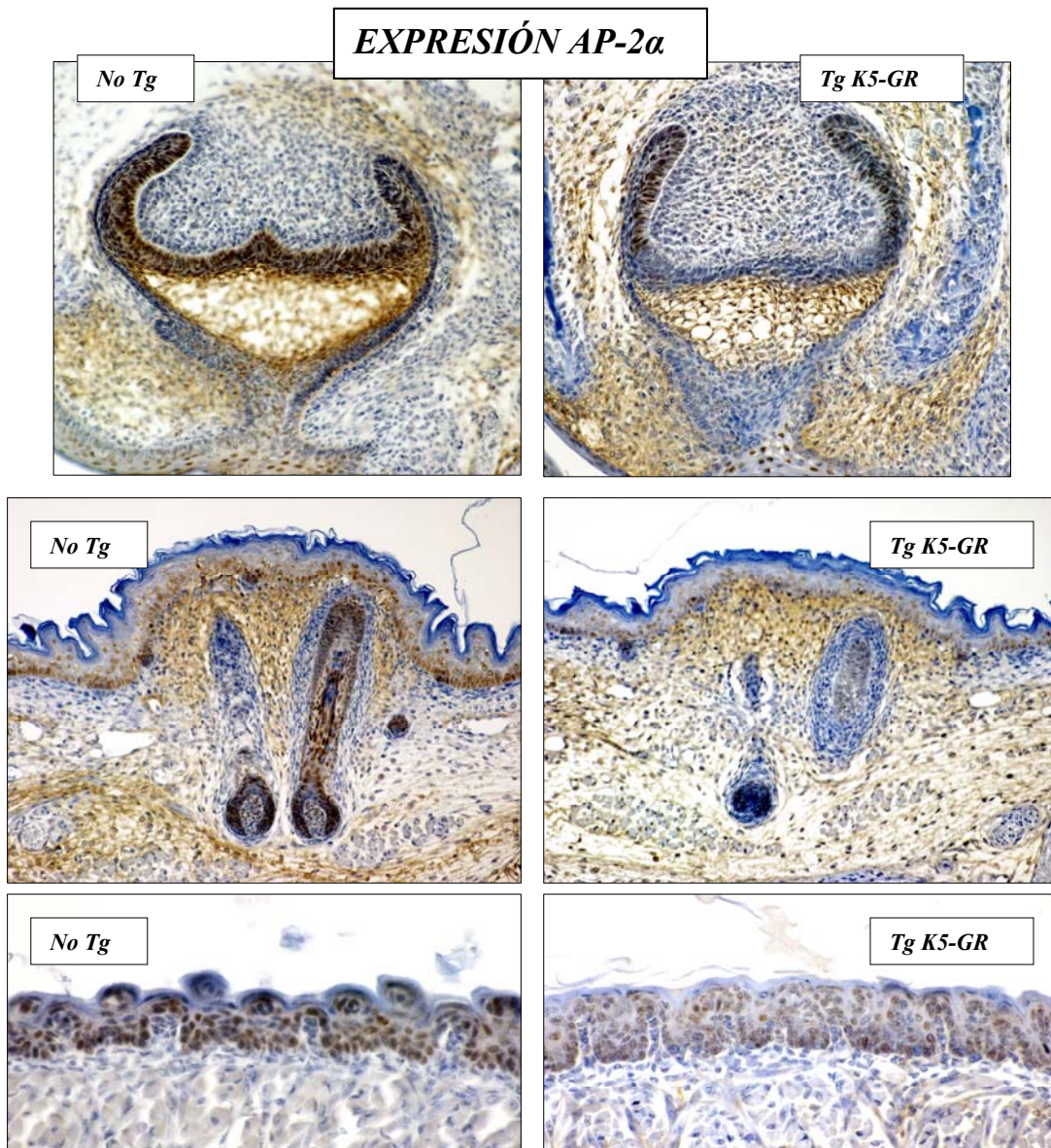


Figura 49. Expresión de AP-2 α en epitelios estratificados. Secciones de tejidos de ratones no transgénicos (izquierda) y transgénicos K5-GR (derecha) de 18,5 d.p.c. inmunomarcadas con un anticuerpo específico anti-AP-2 α . **Arriba:** Secciones coronales a nivel del primer molar superior; ampliación: 200x. **Centro:** Secciones de piel de la cabeza donde se aprecian dos folículos de vibrisa; ampliación: 200x. **Abajo:** Epitelio lingual; ampliación: 400x.

11. ALTERACIONES EN ÓRGANOS ENDOCRINOS EN TRANSGÉNICOS K5-GR.

11.1. Alteraciones en las glándulas adrenales en recién nacidos.

Si bien las células epiteliales de las glándulas adrenales no expresan la queratina K5 y, por lo tanto, no son diana del transgén, hemos analizado el tamaño de estas glándulas en ratones recién nacidos transgénicos K5-GR y no transgénicos, para conocer la posible respuesta endocrina ante la sobreexpresión del GR desde 13,5 d.p.c. hasta el nacimiento, teniendo en cuenta la importancia del eje hipotálamo-hipofisis-adrenal en la regulación del metabolismo de los GCs.

Para ello, después de disecar y fotografiar ambos riñones y glándulas adrenales en recién nacidos no transgénicos y transgénicos, medimos el área de superficie de ambos órganos, utilizando un programa informático de análisis de imagen, que nos permitió determinar la proporción que representaba la glándula adrenal con relación a su riñón adyacente en cada uno de los animales. Relacionamos el tamaño de las glándulas adrenales con el tamaño del riñón para obviar las diferencias de tamaño somático general que mostraban los ratones transgénicos en comparación con los no transgénicos.

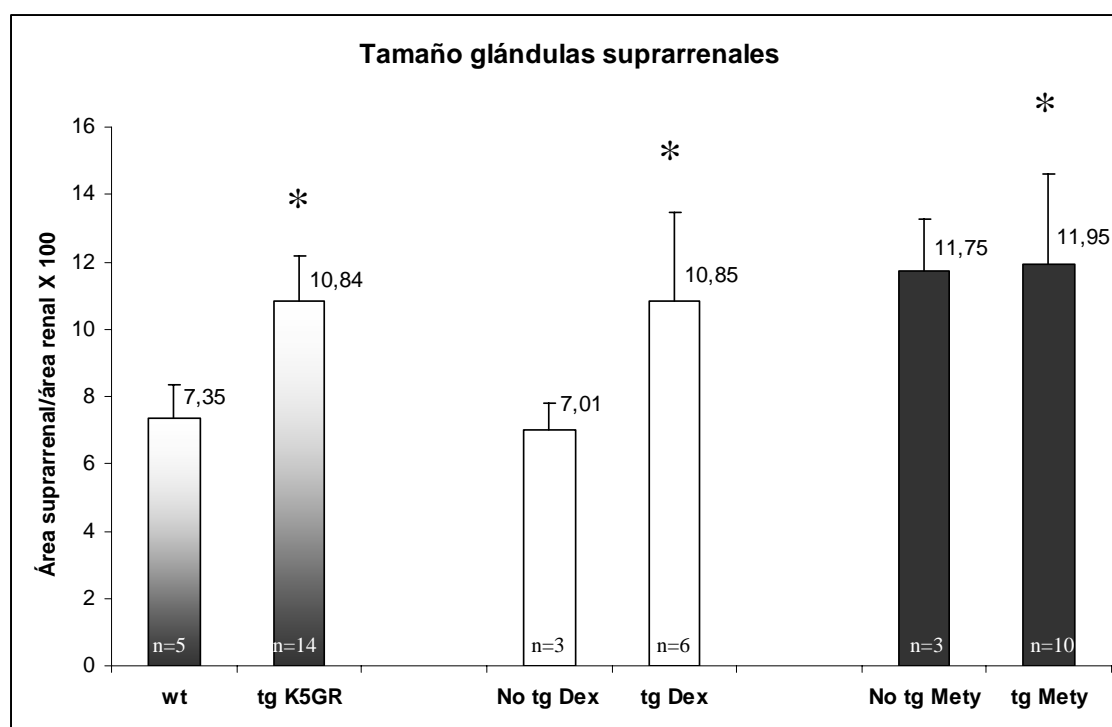
Los ratones recién nacidos transgénicos K5-GR mostraron un incremento significativo ($P < 0,001$) en el tamaño de las glándulas adrenales (Figura 50B) en comparación con sus hermanos de camada no transgénicos (Figura 50A), ya que la proporción media del área de las glándulas adrenales con relación al área de los riñones fue del $10,84 \pm 1,34$ % ($n=14$) mientras que en los no transgénicos esta relación fue del $7,35 \pm 0,98$ % ($n=5$); el incremento medio observado en el tamaño de las adrenales en los transgénicos K5-GR fue del 47,48 % en comparación con los no transgénicos .

En los ratones recién nacidos transgénicos K5-GR tratados con Dex intraútero, el área representada por sus glándulas adrenales constituyó un promedio del $10,85 \pm 2,63$ % ($n=6$) del área renal, semejante al observado en los transgénicos sin tratar.

Los ratones transgénicos recién nacidos K5-GR tratados con el inhibidor de la síntesis de GCs metopirona, intraútero, presentaron también un aumento en el tamaño de

las glándulas adrenales mostrando un porcentaje de área del $11,95 \pm 2,68$ (n=10) con relación al área renal. En conjunto, el análisis de estos valores no arrojó diferencias significativas relativas al tamaño de las glándulas adrenales entre los transgénicos sin tratamiento o tratados.

En el gráfico inferior se muestran las diferencias en la superficie relativa de las glándulas adrenales en relación con la superficie del riñón entre no transgénicos y transgénicos con y sin tratamiento.



* Diferencias estadísticamente significativas con los no transgénicos (wt) ($P < 0.001$). Para comparar las medias entre los diferentes grupos se utilizó la prueba *t-Student*.

El estudio histológico de las glándulas adrenales en los ratones transgénicos K5-GR recién nacidos mostró como el aumento del tamaño de esta glándula era debido a una hiperplasia de la capa fascicular. En los mamíferos esta capa está formada por células poliédricas, vacuoladas (espongiocitos), que contienen los GCs previamente sintetizados. Estas células pueden ponerse de manifiesto con la tinción de PAS ya que las vacuolas cargadas de corticosterona toman el color rojo del reactivo de Schiff. La figura 50 muestra la gran hiperplasia de las células de la capa fascicular las cuales, disponiéndose en la forma de cordones típicos, constituyen la mayor parte de la glándula, dificultando la

diferenciación del resto de las capas; por el contrario, en los ratones no transgénicos la capa fascicular era más fina y se apreciaban bien delimitadas las tres zonas de la cortical: glomerular, fascicular y reticular (Figura 50, comparar C y D).

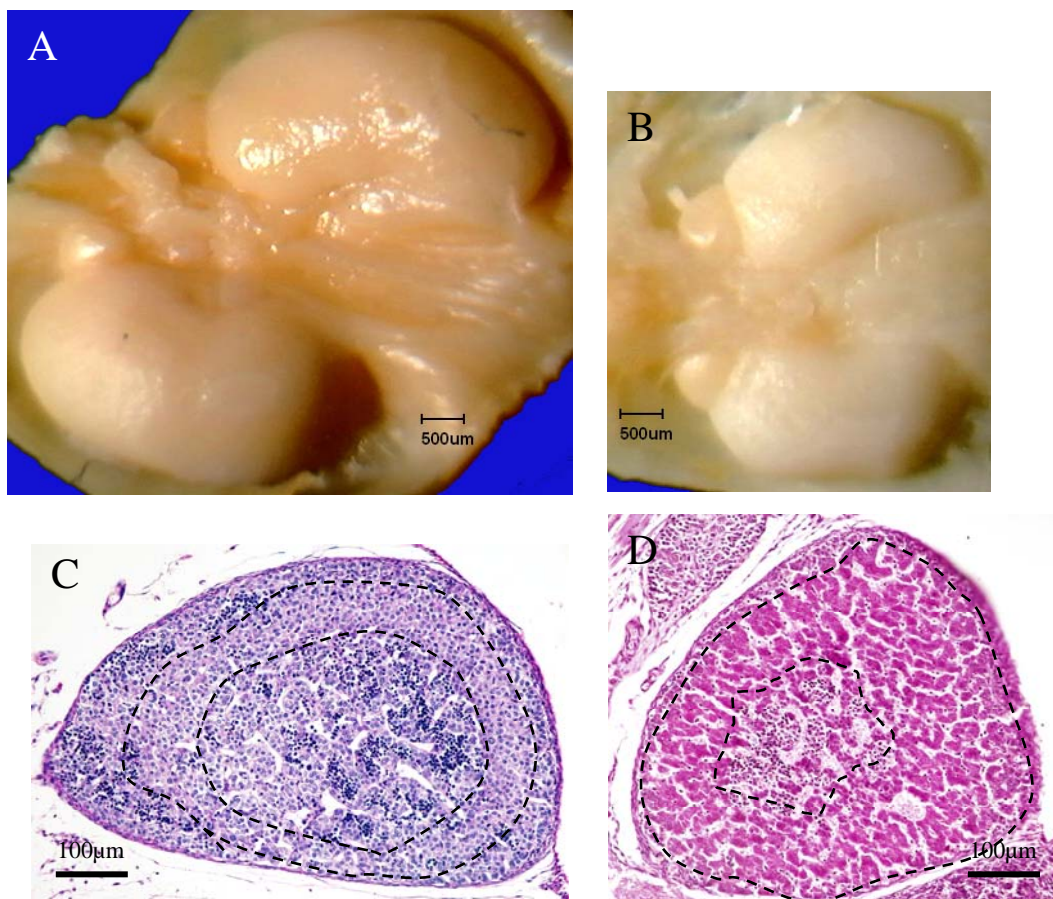


Figura 50. Hiperplasia adrenal en ratones recién nacidos transgénicos K5-GR. (A, C) No transgénicos. (B, D) transgénicos K5-GR. Aumento de tamaño de las glándulas adrenales en los transgénicos en proporción al menor tamaño de los riñones (B) debido al menor crecimiento somático general en comparación con los no transgénicos (A). C, D: Secciones frontales de la glándula adrenal de los mismos ratones de la imagen superior teñidas con PAS. La capa fascicular se muestra entre líneas discontinuas y aparece hiperplásica en el ratón transgénico (D); las células cargadas de corticosterona, positivas al reactivo de Schiff, se tiñen de color rojo. Ampliaciones: C, D: 100X.

11.2. Estudio inmunohistoquímico de las hormonas hipofisarias.

Para profundizar en el estudio del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal llevamos a cabo el estudio inmunohistoquímico de los seis tipos de células secretoras de la adenohipófisis (somatotropas, corticotropas, tiotropas, gonadotropas secretoras de FSH o LH y lactotropas) en secciones frontales de hipófisis de recién nacidos y adultos, no transgénicos y transgénicos. Los resultados de estos análisis no reflejaron diferencias entre los no transgénicos y transgénicos adultos.

En ratones recién nacidos tampoco se encontraron diferencias entre no transgénicos y transgénicos en la expresión hipofisaria de TSH, LH, FSH, o Prolactina, sin embargo la expresión de corticotropina y de hormona de crecimiento mostró importantes variaciones.

11.2.1. Expresión de ACTH en la hipófisis.

Para determinar el porcentaje de células productoras de ACTH (células corticotropas) en las secciones de hipófisis de embriones recién nacidos transgénicos y no transgénicos, utilizamos el marcaje inmunohistoquímico con el anticuerpo específico anti-ACTH.

La distribución de las células que sintetizaban ACTH en la hipófisis no era homogénea, acumulándose con mayor proporción en los animales control en una banda en las proximidades de la neurohipófisis (istmo) y en la periferia de las astas hipofisarias. Este patrón de distribución se mantuvo a lo largo y ancho de la totalidad de la glándula, tanto en la hipófisis de animales no transgénicos como transgénicos K5-GR, lo cual verificamos tras la realización de secciones seriadas de la totalidad de la glándula y el cartografiado de un número significativo de células ACTH positivas (más de 3.000 en transgénicos y más de 8.000 en no transgénicos) (Figura 51).

El recuento de células en tres secciones de diferente profundidad, en cada hipófisis, puso de manifiesto que en los ratones recién nacidos no transgénicos el promedio de células ACTH positivas con relación al total de células fue de $33,75 \pm 1,43$ % (n=4).

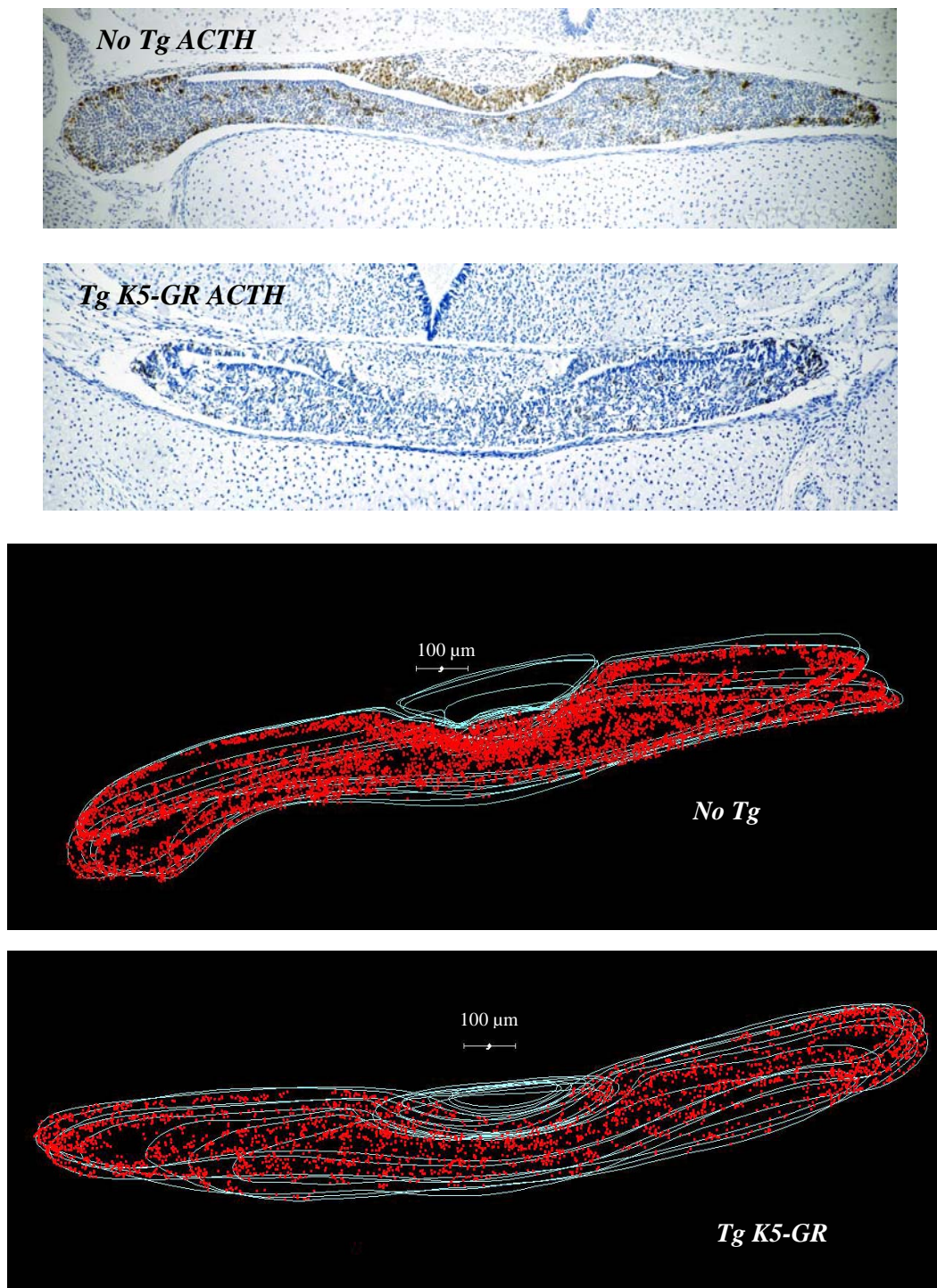


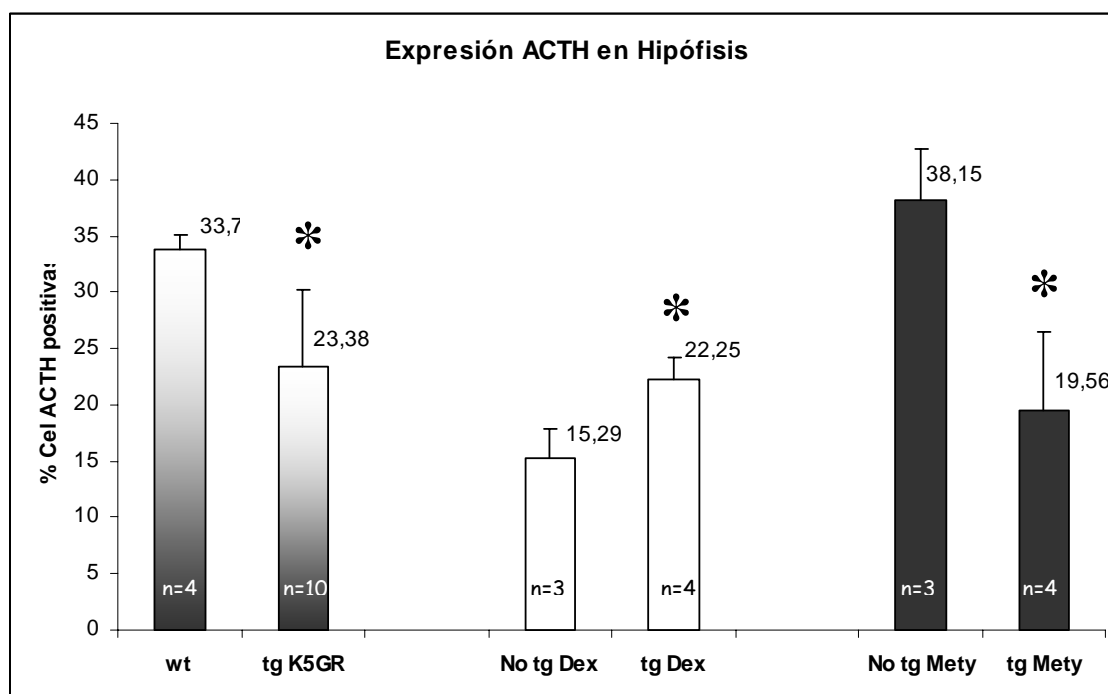
Figura 51. Inmunomarcaje y cartografía de las células ACTH positivas en hipófisis de recién nacidos. Las dos imágenes superiores muestran la distribución no homogénea de las células corticotropas y una disminución en el transgénico (abajo). Las dos imágenes inferiores muestran una representación cartográfica tridimensional (*mapping*) de las células corticotropas (marcadas con puntos rojos) de las mismas hipófisis de arriba. Para el montaje estereológico, tanto en el animal transgénico, como en el no transgénico, se utilizaron ocho secciones de hipófisis. Ampliaciones: 40X.

En los ratones recién nacidos transgénicos K5-GR el número de células positivas fue de $23,38 \pm 6,96$ (n=10), lo que supuso una disminución estadísticamente significativa del 30,72% ($p < 0,05$) con respecto a los no transgénicos.

En los ratones recién nacidos transgénicos K5-GR que recibieron Dex durante la gestación, el promedio de células ACTH positivas fue de $22,25 \pm 6,9$ % (n=4), unos valores estadísticamente similares al grupo de los ratones recién nacidos transgénicos que no recibieron tratamiento y diferente al de no transgénicos.

Los ratones recién nacidos transgénicos K5-GR que recibieron metopirona durante la gestación mostraron un promedio de $19,56 \pm 4,77$ % (n=4). Desde el punto de vista estadístico, estos resultados resultaron similares a los observados en los transgénicos K5-GR que no recibieron tratamiento y diferentes a los observados en los no transgénicos.

En el gráfico inferior se muestran las diferencias en la expresión de ACTH en la hipófisis entre no transgénicos y transgénicos con y sin tratamiento, expresada en porcentaje de células positivas respecto al total de células.



* Diferencias estadísticamente significativas con los no transgénicos (wt) ($P < 0,05$). Para comparar las medias entre los diferentes grupos se utilizó la prueba *t-Student*.

Utilizando el mismo anticuerpo específico anti-ACTH realizamos el marcaje inmunohistoquímico de secciones frontales de hipófisis en ratones adultos no transgénicos y transgénicos (Figura 52). La cuantificación de los resultados obtenidos no evidenció diferencias significativas entre ambos grupos, ya que los ratones transgénicos (n=5) mostraron un porcentaje promedio de $21,84 \pm 1,73$ % de células ACTH positivas, muy similar al promedio observado en los adultos control (n=4) que fue de $22,23 \pm 4,45$ %.

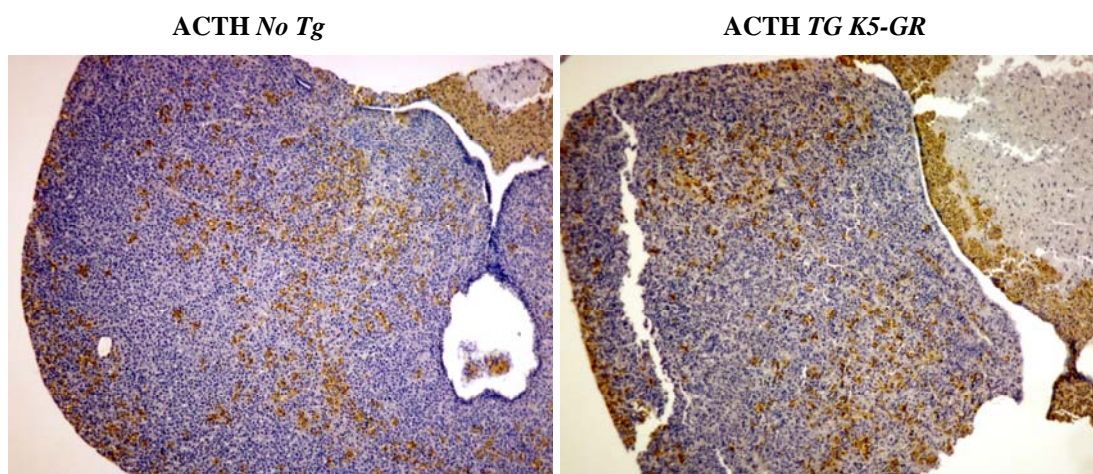


Figura 52. Expresión de ACTH en la hipófisis de ratones adultos. Secciones transversales de hipófisis de ratones adultos no transgénico y transgénico K5-GR inmunomarcadas con el anticuerpo anti-ACTH. En ambos grupos el número de células corticotropas marcadas positivamente fue estadísticamente similar ($p=0,51$).

11.2.2. Expresión de GH en la hipófisis.

Para determinar el porcentaje de células productoras de GH (células somatotropas) en las secciones de hipófisis de embriones recién nacidos transgénicos y no transgénicos, utilizamos el marcaje inmunohistoquímico con el anticuerpo específico anti-GH.

Las células GH positivas en no transgénicos y transgénicos aparecían distribuidas a lo largo de toda la adenohipófisis. Los niveles de expresión de GH disminuyeron significativamente en los transgénicos y, aún más, en los transgénicos tratados con Dex intraútero, mientras que los transgénicos tratados con Metopirona mostraron niveles de expresión de GH que se aproximaban a los detectados en los no transgénicos (Figura 53).

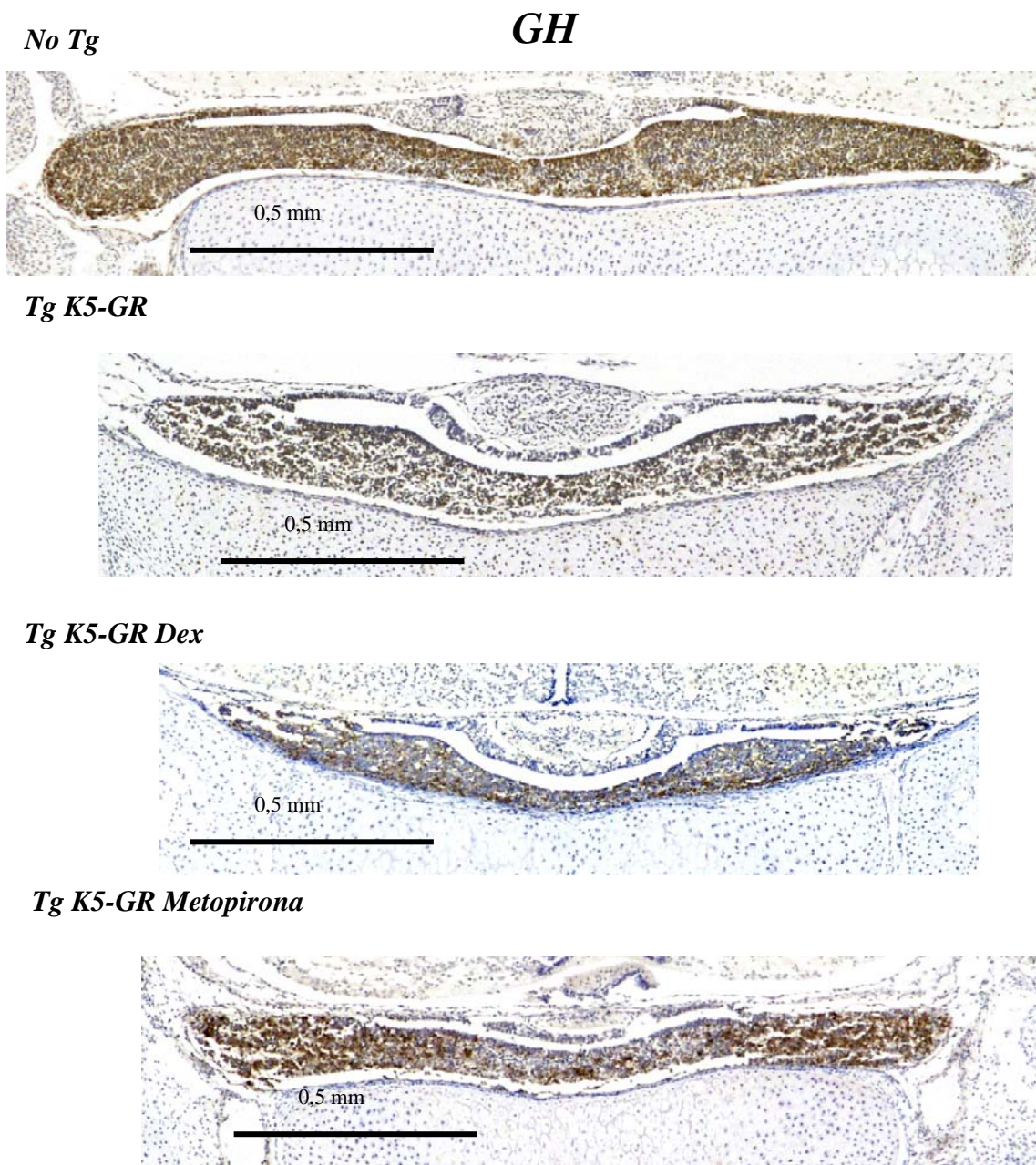
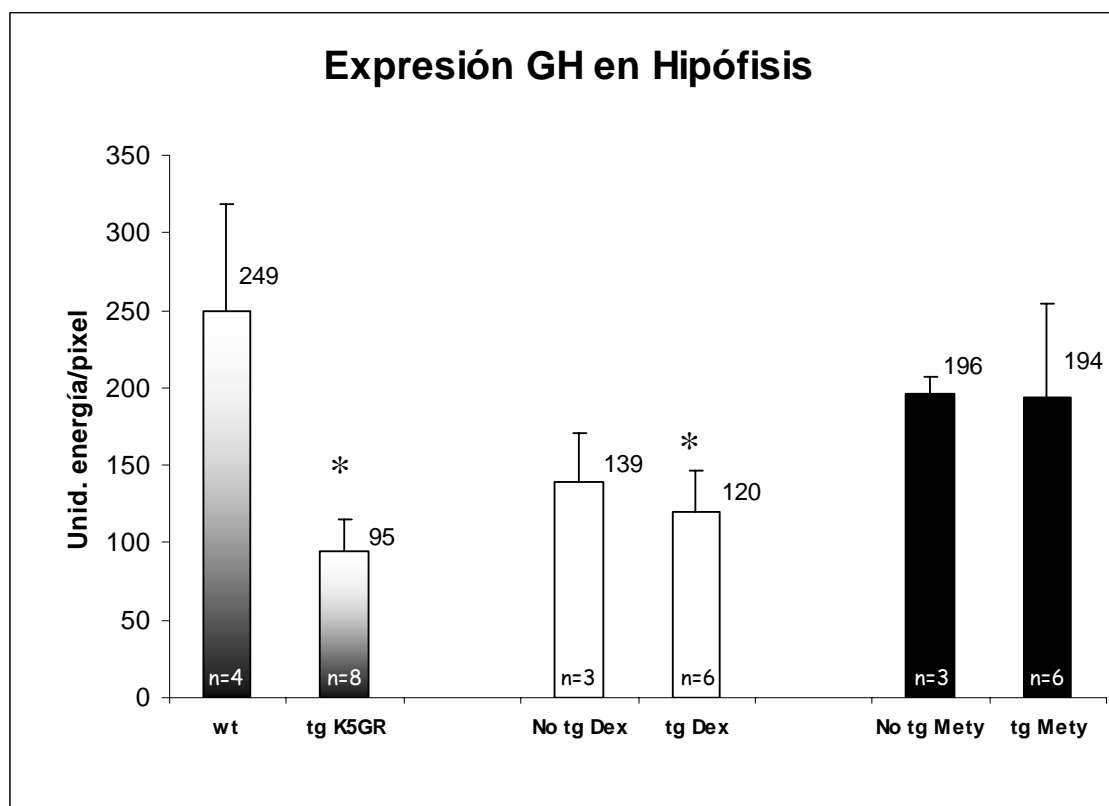


Figura 53. Expresión de GH en hipófisis de recién nacidos y efectos del tratamiento con Dex o Metopirona. En los transgénicos K5-GR así como en los transgénicos tratados con Dex, se observa una importante reducción en los niveles de expresión de GH en la hipófisis. En los transgénicos tratados con metopirona los niveles de expresión de esta hormona se aproximan a los valores normales. Ampliaciones: 40X.

Para verificar las diferencias observadas en la intensidad de la expresión de GH, realizamos la cuantificación de su expresión a través de la determinación de la intensidad de cromógeno, expresada como unidades de energía/píxel (ue/píxel), en los citoplasmas de las células somatotropas. Los resultados arrojaron un promedio de fuerza de señal acumulada en el citoplasma de las células somatotropas de $249,87 \pm 70,44$ ue/píxel (n=4)

en los ratones control, mientras que en los ratones transgénicos el promedio fue de $95,68 \pm 20,35$ ue/píxel ($n=8$), lo que supuso una reducción significativa en los niveles de expresión de GH del 61,9% (2,6 veces menos).

Los ratones recién nacidos transgénicos cuyas madres fueron tratadas con Dex durante la gestación mostraron unos niveles de expresión de GH similares a los encontrados en los transgénicos K5-GR no tratados, con un promedio de fuerza de señal acumulada de $120,67 \pm 27,32$ ue/píxel ($n=6$), valor que no arrojó diferencias significativas entre ambos grupos. En cambio, los ratones recién nacidos transgénicos cuyas madres fueron tratadas con el inhibidor de la síntesis de GCs metopirona, mostraron un aumento estadísticamente significativo en los niveles de expresión de GH con un promedio de fuerza de señal acumulada de $194,35 \pm 60,77$ ue/píxel ($n=6$) muy próximo a los valores normales observados en los no transgénicos, no existiendo entre ellos diferencias significativas. En el siguiente gráfico se muestran las diferencias en los niveles de expresión de GH en la hipófisis entre no transgénicos y transgénicos con y sin tratamiento, expresada en unidades de energía por píxel.



* Diferencias estadísticamente significativas con los no transgénicos (wt) y Tg tratados con metopirona ($P<0.05$). Para comparar las medias entre los diferentes grupos se utilizó la prueba *t-Student*.

12. ALTERACIONES EN LOS ÓRGANOS LINFOIDES EN TRANSGÉNICOS K5-GR.

12.1. Incremento de la apoptosis en el timo.

A pesar de que los ratones transgénicos adultos K5-GR no mostraron signos clínicos ni histopatológicos compatibles con un estado inmunodeficiente, llevamos a cabo el estudio de los niveles de apoptosis en el timo de ratones jóvenes (4 semanas), habida cuenta de que las células retículoepiteliales tímicas expresan queratina K5 y son, por tanto, diana del transgén, unido al hecho de que los GCs inducen apoptosis de linfocitos T y que existen diversas Displasias Ectodérmicas humanas asociadas a inmunodeficiencias.

El marcaje de las células apoptóticas en secciones de timo de ratones control (n=2) de un mes de edad mediante la técnica ISOL (Apoptag *In situ* Oligo ligation Kit) mostró un porcentaje promedio de linfocitos en apoptosis del $20,79 \pm 3,46\%$ en la zona cortical y del $10,71 \pm 0,61\%$ en la zona medular (Figura 54).

En los ratones transgénicos K5-GR (n=2) el índice apoptótico estaba aumentado 2,34 veces (un 134%) en la zona cortical presentando un promedio del $48,66 \pm 0,12\%$ de células en apoptosis, mientras que en la zona medular el índice apoptótico hallado fue del $27,09 \pm 3,31\%$ lo que supuso un incremento 2,5 veces superior (un 153%) al control en la misma zona (Figura 54).

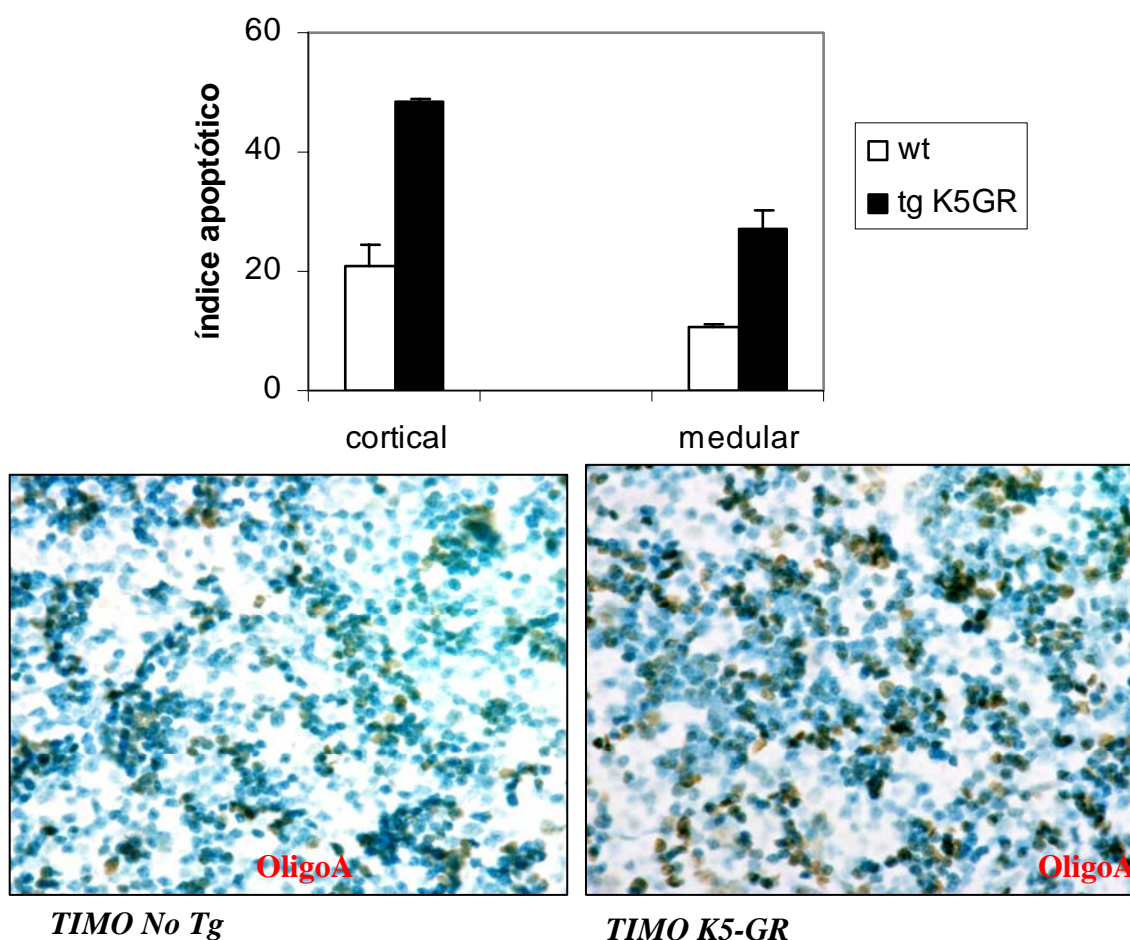


Figura 54. Detección de apoptosis “in situ” en la zona cortical del timo en ratones de 4 semanas. Secciones de control (izquierda) y transgénico K5-GR (derecha) marcadas con ApopTagTM Peroxidase *In Situ* Oligo Ligation Kit. Ambas imágenes fueron marcadas utilizando el oligonucleótido A, suministrado por el fabricante, el cual que se liga específicamente con los extremos salientes (3' *overhang*) generados específicamente por células en apoptosis. La gráfica de barras (arriba) muestra el índice apoptótico de la zona cortical y medular del timo de ratones no transgénicos y transgénicos K5-GR de un mes de edad.

12.2. Otros órganos linfoides.

Utilizando un estereomicroscopio de observación llevamos a cabo el recuento del número de placas de Peyer presentes a lo largo del intestino de ratones adultos no transgénicos (n=5) y transgénicos K5-GR (n=23).

Los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$) entre los dos grupos en cuanto al número de placas de Peyer, las cuales presentaron un

tamaño y una morfología macroscópica e histológica similar en los ratones no transgénicos y transgénicos.

	Nº placas de Peyer intestinales (X ± SD)
No transgénicos (n=5)	7,25±1,25
Tg K5-GR (n=23)	8,38±1,72

No observamos diferencias macroscópicas ni histológicas en el tamaño y forma de la tonsila cecal, del apéndice vermicular, entre ratones transgénicos adultos y no transgénicos.

El estudio macroscópico e histopatológico del bazo de los ratones transgénicos K5-GR tampoco mostró diferencias con los correspondientes no transgénicos de la misma edad.

El número, forma, situación y tamaño de los nódulos linfoides periféricos axilares/braquiales, poplíteos/inguinales, cervicales superficiales, lumbares y mesentéricos de los ratones transgénicos K5-GR fueron similares a los presentados por los ratones control.

13. ESTUDIO RADIOLÓGICO EN TRANSGÉNICOS ADULTOS K5-GR.

Teniendo en cuenta la existencia de un tipo de Displasia Ectodérmica humana asociada a osteopetrosis y el aumento de densidad ósea observado en algunos modelos murinos de Displasia Ectodérmica, nos propusimos analizar la densidad ósea de ratones adultos no transgénicos (n=4) y transgénicos K5-GR (n=12), de 18 meses de edad, a través del estudio radiológico del esqueleto.

El examen de las placas radiológicas no evidenció diferencias en la densidad ósea entre los ratones transgénicos y los no transgénicos (Figura 55).

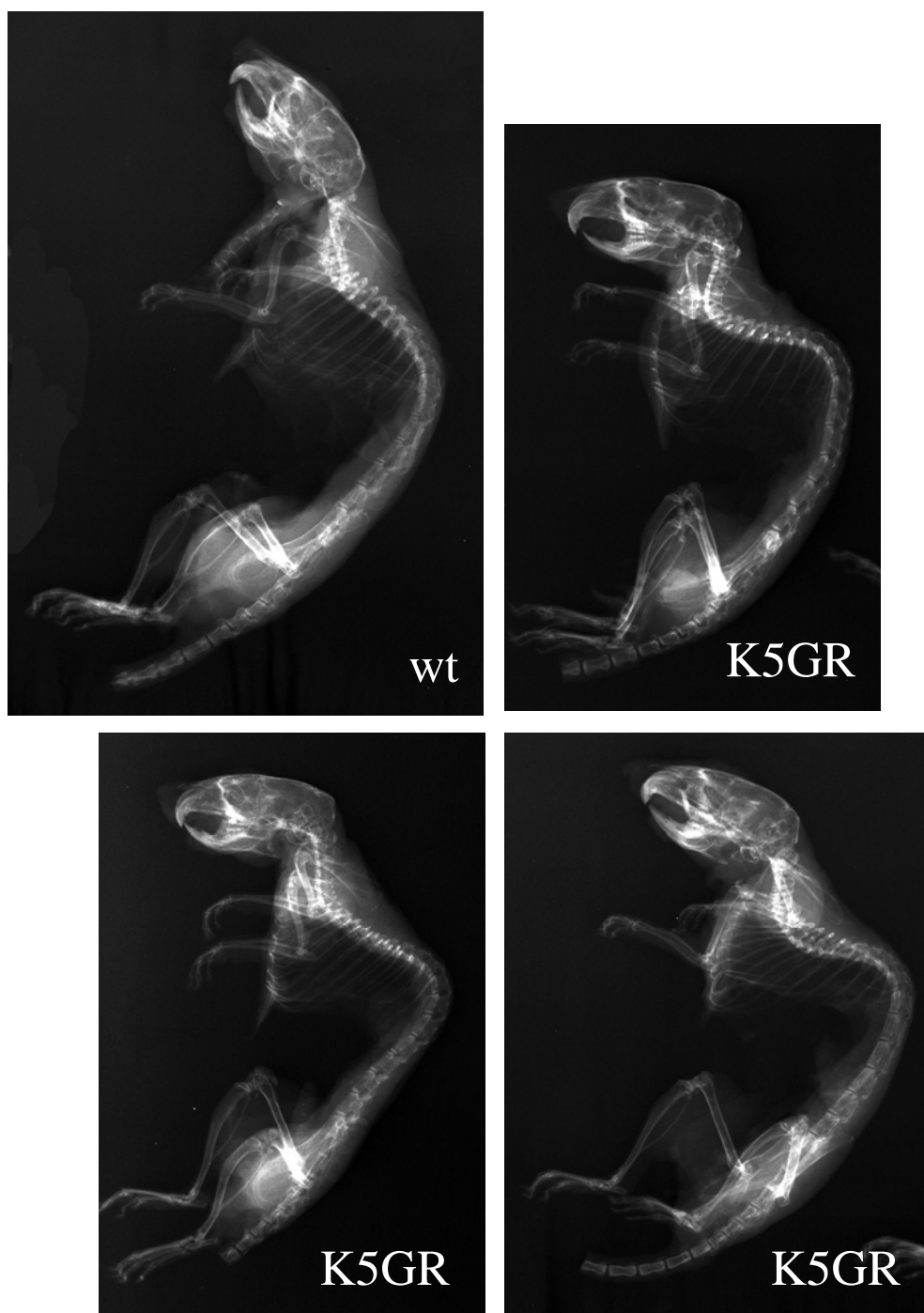


Figura 55. *Imágenes radiográficas del esqueleto en ratones de 18 meses de edad.* La densidad ósea del fémur y cráneo era radiológicamente similar en transgénicos y no transgénicos. Se utilizaron los mismos parámetros de exposición, intensidad y kilovoltaje en los cuatro ratones ya que corresponden a una única placa radiográfica.

DISCUSIÓN

1. El fenotipo observado en los transgénicos K5-GR es dependiente de los niveles de expresión del transgén.

En este estudio, investigamos los efectos *in vivo* producidos por una ganancia de función del GR inducida por la sobreexpresión de este receptor en epitelios estratificados vehiculada por un promotor específico de tejido. Para ello, estudiamos el fenotipo de los ratones transgénicos generados previamente (K5-GR) que expresan el GR bajo el control del promotor de la queratina K5 bovina. En este trabajo hemos utilizado las líneas de transgénicos 72 y 285, con una expresión elevada e intermedia, relativamente hablando, de los niveles de transcrito y proteína correspondientes al transgén en diversos tejidos en los que se expresa la queratina K5, demostrado mediante *Northern blot*, *immunoblotting* e inmunolocalización (Pérez *et al.*, 2001).

En este estudio, demostramos histológicamente que la inmunolocalización del transgén se correlaciona con el patrón de expresión endógeno de la queratina K5 mediante la utilización de anticuerpos anti-GR que discriminan entre el GR endógeno y transgén. En la Figura 11 observamos como, el anticuerpo mGR que reconoce tanto el GR de ratón (endógeno) como el GR de rata (producto del transgén) marca los queratinocitos de la capa basal en los ratones recién nacidos transgénicos, estrato de expresión característico de la queratina K5. El inmunomarcaje frente al rGR demuestra, inequívocamente, que el GR expresado en la capa basal correspondía al transgén, ya que este anticuerpo es específico para GR de rata. Es importante señalar que la localización nuclear de GR, exclusiva de los tejidos en que se expresa el transgén, se observa también en la epidermis de animales adultos (Figura 20), en las células mioepiteliales de las glándulas prepucciales (Figura 27), en el órgano del esmalte de los molares en desarrollo (Figura 43), en el epitelio oral (Figura 40), en la capa basal del epitelio en los párpados y córnea en desarrollo (Figura 32 y 33) etc., todos ellos epitelios derivados del ectodermo primitivo que expresan la queratina K5.

Los ratones transgénicos K5-GR desarrollan anomalías de diferente gravedad en órganos tales como la piel y glándulas cutáneas, el paladar y el ojo; estas anomalías son

mucho más graves en la línea 72, probablemente debido al hecho de incluir mas copias del transgén, de manera que los recién nacidos mueren a las pocas horas del nacimiento. A pesar del inconveniente que esto supone, la línea 72 nos permitió, mientras se mantuvo vivo el fundador, estudiar los efectos de los mayores niveles de sobreexpresión relativos del GR, en tejidos diana durante el desarrollo embrionario.

La muerte perinatal se produce también en los descendientes de la línea 285 nacidos en homocigosis, pero los descendientes heterocigotos sobreviven hasta la madurez, conservando la fertilidad. En estos animales heterocigotos de la línea 285, hemos realizado la mayor parte de nuestro estudio y, sobre ellos (realmente la propuesta se basa en el análisis conjunto de las 2 líneas) proponemos un nuevo modelo murino de Displasia Ectodérmica.

El hecho de que las dos líneas generadas independientemente desplieguen rasgos y malformaciones, desde el punto de vista patogénico, similares, aun con distinta gravedad, demuestra que el fenotipo resultante depende de la acción del transgén *per se* y no del lugar de inserción.

2. Alteraciones en la piel y folículos pilosos en los transgénicos K5-GR.

El papel de los glucocorticoides y su interacción con el GR durante el crecimiento embrionario y su desarrollo ha sido un tema de interés durante muchos años. Hacia la mitad de la gestación, los receptores de glucocorticoides intracelulares se expresan en la mayoría de los tejidos fetales, coincidiendo el momento de la transcripción del GR, con la diferenciación terminal de muchos tejidos (Bamberger *et al.*, 1996); muchos procesos de la morfogénesis embrionaria están mediados a través de la acción de los GCs, por lo que, GR y su ligando, deben expresarse en un contexto espacio-tiempo muy preciso para dar lugar a un embrión normal (Moore and Persaud, 1999). El modelo de ratón transgénico que hemos caracterizado sobreexpresa el GR en los epitelios estratificados a partir del día 13,5 d.p.c. dirigido por el promotor de la queratina K5, en órganos y tejidos que son embriológicamente derivados del ectodermo superficial.

El grado de afectación de la piel, principal órgano de expresión del transgén, varía entre individuos y según la zona corporal que se considere.

2.1. Alteraciones cutáneas durante el desarrollo.

El estudio histopatológico de la piel e inmunohistoquímico frente a la queratina K5 muestra un marcado retraso en el desarrollo de la epidermis y de los folículos pilosos en todo el cuerpo en fetos a término (Figura 17), lo que determina la aparición de una piel más fina y unos folículos pilosos en fases más precoces de su desarrollo.

La intensa expresión del GR en los queratinocitos de la capa basal de la epidermis y de la v.r.e. de los folículos pilosos con localización nuclear de este receptor (Figura 11), implica un elevado nivel de expresión en esas células, que facilitaría tanto las acciones transrepositoras como transactivadoras y sugiere una implicación directa del GR en la patogénesis de las lesiones (Hache *et al.*, 1999).

La piel que recubre la cabeza es, sin duda, la más afectada de toda la superficie corporal. La lesión más leve de la piel en el vértice craneal de los embriones transgénicos es la hipoplasia epidérmica, caracterizada histológicamente por una piel muy fina, poco diferenciada y con retraso en el desarrollo de los folículos pilosos (Figura 18); esta epidermis hipoplásica en las imágenes de microscopía electrónica de barrido trasluce una amplia zona subyacente de ausencia de hueso craneal o fontanela agrandada (Figura 15).

La lesión moderada de la piel de la cabeza es la ACC, en la cual existe un defecto en el desarrollo de toda la epidermis que afecta, con mayor o menor extensión, a la mayoría de los ratones transgénicos recién nacidos (Figuras 14 y 17) en la región del vértex craneal; esta ACC, con el tiempo, se resuelve espontáneamente sin secuelas aparentes en los transgénicos adultos.

Las lesiones más graves en el desarrollo de la piel afectan a la cabeza y línea alba abdominal cuando se produce ACC grave con falta de desarrollo, no solamente de la epidermis, en la cual se sobreexpresa el GR, sino también de la dermis, hipodermis y músculos y huesos subyacentes, provocando acrania con exencefalia y gastrosquisis con salida al exterior de los órganos abdominales (Figuras 12, 13 y 16); este hecho sugiere una interferencia en la morfogénesis embrionaria que, partiendo de la epidermis, afecta a estructuras mesodérmicas subyacentes. No obstante, esta interferencia, desaparece o se supera pocos días después del nacimiento, ya que la piel hipoplásica, la aplasia cutis

moderada y el agrandamiento de la fontanela se recuperan *ad integrum*, proporcionando un cierre craneal adecuado.

Este fenotipo cutáneo presentado por los ratones transgénicos K5-GR es muy similar al observado en pacientes con Displasia Ectodérmica (ED) que pueden presentar ACC en la piel de la calota, asociada en ocasiones a malformaciones de los tejidos subyacentes. Las malformaciones clínicas descritas en la piel de pacientes con ACC pueden ser únicas o múltiples y de extensión variable, afectando más frecuentemente a la región craneal y al abdomen (Frieden, 1986). La hipoplasia de los tejidos de la zona de la calota observada en los ratones transgénicos K5-GR se acrecienta con la edad embrionaria hasta hacerse máxima en el nacimiento. El hecho de que lesiones similares sean frecuentes en el vértice craneal en humanos, propició la hipótesis descrita por Stephan *et al.* (1982) según la cual la ACC estaría promovida por las tensiones generadas por el rápido crecimiento cerebral, siendo máximas en el vértice craneal, que distienden la piel y posibilitan o inducen las alteraciones; tales acontecimientos podrían ocurrir en los ratones transgénicos K5-GR y explicarían la predominancia de lesiones en determinadas zonas de la piel y no en otras, a pesar de expresar toda la epidermis del embrión niveles similares del GR. Como refuerzo de esta teoría hemos observado que a partir de la edad gestacional de 15,5 d.p.c., la epidermis que recubre la parte superior de la cabeza es más fina en embriones no transgénicos (Figuras 16 y 18).

Las malformaciones de la piel de la zona de la calota caracterizan sin duda la ED en humanos, hasta el punto de que, recientemente, la ausencia de estructuras ecninas en la biopsia de la piel (*punch biopsy*) que recubre el cráneo, se ha convertido en el principal marcador-diagnóstico de displasia ectodérmica hipohidrótica postnatal en humanos, con una gran sensibilidad del 67% y una especificidad del 100% (Rouse *et al.*, 2004), con lo que, la presencia de glándulas sudoríparas en la biopsia de piel craneal en un niño sospechoso de HED descarta por completo la enfermedad.

La gravedad de la ACC en los ratones transgénicos K5-GR varía entre animales de la misma camada (Figuras 12 y 13); de igual manera, en pacientes con ED afectados de ACC se ha descrito una variabilidad intra e interfamiliar (Frieden *et al.*, 1986) por lo que la heterogeneidad es en ellos la norma.

En los embriones transgénicos y, conforme aumenta la gravedad del fenotipo, detectamos un retraso en la osificación del hueso supraoccipital o, en casos extremos, una ausencia total de pared craneal, lo que impide el cierre de la cabeza (embriones de la línea 72, Figura 12 y 13), determinando la muerte tras el parto. En humanos, la acrania se considera una forma grave de ACC (Chitayat *et al.*, 1992), la cual produce la muerte por infección y/o hemorragia del seno sagital a partir del defecto en el cierre de la pared craneal ósea (Leboucq *et al.*, 1994).

La ACC moderada, presentada por los ratones transgénicos de la línea 285 es similar a la ACC humana, permite la vida del animal, puesto que las lesiones cicatrizan totalmente y suponen un interesante modelo animal de ACC, si tenemos en cuenta que en otros modelos murinos de ED no se ha descrito esta lesión.

2.2. Alteraciones cutáneas en adultos.

Durante los primeros días de vida postnatal, la piel de los ratones transgénicos K5-GR se regenera, completa su queratinización, y los folículos pilosos viables acaban generando el pelo. Sin embargo, la piel de los adultos dista de ser una piel normal, no en vano, en su estrato basal continúa expresando intensamente el transgén (Figura 20). Así, la epidermis de los adultos se adelgaza reflejando un lento proceso de atrofia que afecta a todas sus capas; algunos folículos pilosos degeneran de tal manera que los nuevos anagenes son incapaces de generar un pelo; estos folículos pilosos displásicos afuncionales progresivamente se atrofian y desaparecen dejando la presencia de una glándula sebácea huérfana, testigo temporal de un folículo ausente. Este proceso lleva a la disminución del número de folículos pilosos por milímetro de un 50% y a la aparición de zonas de alopecia en mosaico (Figura 20).

La alopecia en adultos afecta con mayor frecuencia a la cara y el hocico, zonas más expuestas al roce y/o traumatismos mecánicos; las vibrisas o pelos sensitivos no escapan a este proceso degenerativo mostrándonos la existencia de un proceso displásico no inflamatorio y no cicatricial, atribuida al efecto directo causado por la sobreexpresión del GR (Figura 19, 20 y 21). La ausencia de infiltrado inflamatorio en la piel (y en otros epitelios diana del transgén) ante agresiones traumáticas y/o infecciosas, es una de las características de los ratones transgénicos K5-GR que atribuimos a la sobreexpresión del

GR, habida cuenta de las muy conocidas acciones antiinflamatorias de los GC. De hecho, se ha demostrado en trabajos previos que la sobreexpresión de GR en la epidermis de los transgénicos K5-GR inhibe los niveles de distintos genes pro-inflamatorios, incluidos IL-1, IL-6 y TNF- α (Pérez *et al.*, 2001).

En los ratones adultos K5-GR es frecuente observar incontinencia pigmentaria en zonas de piel expuestas a traumatismos, como la piel de las palmas de las manos, las plantas de los pies o de la cola, evidencia de la fragilidad de una capa basal incapaz de mantenerse estructuralmente estable ante continuas agresiones (Figura 23).

El fenotipo de piel descrito en los ratones transgénicos K5-GR es, en general, similar al observado en otros modelos murinos de ED, particularmente en aspectos como la piel fina, la alopecia en mosaico en animales viejos, el reducido número de vibrisas y la displasia de folículos pilosos en animales añosos. Debemos reseñar que en los ratones transgénicos K5-GR la pérdida de folículos pilosos por displasia de los mismos se detecta ya a las 5 semanas de vida.

La descamación y la piel fina es a su vez una de las características de la HED (Pinheiro *et al.*, 1979 y 1981; Itin and Fistarol, 2004).

2.3. Defectos en los folículos pilosos.

Los apéndices epiteliales (pelos, uñas, glándulas, dientes) se forman a partir del ectodermo y del mesénquima durante el período de estratificación de la piel en los ratones. Las interacciones recíprocas o “señales” entre el epitelio y la dermis subyacente se consideran determinantes de la morfogénesis de los apéndices cutáneos tales como los folículos pilosos (Paus and Cotsarelis, 1999; Paus *et al.*, 1999). En los últimos años, se ha demostrado que se activan varios sistemas de señalización durante las primeras fases de la morfogénesis folicular, los cuales interaccionan positiva o negativamente (Millar, 2002). La identificación de la primera señal dérmica es desconocida, sin embargo, la señal podría ser una molécula Wnt o un activador de la señalización de la β -catenina (Noramly, 1999; Millar, 2002). En la promoción de la formación de las placodas, o condensaciones del ectodermo para formar un apéndice, existe una compleja competición entre múltiples moléculas promotoras y represoras de su formación; entre ellas, la ectodisplasina, su

receptor EDAR y otros miembros de la familia de los receptores del TNF como son TROY y XEDAR, que se expresan en los folículos pilosos en desarrollo (Kojima *et al*, 2000; Yan *et al*, 2000). La pérdida de señalización de estas vías (p. ej. por mutación) es responsable de la ausencia de formación de algunos subtipos de pelo en los modelos murinos de ED (Headon and Overbeek, 1999) al ocasionar en conjunto, una menor actividad de los genes dependientes de NF- κ B, punto de confluencia común, como veremos más adelante, entre otros modelos de ED y los ratones transgénicos K5-GR.

La formación de los folículos pilosos en el embrión del ratón se produce por oleadas, comenzando el día E13 en el hombro, extendiéndose las oleadas hacia la región caudal, anterior, ventral y dorsalmente, apareciendo los pelos corporales tipo *guard* en primer lugar seguidos por los pelos *awls* (E16) y *auchennes/zigzags* (E18); las vibrisas comienzan su desarrollo rostro-caudal antes que los pelos, el día E12 (Kaufman and Bard, 1999; Byrne and Hardman, 2002).

Los análisis del pelo han mostrado la presencia en los ratones transgénicos K5-GR, de los cuatro tipos de pelo corporales característicos del ratón: *guard*, *awl*, *auchene*, y *zigzag*; por el contrario, el resto de modelos de ED murinos presentan predominantemente un solo tipo de pelo de características intermedias entre *guard* y *awl*.

Si tenemos en cuenta que el uso del promotor K5 dirige la expresión del transgén en las células de la v.r.e. alrededor del día E15,5 datos demostrados por la detección del gen reportador lacZ (Ramírez *et al.*, 1994), es decir, dos días más tarde que en la epidermis, y dos días y medio más tarde del inicio de la foliculogénesis, podemos hipotetizar que en los ratones transgénicos K5-GR, las primeras oleadas de folículos pilosos (*guard*) han iniciado ya la morfogénesis en ese momento, escapando por lo tanto, a las acciones inhibitoras del transgén. Para explicar como el resto de los folículos desarrollan pelos normales, cabe especular que, o bien una parte de la inducción a nivel molecular mesénquima-ectodermo antes descrita ya se ha producido antes de la expresión del transgén o bien que la acción del transgén no es suficiente para interferir en una forma más severa con la foliculogénesis. Lamentablemente, la muerte perinatal de la progenie de los ratones de la línea 72 y de los homocigotos de la línea 285 antes de la aparición del pelo imposibilitó el estudio en condiciones de mayor expresión fenotípica.

Un rasgo común de otros modelos murinos de ED, como los ratones *tabby*, *downless*, y *crinkled* es que, a pesar de carecer de varios subtipos de pelo, poseen la misma densidad de folículos pilosos que los ratones no transgénicos (Claxton, 1967) lo que diferencia a estos modelos de ED de los ratones K5-GR. Es bien conocido desde hace tiempo que la fase de anagén es suprimida mediante la administración de glucocorticoides y que los estímulos que inducen esta fase de crecimiento activo del folículo (señales espontáneas o traumáticas) se suspenden temporalmente, manteniéndose los folículos en fase de telogén, actuando de nuevo cuando cesa la aplicación de los esteroides, estimulando el comienzo de un nuevo anagén (Stenn and Paus, 2001); estos datos son coherentes con el gran número de pelos en fase de telogén que observamos en los ratones K5-GR y con la reducción total del número de folículos pilosos en los adultos, ya que no sería posible mantener el ciclo del pelo detenido en telogén de forma indefinida.

3. Hipoplasia o aplasia de glándulas ectodérmicas.

Además de los folículos pilosos, otros órganos tales como las glándulas sudoríparas, salivales, prepuciales, de Meibomio, etc, que resultan afectadas en las EDs, se desarrollan también como apéndices ectodérmicos. Su desarrollo, al igual que en caso de los folículos pilosos, está regulado por una secuencia de interacciones inductivas entre dos capas adyacentes, el epitelio y el mesénquima. Estas interacciones constituyen los mecanismos más importantes determinantes de la morfogénesis órgano-específica y regulan una gran variedad de funciones celulares incluyendo la proliferación, diferenciación y muerte celular. A nivel molecular estas interacciones están mediadas por señales moleculares que se expresan reiteradamente durante los diferentes estadios del desarrollo como FGFs (factores de crecimiento de fibroblastos), BMPs (proteínas de la morfogénesis del hueso) o proteínas de la familia Wnt (Thesleff *et al.*, 2002). La iniciación del desarrollo de los órganos como apéndices epidérmicos siempre comienza con un engrosamiento epitelial o placoda; una característica de las placodas es que expresan muchas de las señales moleculares arriba indicadas, por lo que se definen como auténticos “centros de señalización” embrionaria. Posteriormente, las placodas se desarrollan más profundamente hacia el mesénquima, produciéndose una interacción específica ectodermo-mesénquima en cada órgano, determinando una ramificación en su morfogénesis (Millota and Thesleff, 2003).

Las glándulas exocrinas de procedencia ectodérmica expresan queratina K5 (y por tanto el GR transgén), no solamente al inicio del período de morfogénesis embrionaria, sino también en la época adulta, puesto que las células mioepiteliales de procedencia ectodérmica, y con características contráctiles, sintetizan queratina K5 y se disponen rodeando los acinos glandulares (Hori *et al.*, 1985). Así mismo, las células epiteliales ductales de todas estas glándulas expresan el transgén, lo que, sin duda colabora en la etiopatogenia del fenotipo. La sobreexpresión del receptor de glucocorticoides en estas células, puesta de manifiesto por la inmunolocalización nuclear del GR (Figura 27), determina una desestructuración de la morfología glandular, mostrando no solo un menor desarrollo, sino también un retraso en la maduración de las células parenquimatosas, una esclerosis del tejido conjuntivo intersticial y un menor número de células epiteliales ductales y mioepiteliales. Este proceso displásico necesariamente ocasionará una disminución o pérdida de eficacia funcional, disminuyendo la producción de sudor o de saliva, en el caso de las glándulas sudoríparas o salivares, y disminución de la secreción de grasas lubricantes en el caso de las glándulas prepucales; en el caso de las glándulas de Meibomio, se produce la ausencia total de función por aplasia glandular, privando a los epitelios anteriores del ojo de la necesaria lubricación lipídica.

3.1. Ausencia o disminución de glándulas ecrinas.

La ausencia/disminución de glándulas sudoríparas es una de los rasgos que caracterizan muchas de las EDs en humanos. En el hombre el desarrollo embrionario de las glándulas sudoríparas comienza hacia la semana 14-16 de la gestación y durante la semana 24 se completa su maduración. En nuestros estudios, no hemos encontrado glándulas sudoríparas ramificadas y maduras en el momento del nacimiento ni en recién nacidos no transgénicos ni en transgénicos, puesto que éstas completan su maduración postnatalmente; sin embargo, hemos observado un menor desarrollo y a veces ausencia de estas glándulas en los animales adultos a nivel de la dermis de las almohadillas plantares o palmares, apareciendo los acinos secretores estructuralmente desorganizados y con una disminución apreciable del número células mioepiteliales (Figura 26).

La ausencia, la disminución del tamaño y la displasia de glándulas sudoríparas en las almohadillas plantares y palmares de ratones adultos es una de las características de los ratones transgénicos K5-GR que comparte con los ratones *tabby*, *downless*, *crinkled* y

otros modelos murinos de ED (Srivastava *et al.*, 2001). En estos modelos la ausencia de glándulas sudoríparas en ocasiones es total, como en el caso de los ratones deficientes en TRAF6 o en el ratón *tabby*, en el que la ausencia absoluta de glándulas sudoríparas se asocia a la desaparición de los dermatoglifos (*dermal ridges*) o pliegues de flexión en las palmas de las manos y las plantas de los pies. Los ratones transgénicos K5-GR presentaban dermatoglifos, aunque menos marcados por ser menos profundos que en no transgénicos, junto con una disminución o ausencia de sólo algunas glándulas sudoríparas; estos rasgos en los ratones K5-GR, aunque más leves, constituyen un punto más de coincidencia con los modelos murinos de ED.

3.2. Ausencia de glándulas holocrinas.

No observamos anomalías en las glándulas sebáceas en los ratones K5-GR, si bien, están disminuidas en número con respecto a los no transgénicos, ya que se encuentran asociadas a los folículos pilosos; cuando éstos degeneran y desaparecen en los transgénicos, se produce también, aunque de forma lenta y progresiva, la atrofia y desaparición total de sus glándulas sebáceas. Tampoco se ha demostrado el deterioro y/o la ausencia de estas glándulas en los ratones *tabby*, *downless* o *crinkled* (Sundberg, 1994), pero los ratones deficientes en TRAF6 muestran un menor desarrollo y, en ocasiones, ausencia de las glándulas sebáceas. En algunos pacientes con HED se ha descrito un menor número de glándulas sebáceas (Al-Jassim and Swift, 1996).

Es posible que el desarrollo de las glándulas sebáceas asociadas a los folículos pilosos escape al efecto de la sobreexpresión del GR al expresarse solamente en las células mioepiteliales que rodean a los acinos secretores, y de forma tardía en el desarrollo embrionario.

Las glándulas prepucciales y las glándulas de Meibomio son glándulas sebáceas modificadas con secreción del tipo holocrino, al formar los sebocitos maduros y lisados, parte de la secreción o sebo. En coincidencia con otros modelos murinos de ED, los transgénicos K5-GR presentan un menor desarrollo de las glándulas prepucciales, las cuales aparecen en ocasiones muy desestructuradas (Figura 27), y ausencia de glándulas de Meibomio.

Las glándulas de Meibomio comienzan a diferenciarse a partir del día 15,5 d.p.c en el momento en que los párpados están ya fusionados; una diferenciación que finaliza el quinto día de vida postnatal, aunque los conductos de drenaje no se abren en los márgenes parpebrales hasta que se produce la apertura de los mismos a los 8-10 días del nacimiento (Findlander *et al.*, 1993). Si bien es comprensible la ausencia de glándulas de Meibomio en los ratones transgénicos K5-GR que nacen con falta de desarrollo de ambos párpados, también se observa ausencia de estas glándulas parpebrales en los casos en que uno de los párpados sí se desarrolla (normalmente el inferior), o en el caso de los ratones con afectación ocular unilateral, también existe ausencia de glándulas de Meibomio en el ojo no afectado; la mayor sensibilidad de estas glándulas a la sobreexpresión del GR puede tener relación con el hecho de que inician su desarrollo en el momento de mayor expresión del transgén.

3.3. Mecanismos moleculares implicados en alteraciones de piel y glándulas ectodérmicas.

A modo de resumen, los ratones K5-GR muestran un retraso en la diferenciación durante la morfogénesis epidérmica, un menor número y displasia de los folículos pilosos, una displasia y reducido número de glándulas ectodérmicas, ecrinas y holocrinas, debida en ocasiones a la agenesia de las mismas. Estos datos indican que la sobreexpresión del GR en epitelios estratificados, que derivan del ectodermo embrionario, provoca señales que inducen a un retraso en el desarrollo de la piel y de los apéndices epidérmicos o que provocan la ausencia del primordio embrionario a partir del cual se desarrollan. El fenotipo de los ratones K5-GR en la piel es similar al descrito en los ratones *tabby*, *downless*, *crinkled* y ratones deficientes en TRAF6 y muy similar al que presentan los pacientes humanos con HED (Pinheiro *et al.*, 1994).

A nivel molecular, la piel y los apéndices epidérmicos expresan niveles altos de proteínas relacionadas con la superfamilia del TNFR como son EDA/EDAR, TROY y XEDAR (Headon *et al.*, 1999; Kojima *et al.*, 2000; Yan *et al.*, 2000) las cuales vehiculan señales de activación de NF- κ B; también TRAF6 produce una activación de NF- κ B transmitiendo señales desde XEDAR hasta el complejo IKK (Naito *et al.*, 2002). La activación total de NF- κ B es imprescindible para el desarrollo normal de los apéndices epidérmicos (Schmidt-Ullrich *et al.*, 1996); de hecho, los ratones que expresan

ubicuamente una forma mutante de I κ B α que actúa como un super-represor de la actividad NF- κ B, muestran un fenotipo idéntico a los ratones *tabby*, *downless* y *crinkled* (Schmidt-Ullrich *et al.*, 2001).

La piel de transgénicos neonatos K5-GR exhibe una menor actividad NF- κ B de unión al DNA en comparación con los no transgénicos (Pérez *et al.*, 2001). Estos datos, junto con todo lo expuesto anteriormente nos lleva a considerar a las conocidas interacciones represoras entre el GR y la vía de señalización de NF- κ B (Mukaida *et al.*, 1994; Scheinman *et al.*, 1995; McKay *et al.*, 1999; De Bosscher *et al.*, 2000; Vlaeminck-Guillem *et al.*, 2003) como responsables, al menos parcialmente, del desarrollo embrionario anormal de la piel y sus apéndices en los transgénicos K5-GR.

En el desarrollo normal de la epidermis se encuentran implicados un número de factores de transcripción capaces de responder al stress; estos permiten una adecuada proliferación, diferenciación y migración de los queratinocitos; el factor de transcripción AP-1 es uno de estos factores que ha sido directamente ligado a un número de procesos en la piel incluídas la carcinogénesis epidérmica (transformación oncogénica) y las interacciones dermo-epidérmicas (Angel and Szabowski 2002; Yates and Rayner 2002). Además, en invertebrados como *Drosophila*, la función AP-1 es imprescindible para la normal elongación y cierre de las fisuras epidérmicas (Kockel *et al.*, 2001). AP-1 no solo se expresa durante la diferenciación de los queratinocitos (Mehic *et al.*, 2005) sino que participa también en el proceso de cicatrización de heridas y más concretamente en la migración de las células epiteliales actuando a través del EGF y sobre su receptor (EGFR) (Fu *et al.*, 1999; Park *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 2000) y lo que es más, mutaciones en el receptor EGF o de uno de sus ligandos el TGF α , afecta claramente al proceso de movimiento epitelial en vertebrados, causando un fenotipo de “ojo abierto” es decir, un fallo de la epidermis del párpado para recubrir el ojo antes del nacimiento (Luetkeke *et al.* 1993; Mann *et al.*, 1993; Fowler *et al.*, 1995). Un fenotipo similar se ha conseguido en ratones condicionales con delección del protooncogén c-Jun en la epidermis ya que estos ratones nacen con el “ojo abierto” y presentan también defectos en la cicatrización de heridas debido a una incapacidad para activar al receptor de EGF en el borde de los párpados y en el borde de las heridas (Zenz *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2003).

Aunque los ratones transgénicos K5-GR adultos no tienen problemas en la cicatrización de heridas, los recién nacidos presentan un “ojo abierto” fenotípicamente similar al observado en los ratones con mutaciones que afectan a las vías EGF/AP-1. Este hecho, unido a datos recientes que muestran que en piel de ratones transgénicos K5-GR adultos se detectan niveles disminuidos de *c-fos* mediante Northern blot (no mostrado) y dadas las conocidas interacciones entre GR y AP-1, no podemos descartar la interacción negativa de GR sobre la vía AP-1 como un potencial responsable de parte del fenotipo ocular o de la hipoplasia epidérmica de los ratones transgénicos K5-GR.

Aunque hoy en día sabemos que en la diferenciación terminal de los queratinocitos se encuentran implicados un gran número de genes (Hu *et al.* 1999; Takeda *et al.*, 1999; Rangarajan *et al.*, 2001), el factor de transcripción p63 se expresa en las células basales de la epidermis (incluidas las “*stem cell*”/células troncales) y otros epitelios, durante el desarrollo embrionario en el ratón, jugando un papel doble, por un lado iniciando la estratificación epitelial durante el desarrollo del embrión y, por otro lado, manteniendo un potencial proliferativo de los queratinocitos en la capa basal de la piel madura (Koster *et al.*, 2004). Por lo tanto, p63 juega un papel clave en el desarrollo de los apéndices epidérmicos tales como los dientes, folículos pilosos y glándulas mamarias (Mills *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999). La superficie epitelial de ratones recién nacidos deficientes en p63 (p63 *-/-*) es incapaz de estratificarse y solo posee una única capa de células que no expresan ninguno de los marcadores de diferenciación epidérmica, incluyendo las queratinas K5 y K14 (Mills *et al.*, 1999; Yang *et al.* 1999), lo que determina la deshidratación y muerte a las pocas horas del nacimiento. También se ha propuesto que p63 juega un papel central en el mantenimiento de la población de *stem cells* en un epitelio estratificado completamente diferenciado (Mills *et al.*, 1999).

Teniendo en cuenta estos antecedentes y la relación de mutaciones del gen p63 en varias EDs en humanos, tales como el síndrome de EEC (ectrodactilia, displasia ectodérmica y paladar hendido; OMIM 604292) (Barrow *et al.*, 2002; Ray *et al.*, 2004), el síndrome AEC (anquilobefaron, displasia ectodérmica y paladar hendido; OMIM 106260) y, probablemente los síndromes LMS (síndrome mama-miembro; OMIM 603543), LADD (síndrome lacrimo-aurículo-dento-digital; OMIM 149730) y ADULT (Síndrome Acrodermato-ungueo-lacrimo-dental; OMIM 103285) (McGrath *et al.*, 2001), p63 atrajo

nuestra atención como proteína candidata a estar implicada, desde el punto de vista molecular, en el fenotipo de los ratones K5-GR.

Las dos isoformas principales de la proteína p63, TAp63 que posee dominios de transactivación y $\Delta Np63$ que no los posee, deben encontrarse equilibradas entre sí para permitir a las células responder a las señales requeridas para la maduración de la epidermis del embrión; como $\Delta Np63$ es la isoforma que se expresa predominantemente en la epidermis madura (Yang *et al.*, 1998; Liefer *et al.*, 2000) fue la isoforma de elección para estudiar su expresión en los ratones K5-GR. Nuestros resultados muestran en los transgénicos una disminución de esta proteína en el desarrollo de los epitelios estratificados de origen ectodérmico como la epidermis y folículos pilosos (Figura 25), por lo que la alteración en la diferenciación y proliferación epidérmicas en los transgénicos K5-GR, entre otros mecanismos, estaría mediada por una interacción negativa de GR sobre la vía de señalización de p63

4. Malformaciones letales.

La simple inspección de los embriones transgénicos de la línea 72 pone de manifiesto, no solo un menor desarrollo somático general, una piel más fina con áreas de ACC, sino también otras malformaciones muy graves responsables de la muerte perinatal como son la acrania con exencefalia por falta de cierre de las estructuras que cierran el tubo neural embrionario, la gastrosquisis por falta de cierre de la pared abdominal anterior y la hendidura palatina por ausencia de cierre del paladar secundario. Dentro de estas malformaciones graves incluimos la falta de desarrollo de los párpados, malformación no letal pero que compartiría características etiopatogénicas con las lesiones graves.

Malformaciones muy similares a estas como el labio/paladar hendido, los defectos en el desarrollo de los párpados (colobomas parpebrales), la gastrosquisis, la permanente contracción de las extremidades y diversos grados de ACC, entre otras, se han descrito en pacientes humanos afectados de formas graves de ED (Frieden *et al.*, 1986).

Como la acrania con exencefalia, el paladar hendido, la falta del desarrollo de los párpados y la gastrosquisis no aparecen en los fenotipos de los modelos murinos de ED que envuelven disfunciones de la vía TNF que convergen en la activación de NF- κ B

(Schmidt-Ullrich *et al.*, 2001), es posible especular que la sobreexpresión del GR pudiera interaccionar adicionalmente con otras vías implicadas en el desarrollo embrionario distintas a la vía de activación de NF- κ B.

4.1. Mecanismos moleculares implicados en malformaciones graves por falta de cierre de tejidos en desarrollo.

Los factores de transcripción AP-2, una familia de proteínas inducidas por el ácido retinoico, se han caracterizado como reguladoras de la expresión génica durante el complejo proceso de la morfogénesis embrionaria. Durante los primeros estadios del desarrollo, los tres genes de la familia AP-2 (*Tfap2a*, *Tfap2b* y *Tfap2c*) se coexpresan en las células de la cresta neural mientras que, en los estadios finales del desarrollo, existe una expresión variable de estos genes en la epidermis, prominencias faciales y placodas de las extremidades (Moser *et al.*, 1995 y 1997; Chauzaud *et al.*, 1996). Las proteínas codificadas por estos genes TFAP2 (TFAP-2 α , TFAP-2 β y TRAP-2 γ) forman homo y heterodímeros con otros miembros de la familia TFAP2. Los dímeros se unen a secuencias palindrómicas del DNA en las regiones promotoras de determinados genes, activando su transcripción.

El gen *Tfap2a* es un regulador decisivo de la embriogénesis fisiológica en los vertebrados: los ratones deficientes en TFAP-2 α mueren perinatalmente y muestran deformidades congénitas múltiples entre las que se encuentran malformaciones que implican fallos en el cierre del tubo neural anterior y malformaciones craneoencefálicas incluyendo defectos en el cierre de los ojos, defectos en el cierre del paladar secundario y defectos en el cierre de la pared abdominal y torácica (Zhang *et al.*, 1996; Schorle *et al.*, 1996; West-Mays *et al.*, 1999). También se han generado quimeras portando células AP-2 null, que presentan las malformaciones de los ratones AP-2 *-/-* en aquellas zonas del embrión que presentan una distribución somática de las células null (Nottoli *et al.*, 1998).

Los ratones transgénicos K5-GR con fenotipo grave comparten con este modelo murino las malformaciones letales; restringidas lógicamente, en el caso de los ratones K5-GR, a los tejidos y el tiempo donde actúa el transgén, como son el paladar hendido, la exencefalia, la gastrosquisis, o los graves defectos en el ojo por falta de desarrollo de los párpados. Dada la coincidencia fenotípica, nuestros datos sugieren una potencial relación entre las vías de señalización mediadas por AP-2 y GR durante el desarrollo embrionario,

sobre todo si tenemos en cuenta la menor expresión de AP-2 detectada mediante técnicas inmunohistoquímicas en epitelios orales y piel en embriones transgénicos K5-GR de 18,5 d.p.c. (Figura 49).

5. Malformaciones oculares.

Uno de los rasgos fenotípicos más llamativos de los ratones K5-GR es la ausencia de uno o ambos párpados que afecta a uno o ambos ojos en los recién nacidos; esta situación no se ha descrito, con tanta severidad, en los modelos murinos de ED.

En pacientes humanos diagnosticados de ED también se describen anomalías oculares, en especial las que afectan a las estructuras anteriores del globo ocular y anejos, como en el síndrome de Hay-Wells (AEC) en el cual hay fisuras parpebrales muy cortas, con fusión lateral de las mismas (*anquiblefaron filiforme adnatum*) y ausencia de pestañas (Martínez-Frías *et al.*, 1996), en el síndrome de EEC en el que se produce ausencia y/o disminución de glándulas de Meibomio, entropión con triquiasis (inversión de una o más pestañas de manera que su extremo roza y lesiona la córnea), poco desarrollo de los tarsos parpebrales y anormalidades en el sistema de drenaje lacrimo-nasal (Roelfsema and Cobben 1996; Ireland *et al.*, 1998). También en la HED se describen defectos en el epitelio corneal (queratitis *punctata* superficial, *pannus* circunferencial, opacidades corneales, entre otras), vascularización de la córnea y complicaciones relacionadas con el sistema lacrimo-nasal (malposición/ausencia de puntos lagrimales y dracriocistitis crónica) (Philippe *et al.*, 1988; Donahue *et al.*, 1999). En síndromes de ED complejos aparece anoftalmía y microftalmía (Rodini *et al.*, 1992).

5.1. Malformaciones oculares durante el desarrollo.

Nuestros datos indican que el GR juega un papel de gran importancia en el desarrollo de las estructuras anteriores del globo ocular, como se muestra tanto en las imágenes con el microscopio electrónico de barrido (Figura 31), como en las imágenes histológicas de las Figuras 32, 33 y 34. El menor desarrollo parpebral puede afectar a ambos ojos pero, con más frecuencia, las lesiones son unilaterales; cuando solo uno de los párpados está ausente, siempre es el superior (Figura 30). Uno de los puntos más relevantes en este estudio es mostrar como la sobreexpresión del GR ejerce una acción

antiproliferativa sobre las células epiteliales de los párpados y de la córnea en desarrollo en los ratones transgénicos (Figura 32). A los 15,5 d.p.c. los embriones K5-GR muestran una disminución en la proliferación en el párpado y la córnea, lo que deriva en cambios atróficos visibles a los 16,5 d.p.c y, finalmente, a necrosis de los bordes parpebrales en embriones maduros y recién nacidos. Estas alteraciones pueden explicarse por el hecho de que el epitelio de los párpados supone un blanco para la expresión del transgén: en el epitelio corneal el transgén está activo a partir del día 13,5 d.c.p. y en el epitelio conjuntival a partir del día 15,5 d.p.c. según demostró el gen reportador lacZ (Ramírez *et al.*, 1994). A los 16,5 d.p.c. la expresión del transgén es evidente en el núcleo de las células de la capa basal de la epidermis de los párpados y del epitelio corneal y se correlaciona con un importante retraso en el desarrollo del párpado (Figura 33). A los 17.5 d.p.c., el epitelio de los bordes parpebrales y de la córnea de los embriones transgénicos presenta ya los primeros cambios necróticos, que se agravan en embriones a término y ratones recién nacidos (Figuras 33 y 34).

Durante el periodo embrionario, a partir del ectodermo superficial comienza el desarrollo de los márgenes del ojo para formar los futuros párpados, los cuales son evidentes a los 13,5/14,5 d.p.c.; los márgenes de los párpados progresan sobre la superficie corneal del ojo hasta llegar a contactar el uno con el otro a los 15,5 d.p.c. (Kaufman and Bard, 1999); sin embargo, el párpado superior se desarrolla más precozmente que el inferior (Rugh, 1990) lo que explica que el efecto antiproliferativo del transgén y los cambios necróticos observados en embriones de 18,5 d.p.c y ratones recién nacidos transgénicos K5-GR son más graves en el párpado superior que en el inferior.

Teniendo en cuenta que los transgenes bajo el control del promotor de la K5 no se expresan hasta más allá del día 13,5 d.p.c. (Ramírez *et al.*, 1994) y que para esas fechas el cristalino ya presenta un grado avanzado de diferenciación, es comprensible que no se encuentre afectado directamente en los ratones K5-GR a pesar de proceder del ectodermo superficial que recubre la cabeza y a pesar de expresar filamentos intermedios durante las fases más precoces de su desarrollo (fases vesiculares) (Kasper and Viebahn, 1992). Por otra parte, la expresión del transgén en la conjuntiva ocular a partir del día 15,5 d.p.c., es decir, dos días de retraso en relación a otros epitelios como la piel o la córnea, justifica, sin duda, una menor afectación de la conjuntiva, al disponer de más tiempo de libertad para su diferenciación.

Consideramos que el deterioro en el desarrollo de la córnea en los transgénicos K5-GR es una consecuencia de dos efectos distintos: por un lado se debería a la destrucción anómala del epitelio de la región central de la córnea como consecuencia de los efectos antiproliferativos de la sobreexpresión del GR (Figuras 31 a 35); por otro lado, la ausencia de fusión de los párpados en los transgénicos impide la formación del saco conjuntival y del imprescindible microambiente protector y aislante del ojo, tanto *in útero*, como en los primeros días de vida postnatal (Kaufman and Bard, 1999); esta situación puede interferir con la diferenciación corneal tal y como sugieren algunos autores (Addison and How, 1999) ya que el cierre de los párpados protegería a la córnea de potenciales sustancias tóxicas, presentes en el líquido amniótico, hasta que las fases más críticas de la diferenciación corneal se hayan completado. En este sentido, cabe destacar que la necrosis en los ratones K5-GR recién nacidos afecta a los epitelios oculares que han sido expuestos al líquido amniótico *in útero*, mientras que los epitelios protegidos del fórnix se mantienen relativamente intactos (Figura 34).

La cicatrización y opacidad de la córnea con vascularización del estroma, así como la calcificación distrófica, la presencia de desmatoceles y *leucoma adherens* son reconocidas en humanos como secuelas tardías de enfermedades inflamatorias de la córnea tanto ulcerativas como no ulcerativas (Haustein, 1983). Por lo tanto, después de producirse una destrucción del epitelio corneal se desarrollan, secundariamente, diversos grados de destrucción del estroma corneal. Del mismo modo, los embriones transgénicos K5-GR presentan cambios necróticos en el epitelio corneal que aparecen como úlceras focales de la región central de la córnea o como una amplia descamación de casi toda la superficie corneal (Figura 31). En los ratones adultos K5-GR, se observa con frecuencia opacidad corneal con amplios depósitos cálcicos, *leucoma adherens* y desmatocelo que pueden consideramos como secuelas de la ulceración corneal que sufrieron durante el desarrollo embrionario (Figuras 36 y 37).

La menor expresión de p63 observada en los epitelios de los párpados, de la conjuntiva ocular y del epitelio corneal en ratones transgénicos K5-GR recién nacidos, evidencia una inhibición producida por la sobreexpresión de GR sobre las células de proliferación transitoria, aunque desconocemos los mecanismos que median dicha inhibición. La menor proliferación celular observada en el epitelio corneal al nacimiento, es más acentuada que la observada en otros epitelios como la epidermis, el epitelio oral o

la misma conjuntiva ocular; además en esos tejidos se produce una “regeneración” postnatal puesto que se conserva un grado de potencial cito renovador. La menor densidad de células de proliferación transitoria existente en la capa basal del epitelio corneal y su bajo grado de autorenovación explicarían una mayor susceptibilidad a las acciones represoras del GR, ya que la epidermis es reemplazada aproximadamente cada mes (Green *et al.*, 1980) mientras que el epitelio corneal se renueva cada 9-12 meses a partir de células madre del limbo corneal (Wagoner *et al.*, 1997).

Las malformaciones oculares afectan a los ratones transgénicos K5-GR de forma desigual, bien al ojo derecho, al izquierdo o a ambos. Una posible explicación para esta singularidad, es que el desarrollo del ojo del ratón no es un proceso realizado estrictamente simétrico, ya que las presiones uterinas y la vascularización, entre otros factores ambientales, pueden afectar de manera diferente a uno u otro lado del cuerpo durante el desarrollo y, por lo tanto, determinar su diferenciación asimétrica. Esta hipótesis es coherente con la idea actual de que los defectos congénitos son la consecuencia de la interacción entre el genoma del embrión y su medio ambiente (Carlson, 2000). En cualquier caso, entre todas las malformaciones que hemos observado en los ratones K5-GR, los defectos en la formación de los párpados y las malformaciones de las estructuras de la parte anterior del ojo son los más comunes y consistentes, ya que aparecen en la práctica totalidad de los transgénicos, incluso en los de fenotipo más leve, indicando que la expresión equilibrada del GR durante la embriogénesis es crítica para el desarrollo del ojo.

5.2. Secuelas oculares en ratones adultos.

Las manifestaciones oftalmológicas son habituales en las EDs ya que, no solo el cristalino, sino también el epitelio de la córnea, la conjuntiva y las glándulas de los párpados derivan de la superficie del ectodermo (Apple and Rabb, 1998; Kaufman and Bard, 1999). De hecho, las secuelas en pacientes con ED son progresivas ocasionando minusvalías a lo largo de la vida debidas a defectos oculares. Los pacientes muestran defectos en el epitelio corneal desde el nacimiento y/o neovascularización corneal a partir del limbo corneal acompañadas de opacidades corneales (Tijmes *et al.*, 1997; Donahue *et al.*, 1999). Las queratopatías en la ED se han relacionado con defectos primarios del epitelio corneal inducidos por la propia ED (Philippe *et al.*, 1988; Stahl *et al.*, 2000), agravándose por infecciones secundarias de los conductos lacrimo-nasales (McNab *et al.*,

1989) y por la inestabilidad de las lágrimas debido a una escasa secreción de las glándulas lagrimales y de Meibomio. Estos datos indican que la patogenia implicada en la ED podría ser multifactorial. Sorprendentemente, la ausencia absoluta de glándulas de Meibomio se ha propuesto como un marcador diagnóstico para el síndrome de EEC (Mondino *et al.*, 1984; Bonnard *et al.*, 1996; Ireland *et al.*, 1998).

Los ratones adultos K5-GR presentan una epidermalización de la córnea, con pelos creciendo en su interior (Figura 37) característica que se ha descrito en algunos pacientes con ED (Tijmes *et al.*, 1997). En humanos, la causa más frecuente de esta condición es la exposición corneal permanente que puede seguir a cualquier lesión que evita el cierre correcto de los párpados (Apple and Rabb, 1998). Como sugerimos anteriormente, en embriones de 18,5 d.p.c. y en recién nacidos K5-GR, la córnea no solo sufre ulceración por la sobreexpresión del transgén sino también por su anormal exposición *in útero* y después del nacimiento, ejerciendo un efecto negativo sumatorio. Estos factores combinados pueden ser responsables de la destrucción de todas o la mayor parte de las células madre localizadas en la región del limbo corneal (Cotsarelis *et al.*, 1989), por lo que la cicatrización se produciría solo a partir del epitelio conjuntival dando lugar a las sinequias corneo-parpebrales (sinbléfaron) y a la epidermalización corneal (Figuras 36 y 37).

Los glucocorticoides son ampliamente utilizados en oftalmología debido a sus potentes propiedades anti-inflamatorias, tanto después de la cirugía oftalmológica como en numerosas enfermedades inflamatorias leves (Kanski, 2000). En este trabajo, mostramos evidencias de que GR juega un papel antiproliferativo en el epitelio ocular anterior que interfiere con el desarrollo del ojo. En este sentido, y a pesar del gran conocimiento que existe sobre el tema, no podemos dejar de proponer una reevaluación del uso de glucocorticoides en tratamientos tópicos oculares y la búsqueda de drogas más específicas sin estos efectos indeseables.

5.3. Posibles mecanismos moleculares implicados en el fenotipo ocular.

El fenotipo ocular de los embriones y recién nacidos K5-GR comprende los defectos descritos en pacientes con ED, los cuales pueden padecer ulceraciones corneales reiteradas desde el nacimiento y, en ocasiones, ceguera debido a malformaciones graves (Apple and Rabb, 1998; Donahue *et al.*, 1999).

Los defectos oculares descritos en otros modelos murinos de ED con alteraciones en la vía TNF, en los cuales hay una función defectuosa de la vía NF- κ B, tales como ojos secos, queratoconjuntivitis *sicca* y, ocasionalmente, ceguera por opacidad corneal, se relacionan con un menor desarrollo de las glándulas tarsales y lagrimales y/o defectos morfológicos en los conductos lacrimo-nasales (Yoshida *et al.*, 2000; Schmidt-Ulrich *et al.*, 2001; Naito *et al.*, 2002). Estos defectos coinciden, al menos parcialmente, con los defectos oculares presentados por los ratones transgénicos K5-GR. Teniendo en cuenta el conocido antagonismo biológico entre GR y NF- κ B (Mckay and Cidlowski, 1999), consideramos que el fenotipo ocular presentado por los ratones K5-GR se debe, parcialmente, a la interferencia en la actividad NF κ B.

Sin embargo, las malformaciones observadas en los ojos de los ratones K5-GR son mucho más acentuadas que las observadas en otros modelos de ratón con una función NF- κ B defectuosa, en especial en lo referente a la falta de desarrollo parpebral, lesión que en definitiva, al privar al ojo de la necesaria protección desencadena la mayor parte del resto de lesiones. A la luz de los datos recogidos en la literatura y nuestros datos recientes (Fig. 49), podríamos especular que la interferencia con otras vías de señalización, como AP-1 y AP-2 podría ser la responsable de la falta del cierre del ojo, si consideramos que la expresión de AP-2 α es especialmente intensa desde el día 12 al 16 d.p.c. en la córnea, párpados, epidermis parpebral y glándulas de Meibomio (Moser *et al.*, 1997).

6. Alteraciones en la cavidad oral

6.1. Anomalías en el desarrollo del paladar secundario.

El paladar hendido y el labio leporino incluyen un grupo de malformaciones muy comunes en medicina humana que afectan a 1 de cada 700 nacimientos en el mundo (Schutte and Murray, 1999; Murray, 2002), con graves repercusiones sobre la salud al causar deformaciones faciales, problemas de alimentación, frecuentes infecciones del oído medio y la necesidad de múltiples intervenciones quirúrgicas reconstructivas. Clínicamente, cuando el paladar hendido/labio leporino aparecen con otras dos o más malformaciones se clasifican como una entidad sindrómica (SCLP) y, si aparecen como un defecto aislado, se emplea el término no-sindrómico (NSCLP).

Entre las entidades sindrómicas, no solo los síndromes EEC y AEC causados por mutaciones de p63, ocasionan paladar hendido asociado a displasia ectodérmica, sino que también recientemente, se han descubierto varios genes causantes de hendiduras orofaciales (Wong *et al.*, 2004), entre ellos mutaciones en el gen *poliovirus receptor like-1* (PVRL1), un gen que codifica para moléculas implicadas en la adhesión celular, que dan lugar al síndrome de labio leporino/paladar hendido asociado a displasia ectodérmica (CLPED ó Displasia ectodérmica Margarita Island; OMIM 225060) caracterizado por labio leporino con o sin paladar hendido, displasia ectodérmica hidrótica y sindactilia (Suzuki *et al.*, 2000).

El paladar secundario o definitivo inicia su proyección vertical (dorso ventral), en el ratón, el día E12 a partir de dos protuberancias mesenquimatosas; en el día E13,5, estos procesos palatinos se elevan rápidamente hacia una posición horizontal por encima de la lengua, hasta contactar y fusionarse previa degeneración del epitelio que los recubre (Depew *et al.*, 2002).

El 13,5 % de los ratones K5-GR de la línea 285 desarrollan paladar hendido bilateral por un defecto en el crecimiento de los procesos palatinos laterales que impide su migración y fusión lateral (Figura 39) lo cual determina su muerte perinatal; en el resto de ratones supervivientes se produce la fusión del paladar correctamente, aunque se cubre de un epitelio más fino, con la escala palatina del paladar duro muy poco marcada (Figuras 40 y 41). El crecimiento de los procesos laterales se encuentra mediado por mecanismos moleculares que regulan la proliferación celular (Depew *et al.*, 2002) y el hecho de que precisamente el día 13,5 d.p.c comience a activarse el transgén en los epitelios orales (Ramírez *et al.*, 1994) nos hace considerar a la sobreexpresión del GR responsable de las acciones antiproliferativas causantes de un defecto en el cierre del paladar secundario. Por lo que el efecto inhibitorio del transgén en células ectodérmicas del estomodeo primitivo, trasciende al mesénquima subyacente inhibiendo su adecuada diferenciación y proliferación.

La fusión de los procesos maxilares con las prominencias nasales laterales tiene lugar en el ratón hacia el día 12 d.p.c (Kaufman and Bard, 1999), antes del inicio de la activación del transgén, lo que justifica la ausencia absoluta de hendiduras del paladar primario o del labio en los ratones transgénicos K5-GR.

6.2. Posibles mecanismos moleculares implicados en el fenotipo del paladar.

Existen hasta el momento al menos 10 modelos murinos de paladar hendido obtenidos todos ellos por generación de ratones knockout para otras tantas 10 proteínas (Murray JC, 2002), lo que pone de manifiesto la complejidad de la palatogénesis a nivel molecular, puesto que en la etiología de las hendiduras orofaciales están implicados varios genes y varias vías de señalización a las que debemos sumar las interacciones genético-ambientales. Las hendiduras del labio y del paladar representarían el común “punto final” ocasionado por la interrupción de alguna de las múltiples vías que permiten el complejo desarrollo facial (Schutte and Murray, 1999).

Entre los modelos murinos de paladar hendido, el ratón *knockout* para el factor de transcripción sensible al ácido retinoico (TFAP-2 α) presenta importantes similitudes fenotípicas con los ratones transgénicos K5-GR (Schorle *et al.*, 1996; Nottoli *et al.*, 1998). AP-2 se expresa en tejidos que sufren cambios morfogénicos durante la organogénesis, sobre todo en los tejidos de la cresta neural (Williams *et al.*, 1988; Lüscher *et al.*, 1989; Mitchell *et al.*, 1991; Shen *et al.*, 1997), concentrándose su expresión, durante las últimas fases de la embriogénesis, en el desarrollo de la piel, prominencias faciales y arcos branquiales. La expresión de AP-2 se encuentra frecuentemente asociada con programas de desarrollo que implican una interacción epitelio-mesénquima, tales como la formación de la cresta neural, las paredes del cuerpo, las extremidades y la cara, por consiguiente, AP-2 ejerce su influencia en la morfogénesis a través de un conjunto de genes (Nottoli *et al.*, 1998).

El factor de transcripción AP-2 se une a secuencias reguladoras del promotor de GR en humanos y rata (Nobukuni *et al.*, 1995) y es capaz de transactivar dicho promotor. Este trabajo sugiere que AP-2 podría contribuir, en parte, a determinar la expresión de GR durante el desarrollo.

Consideramos a la interacción negativa de la vía AP-2 en respuesta a la sobreexpresión del GR como una posible causa del paladar hendido en los ratones transgénicos K5-GR. No podemos excluir que la represión de la vía NF- κ B pueda intervenir, agravando o incluso ocasionando esta misma malformación; sin embargo en

ninguno de los modelos murinos que interfieren con el TNF se describe paladar hendido, a excepción de los knockout de IKK α (Li *et al.*, 1999).

En nuestro estudio planteamos que los ratones transgénicos K5-GR constituyen un nuevo modelo para el estudio del paladar hendido. Aunque solo un 13,5 % de los ratones K5-GR presentan paladar hendido, debido a la heterogeneidad fenotípica, este porcentaje es adecuado para la utilización de esta línea como modelo murino de hendidura palatina, si tenemos en cuenta que la malformación *per se*, causa necesariamente la muerte en los recién nacidos afectados debido a problemas respiratorios o de alimentación.

La casuística de paladar hendido en los transgénicos K5-GR (cuya estirpe genética es la cepa híbrida B6D2) podría incrementarse mediante el cruce con estirpes genéticas en las cuales exista una elevada incidencia de paladar hendido espontáneo, tales como A/J, A/WySn, y CL/Fr, estirpes utilizadas desde hace muchos años por su fondo genético que proporciona una mayor susceptibilidad a los mecanismos inductores de paladar hendido (Kalter, 1979; Juriloff and Fraser, 1980; Gong, 2001)

6.3. Retraso en la odontogénesis y agenesia dental.

Las alteraciones en el número y en la forma de los dientes (hipodoncia, oligodoncia, dientes coniformes, taurodontismo o cámara pulpar alongada) constituyen signos clínicos que caracterizan, no solo a la HED, sino a un gran número de EDs humanas.

El órgano dental es uno de los apéndices epiteliales más afectados por la sobreexpresión del GR en los ratones transgénicos K5-GR; motivo por el que hemos seleccionado éste órgano para profundizar en los acontecimientos moleculares responsables del fenotipo. Por otra parte, la clasificación del desarrollo embrionario del diente está muy bien definida, tanto histológica como molecularmente, al ser uno de los órganos más investigados en los últimos años, lo cual facilita la interpretación más objetiva de las posibles diferencias entre no transgénicos y transgénicos; además, su tamaño y situación facilitan el abordaje histopatológico e inmunohistoquímico.

El desarrollo de los dientes implica interacciones epitelio-mesénquima que se encuentran mediadas por señales compartidas con otros apéndices ectodérmicos (folículos pilosos, glándulas sudoríparas, glándulas prepuciales, etc.). Solo se conoce una parte de esta compleja red molecular, en particular, la señalización relacionada con las familias BMP, FGF, Hh y Wnt. Durante las distintas fases del desarrollo del diente, se utiliza la misma cascada de señalización molecular. La aparición de un diente parece estar determinada por señales epiteliales, lo que ocasiona la activación de genes del mesénquima; el avance de la odontogénesis se encuentra mediado por centros de señalización temporales: uno en el epitelio que iniciará la formación de las yemas dentales y, otro en los nudos de esmalte primario y secundario que inducirán señales de proliferación y crecimiento de las coronas y de las cúspides individuales dentales (Jernvall and Thesleff, 2000).

La agenesia de algunos molares, la microdoncia y el retraso en su desarrollo durante el período embrionario que presentan un gran número de ratones K5-GR, guarda paralelismos con las alteraciones de los pacientes humanos con EDs y con las alteraciones dentales observadas en todos los modelos murinos de ED. El patrón fenotípico relatado en estos otros modelos murinos es prácticamente idéntico: los incisivos pueden faltar o estar disminuidos en tamaño, el primer molar es más pequeño y el tercer molar a veces desaparece (Grüneberg, 1965, 1966; Sofaer 1969; Pispá *et al.*, 1999).

La causa de la ausencia de afectación de los incisivos superiores e inferiores en los ratones transgénicos K5-GR, a diferencia de lo observado en otros modelos murinos de ED (y en la ED humana) debemos buscarla en el momento del desarrollo en que comienza a detectarse el transgén, ya que cuando éste empieza a expresarse en el embrión, tal y como puede observarse por la expresión del gen reportador lacZ (Ramírez *et al.*, 1994), determinados tipos celulares ya han comenzado parte de su desarrollo. Así, el promotor de queratina K5 bovina comienza a detectarse en el incisivo murino no antes del día E13,5 del desarrollo embrionario (Ramírez *et al.*, 1994), cuando el germen dental de los incisivos se encuentran en fase de caperuza temprana (*Early Cap Stage*). Dado que los incisivos comienzan su desarrollo embrionario el día E11 (*Epithelial thickening stage*) (Depew *et al.*, 2002), dos días y medio antes de la activación del transgén, un gran número de células del órgano del esmalte se desarrollan normalmente sin interferencias, lo cual permitiría el desarrollo de unos incisivos normales. Aunque el ratón carece de caninos y premolares, los

molares comienzan a desarrollarse después de los incisivos siguiendo un orden similar al observado en otros mamíferos: primero se desarrolla el primer molar y después, el segundo y el tercero a medida que el desarrollo maxilar/mandibular lo permite. El día E13,5 cuando ya se detecta expresión del transgén y los incisivos se encuentran en fase de caperuza, el primer molar superior se encuentra en fase de yema (*Bud Stage*), por lo que resulta afectado por la sobreexpresión del GR durante más tiempo antes de completar su desarrollo. Como el segundo molar inicia su diferenciación el día E15,5 del desarrollo embrionario y el tercer molar el día P4 después del nacimiento (Depew *et al.*, 2002), los efectos antiproliferativos de la sobreexpresión del GR son máximos, produciendo, en ocasiones, la agenesia. Estos datos nos llevan a considerar que los efectos de la sobreexpresión del GR son tanto más acentuados cuanto más indiferenciadas sean sus células diana; lo cual es coherente si tenemos en cuenta la abundante expresión de queratinas K5 y K14 detectada en estas células (Fuchs *et al.*, 1996; Magin *et al.*, 1998).

La expresión de la queratina K5 aparece en el ectodermo del estomodeo desde el inicio del desarrollo dental y se mantiene con un fuerte marcaje hasta la fase de campana precoz; a partir de este momento y, según progresa la diferenciación de los ameloblastos, la queratina K5 va desapareciendo y en la fase de campana tardía (*Late Bell Stage*) es sustituida por la queratina K19 (Domingues *et al.*, 2000) de tal modo que los ameloblastos completamente diferenciados no expresan queratina K5. Este patrón fisiológico de expresión de la queratina K5, que se imita con el uso de las secuencias reguladoras del promotor de la K5 bovina, permitiría a los ameloblastos -ya diferenciados durante las últimas fases del desarrollo dental- la síntesis de un esmalte sin los efectos de la sobreexpresión de GR, lo que explicaría la ausencia de malformaciones en este tejido, como hipoplasia del esmalte (muy frecuente en la HED), en los transgénicos K5-GR y explicaría, al menos en parte, el total desarrollo de las 6 cúspides completas observadas en los molares de los ratones K5-GR a diferencia de la única y anormal cúspide desarrollada en los molares del ratón *tabby* y otros.

6.4. Mecanismos moleculares implicados en el fenotipo dental.

Numerosas evidencias demuestran que *in vivo*, la acción de TNF se encuentra mediada, en parte, a través de NF- κ B. En ratones adultos mutantes para IKK α (que exhiben cierta actividad NF- κ B en algunos tejidos) se desarrollan molares con cúspides redondeadas, similares a las observadas en los ratones mutantes *EdaA1*, *Edar*, o *Edaradd* y en embriones *IKK α -/-*. Los ratones transgénicos que expresan una forma super-represora de I κ B α (defectivos en la activación de NF- κ B) muestran un fenotipo más severo, con pérdida de la totalidad de muela (Ohazama *et al.*, 2004b). Dado que la actividad NF- κ B y la transcripción de I κ B α se localizan en el nudo del esmalte, NF- κ B es, con toda probabilidad, diana de la señalización mediada por EdaA1 (o se encuentra “por debajo” en la vía de señalización).

Los embriones K5-GR presentan una disminución de actividad NF- κ B en todo el órgano del esmalte, siendo esta disminución máxima, precisamente, en las zonas donde se sitúan los nudos del esmalte (Figura 45), lo que demuestra la importancia del antagonismo entre estos factores de transcripción en el fenotipo dental.

La agenesia dental y microdoncia presentes en los ratones adultos K5-GR y el retraso en el desarrollo de los molares guarda paralelismos con el fenotipo dental observado en ratones con alteraciones en la vía TNF; conocido el antagonismo recíproco a nivel molecular entre GR y NF- κ B (De Bosscher *et al.*, 2000; Vlaeminck-Guillem *et al.*, 2003), concluimos que el fenotipo dental en los ratones K5-GR se debe a una regulación negativa causada por GR sobre NF- κ B, de manera análoga a lo que ocurre en epidermis (Pérez *et al.*, 2001; Leis *et al.*, 2004).

La señalización mediada por TNF está implicada en la regulación, tanto del número y tamaño de las cúspides dentales, como del número de molares. Los ratones desarrollan tres molares en cada cuadrante, bordeados distalmente por una zona edéntula. Los ratones *tabby* no solo presentan alteraciones en la morfología de las coronas, sino que un 20% carecen de incisivos o terceros molares (Pispa *et al.*, 1999) en coincidencia con los mutantes I κ B α que carecen del tercer molar. En ambos modelos hay una pérdida de la señalización Edar (Mikkola and Thesleff, 2003; Ohazama *et al.*, 2004). Por el contrario, la sobreexpresión de EdaA1 en el ectodermo, dirigida por el promotor de la queratina K14,

lleva a la formación de un diente premolar adicional en la diastema al lado del primer molar (Mustonen *et al.*, 2003). En consecuencia, es probable que la activación de distintas vías inducidas por TNF controle el tamaño y la posición de los dientes en una fase muy temprana del desarrollo dental (Meletich and Sharpe, 2004).

Aunque los ratones K5-GR no tienen alterada la forma de las cúspides dentales debido, posiblemente, a que el transgén no se expresa durante el período de formación del esmalte, la ausencia de primordios dentales se puede englobar, sin excluir interacciones a otros niveles, en el contexto de una actividad represora del GR sobre la vía de señalización NF- κ B inducida por TNF.

6.5 Mecanismos moleculares de interferencia GR-NF κ B en los ratones transgénicos K5-GR.

La disminución en la actividad de NF κ B en los molares con alteraciones en la diferenciación de los embriones K5-GR se correlaciona con la expresión reducida de las proteína p65 e IKK γ , observada en los marcajes inmunohistoquímicos (Figura 45), indicando que GR interfiere con la función NF- κ B a varios niveles. Esta disminución de la actividad NF κ B en los transgénicos K5-GR es debida, al menos parcialmente, a unos niveles reducidos de la proteína IKK γ (Leis *et al.*, 2004). Los ratones deficientes en IKK γ muestran malformaciones en los derivados ectodérmicos similares a las observadas en pacientes humanos con ED, incluyendo las malformaciones dentales (Makris *et al.*, 2000; Schmidt-Supprian *et al.*, 2000). Concretamente, en pacientes con HED se han descrito mutaciones en el dominio carboxilo-terminal de IKK γ (Orange and Geha, 2003).

Por otra parte existe una disminución en los niveles de IKK α en los molares de los ratones K5-GR. En este sentido, el fenotipo que describimos se asemeja al de los ratones deficientes en IKK α , en los cuales no se produce la diferenciación epidérmica, presentando además alteraciones en el desarrollo de los párpados, córnea, conjuntiva y hendidura del paladar secundario (Li *et al.*, 1999; Yoshida *et al.*, 2000). El mecanismo preciso por el cual IKK α ejerce su influencia sobre la morfogénesis y desarrollo todavía no está aclarado. Algunos problemas de los ratones deficientes en IKK α , incluyendo los defectos oculares, podrían ser debidos a alteraciones en la activación de la vía canónica, o alternativa, de activación de NF- κ B (Yoshida *et al.*, 2000, Senftleben *et al.*, 2001). Sin embargo, en los

ratones deficientes en $IKK\alpha$ la falta de diferenciación epidérmica está mediada por la producción de un factor soluble que induce la diferenciación de los queratinocitos (Hu *et al.*, 2001), mientras que la alteración en el desarrollo dental se encuentra mediada por las vías de señalización Notch/Wnt/Shh (Ohazama *et al.*, 2004). Estas dos vías de actuación de $IKK\alpha$ son independientes de la vía de señalización NF- κ B. Por todo ello, no podemos concluir que los defectos observados en la morfogénesis de tejidos epiteliales en ratones K5-GR puedan ser debidos exclusivamente a un deterioro en la función NF- κ B, ya que la disminución de la actividad $IKK\alpha$ en los tejidos dentales podría ser responsable, independientemente de NF- κ B, de parte del fenotipo. Serán necesarios más experimentos que identifiquen esas señales de desarrollo alteradas por la expresión anormal del GR.

7. Tratamientos con Dexametasona o Metopirona *in útero*.

La administración de dexametasona o metopirona a madres gestantes, durante el periodo de actividad del transgén, nos ha permitido confirmar que el fenotipo de los ratones transgénicos se debe específicamente a la sobreexpresión del GR, en tanto que las alteraciones se agravaron en los embriones a término y neonatos transgénicos expuestos a dexametasona y, revirtieron parcialmente, en aquellos que recibieron el inhibidor de la síntesis de GC metopirona (Figuras 24, 38, 47 y 52).

El efecto de la dexametasona sobre el fenotipo de los ratones transgénicos K5-GR produce un agravamiento de las malformaciones, ocasionado un mayor retraso en la diferenciación de la epidermis, con un menor desarrollo o pérdida de folículos pilosos, y un mayor retraso en la diferenciación de los primordios dentales y el epitelio oral. El agravamiento del fenotipo no se observa por igual en todos los animales ni en todos los tejidos, siendo las malformaciones en ocasiones superponibles a las de los animales transgénicos no tratados con dexametasona. Esta aparente falta de respuesta del GR a la adición de ligando en algunos transgénicos puede ser debida a una activación constitutiva del GR en los epitelios como consecuencia de una total saturación hormonal, que insensibiliza al tejido diana frente a la administración de glucocorticoides exógenos. De hecho, en los ratones K5-GR hemos observado que el GR se encuentra localizado en el núcleo de las células epiteliales diana del transgén.

En este sentido, Hache *et al.*, (1999) han señalado que el GR unido al complejo de proteínas del shock térmico (hsp) se encuentra en un equilibrio dinámico entre el núcleo y el citoplasma y, el complejo, se mueve continuamente a través de los poros de la membrana nuclear. Cuando estos receptores no se encuentran ligados a glucocorticoides y se expresan en niveles fisiológicos, este equilibrio favorece la localización citoplásmica del GR. En algunas células, sin embargo, la sobreexpresión del GR promueve su transferencia al núcleo en ausencia de estímulo hormonal, donde permanece formando complejos con hsp70; desconociéndose el motivo de esta permanencia nuclear (Sánchez *et al.*, 1990). De este modo, la inmunolocalización nuclear del GR observada en los ratones K5-GR se correlaciona con la sobreexpresión del mismo. Trabajos previos demuestran que el transgén GR está constitutivamente activo (Budunova *et al.*, 2003), lo cual hace suponer que las manifestaciones fenotípicas más graves observadas, principalmente, durante el período embrionario, se deben a una activación constitutiva de GR. Sin embargo, no hemos demostrado formalmente si los niveles circulantes de glucocorticoides están elevados en los transgénicos y si el transgén GR está unido al ligando en los tejidos diana. El desarrollo de una hiperplasia de la capa fascicular de las glándulas adrenales de los embriones K5-GR proporcionaría el sustrato hormonal imprescindible para la activación del receptor y sería compatible con un aumento en los niveles de corticosterona (Figura 50). No tenemos evidencias directas (determinación hormonal de corticosterona en plasma) que nos permitan concluir que existen alteraciones (a la alza o a la baja) de los niveles circulantes de GCs endógenos en los transgénicos K5-GR. La principal dificultad metodológica para abordar estos experimentos es el escaso volumen de suero/plasma que puede obtenerse de un embrión tardío o neonato, muy por debajo de lo necesario para los ensayos RIA.

El tratamiento *in útero* con el inhibidor de la síntesis de glucocorticoides, metopirona, provoca una recuperación parcial del fenotipo en los ratones K5-GR, tanto en la piel y dientes como en los tejidos afectados del globo ocular. Esta mejoría de las alteraciones implica, sin duda, un efecto sobre la acción del transgén; sin embargo, ante la ausencia absoluta de GC sería esperable la desaparición total del fenotipo, y en los ratones K5-GR expuestos a metopirona persiste la afectación parpebral, puesto que los párpados no se llegan a cerrar, la córnea todavía presenta lesiones y persiste un leve retraso en la diferenciación dental y epidérmica, en algunos animales. Por todo ello podemos suponer que, a pesar del tratamiento con el inhibidor de la síntesis de GC, sigue existiendo un grado indeterminado de actividad del GR, quizás debido, entre otras causas, a la dosis utilizada.

Una posible explicación para esta actividad remanente del GR sería una superación de la inhibición enzimática que causa la metopirona mediante el incremento del número de células que sintetizan GC (hiperplasia suprarrenal) tal como ocurre en algunos pacientes humanos afectados de Síndrome de Cushing tratados con metopirona (Horth, 1978). Un dato que apoyaría este mecanismo es la hipertrofia/hiperplasia suprarrenal que persiste en los ratones transgénicos recién nacidos tratados con metopirona tal y como comentaremos más adelante.

8. Alteraciones en la proliferación y diferenciación epitelial. Interferencia con p63.

8.1. Disminución de la proliferación epitelial en epitelios.

La menor incorporación de BrdU por las células epiteliales del órgano del esmalte en los transgénicos K5-GR (Figura 44) confirma el menor índice proliferativo probablemente ocasionado, entre otros mecanismos, por la interferencia entre GR y NF- κ B en epitelios (Perez *et al.*, 2001). Debemos subrayar que esta inhibición de la proliferación no solo afecta a las células epiteliales del órgano del esmalte sino también a las células del mesénquima que originarán odontoblastos, reafirmando la necesidad de unas interacciones adecuadas epitelio-mesenquimales en la morfogénesis embrionaria.

8.2. Retraso en la diferenciación de epitelios.

Nuestros resultados muestran en los transgénicos K5-GR una disminución de la isoforma Δ Np63 que se expresa predominantemente en la epidermis madura (Yang *et al.*, 1998; Lierfer *et al.*, 2000) durante el desarrollo de los epitelios estratificados de origen ectodérmico como la piel (Figura 25), epitelios anteriores del ojo (Figura 35) y epitelios orales y del órgano del esmalte (Figura 48).

En un embrión no transgénico de 12 días de desarrollo, la piel está compuesta por una capa de células ectodérmicas indiferenciadas recubiertas por el peridermo (Byrne and Hardman, 2002); a los 12-15 días de desarrollo embrionario (dependiendo de la zona corporal) y con la mediación imprescindible de p63, estas células ectodérmicas, merced a una intensa actividad mitótica, originan la capa de células del estrato intermedio, las cuales comienzan a sintetizar, junto con la capa basal, las queratinas K5 y K14 (Fuchs *et al.*,

1996; Magin *et al.*, 1998). Una vez iniciada la diferenciación, las células madre de esa primera capa de células basales se convierten en células pertenecientes al grupo de células de proliferación transitoria (*transient amplifying cells*), las cuales tienen una capacidad limitada de proliferación y autorenovación y expresan p63, aunque en menor cantidad que las *stem cells* (Yang *et al.*, 1999).

El promotor de la queratina K5 bovina comienza a detectarse en la epidermis del embrión transgénico a los 13,5 d.p.c, como puede observarse por la expresión del gen reportador lacZ (Ramírez *et al.*, 1994), por lo tanto, cuando el transgén comienza a expresarse en un embrión K5-GR, se encuentra con una piel que ya ha iniciado su proceso de diferenciación, puesto que se encuentra en la fase de estrato intermedio. La represión de la actividad p63 no afectará a las *stem cells*, ya que estas no expresan queratina K5, pero sí a los queratinocitos de la capa basal, auténticas *transient amplifying cells* a esa edad, reprimiendo su potencial proliferativo.

En los tejidos dentales se presenta una situación superponible, puesto que las células del ectodermo que originarán el órgano del esmalte, ya desde fases tempranas del desarrollo dental, sintetizan queratina K5 endógena, manteniéndose en niveles altos de expresión hasta la fase de campana, momento en el que cesa (Domingues *et al.*, 2000); de este modo, los ameloblastos, completamente diferenciados, ya no expresan queratina K5. Consideramos que los acontecimientos que llevan al retraso en la diferenciación de los ameloblastos y, por consiguiente, al retraso en el desarrollo de los molares parecen ser los mismos que los que llevan al retraso en la diferenciación epidérmica, ya que las acciones negativas sobre la diferenciación/proliferación debidas a la sobreexpresión del GR tendrían lugar durante la casi totalidad de las etapas del desarrollo dental.

8.3. Mecanismos de interferencia GR- Δ Np63.

Hemos intentado averiguar el mecanismo responsable de esta disminución de Δ Np63 en los epitelios de origen ectodérmico observada en los ratones K5-GR concentrándonos en la proteína Akt, ya que esta quinasa induce la expresión de Δ Np63 (Barbieri *et al.*, 2003) y se encuentra regulada negativamente por el GR (Leis *et al.*, 2004). Como esperábamos, los inmunomarcajes utilizando un anticuerpo específico anti-Akt-P mostraron una reducción de esta proteína en la mucosa oral de los embriones K5-GR

(datos no mostrados). Sin embargo, en la capa de ameloblastos, no se encontró apenas expresión de Akt-P, sugiriendo que la interacción descrita entre GR y Akt en otros epitelios no es responsable de los defectos observados en los dientes de embriones K5-GR.

En busca de mecanismos adicionales subyacentes a los defectos epiteliales en los dientes, hemos examinado la expresión de BMP4 mediante inmunohistoquímica, ya que Δ Np63 es un diana trascricional de la señalización de Bmp en otros modelos complejos (Bakkers *et al.*, 2002) y la señalización de BMP4 ha demostrado regular el desarrollo del diente (Tuckers *et al.*, 1998; Bei *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000). Los embriones K5-GR presentaron una disminución en la expresión de BMP4 en epitelios orales pero esta disminución parecía no afectar a la capa de ameloblastos (datos no mostrados) tal y como ocurría con la expresión de Akt.

Finalmente, también hemos estudiado la expresión del factor de transcripción Foxo3a ya que este factor es regulado por Akt y por la quinasa I κ B de una manera independiente de Akt (Kops *et al.*, 1999, Hu *et al.*, 2004). La expresión similar hallada en la capa de ameloblastos de embriones no transgénicos y transgénicos K5-GR y refuerza la ausencia de actividad Akt en este epitelio e indica que Foxo3a no es responsable del descenso en la expresión de Δ Np63 (datos no mostrados).

Es posible que el efecto de GR sobre la expresión de Δ Np63 se deba a una represión a nivel transcripcional.

9. Órganos linfoides.

Las proteínas de la familia I κ B/NF- κ B están implicadas en el desarrollo y la función del sistema inmune (Li and Verma, 2002). Se conocen tres inmunodeficiencias humanas asociadas con una señalización alterada de NF- κ B (Puel *et al.*, 2004; Ku *et al.*, 2005):

- La displasia ectodérmica anhidrótica de herencia recesiva ligada al cromosoma X (XL-EDA-ID) causada por mutaciones en el gen NEMO que codifica para IKK γ .
- La displasia ectodérmica autosómica dominante (AD-EDA-ID) causada por una mutación en el gen que codifica para la proteína inhibidora I κ B α y

- La inmunodeficiencia autosómica recesiva sin EDA que es causada por mutaciones en el gen que codifica para IRAK-4, una quinasa que actúa por encima del complejo IKK en la vía de señalización TIR.

Como en los ratones transgénicos K5-GR la sobreexpresión del GR reprime la actividad NF- κ B y además, reduce los niveles de la quinasa IKK γ y, consecuentemente, disminuye la actividad IKK, nos hemos planteado determinar si esta represión determina alteraciones en el sistema inmunitario.

9.1. Aumento de la apoptosis de linfocitos T en el timo.

Los linfocitos T comienzan su desarrollo como precursores en la médula ósea. Estas células migran al timo donde se dividen, se diferencian y maduran hacia linfocitos T funcionales (Mehr, *et al.*, 1995). La mayoría de los timocitos (95-99%) mueren en el curso de este proceso, y solo una pequeña parte de ellos abandonan el timo como células maduras (Surh and Sprent, 1994). El timo alcanza su máximo tamaño a la edad de 1 mes en ratones y, a partir de este momento, se produce una disminución exponencial de la celularidad (Bar-Daylan and Small, 1994). Varias hormonas y efectores endocrinos (glucocorticoides, hormona del crecimiento, insulina, etc.) forman parte de la regulación de la involución tímica (Bar-Daylan and Small, 1994), que se produce por una elevación en la tasa de apoptosis, o por una reducción en la tasa de proliferación de los linfocitos (Mehr *et al.*, 1995).

Las células reticuloepiteliales del timo, de origen endodérmico, juegan un papel activo estimulando la maduración de los linfocitos T a través de la mediación de sustancias humorales e, incluso, a través de su contacto directo con los timocitos (Suster and Rosai, 1997). Conociendo que estas células reticuloepiteliales del timo expresan queratina K5 y dado que los glucocorticoides inducen apoptosis de linfocitos T (Nieto *et al.*, 1992; Cidlowski *et al.*, 1996) unido al hecho de que las células reticuloepiteliales tienen funciones paracrinas mediadas por el GR, que inducen apoptosis de timocitos (Pazirandeh *et al.*, 1999), hemos comparado la tasa de apoptosis de linfocitos T en los timos de ratones de un mes de vida. La determinación del porcentaje de células apoptóticas (índice apoptótico) en los timos mediante la técnica ISOL (*In situ* Oligo ligation), que utiliza la ligasa de ADN T4 para ligar específicamente los fragmentos resultantes de la actividad

DNasa tipo I a oligonucleóticos marcados con biotina, resulta más útil en la identificación de células apoptóticas que las técnicas convencionales como TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT) ya que evita el marcaje randomizado de las células necróticas (Didenko *et al.*, 1996).

Los ratones K5-GR presentan un índice de apoptosis en la región cortical del timo un 57,27% superior a la presentada por sus hermanos de camada no transgénicos. En la región medular el incremento del índice apoptótico en los transgénicos en relación a los no transgénicos fue del 25,33%. En base a la literatura, la represión de NF- κ B y AP-1 producida por la sobreexpresión del GR podría ser la responsable de este incremento en el índice apoptótico en los ratones transgénicos K5-GR; las interacciones proteína-proteína podrían ser las responsables de esta represión (Tao *et al.*, 2001).

Las evidencias descritas en la literatura acerca de los mecanismos responsables del efecto pro-apoptótico de los GCs en células T en cultivo, no permiten concluir si dicho efecto está mediado a través de la función de transrepresión o transactivación (Tao *et al.*, 2001). Probablemente, los efectos pro-apoptóticos de los GCs se ejerzan a través de varias vías independientes.

Si bien en el ratón *tabby*, *downless* y *crinkled* no se describe inmunodeficiencia, los ratones transgénicos que expresan una forma super-represora de I κ B α (que inhibe parcialmente la actividad NF- κ B) presentan disfunciones en la actividad de los macrófagos, lo que ocasiona mayor susceptibilidad a ciertos tipos de infecciones bacterianas; estos ratones presentan ausencia y/o disminución del tamaño de las placas de Peyer y de otros nódulos linfoides periféricos, deficiencias que determinan la muerte entre los 6 y 12 meses de edad, confirmando la necesidad de la actividad NF- κ B para alcanzar un sistema inmunitario competente (Schmidt-Ullrich *et al.*, 2001). Los ratones transgénicos K5-GR no presentan anomalías en el desarrollo de los órganos linfoides secundarios, hecho esperable, ya que no existen en ellos células que expresen queratina K5. Sin embargo, aunque la vida media de los animales es equivalente a la de animales no transgénicos, no hemos determinado si presentan una mayor susceptibilidad a infecciones por diversos agentes.

En resumen, los ratones K5-GR desarrollan un sistema inmune competente y el aumento que presentan de la apoptosis en los linfocitos del timo, no tiene la suficiente entidad como para determinar una inmunodeficiencia clínicamente detectable en condiciones basales.

10. Menor desarrollo corporal en los transgénicos K5-GR.

El menor desarrollo somático observado al nacimiento, en los ratones transgénicos K5-GR, es más acusado en los animales de la línea 72 y en algunos animales de la línea 285 con mayor severidad fenotípica. Durante la vida postnatal, la mayoría de los ratones transgénicos alcanzan un tamaño corporal equiparable al de los no transgénicos. Nuestros estudios inmunohistoquímicos han confirmado que el menor desarrollo de los ratones transgénicos K5-GR recién nacidos, se correlaciona con una disminución de la expresión de hormona de crecimiento en la adenohipófisis (Figura 52).

Durante el desarrollo embrionario, las células de la adenohipófisis se desarrollan según un orden establecido, apareciendo en primer lugar las células corticotropas, seguidas de las gonadotropas, tirotropas, somatotropas y lactotropas. Las células corticotropas son capaces de diferenciarse autónomamente en cultivos no estimulados, mientras que los otros tipos de células no se diferencian sin señales extracelulares (Chatelain *et al.*, 1979). Varios estudios en ratas sugieren que algunas hormonas, actuando solas o en combinación, pueden actuar como factores de diferenciación durante estadios específicos del desarrollo de la hipófisis (Dubois and Hemming., 1991, Heritier and Dubois, 1993). Los glucocorticoides son capaces de inducir la diferenciación de células somatotropas fetales en ratas tanto *in vitro* (Hemming *et al.*, 1984 y 1988, Nogami *et al.*, 1997), como *in vivo* (Nogami *et al.*, 1993 y 1995). Así mismo, el factor liberador de la hormona del crecimiento (GHRH) parece estar implicado en la expansión clonal de las células somatotropas diferenciadas (Billestrup *et al.*, 1986; Mayo *et al.*, 1988; Gage *et al.*, 1995). Sin embargo, el papel de los glucocorticoides sobre la secreción de GH es doble (Nakagawa *et al.*, 1987), ya que un exceso crónico de glucocorticoides inhiben la secreción de GH en ratas (Ohyama *et al.*, 1997). Se ha sugerido que los glucocorticoides ejercen un papel inhibitorio en el hipotálamo, sobrepasando el efecto positivo ocasionado a nivel somatotropo; así dosis fisiológicas de GC incrementan la secreción de GHRH hipotalámica, mientras que

mayores concentraciones producen disminución de GHRH (y aumentan la secreción de la hormona inhibidora de la somatostatina) (Fernández-Vazquez *et al.*, 1995).

A la vista de estos datos, y dado que en la hipófisis no existen células que expresen queratina K5, parece coherente especular que la menor expresión de GH observada en los ratones transgénicos K5-GR en el momento del nacimiento guarde una relación con unos niveles de GC circulantes muy altos, sintetizados por unas glándulas suprarrenales hiperplásicas.

La hipófisis de los ratones transgénicos K5-GR tratados con fuertes dosis de dexametasona *in útero* no responden como sería esperable en un ratón no transgénico, con una mayor diferenciación de células somatotropas, sino que la respuesta es estadísticamente similar a la de los ratones transgénicos no tratados (Figura 52); una vez más, esta ausencia de respuesta a la adición de ligando exógeno puede explicarse en el contexto de una completa saturación de los GRs hipofisarios.

Los ratones que recibieron metopirona *in útero* mostraron unos niveles de expresión de GH próxima a la de los animales no transgénicos, mostrando una reversión casi total de las alteraciones.

La disminución del tamaño corporal no se ha descrito en otros modelos murinos, excepto en los ratones que expresan una forma super-represora de I κ B α , en los cuales el tamaño corporal disminuye un 30-50%, lo cual podía estar relacionado, en este caso, con la intensa apoptosis hepática desarrollada por esos animales en el período embrionario (Schmidt-Ullrich *et al.*, 2001).

En base a nuestros datos, postulamos que el menor desarrollo corporal de los embriones y ratones recién nacidos transgénicos K5-GR, como consecuencia de una menor expresión de la hormona de crecimiento durante los últimos períodos del desarrollo embrionario, puede ser debido a unos niveles de corticosterona sanguíneos muy elevados y no a una acción directa del transgén.

11. Densitometría ósea.

Dado que en los últimos años se ha descrito en humanos una forma de ED asociada a osteopetrosis, ocasionada por una mutación del gen NEMO y, habida cuenta de que otros modelos murinos, como los deficientes en TRAF6 (Cao *et al.*, 1996) y los deficientes en NF- κ B/Rel obtenidos mediante “targeting” genético (Schmidt-Ullrich *et al.*, 2001), presentan también un aumento de la densidad ósea en la edad adulta, nos planteamos determinar si los ratones transgénicos K5-GR desarrollaban anomalías en la aposición y/o reabsorción ósea, a pesar de que el tejido óseo no expresa la queratina K5. El análisis de las radiografías nos permitió descartar la presencia de esta patología en los ratones transgénicos K5-GR ya que no se evidenciaron diferencias en cuanto a la calcificación ósea en comparación con los animales no transgénicos.

12. Eje hipotálamo-hipófisis-adrenales en los transgénicos K5-GR.

Uno de los hallazgos no esperado en los ratones transgénicos K5-GR son las alteraciones en la función hipofisaria-adrenal durante el período del desarrollo embrionario. La hiperplasia de la zona fascicular de las glándulas suprarrenales que presentan los recién nacidos transgénicos, prueba incuestionable de una mayor síntesis de corticosterona, en una glándula donde no existen células que expresen el transgén, indica que la sobreexpresión del GR en la piel, y otros derivados ectodérmicos, es capaz de inducir, a través de mecanismos a distancia, un incremento en la síntesis de glucocorticoides. El aumento de la esteroidogénesis correlacionado con una disminución en la expresión de ACTH por la hipófisis resulta paradójico ya que el crecimiento embrionario de la glándula suprarrenal está principalmente inducido por factores tróficos que parten de la ACTH (Warnes *et al.*, 2004) y que están mediados por el factor de crecimiento IGF-II (*insulin-like grow factor-II*) (Fottner *et al.*, 2001).

Un efecto de retroalimentación negativa sobre la hipófisis, producida por un exceso de glucocorticoides en embriones a término podría ser una posible explicación que justificara la disminución de ACTH detectada en los transgénicos K5-GR justo en el momento del nacimiento (Figura 51); esto supondría asumir unos niveles altos de ACTH en épocas previas al parto que estimularan el desarrollo de la hiperplasia adrenal; sin embargo, la hiperplasia de la capa fascicular de las adrenales aparece también en los

embriones transgénicos K5-GR expuestos a dexametasona *in útero* desde el día 12.5 d.p.c hasta el nacimiento, lo cual sugiere que el efecto hiperplasiante suprarrenal no está inducido por la ACTH, es decir, que este efecto dependiente del transgén es independiente de la administración de ligando exógeno.

Desde un punto de vista fisiológico, los niveles de glucocorticoides fetales son muy inferiores a los niveles maternos (Beitins, *et al.*, 1973; Klemcke *et al.*, 1995) ya que la placenta actúa como una barrera que permite el paso de solo una pequeña parte (10-20%) de los glucocorticoides activos hacia el feto, acción que está mediada por unos niveles altos de expresión en la placenta de la enzima 11 β hidroxisteroide-deshidrogenasa-II (11 β -HSD-2) que cataliza la conversión de los glucocorticoides activos (cortisol y corticosterona) a 11-cetoformas inertes (cortisona y 11-dehidrocorticosterona) (White and Agarwal, 1997). Por lo tanto, cabe suponer que los embriones transgénicos K5-GR estuvieron expuestos a los niveles de glucocorticoides generados por sus propias glándulas suprarrenales y no a los proporcionados por la sangre materna; la dexametasona, sin embargo, es un pobre sustrato para la 11 β -HSD-2 que atraviesa la placenta fácilmente (Brown *et al.*, 1996), ocasionando efectos a través de la activación de GR. Entre estos efectos, la dexametasona, mediante retroalimentación negativa, actúa a través de GR en el núcleo paraventricular y en la hipófisis anterior inhibiendo a la hormona liberadora de la corticotropina (CRH) y a la ACTH, respectivamente (Matthews, 2002). El que los embriones transgénicos K5-GR tratados con dexametasona tengan una expresión de células ACTH en la adenohipófisis similar a la de los embriones transgénicos que no recibieron ningún tratamiento, podría explicarse en el contexto de unos niveles de glucocorticoides endógenos altos que saturan completamente los GRs, por lo que la adición de más ligando no ocasiona nuevas respuestas.

A la vista de todos estos datos y, no encontrando un mecanismo plausible que permita explicar los acontecimientos, consideramos que la sobreexpresión del GR en la epidermis y otros tejidos de origen epitelial induce, durante el período embrionario, una hiperplasia de la capa fascicular de las glándulas adrenales a través de mecanismos que no utilizan el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal convencional (HPA); una posibilidad sería la implicación de alguna molécula con capacidad de estimular IGF-II, ya que este factor induce la actividad mitogénica y es un estimulante de la diferenciación de las células

adrenocorticales (Pham-Huu-Trung *et al.*, 1991, l'Allemand *et al.* 1996, Kristiansen *et al.* 1997).

En un sentido amplio, la piel y sus apéndices son productores de hormonas, además de ser diana de la acción hormonal, aunque este aspecto pasa habitualmente desapercibido. La piel es capaz de sintetizar hormonas esteroides, IGFs, vitamina D y retinoides, además de metabolizar dichas hormonas y de regular su activación/inactivación. El hecho de que la piel sea capaz de sintetizar y liberar hormonas al torrente sanguíneo arguye a favor de la consideración de este órgano como un órgano endocrino periférico (Zouboulis, 2000). Dado que en los recién nacidos transgénicos K5-GR existe hiperplasia adrenal con una menor expresión hipofisaria de ACTH y, considerando que los niveles de expresión de ACTH no se ven influidos por los tratamientos *in útero* con Dex o metopirona, no podemos descartar la hipótesis de la inducción de hiperplasia adrenal por señalización hormonal desde la capa basal de los epitelios diana del transgén y, por tanto, a través de un mecanismo diferente al eje hipotálamo-hipófisis-adrenal.

Mientras que los niveles fisiológicos de glucocorticoides juegan un papel crucial en la maduración final de muchos órganos fetales (Baxter and Rousseau, 1979) principalmente de los pulmones, el cerebro, la retina, el riñón y el timo (Tesoriere *et al.*, 1989; Mendelson *et al.*, 1991; Slotkin *et al.*, 1991, 1996, 1998; Takahashi, 1998; Franchimont *et al.*, 2002; Tschanz *et al.*, 2003; Bizarro and Gross, 2004;), mediante el control de la proliferación, diferenciación y apoptosis, la exposición a un exceso de glucocorticoides durante el período prenatal retrasa el crecimiento fetal y se relaciona con el desarrollo de enfermedades en la vida adulta, pudiendo producir alteraciones en la morfogénesis, tales como paladar y labio hendido y otras malformaciones (Gandelman and Rosenthal 1981; LaBorde *et al.*, 1992; Benediktsson *et al.*, 1993; Lindsay *et al.*, 1996). Se podría especular que, el exceso de glucocorticoides al cual se han visto expuestos los embriones transgénicos K5-GR ha contribuido, con probabilidad, a disminuir su crecimiento y maduración en el último período embrionario.

En los embriones transgénicos K5-GR expuestos al inhibidor de la síntesis de glucocorticoides metopirona, la hipertrofia de la capa fascicular suprarrenal y la disminución en la expresión de ACTH hipofisaria se mantienen a unos niveles similares a los hallados en los transgénicos no tratados (Figura 51).

La administración de metopirona reduce la síntesis endógena de glucocorticoides mediante la inhibición de la 11 β -hidroxilasa y, este efecto, ocurre tanto en la glándula suprarrenal de la madre como en la del feto (Jenkins *et al.*, 1958). La droga causa, al mismo tiempo, una activación de la ACTH (Baram and Schültz, 1992; Conte-Devolx *et al.*, 1992; Hermann *et al.*, 1992; Alexander *et al.*, 1993; Van Vugt *et al.*, 1997); además, la administración de metopirona estimula en el núcleo paraventricular a las principales células secretagogas del eje HPA, la vasopresina y al factor liberador de la corticotropina (Baram and Schültz, 1992; Van Vugt *et al.*, 1997). Estos efectos de la metopirona se atribuyen a la inhibición de la biosíntesis de glucocorticoides y a la consecuente reducción del efecto inhibitorio de la retroalimentación negativa de los glucocorticoides sobre el eje HPA: el estímulo sobre este eje intentará y logrará superar la inhibición de la hidroxilación del 11-desoxicortisol hacia cortisol en la glándula suprarrenal fetal (Warnes *et al.*, 2004a, 2004b).

En los ratones recién nacidos K5-GR tratados con metopirona *in útero*, la expresión de células ACTH positivas en la adenohipófisis está disminuida de manera significativa, al igual que en los transgénicos que no recibieron ningún tratamiento. Esto indica que el eje HPA fetal no se ha estimulado como consecuencia de la administración de metopirona sino que, muy al contrario, la ACTH hipofisaria en estos ratones está disminuida, probablemente en respuesta a unos niveles altos de GC circulantes. Si la hiperplasia de la corteza adrenal no se ha producido en respuesta a un aumento creciente de la ACTH, debe existir algún otro mecanismo, utilizado por GR, para inducir durante el período embrionario la síntesis de su propio ligando. La potencia de estos mecanismos superaría en poco tiempo el efecto enzimático de la metopirona. En definitiva, son necesarios estudios más profundos que nos ayuden a comprender las interacciones moleculares responsables de estos hallazgos, estudios que incluirían un número más elevado de animales no transgénicos (wt) de los utilizados en este análisis y que se expondrían a los tratamientos (Dex y metopirona).

13. Fenotipo de los ratones K5-GR comparado con otros modelos murinos.

Como resumen presentamos una relación de las malformaciones más significativas observadas en los ratones transgénicos K5-GR, algunas de ellas en común con otros modelos murinos de ED.

<i>Alteraciones comunes a otros modelos ED</i>	<i>Alteraciones solo descritas en los transgénicos K5-GR</i>
<i>Retraso en la diferenciación epidérmica</i>	<i>Aplasia cutis congénita</i>
<i>Piel fina</i>	<i>Esclerosis corneal, microftalmía, ceguera</i>
<i>Nº vibrisas/nº folículos pilosos reducidos</i>	<i>Ausencia de párpados parcial/total</i>
<i>Displasia de folículos pilosos</i>	<i>Hendidura del paladar secundario</i>
<i>Alopecia en mosaico en adultos viejos</i>	<i>Gastrosquisis</i>
<i>Ausencia/reducción gl. sudoríparas</i>	<i>Exencefalia</i>
<i>Ausencia de gl. Meibomio</i>	<i>Tamaño corporal disminuido</i>
<i>Retraso en la odontogénesis.</i>	<i>Incremento de apoptosis de timocitos</i>
<i>Oligodoncia.</i>	
<i>Cola retorcida</i>	

14. Posibles mecanismos adaptativos en los transgénicos K5-GR adultos.

Globalmente, el fenotipo descrito en los ratones transgénicos K5-GR muestra una serie de alteraciones inducidas por la expresión espacio-temporal del transgén en distintas vías de señalización durante el desarrollo embrionario; tras el nacimiento, si el fenotipo no es grave (gastrosquisis, exencefalia, paladar hendido), los ratones crecen y se desarrollan hasta la edad adulta, sufriendo las secuelas de las malformaciones que se produjeron en la vida embrionaria como son la ceguera, la carencia de algunos molares, un pelaje ralo, la disminución de la sudoración, etc. Un hecho notable es que después del nacimiento, y a pesar de existir una fuerte expresión del transgén en la piel y derivados ectodérmicos, dejan de observarse nuevos rasgos patológicos en el adulto a excepción de la alopecia; debe existir, por lo tanto, un proceso de adaptación o unos mecanismos que permiten a las células de los tejidos implicados “protegerse” de la sobreexpresión del GR. Otra interpretación es que GR ejerza acciones en la morfogénesis durante una ventana temporal,

como hemos demostrado en este estudio, pero siga vigente en la respuesta a estrés, sugiriendo mecanismos alternativos implicados. En este sentido, la expresión del transgén en la edad adulta es crucial en la respuesta a estrés inducida, por ejemplo, por el promotor tumoral TPA, dado que inhibe la acción proliferativa, inflamatoria y tumoral de este agente (Budunova *et al.*, 2003). Estos datos demuestran la vigencia de los efectos terapéuticos del transgén en la edad adulta. Sugerimos dos mecanismos posibles.

14.1. Disminución de la sensibilidad a glucocorticoides.

El nivel de expresión del GR es uno de los principales determinantes de la sensibilidad a los glucocorticoides (Vanderbilt *et al.* 1987; Freeman *et al.*, 2004).

Los niveles de GR se establecen durante la vida perinatal en función del nivel de GCs medioambientales que existen en ese periodo (incluyendo el stress, los tratamientos con dexametasona, etc), programándose un nivel de GR crítico (*set point*) específico para cada tejido (de Kloet *et al.* 1990; Nyirenda *et al.*, 1998; Cleasby *et al.*, 2003). En los tejidos adultos de los mamíferos, los niveles de GR sufren una regulación alrededor de ese punto crítico por los GCs, los cuales regulan negativamente el ARNm del GR.

En el adulto, los glucocorticoides y la expresión de su receptor (GR) están estrechamente relacionados por un mecanismo de retroalimentación negativa, de tal manera que GR es regulado transcripcional y post-traduccionalmente de forma negativa por un exceso de corticosteroides, por ejemplo, en el hígado (a través de respuestas al estrés o a la administración exógena) y regulado positivamente, de manera transitoria, por adrenalectomía a nivel del hipotálamo (Dong *et al.*, 1988; Reul *et al.*, 1989), acercándose a ese nivel de “punto crítico” tejido-específico programado perinatalmente; la expresión del GR es, pues, importante para limitar la sensibilidad celular a las hormonas. La menor expresión del ARNm del GR y de la proteína se producen en el adulto por la administración de dosis repetidas de dexametasona, algo que no ocurre durante el período embrionario en rata, donde ni el ARNm del GR ni GR se ven afectados por la administración de dexametasona (Ghosh *et al.*, 2000).

Las células que sobreexpresan GR de rata en los ratones transgénicos K5-GR, lo hacen por imposición del promotor de la queratina K5, lo que determina sobreexpresión de

un receptor que no ha tenido la posibilidad de la regulación negativa antes descrita. Sin embargo, esas mismas células tienen la posibilidad de expresar GR endógeno, el cual sí es susceptible de regulación tanto a la alza como a la baja, por lo que la sobreexpresión del GR transgénico podría ser compensado durante la vida adulta, al menos parcialmente, con una menor expresión del GR fisiológico.

14.2. Modulación a nivel de pre-receptor mediante la enzima 11 β -HSD.

El carácter lipofílico de los glucocorticoides permite su libre acceso a su receptor a través de la membrana plasmática. Hasta hace una década, se pensaba que los principales determinantes de la acción de los GC eran los niveles de hormona en la sangre, su grado de unión a proteínas (globulina transportadora del cortisol) y la densidad del GR en los tejidos; sin embargo, se conoce la existencia de un mecanismo adicional que ejerce un control a través de enzimas específicas de tejido que actúan sobre el metabolismo a nivel pre-receptor y que son las 11 β -HSDs (Seckl and Walker, 2001; Seckl, 2004).

Las dos isoenzimas tienen funciones diferentes: la 11 β -HSD-2 es una 11 β -deshidrogenasa exclusiva que actúa en los tejidos que son diana de la aldosterona (nefrona distal, colon, glándulas sudoríparas, placenta) para evitar la unión de los GC a receptores de mineralocorticoides, los cuales no son selectivos. La 11 β -HSD-1 es una 11 β -reductasa *in vivo* que actúa en muchos tejidos (hígado, tejido adiposo, sistema nervioso central, pulmón, etc.) para incrementar las concentraciones locales de glucocorticoides activos y, consecuentemente, mantener una adecuada exposición a la relativa poca afinidad de los GR con su ligando (Seckl, 2004).

Hasta el momento, disponemos de pocos estudios acerca de la actividad de la enzima 11 β -HSD en la piel. Se sabe que la 11 β -HSD se expresa en la epidermis, aunque la actividad direccional de esta enzima en la epidermis aún no se ha establecido (Tomlinson *et al.*, 2004). En estudios *in vitro* se ha comprobado una actividad 11 β -HSD predominantemente reductasa en fibroblastos dérmicos humanos, lo que incrementa los niveles intracelulares de cortisol; esta actividad aumenta administrando GC (Hammami and Siiteri, 1991). Por otra parte, la potencia de la hidrocortisona aplicada tópicamente en la piel, puede incrementarse mediante la administración de ácido glicirretínico, un

inhibidor selectivo de 11 β -HSD-2 (Teelucksingh *et al.*, 1990; Stewart, 2003), lo que aporta indicios acerca de una actividad 11 β -deshidrogenasa en la epidermis.

De forma similar, un aumento de actividad 11 β -deshidrogenasa en los tejidos que sobreexpresan GR en los ratones transgénicos K5-GR disminuiría los niveles de corticosterona disponibles para unirse a su ligando, “protegiendo” a las células de los ratones transgénicos K5-GR de un exceso de actividad del GR.

CONCLUSIONES

1. La sobreexpresión del receptor de glucocorticoides (GR) en epitelios estratificados induce malformaciones congénitas de carácter no progresivo que afectan a la epidermis y a otros apéndices epidérmicos, ocasionando lesiones características de las Displasias ectodérmicas humanas como son la aplasia cutis congénita, la piel fina, la disminución y displasia de folículos pilosos, la disminución y displasia de glándulas sudoríparas, la ausencia de glándulas de Meibomio, la oligodoncia y el retraso en la odontogénesis, por lo que consideramos que los ratones transgénicos K5-GR constituyen un nuevo modelo para el estudio de estos síndromes.
2. La hendidura del paladar secundario, observada en el 13,5% de los ratones transgénicos K5-GR supone un nuevo modelo animal para el estudio del paladar hendido humano de gran utilidad, teniendo en cuenta que la elevada letalidad presente en la mayoría de los modelos descritos hasta el momento no permiten el establecimiento de líneas para su estudio.
3. Los resultados obtenidos tras la administración de dexametasona, o del inhibidor de la síntesis de glucocorticoides metopirona, *in útero*, durante el periodo de actividad del transgén, confirman que el fenotipo de los transgénicos K5-GR se debe, específicamente, a la sobreexpresión del receptor de glucocorticoides, en tanto que las alteraciones se agravan en la mayoría de los tejidos expuestos a dexametasona y se revierten parcialmente al recibir metopirona.
4. La ausencia de uno o ambos párpados y las lesiones corneales observadas durante el desarrollo embrionario en los transgénicos K5-GR, incluso en aquellos que presentan el fenotipo más leve, evidencian la influencia negativa de la sobreexpresión del receptor de glucocorticoides (GR) sobre la formación de los epitelios anteriores del ojo.
5. La menor expresión de $\Delta Np63$ en la epidermis, folículos pilosos y epitelios orales, en los transgénicos K5-GR, inducida por la sobreexpresión del receptor de glucocorticoides, demuestra que el retraso en la diferenciación y en la proliferación

epitelial está mediado, al menos parcialmente, por una regulación negativa del factor de transcripción p63 en los tejidos diana de expresión del transgén.

6. La menor expresión de las quinasas IKK γ e IKK α en el órgano del esmalte en los transgénicos K5-GR demuestra que los defectos observados en la odontogénesis, son consecuencia de una regulación negativa de la vía de señalización NF- κ B ejercida por GR, sin perjuicio de que la inhibición de IKK α , de forma independiente, determine parte del fenotipo.
7. Los defectos de cierre en las estructuras en desarrollo en los transgénicos K5-GR, tales como acrania, paladar hendido, gastrosquisis y falta de cierre parpebral parecen estar mediados por la interferencia de GR con el factor de transcripción AP-2 en los lugares de expresión del transgén, teniendo en cuenta la menor expresión de TFAP-2 α detectada en estos animales.
8. El incremento del índice apoptótico de los linfocitos T, debido a la sobreexpresión del receptor de glucocorticoides en las células linfoepiteliales del timo, no induce inmunodeficiencia en los transgénicos K5-GR.
9. La sobreexpresión del receptor de glucocorticoides en la piel y otros epitelios produce un desequilibrio del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal durante el desarrollo embrionario, induciendo una hiperplasia de la capa fascicular suprarrenal a través de mecanismos diferentes a los mediados por la ACTH.
10. La disminución del tamaño corporal de los ratones transgénicos K5-GR se produce, entre otros posibles mecanismos, como consecuencia de una disminución en la síntesis de hormona del crecimiento (GH) en la hipófisis anterior.
11. Los ratones transgénicos K5-GR adultos desarrollan mecanismos compensadores que les permiten adaptarse a la persistente sobreexpresión del transgén, minimizando la aparición de nuevas lesiones.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, B.D., McNabb, F.M.A. and Lau, C.** 1994. Glucocorticoid receptor expression during the development of the embryonic mouse secondary palate. *Craniofac. Genet. Dev. Biol.* 14: 87-96.
- Addison, W.H.F. and How, H.W.** 1999. The development of the eyelids of the albino rat, until the completion of disjunction. *Am. J. Anat.* 29:1-31.
- Ahluwalia, A.** 1998. Topical glucocorticoids and the skin-mechanisms of action: an update. *Mediators of inflammation* 7: 183-193.
- Alexander, S.L., Irving, C.H., Livesey, J.H. and Donald, R.A.** 1993. The acute effect of lowering plasma cortisol on the secretion of corticotropin-releasing hormone, arginine vasopressin, and adrenocorticotropin as revealed by intensive sampling of pituitary venous blood in the normal horse. *Endocrinology* 133: 860-6.
- Al-Jassim, A. H. and Swift, A. C.** 1996. *J. Laryngol. Otol.* 110: 379-382.
- Almawi, W.Y. and Melemedjian, O.K.** 2002. Molecular mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor. *J. Leukoc. Biol.* 71: 9–15.
- Angel, P. and Szabowski, A.** 2002. Function of AP-1 target genes in mesenchymal-epithelial cross-talk in skin. *Biochem. Pharmacol.* 64: 949–956.
- Anneren, G., Andersson, T., Lindgren, P.G. and Kjartansson, S.** 1991. Ectrodactyly-ectodermal dysplasia-clefting syndrome (EEC): the clinical variation and prenatal diagnosis. *Clin. Genet.* 40: 257-262.
- Apple, K.J. and Rabb, M.F.** 1998. *Ocular pathology*. 5th ed. Mosby Inc. St. Louis. Missouri, USA.
- Aradhya, S., and Nelson, D.L.** 2001. NF- κ B signaling and human disease. Current Opinion in *Genetics and Development* 11: 300-306.

- Auphan, N., DiDonato, J.A., Rosette, C., Helmberg, A. and Karin, M.** 1995. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* 13: 286-90.
- Baala, L., Hadj Rabia, S., Zlotogora, J., Kabbaj, K., Chhoul, H., Munnich, A., Lyonnet, S. and Sefiani, A.** 1999. Both recessive and dominant forms of anhidrotic/hypohidrotic ectodermal dysplasia map to chromosome 2q11-q13. *Am. J. Hum. Genet.* 64: 651-3.
- Bakkers, J., Hild, M., Kramer, C., Furutani-Seiki, M. and Hammerschmidt, M.** 2002. Zebrafish DeltaNp63 is a direct target of Bmp signaling and encodes a transcriptional repressor blocking neural specification in the ventral ectoderm. *Dev. Cell.* 2: 617-27.
- Bamberger, C.M., Schulte, H.M. and Chrousos, G.P.** 1996. Molecular determinants of GR function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocrine Review* 17: 245-61.
- Bamberger, G.M., Bamberger, A.M., de Castro, M. and Chrousos, G.P.** 1995. Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoids action in humans. *J. Clin. Invest.* 95: 2435-41.
- Baram, T.Z. and Schultz, L.** 1992. CRH gene expression in the fetal rat is not increased after pharmacological adrenalectomy. *Neurosci. Lett.* 17: 215-8.
- Barbieri, C.E., Barton, C.E. and Pietenpol, J.A.** 2003. Delta Np63 alpha expression is regulated by the phosphoinositide 3-kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 278: 51408-14.
- Bar-Dayan, Y. and Small, M.** 1994. Effect of bovine growth hormone administration on the pattern of thymic involution in mice. *Thymus* 23: 95-101.
- Barnes, P.J.** 1995. Inhaled glucocorticoids for asthma. *New England Journal of Medicine* 332: 868-875.
- Barnes, P. J.** 1996. Mechanism of action of glucocorticoids in asthma. *Am. J. Respir.* 154: 21-27.

- Barnes, P.J.** 1998. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin. Sci. (London)* 94: 557–572.
- Barnes, P.J. and Adcock, I.M.** 2003. How do corticosteroids work in asthma? *Ann. Intern. Med.* 2: 359-70.
- Barnes, P.J. and Karin, M.** 1997. Nuclear factor- κ B a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *New England Journal of Medicine* 336: 1066-1071.
- Barrow, L.L., van Bokhoven, H., Daack-Hirsch, S., Andersen, T., van Beersum, S.E., Gorlin, R. and Murray, J.C.** 2002. Analysis of the p63 gene in classical EEC syndrome, related syndromes, and non-syndromic orofacial clefts. *J. Med. Genet.* 39: 559-66.
- Baxter, J.D. and Rousseau, G.G.** 1979. Glucocorticoid hormone action: an overview. *Monogr. Endocrinol.* 12: 1-24.
- Bei, M., Kratochwil, K. and Maas, R.L.** 2000. BMP4 rescues a non-cell-autonomous function of Msx1 in tooth development. *Development* 127: 4711-8.
- Beitins, I.Z., Bayard, F., Ances, I.G., Kowarski, A. and Migeon, C.J.** 1973. The metabolic clearance rate, blood production, interconversion and transplacental passage of cortisol and cortisone in pregnancy near term. *Pediatr. Res.* 7: 509-19.
- Benediktsson, R., Lindsay, R.S., Noble, J., Seckl, J.R. and Edwards, C.R.** 1993. Glucocorticoid exposure in utero: new model for adult hypertension. *Lancet* 6: 339-41.
- Berlin, A.L., Paller, A.S. and Chan, L.S.** 2002. Incontinentia pigmenti: a review and update on the molecular basis of pathophysiology. *J. Am. Acad. Dermatol.* 47: 169-87.
- Billestrup, N., Swanson, L.W. and Vale, W.** 1986. Growth hormone-releasing factor stimulates proliferation of somatotrophs *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 6854–6857

- Bizzarro, M.J. and Gross, I.** 2004. Effects of hormones on fetal lung development. *Obstet. Gynecol. Clin. North. Am.* 31: 949-61.
- Blecher, S. R., Kapalanga, J. and Lalonde, D.** 1990. Induction of sweat glands by epidermal growth factor in murine X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia. *Nature* 345: 542-544.
- Blecher, S.R.** 1986. Anhidrosis and absence of sweat glands in mice hemizygous for the Tabby gene: supportive evidence for the hypothesis of homology between Tabby and human anhidrotic (hypohidrotic) ectodermal dysplasia (Christ-Siemens-Touraine syndrome). *J. Invest. Dermatol.* 87: 720-2.
- Bonnard, E., Logan, P. and Eustace, P.** 1996. Absent meibomian glands: a marker for EEC syndrome. *Eye* 10: 355-361.
- Brown, R.W., Kotolevtsev, Y., Lindsay, R.S., Lyons, V., Murad, P., Mullins, J.J., Chapman, K.E., Edwards, C.R.W. and Seckl, J.R.** 1996. Isolation and cloning of human placental 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase-2 cDNA. *Biochemical journal* 313: 1007-1017.
- Brûlet, P., Babinet, C., Kemler, R. and Jacob, J.** 1980. Monoclonal antibodies against trophectoderm-specific markers during mouse blastocyst formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 41113-41117.
- Bruna, A., Nicolas, M., Munoz, A., Kyriakis, J.M. and Caelles, C.** 2003. Glucocorticoid receptor-JNK interaction mediates inhibition of the JNK pathway by glucocorticoids. *Embo J.* 22: 6035-44.
- Budunova, I., Kowalczyk, D., Pérez, P., Yao, YJ., Jorcano, J.L. and Slaga T.J.** 2003. Glucocorticoid receptor functions as a potent suppressor of mouse skin carcinogenesis. *Oncogene* 22: 3279-3287.
- Buss, P.W., Hughes, H.E. and Clarke, A.** 1995. Twenty-four cases of the EEC syndrome: clinical presentation and management. *J. Med. Genet.* 32: 716-723.

- Byrne, C. and Hardman, M.** 2002. Integumentary structures. In: *Mouse Development: patterning, morphogenesis and organogenesis*. Ed. Rossant, J., Tam, P. L. Academic Press, cop. San Diego, pp. 567-589.
- Byrne, C., Tainsky, M. and Fuchs, E.** 1994. Programming gene expression in developing epidermis. *Development* 120: 2369-83.
- Caelles, C., Gonzalez-Sancho, J.M. and Munoz, A.** 1997. Nuclear hormone receptor antagonism with AP-1 by inhibition of the JNK pathway. *Genes Dev.* 11: 3351-64.
- Cambiaghi, S., Restano, L., Paakkonen, K., Caputo, R. and Kere, J.** 2000. Clinical findings in mosaic carriers of hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Arch. Dermatol.* 136: 217-224.
- Candi, E., Tarcsa, E., Digiovanna, J.J., Compton, J.G., Elias, P.M., Marekov, L.N. and Steinert, P.M.** 1998. A highly conserved lysine residue on the head domain of type II keratins is essential for the attachment of keratin intermediate filaments to the cornified cell envelope through isopeptide crosslinking by transglutaminases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 3: 2067-72.
- Cao, Z., Xiong, J., Takeuchi, M., Kurama, T. and Goeddel, D. V.** 1996. TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 383: 443-446.
- Carlson, B.M.** 2000. *Embriología humana y biología del desarrollo*. 2ª ed. Harcourt. Madrid.
- Chatelain, A., Dupouy, J.P. and Dubois, M.P.** 1979. Ontogenesis of cells producing polypeptide hormones (ACTH, MSH, LPH, GH, prolactin) in the fetal hypophysis of the rat: influence of the hypothalamus. *Cell. Tissue. Res.* 196: 409-427.
- Chazaud, C., Oulad-Abdelghani, M., Bouillet, P., Decimo, D., Chambon, P. and Dolle, P.** 1996. AP-2.2, a novel gene related to AP-2, is expressed in the forebrain, limbs and face during mouse embryogenesis. *Mech. Dev.* 54: 83-94.

- Chen, F., Castranova, V., Shi, X. and Demers, L.** 1999. New Insights into the Role of Nuclear Factor-kB, a Ubiquitous Transcription Factor in the Initiation of Diseases. *Clinical Chemistry* 45: 7-17.
- Chitayat, D., Meunier, C., Hodgkinson, K.A., Robb, L. and Azouz, M.** 1992. Acrania: a manifestation of the Adams-Oliver syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 44: 562-566.
- Cidlowski, J.A., King, K.L., Evans-Storms, R.B., Montague, J.W., Bortner, C.D. and Hughes, F.M. Jr.** 1996. The biochemistry and molecular biology of glucocorticoid-induced apoptosis in the immune system. *Recent Prog. Horm. Res.* 51: 457-90.
- Clarke, A., Phillips, D.I.M., Brown, R. and Harper, P.S.** 1987. Clinical aspects of X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Arch Dis Child.* 62: 989-996.
- Claxton, J.H.** 1967. The initiation and development of the hair follicle population in tabby mice. *Genet. Res.* 10: 161-171.
- Cleasby, M.E., Livingstone, D.E., Nyirenda, M.J., Seckl, J.R. and Walter, B.R.** 2003. Is programming of glucocorticoid receptor expression by prenatal dexamethasone in the rat secondary to metabolic derangement in adulthood? *Eur. J. Endocrinol.* 148: 129-38.
- Coghlan, M.J., Elmore, S.W., Kym, P.R. and Kort, M.E.** 2003. The pursuit of differentiated ligands for the glucocorticoid receptor. *Curr. Top. Med. Chem.* 3: 1617-1635.
- Cole, T.J., Blendy, J.A., Monaghan, A.P., Krieglstein, K., Schmid, W., Aguzzi, A., Fantuzzi, G., Hummler, E., Unsicker, K. and Schutz, G.** 1995. Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes Dev.* 9: 1608-21.
- Compton, M.M. and Cidlowski, J.A.** 1986. Rapid *in vivo* effects of glucocorticoids on the integrity of rat lymphocyte genomic deoxyribonucleic acid. *Endocrinology* 118: 38-45.

- Conte-Devolx, B., Guillaume, V., Boudouresque, F., Graziani, N., Magnan, E., Grino, M., Empeaire, N., Nahoul, K., Cataldi, M. and Oliver, C.** 1992. Effects of metyrapone infusion on corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin secretion into the hypophysial portal blood of conscious, unrestrained rams. *Acta Endocrinol. (Copenh)* 127: 435-40.
- Coope, H.J., Atkinson, P.G., Huhse, B., Belich, M., Janzen, J., Holman, M.J., Klaus, G.G., Johnston, L.H. and Ley S.C.** 2002. CD40 regulates the processing of NF-kappaB2 p100 to p52. *Embo J.* 21: 5375-85.
- Cotsarelis, G., Cheng, S.Z., Dong, G., Sun, T.T. and Lavker, R.M.** 1989. Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells. *Cell* 57: 201-9.
- Coulombe, P.A., Hutton, M.E., Letai, A., Hebert, A., Paller, A.S. and Fuchs, E.** 1991. Point mutations in human keratin K14 of epidermolysis bullosa simplex patients: genetic and functional analysis. *Cell* 66: 1301-1311.
- Cowin, P., Franke, W.W., Grund, C., Kapprell, H.P. and Kartenbeck, J.** 1985. The desmosome-intermediate filament complex. In: *The cell in contact*. Ed. Edelman, G., Thiery, J.P. New York Willey, pp. 427-460.
- Crawford, P.J.M., Aldred, M.J. and Clarke, A.** 1991. Clinical and radiographic dental findings in X linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *J. Med. Genet.* 28: 181-185.
- Cui, C.Y., Durmowicz, M., Tanaka, T.S., Hartung, A.J., Tezuka, T., Hashimoto, K., Ko, M.S., Srivastava, A.K. and Schlessinger, D.** 2002. EDA targets revealed by skin gene expression profiles of wild-type, Tabby and Tabby EDA-A1 transgenic mice. *Hum. Mol. Genet.* 11: 1763-73.
- Dahlman-Wright, K., Wright, A., Gustafsson, J.A. and Carlstedt-Duke, J.** 1991. Interaction of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain with DNA as a dimer is mediated by a short segment of five amino acids. *J. Biol. Chem.* 266: 3107-12.

- Dale, B.A., Holbrook, K.A., Kimball, J.R., Hoff, M. and Sun, T.T.** 1985. Expression of epidermal keratins and filaggrin during human fetal skin development. *J. Cell. Biol.* 101: 1257-1269.
- Davidson, P. and Hardy, M.H.** 1952. The development of mouse vibrissae in vivo and in vitro. *J. Anat.* 86: 342-56.
- De Bosscher, K., Schmitz, M.L., Vanden Berghe, W., Plaisance, S., Fiers, W. and Haegeman, G.** 1997. Glucocorticoid-mediated repression of nuclear factor-kappaB-dependent transcription involves direct interference with transactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 13504-9.
- De Bosscher, K., Vanden Berghe, W. and Haegeman, G.** 2001. Glucocorticoid repression of AP-1 is not mediated by competition for nuclear coactivators. *Mol. Endocrinol.* 15: 219-27.
- De Bosscher, K., Vanden Berghe, W. and Haegeman, G.** 2003. The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr. Rev.* 24: 488-522.
- De Bosscher, K., Vanden Berghe, W., Vermeulen, L., Plaisance, S., Boone, E. and Haegeman, G.** 2000. Glucocorticoids repress NF-kappaB-driven genes by disturbing the interaction of p65 with the basal transcription machinery, irrespective of coactivator levels in the cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 3919-24.
- De Kloet, E.R., Real, J.M. and Zutanito, W.** 1990. Corticosteroids and the brain. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 37: 387-94.
- Depew, M.J., Tucker, A.S. and Sharpe, P.T.** 2002. Craniofacial development. In: *Mouse Development: patterning, morphogenesis and organogenesis*. Ed. Rossant, J., Tam, P. L. Academic Press, cop. San Diego, pp. 421-498.
- Didenko, V.V. and Hornsby, P.J.** 1996. Presence of double-strand breaks with single-base 3' overhangs in cells undergoing apoptosis but not necrosis. *J. Cell. Biol.* 135: 1369-76.

- Dittmar, K.D., Banach, M., Galigniana, M.D. and Pratt, W.B.** 1998. The role of DnaJ-like proteins in glucocorticoid receptor hsp90 heterocomplex assembly by the reconstituted hsp90.p60.hsp70 foldosome complex. *J. Biol. Chem.* 273: 7358–7366.
- Dittmar, K.D., Demady, D.R., Stancato, L.F., Krishna, P. and Pratt, W.B.** 1997. Folding of the glucocorticoid receptor by the heat shock protein (hsp) 90-based chaperone machinery. The role of p23 is to stabilize receptor. hsp90 heterocomplexes formed by hsp90.p60.hsp70. *J. Biol. Chem.* 272: 21213–21220.
- Doffinger, R., Smahi, A., Bessia, C., Geissmann, F., Feinberg, J., Durandy, A., Bodemer, C., Kenwrick, S., Dupuis-Girod, S., Blanche, S., Wood, P., Rabia, S.H., Headon, D.J., Overbeek, P.A., Le Deist, F., Holland, S.M., Belani, K., Kumararatne, D.S., Fischer, A., Shapiro, R., Conley, M.E., Reimund, E., Kalhoff, H., Abinun, M., Munnich, A., Israel, A., Courtois, G. and Casanova, J.L.** 2001. X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency is caused by impaired NF-kappaB signaling. *Nat. Genet.* 27: 277-85.
- Domingues, M.G., Jaeger, M.M., Araujo, V.C. and Araujo, N.S.** 2000. Expression of cytokeratins in human enamel organ. *Eur. J. Oral. Sci.* 108: 43-7.
- Donahue, J.P., Shea, C.J. and Taravella, M.J.** 1999. Hidrotic ectodermal dysplasia with corneal involvement. *JAAPOS* 3: 372-375.
- Dong, Y., Poellinger, L., Gustafsson, J.A. and Okret, S.** 1988. Regulation of glucocorticoid receptor expression: evidence for transcriptional and posttranslational mechanisms. *Mol. Endocrinol.* 2: 1256-64.
- Dubois, P.M. and Hemming, F.J.** 1991. Fetal development and regulation of pituitary cell types. *J. Electrón. Microscopy Techniques* 19: 2–20.
- Ducut Sigala, J.L., Bottero, V., Young, D.B., Shevchenko, A., Mercurio, F. and Verma, I. M.** 2004. Activation of Transcription Factor NF- κ B Requires ELKS, an I κ B Kinase Regulatory Subunit. *Science* 304: 1963-1967.

- Duprey, P., Morello, D., Vasseur, M., Babinet, C., Condamine, H., Brûlet, P. and Jacob, F.** 1985. Expression of the cytokeratin Endo a gene during early mouse embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 8535-8539.
- Elomaa, O., Pulkkinen, K., Hannelius, U., Mikkola, M., Saarialho-Kere, U. and Kere, J.** 2001. Ectodysplasin is released by proteolytic shedding and binds to the EDAR protein. *Hum. Mol. Genet.* 10: 953-62.
- Ezer, S., Bayes, M., Elomaa, O., Schlessinger, D. and Kere, J.** 1999. Ectodysplasin is a collagenous trimeric type II membrane protein with a tumor necrosis factor-like domain and co-localizes with cytoskeletal structures at lateral and apical surfaces of cells. *Hum. Mol. Genet.* 8: 2079-86.
- Falconer, D.S.** 1952. A totally sex-linked gene in the house mouse. *Nature* 169: 664-665.
- Fawcett, D.W.** 1987. *Tratado de histología*. 11ª ed. Ed. Interamericana. McGraw-Hill.
- Fernandez-Vazquez, G., Cacicedo, L., Lorenzo, M.J., Tolon, R., Lopez, J. and Sanchez-Franco, F.** 1995. Corticosterone modulates growth hormone-releasing factor and somatostatin in fetal rat hypothalamic cultures. *Neuroendocrinology* 61: 31-5.
- Findlater, G.S., McDougall, R.K. and Kaufman, M.H.** 1993. Eyelid development, fusion and subsequent reopening in the mouse. *J. Anat.* 183: 121-129.
- Fottner, C., Engelhardt, D., Elmlinger, M.W. and Weber, M.M.** 2001. Identification and characterization of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein expression and secretion by adult human adrenocortical cells: differential regulation by IGFs and adrenocorticotropin. *J. Endocrinol.* 168: 465-74.
- Fowler, K.J., Walter, F., Alexander, W., Hibbs, M.L., Nice, E.C., Bohmer, R.M., Mann, G.B., Thumwood, C., Maglitto, R., Danks, J.A. et al.** 1995. A mutation in the epidermal growth factor receptor in waved-2 mice has a profound effect on receptor biochemistry that results in impaired lactation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1465–1469.

- Franchimont, D., Galon, J., Vacchio, M.S., Fan, S., Visconti, R., Frucht, D.M., Geenen, V., Chrousos, G.P., Ashwell, J.D. and O'Shea, J.J.** 2002. Positive effects of glucocorticoids on T cell function by up-regulation of IL-7 receptor alpha. *J. Immunol.* 168: 2212-8.
- Franke, W.W., Schiller, D.L., Moll, R., Winter, S., Schmid, E., Engelbrecht, I., Denk, H., Kepler, R. and Platzer, B.** 1981. Diversity of cytokeratins: differentiation-specific expression of cytokeratin polypeptides in epithelial cells and tissues. *J. Moll. Biol.* 153:933-959.
- Freeman, A.I., Munn, H.L., Lyons, V., Dammermann, A., Seckl, J.R. and Chapman, K.E.** 2004. Glucocorticoid down-regulation of rat glucocorticoid receptor does not involve differential promoter regulation. *J. Endocrinol.* 183: 365-74.
- Frieden, I.J.** 1986. Aplasia cutis congenita: A clinical review and proposal for classification. *J. Am. Acad. Dermatol.* 14: 646-660.
- Fu, S., Bottoli, I., Soller, M. and Vogt, P.K.** 1999. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor, a v-Jun target gene, induces oncogenic transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 5716–5721.
- Fuchs, E. and Segre, J.A.** 2000. Stem cells: a new lease on life. *Cell* 100: 143-55.
- Fuchs, E.** 1996. The cytoskeleton and disease: genetic disorders of intermediate filaments. *Annu. Rev. Genet.* 30: 197-231.
- Fuchs, E. and Green, H.** 1980. Change in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell* 19: 1033-1042.
- Fuchs, E. and Weber, K.** 1994. Intermediate filaments: structure, dynamics, function and disease. *Annu. Rev. Biochem.* 63: 345-382.
- Gage, P.J., Lossie, A.C., Scarlett, L.M., Lloyd, R.V. and Camper, S.A.** 1995. Ames dwarf mice exhibit somatotrope commitment but lack growth hormone-releasing factor response. *Endocrinology* 136: 1161–1167.

- Gandelman, R. and Rosenthal, C.** 1981. Deleterious effects of prenatal prednisolone exposure upon morphological and behavioral development of mice. *Teratology* 24: 293-301.
- Ghosh, B., Word, C.R., Held, G.A., Abbott, B.D. and Lau, C.** 2000. Glucocorticoid receptor regulation in the rat embryo: a potential site for developmental toxicity? *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 164: 221-9.
- Ghosh, S. and Karin, M.** 2002. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell.* 109: 81-96.
- Ghosh, S., May, M.J. and Kopp, E.B.** 1998. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16: 225-60.
- Gilgenkrantz, S., Blanchet-Bardon, C., Nazzaro, V., Mujica, P. and Alembik, Y.** 1989. Hypohidrotic ectodermal dysplasia. Clinical study of a family of 30 over three generations. *Hum. Genet.* 81: 120-122.
- Gong, S.G.** 2001. Phenotypic and molecular analyses of A/WySn mice. *Cleft Palate Craniofac J.* 38: 486-91.
- Gounari, F., Merdes, A., Quinlan, R., Hess, J., FitzGerald, P.G., Ouzounis, C.A. and Georgatos, S.D.** 1993. Bovine filensin possesses primary and secondary structure similarity to intermediate filament proteins. *J. Cell Biol.* 121: 874-853.
- Grace, M.P., Kim, K.H., True, L.D. and Fuchs, E.** 1985. Keratin expression in normal oesophageal epithelium and squamous cell carcinoma of the oesophagus. *Cancer Res.* 45: 841-864.
- Green, H.** 1980. The keratinocyte as differentiated cell type. *Harvey Lect.* 74: 101-139.
- Gruneberg, H.** 1965. Genes and genotypes affecting the teeth of the mouse. *Journal of Embryology & Experimental Morphology* 14: 137-159.

- Gruneberg, H.** 1966. The molars of the tabby mouse, and a test of the 'single-active X-chromosome' hypothesis. *Journal of Embryology & Experimental Morphology* 15: 223-244.
- Gude, W.D., Cosgrove, G.E. and Hirsch, G.P.** 1982. *Histological Atlas of the Laboratory Mouse*. Ed. Plenum Press. New York.
- Guyton, A.C. and Hall, E.** 1999. *Tratado de Fisiología Médica*. 9^a ed. McGraw-Hill-Interamericana.
- Hache, R.J.G., Tse, R., Reich, T., Savory, J.G.A. and Lefebvre, Y.A.** 1999. Nucleocytoplasmic trafficking of steroid-free glucocorticoid receptor. *J. Biol.Chem.* 274: 1432-1439.
- Hammami, M.M. and Siiteri, P.K.** 1991. Regulation of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in human skin fibroblasts: enzymatic modulation of glucocorticoid action. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 73: 326-34.
- Hansen, L.A., Alexander, N., Hogan, M.E., Sundberg, J.P., Dlugosz, A., Threadgill, D.W., Magnuson, T. and Yuspa, S.H.** 1997. Genetically null mice reveal a central role for epidermal growth factor receptor in the differentiation of the hair follicle and normal hair development. *American Journal of Pathology* 150: 1959-1975.
- Happle, R. and Frosch, P.J.** 1985. Manifestations of the lines of Blaschko in women heterozygous for X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Clin. Genet.* 27: 468-471.
- Haustein, J.** 1983. On the ultrastructure of the developing and adult mouse corneal stroma. *Anat. Embryol.* 168: 291-305.
- Headon, D.J. and Overbeek, P.A.** 1999. Involvement of a novel Tnf receptor homologue in hair follicle induction. *Nat. Genet.* 22: 370-4.

- Headon, D.J., Emmal, S.A, Ferguson, B.M., Tucker, A.S, Justice, M.J., Sharpe, P.T., Zonana, J. and Overbeek, P.A.** 2001. Gene defect in ectodermal dysplasia implicates a death domain adapter in development. *Nature* 414: 913-6.
- Hemming, F.J., Aubert, M.L. and Dubois, P.M.** 1988. Differentiation of fetal rat somatotropes *in vitro*: effects of cortisol, 3,5,3'-triiodothyronine, and glucagon: a light microscopic and radioimmunological study. *Endocrinology* 123: 1230–1237.
- Hemming, F.J., Begeot, M., Dubois, M.P. and Dubois, P.M.** 1984. Fetal rat somatotropes *in vitro*: effects of insulin, cortisol, and growth hormone-releasing factor on their differentiation: a light and electron microscopic study. *Endocrinology* 114: 2107–2113.
- Heritier, A.G. and Dubois, P.M.** 1993. Influence of thyroliberin on rat pituitary cell type differentiation: an *in vitro* study. *Endocrinology* 132: 634–639.
- Herman, J.P., Schafer, M.K., Thompson, R.C. and Watson, S.J.** 1992. Rapid regulation of corticotropin-releasing hormone gene transcription *in vivo*. *Mol. Endocrinol.* 6: 1061-9.
- Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F. and Lacy, E.** 1994. *Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual.* Cold Spring Harbour Laboratory Press. Cold Spring Harbour, New York.
- Holly, F.J. and Lemp, M.A.** 1977. Tear physiology and dry eyes. *Surv. Ophthalmol.* 22: 69-87.
- Hori, K., Hashimoto, K., Eto, H. and Dekio, S.** 1985. Keratin type intermediate filaments in sweat gland myoepithelial cells. *J. Invest. Dermatol.* 85: 453-9.
- Hu, M.C., Lee, D.F. and Xia, W.** 2004. IkappaB kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a. *Cell* 117: 225-37.

- Hu, Y., Baud, V., Delhase, M., Zhang, P., Deerinck, T., Ellisman, M., Johnson, R. and Karin, M.** 1999. Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKK α subunit of I κ B kinase. *Science* 284: 316-20.
- Hu, Y., Baud, V., Oga, T., Kim, K., Yoshida, K., and Karin, M.** 2001. IKK α controls formation of the epidermis independently of NF- κ B. *Nature* 410: 710-714.
- Huang, S. and Hershey, J.** 1989. Translational initiation factor expression and ribosomal protein gene expression are repressed coordinately but by different mechanisms in murine lymphosarcoma cells treated with glucocorticoids. *Mol. Cell. Biol.* 9: 3679-84.
- Hurley, H.J. and Witkowski, J.A.** 1962. The dynamics of eccrine sweating in man. *J. Invest. Dermatol.* 39: 329-338.
- Ireland, I.A. and Meyer, D.R.** 1998. Ophthalmic manifestations of ectrodactyly-ectodermal dysplasia-clefting syndrome. *Ophthalm. Plast. Reconstr. Surg.* 14: 295-7.
- Itin, P.H. and Bargetzi, M.C.** 2000. Aplasia cutis congenital with precancerous transformation-the first case. Why do these scars never develop invasive tumors? *Eur. J. Dermatol.* 10: 181-183.
- Itin, P.H. and Fistarol, S.K.** 2004. Ectodermal dysplasias. *Am. J. Med. Genet.* 131: 45-51.
- Ito, K., Barnes, P.J. and Adcock, I.M.** 2000. Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1 β -induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12. *Mol. Cell. Biol.* 20: 6891-903.
- Itthagarun, A. and King, N.M.** 1997. Ectodermal dysplasia: a review and case report. *Quintessence Int.* 28: 595-602.
- Iwasaki, Y., Aoki, Y., Katahira, M., Oiso, Y. and Saito, H.** 1997. Nongenomic mechanisms of glucocorticoid inhibition of adrenocorticotropin secretion: possible involvement of GTP-binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235: 295-299.

- Jackson, B.W., Grund, C., Winter, S., Franke, W.W. and Illmensee, K.** 1981. Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. *Differentiation* 20: 203-216.
- Jenkins, J.S., Meakin, J.W., Nelson, D.H. and Thorn, G.W.** 1958. Inhibition of adrenal steroid 11-oxygenation in the dog. *Science* 128: 478-80.
- Jernvall, J. and Thesleff, I.** 2000. Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech. Dev.* 92: 19-29.
- Johnson, A.C., Murphy, B.A., Matelis, C.M., Rubinstein, Y., Piebenga, E.C., Akers, L.M., Neta, G., Vinson, C. and Birrer, M.** 2000. Activator protein-1 mediates induced but not basal epidermal growth factor receptor gene expression. *Mol. Med.* 6: 17-27.
- Jones, J.C.R., Goldman, A.E., Yang, H.Y. and Goldman, R.D.** 1985. The organizational fate of intermediate filament networks in two epithelial cell types during mitosis. *J. Cell Biol.* 100: 93-102.
- Jones, P.H., Harper, S. and Watt, F.M.** 1995. Stem cell patterning and fate in human epidermis. *Cell* 80: 83-93.
- Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C. and Palmer, N.** 1993. *Pathology of Domestic Animals*. 4th Ed. Volume 1. Academic Press, Inc.
- Juriloff, D.M. and Fraser, F.C.** 1980. Genetic maternal effects on cleft lip frequency in A/J and CL/Fr mice. *Teratology* 21: 167-75.
- Kalter, H.** 1979. The history of the A family of inbred mice and the biology of its congenital malformations. *Teratology* 20: 213-32.
- Kanski, J.J.** 2000. *Oftalmología clínica*. 4^a ed. Harcourt. Madrid.

- Kapalanga, J. and Blecher, S. R.** 1990. Effect of the X-linked gene Tabby (Ta) on eyelid opening and incisor eruption in neonatal mice is opposite to that of epidermal growth factor. *Development* 108: 349-355.
- Karin, M. and Chang, L.** 2001. AP-1- glucocorticoid receptor crosstalk taken to a higher level. *J. Endocrinol.* 169: 447-51.
- Karin, M. and Delhase, M.** 2000. The I κ B kinase (IKK) and NF- κ B: key elements of proinflammatory signaling. *Seminars in Immunology* 12: 85-98.
- Kasper, M. and Viebahn, C.** 1992. Cytokeratin expression and early lens development. *Anat. Embryol. (Berl)* 186: 285-90.
- Kassel, O., Sancono, A., Kratzschmar, J., Kreft, B., Stassen, M. and Cato, A.C.** 2001. Glucocorticoids inhibit MAP kinase via increased expression and decreased degradation of MKP-1. *Embo J.* 20: 7108–7116.
- Kaufman, C.K. and Fuchs, E.** 2000. It's got you covered: NF- κ B in epidermis. *J. Cell Biol.* 149: 999-1004.
- Kaufman, M.H.** 1994. *The atlas of mouse development.* Academic Press, Inc.
- Kaufman, M.H. and Bard, J.B.L.** 1999. *The anatomical basis of mouse development.* Academic Press. Harcourt Brace, Publishers. San Diego.
- Kere, J., Srivastava, A.K., Montonen, O., Zonana, J., Thomas, N., Ferguson, B., Munoz, F., Morgan, D., Clarke, A., Baybayan, P., Chen, E.Y., Ezer, S., Saarialho-Kere, U., de la Chapelle, A. and Schlessinger, D.** 1996. X-linked anhidrotic (hypohidrotic) ectodermal dysplasia is caused by mutation in a novel transmembrane protein. *Nat. Genet.* 13: 409-16.
- Kern, J., Warnock, L. and McCafferty, J.** 1997. The 3' untranslated region of IL-1b regulates protein production. *J. Immunol.* 158: 1187-93.

- Kirkham, B.W., Corkill, M.M., Davison, S.C. and Panayi, G.S.** 1991. Response to glucocorticoid treatment in rheumatoid arthritis: *in vitro* cell mediated immune assay predicts *in vivo* responses. *J. Rheumatol.* 18: 821-825.
- Klemcke, H.G.** 1995. Placental metabolism of cortisol at mid- and late gestation in swine. *Biol. Reprod.* 53: 1293-301.
- Klintworth, G.K. and Scroggs, M.W.** 1997. Normal Eye and Ocular Anexa. In: *Histology for Pathologists*. 2nd edition, chapter 13. Ed. Lippincott-Raven. Philadelphia, pp. 315-336.
- Kockel, L., Homsy, J.G. and Bohmann, D.** 2001. Drosophila AP-1: lessons from an invertebrate. *Oncogene* 20: 2347–2364.
- Kojima, T., Morikawa, Y., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Senba, E. and Kitamura, T.** 2000. TROY, a newly identified member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, exhibits a homology with Edar and is expressed in embryonic skin and hair follicles. *J. Biol. Chem.* 275: 20742-7.
- Kollar, E.J. and Baird, G.R.** 1969. The influence of the dental papilla on the development of tooth shape in embryonic mouse tooth germs. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 21: 131-148.
- Kopan, R. and Fuchs, E.** 1989. A new look into an old problem: keratins as tools to investigate determination, morphogenesis, and differentiation in skin. *Genes. Dev.* 3: 1-15.
- Kops, G.J., de Ruiter, N.D., De Vries-Smits, A.M., Powell, D.R., Bos, J.L. and Burgering, B.M.** 1999. Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature* 398: 630-4.
- Korzus, E., Torchia, J., Rose, D.W., Xu, L., Kurokawa, R., McInerney, E.M., Mullen, T.M., Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G.** 1998. Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions. *Science* 279: 703-7.

- Koster, M.I., Kim, S., Mills, A.A., DeMayo, F.J. and Roop, D.R.** 2004. p63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program. *Genes Dev.* 18: 126-31.
- Kristiansen, S.B., Heñido, A., Casson, P.R., Búster, J.E. and Hornsby, P.J.** 1997. Induction of steroidogenic enzyme genes by insulin and IGF-I in cultured adult human adrenocortical cells. *Steroids* 62: 258-65.
- Ku, C.L., Yang, K., Bustamante, J., Puel, A., von Bernuth, H., Santos, O.F., Lawrence, T., Chang, H.H., Al-Mousa, H., Picard, C. and Casanova, J.L.** 2005. Inherited disorders of human Toll-like receptor signaling: immunological implications. *Immunol. Rev.* 203: 10-20.
- Kumar, R. and Thompson, E.B.** 1999. The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids* 64: 310–319.
- Kumar, R. and Thompson, E.B.** 2003. Transactivation functions of the N-terminal domains of nuclear hormone receptors: protein folding and coactivator interactions. *Mol. Endocrinol.* 17: 1–10.
- LaBorde, J.B., Hansen, D.K., Young, J.F., Sheehan, D.M. and Holson, R.R.** 1992. Prenatal dexamethasone exposure in rats: effects of dose, age at exposure, and drug-induced hypophagia on malformations and fetal organ weights. *Fundam. Appl. Toxicol.* 19: 545-54.
- l'Allemand, D., Penhoat, A., Lebrethon, M.C., Ardevol, R., Baehr, V., Oelkers, W. and Saez, J.M.** 1996. Insulin-like growth factors enhance steroidogenic enzyme and corticotropin receptor messenger ribonucleic acid levels and corticotropin steroidogenic responsiveness in cultured human adrenocortical cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81: 3892-7.
- Lamartine, J.** 2003. Towards a new classification of ectodermal dysplasias. *Clin. Exp. Dermatol.* 28: 351-5.

- Landy, S.J. and Donnai, D.** Incontinentia pigmenti (Bloch-Sulzberger syndrome). *J. Med. Genet.* 30: 53–59.
- Lane, E.B., Rugg, E.L., Navsaria, H., Leigh, I.M., Heagerty, A.H.M., Ishida-Yamamoto, A. and Eady, R.A.J.** 1992. A mutation in the conserved helix termination peptide of keratin 5 in hereditary skin blistering. *Nature* 356: 244-246.
- Laurikkala, J., Pispala, J., Jung, H.S., Nieminen, P., Mikkola, M., Wang, X., Saarialho-Kere, U., Galceran, J., Grosschedl, R. and Thesleff, I.** 2002. Regulation of hair follicle development by the TNF signal ectodysplasin and its receptor Edar. *Development* 129: 2541-53.
- Laurikkala, J., Mikkola, M. and Mustonen, T.** 2001. TNF signaling via the ligand-receptor pair ectodysplasin and edar controls the function of epithelial signaling centers and is regulated by Wnt and activin during tooth morphogenesis. *Dev. Biol.* 229: 443-455.
- Lavker, R.M. and Sun, T.T.** 2000. Epidermal stem cells: properties, markers, and location. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 13473-5.
- Le Douarin, N.M., Ziller, C. and Couly, G.F.** 1993. Patterning of neural crest derivatives in the avian embryo: in vivo and in vitro studies. *Dev. Biol.* 159: 24-49.
- Leboucq, N., Montoya, Y., Martínez, P., Montoya-Vigo, F. and Catan, P.** 1994. Aplasia cutis congenita of the scalp with large underlying skull defect: a case report. *Neuroradiology* 36: 480-482.
- Leis, H., Page, A., Ramírez, A., Bravo, A., Segrelles, C., Paramio, J., Baretino, D., Jorcano, J.L. and Pérez, P.** 2004. Glucocorticoid Receptor counteracts tumorigenic activity of Akt in skin through interference with the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) signaling pathway. *Mol. Endocrinology* 18: 303-311.
- Lersch, R. and Fuchs, E.** 1988. Sequence and expression of a type II keratin, K5, in human epidermal cells. *Mol. Cell. Biol.* 8: 486-493.

- Leung, D. and Chrousos, G.** 2000. Is there a role for glucocorticoids receptor beta in glucocorticoid-dependent asthmatics? *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 162: 1-3.
- Li, G., Gustafson-Brown, C., Hanks, S., Nason, K., Arbeit, J., Pogliano, K., Wisdom, R. and Jonson, R.** 2003. c-Jun is Essential for Organization of the Epidermal Leading Edge. *Developmental Cell* 4: 865-877
- Li, Q. and Verma, I.M.** 2002. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 725-34. *Erratum in: 2002. Nat. Rev. Immunol.* 2: 975.
- Li, Q., Lu, Q., Hwang, J.Y., Buscher, D., Lee, K.F., Izpisua-Belmonte, J.C. and Verma, I.M.** 1999. IKK1-deficient mice exhibit abnormal development of skin and skeleton. *Genes Dev.* 13: 1322-8.
- Liefer, K.M., Koster, M.I., Wang, X.J., Yang, A., McKeon, F., and Roop, D.R.** 2000. Down-regulation of p63 is required for epidermal UV-B-induced apoptosis. *Cancer Res.* 60: 4016-4020.
- Lindsay, R.S., Lindsay, R.M., Waddell, B.J. and Seckl, J.R.** 1996. Prenatal glucocorticoid exposure leads to offspring hyperglycaemia in the rat: studies with the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor carbenoxolone. *Diabetologia* 39: 1299-305.
- Losel, R.M., Falkenstein, E., Feuring, M., Schultz, A., Tillmann, H.C., Rossol-Haseroth, K. and Wehling, M.** 2003. Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers. *Physiol. Rev.* 83: 965-1016.
- Luetkeke, N.C., Qiu, T.H., Peiffer, R.L., Oliver, P., Smithies, O. and Lee, D.C.** 1993. TGF alpha deficiency results in hair follicle and eye abnormalities in targeted and waved-1 mice. *Cell* 73: 263-278.
- Lumsden, A.G.** 1988. Spatial organization of the epithelium and the role of neural crest cells in the initiation of the mammalian tooth germ. *Development* 103: 155-169.

- Lüscher, B., Mitchell, P. J., Williams, T. and Tjian, R.** 1989. Regulation of transcription factor AP-2 by the morphogen retinoic acid and by second messengers. *Genes Dev.* 3: 1507-1517.
- Magin, T.M.** 1998. Lessons from keratin transgenic and knockout mice. *Subcell Biochem.* 31: 141-72.
- Mak, J.C., Nishikawa, M. and Barnes, P.J.** 1995. Glucocorticosteroids increased beta 2 adrenergic receptor transcription in human lung. *Am. J. Physiol.* 268: 1041-6.
- Makris, C., Godfrey, V.L., Krähn-Senftleben, G., Takahashi, T., Roberts, J.L., Schwarz, T., Feng, L., Johnson, R.S. and Karin, M.** 2000. Female mice heterozygous for IKK γ / NEMO deficiencies develop a dermatopathy similar to the human X-linked disorder Incontinentia Pigmenti. *Moll. Cell* 5: 969-979.
- Mann, G.B., Fowler, K.J., Gabriel, A., Nice, E.C., Williams, R.L. and Duna, A.R.** 1993. Mice with a null mutation of the TGF alpha gene have abnormal skin architecture, wavy hair, and curly whiskers and often develop corneal inflammation. *Cell* 73: 249-261.
- Martínez-Frías, M.L., Martín, M., Ayala, A., Pardo, M., Bermejo, E. and Urioste, M.** 1996. Síndrome de Hay-Wells, frecuencia en España y revisión en la literatura. *An. Esp. Pediatr.* 45: 101-104.
- Matalova, E., Tucker, A.S. and Sharpe, P.T.** 2004. Death in the life of a tooth. *J. Dent. Res.* 83: 11-16.
- Matkowskyj, K.A., Schonfeld, D. and Benya, R.V.** 2000. Quantitative immunohistochemistry by measuring cumulative signal strength using commercially available software photoshop and matlab. *J. Histochem. Cytochem.* 48: 303-12.
- Matthews, S.G.** 2002. Early programming of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Trends Endocrinol. Metab.* 13: 373-80.

- May, M.J., Marienfeld, R.B. and Ghosh, S.** 2002. Characterization of the Ikappa B-kinase NEMO binding domain. *J. Biol. Chem.* 277: 45992-6000.
- Mayo, K.E., Hammer, R.E., Swanson, L.W., Brinster, R.L., Rosenfeld, M.G. and Evans, R.M.** 1988. Dramatic pituitary hyperplasia in transgenic mice expressing a human growth hormone-releasing factor gene. *Mol. Endocrinol.* 2: 606–612
- McGrath, J.A., Duijf, P.H., Doetsch, V., Irvine, A.D., de Waal, R., Vanmolkot, K.R., Wessagowit, V., Kelly, A., Atherton, D.J., Griffiths, W.A., Orlow, S.J., van Haeringen, A., Ausems, M.G., Yang, A., McKeon, F., Bamshad, M.A., Brunner, H.G., Hamel, B.C. and van Bokhoven, H.** 2001. Hay-Wells syndrome is caused by heterozygous missense mutations in the SAM domain of p63. *Hum. Mol. Genet.* 10: 221-9.
- McKay, L.I. and Cidlowski J.A.** 1999. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor- κ B and steroid receptor signaling pathways. *Endocrine Reviews* 20: 435-459.
- McKay, L.I. and Cidlowski, J.A.** 1999. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between NF- κ B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr. Rev.* 20: 435–459.
- McKusick, V.** 1994. *Mendelian Inheritance in Man. Catalogs of Human Genes and Genetic Disorders.* Baltimore, MD: Johns Hopkins University Press.
- McNab, A.A., Potts, M.J. and Welham, R.A.** 1989. The EEC syndrome and its ocular manifestations. *Br. J. Ophthalmol.* 73: 261-4.
- Mehic, D., Bakiri, L., Ghannadan, M., Wagner, E.F. and Tschachler, E.** 2005. Fos and jun proteins are specifically expressed during differentiation of human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 124: 212-20.
- Mehr, R., Globerson, A. and Perelson, A.S.** 1995. Modeling positive and negative selection and differentiation processes in the thymus. *J. Theor. Biol.* 175: 103-26.

- Mendelson, C.R., Acarregui, M.J., Odom, M.J. and Boggaram, V.** 1991. Developmental and hormonal regulation of surfactant protein A (SP-A) gene expression in fetal lung. *J. Dev. Physiol.* 15: 61-9.
- Miesfeld, R., Rusconi, S., Godowski, P.J., Maler, B.A., Okret, S., Wikstrom, A.C., Gustafsson, J.A. and Yamamoto, K.R.** 1986. Genetic complementation of a glucocorticoid receptor deficiency by expression of cloned receptor DNA. *Cell* 46: 389-399.
- Mikkola, M.L. and Thesleff, I.** 2003. Ectodysplasin signaling in development. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14: 211-224.
- Miletich, I. and Sharpe, P.T.** 2004. Neural crest contribution to mammalian tooth formation. *Birth Defects Res. C. Embryo Today* 72: 200-12.
- Millar, S.E.** 2002. Molecular mechanisms regulating hair follicle development. *J. Invest. Dermatol.* 118: 216-25.
- Mills, A.A., Zheng, B., Wang, X.J., Vogel, H., Roop, D.R. and Bradley, A.** 1999. p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature* 398: 708-13.
- Mina, M. and Kollar, E.J.** 1987. The induction of odontogenesis in non-dental mesenchyme combined with early murine mandibular arch epithelium. *Arch. Oral Biol.* 32: 123-127.
- Mitchell, P. J., Timmons, P. M., Hebert, J. M., Rigby, P. W. J. and Tjian, R.** 1991. Transcription factor AP-2 is expressed in neural crest cell lineages during mouse embryogenesis. *Genes Dev.* 5: 105-119.
- Moll, R., Franke, W.W. Schiller, D.L., Geiger, B. and Krepler, R.** 1982a. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumours and cultured cells. *Cell* 31: 11-24.

- Moll, R., Moll, I. and Wiest, W.** 1982b. Changes in the pattern of cytokeratin polypeptides in epidermis and hair follicles during skin development in human fetuses. *Differentiation* 23: 170-178.
- Mondino, B.J., Bath, P.E., Foos, R.Y., Apt, L. and Rajacich, G.M.** 1984. Absent meibomian glands in the ectrodactyly, ectodermal dysplasia, cleft lip-palate syndrome. *Am. J. Ophthalmol.* 97: 496-500.
- Monreal, A.W., Ferguson, B.M., Headon, D.J., Street, S.L., Overbeek, P.A. and Zonana, J.** 1999. Mutations in the human homologue of mouse dl cause autosomal recessive and dominant hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Nat. Genet.* 22: 366-9.
- Moore, K.L. and Persaud, T.V.N.** 1999. *Clinical embryology*. 6th ed. Ed. McGrawHill. New York.
- Morris, R.J. and Potten, C.S.** 1999. Highly persistent label-retaining cells in the hair follicles of mice and their fate following induction of anagen. *J. Invest. Dermatol.* 112: 470-5.
- Moser, M., Imhof, A., Pscherer, A., Bauer, R., Amselgruber, W., Sinowatz, F., Hofstadter, F., Schule, R. and Buettner, R.** 1995. Cloning and characterization of a second *AP-2AP-2β*. *Development* 121: 2779–2788.
- Moser, M., Rüschoff, J. and Buettner, R.** 1997. Comparative analysis of AP-2 alpha gene expression during murine embryogenesis. *Developmental Dynamics* 208: 115-124.
- Mukaida, N., Morita, M., Ishikawa, Y., Rice, N., Okamoto, S., Kasahara, T. and Matsushima, K.** 1994. Novel mechanism of glucocorticoid-mediated gene repression. Nuclear factor-kappa B is target for glucocorticoid-mediated interleukin 8 gene repression. *J. Biol. Chem.* 269: 13289-95.

- Muller-Rover, S., Handjiski, B., van der Veen, C., Eichmuller, S., Foitzik, K., McKay, I.A., Stenn, K.S. and Paus, R.** 2001. A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages. *J. Invest. Dermatol.* 117: 3-15.
- Munck, A., Mendel, D., Smith, L. and Orti, E.** 1990. Glucocorticoid receptors and actions. *Am. Rev. Respir. Dis.* 141: 2-10.
- Munger, B.L. and Brusilow, S.W.** 1971. The histophysiology of rat plantar sweat glands. *Anat. Rec.* 169: 1-22.
- Munoz, F., Lestringant, G., Sybert, V., Frydman, M., Alswaini, A., Frossard, P. M., Jorgenson, R. and Zonana, J.** 1997. Definitive evidence for an autosomal recessive form of hypohidrotic ectodermal dysplasia clinically indistinguishable from the more common X-linked disorder. *Am. J. Hum. Genet.* 61: 94-100.
- Murillas, R., Larcher, F., Santos, M., Ullrich, A. and Jorcano, J.L.** 1995. Expression of a dominant negative mutant of epidermal growth factor receptor in the epidermis of transgenic mice elicits striking alterations in hair follicle development and skin structure. *Embo J.* 14: 5216-5223.
- Murphy, G.F.** 2005. Histology of the Skin. In: *Lever's Histopathology of the Skin*. 9th ed, chapter 3. Ed. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia, pp.1-55.
- Murray, J.C.** 2002. Gene/environment causes of cleft lip and/or palate. *Clin. Genet.* 61: 248-56.
- Mustonen, T., Pispá, J. and Mikkola, M.L.** 2003. Stimulation of ectodermal organ development by Ectodysplasin-A1. *Dev. Biol.* 259: 123-136.
- Nagy, A.** 2000. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26: 99-109.

- Naito, A., Yoshida, H., Nishioka, E., Satoh, M., Azuma, S., Yamamoto, T., Nishikawa, S. and Inoue, J.** 2002. TRAF6-deficient mice display hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 99: 8766-8771.
- Nakagawa, K., Ishizuka, T., Obara, T., Matsubara, M. and Akikawa, K.** 1987. Dichotomic action of glucocorticoids on growth hormone secretion. *Acta Endocrinol.* (Copenh) 116: 165-71.
- Nakata, M., Koshiba, H., Eto, K. and Nance, W.E.** 1980. A genetic study of anodontia in X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 908-19.
- Nelson, W.G. and Sun, T.** 1983. The 50- and 58-kdalton keratin classes as molecular markers for stratified squamous epithelia: cell culture studies. *J. Cell. Biol.* 97: 244-251.
- Newton, R.** 2000. Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? *Thorax* 55: 603-613.
- Newton, R., Hart, L.A., Stevens, D.A., Bergmann, M., Donnelly, L.E., Adcock, I.M. and Barnes, P.J.** 1998. Effect of dexamethasone on interleukin-1beta-(IL-1beta)-induced nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) and kappaB-dependent transcription in epithelial cells. *Eur. J. Biochem.* 254: 81-9.
- Nieto, M.A., Gonzalez, A., Gambon, F., Diaz-Espada, F. and Lopez-Rivas, A.** 1992. Apoptosis in human thymocytes after treatment with glucocorticoids. *Clin. Exp. Immunol.* 88: 341-4.
- Nishikomori, R., Akutagawa, H., Maruyama, K., Nakata-Hizume, M., Ohmori, K., Mizuno, K., Yachie, A., Yasumi, T., Kusunoki, T., Heike, T. and Nakahata, T.** 2004. X-linked ectodermal dysplasia and immunodeficiency caused by reversion mosaicism of NEMO reveals a critical role for NEMO in human T-cell development and/or survival. *Blood* 103: 4565-72.

- Nishimura, G., Harigaya, A., Kuwashima, M. and Kuwashima, S.** 1997. Craniotubular dysplasia with severe postnatal growth retardation, mental retardation, ectodermal dysplasia, and loose skin: Lenz-Majewski-like syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 71: 87-92.
- Nobukuni, Y., Smith, C.L., Hager, G.L. and Detera-Wadleigh, S.D.** 1995. Characterization of the human glucocorticoid receptor promoter. *Biochemistry* 34: 8207-14.
- Nogami, H. and Tachibana, T.** 1993. Dexamethasone induces advanced growth hormone expression in the fetal rat pituitary gland *in vitro*. *Endocrinology* 132: 517–523.
- Nogami, H., Inoue, K. and Kawamura, K.** 1997. Involvement of glucocorticoid-induced factor(s) in the stimulation of growth hormone expression in the fetal rat pituitary gland *in vitro*. *Endocrinology* 138: 1810–1815.
- Nogami, H., Yokose, T. and Tachibana, T.** 1995 Regulation of growth hormone expression in fetal rat pituitary gland by thyroid or glucocorticoid hormone. *Am. J. Physiol.* 268: 262–267.
- Noramly, S., Freeman, A. and Morgan, B.A.** 1999. Beta-catenin signaling can initiate feather bud development. *Development* 126: 3509-21.
- Nottoli, T., Hagopian-Donaldson, S., Zhang, J., Perkins, A. and Williams, T.** 1998. AP-2-null cells disrupt morphogenesis of the eye, face, and limbs in chimeric mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 13714-9.
- Nussey, S.S. and Whitehead, S.A.** 2001. *Endocrinology: An Integrated Approach*. BIOS Scientific Publishers, Ltd. Oxford, UK:
- Nyirenda, M.J., Lindsay, R.S., Kenyon, C.J., Burchell, A. and Seckl, J.R.** 1998. Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring. *J. Clin. Invest.* 101: 2174-81.

- Oakley, R.H., Jewell, C.M., Judt, M.R., Bofetiado, D.M. and Cidlowski, J.A.** 1999. The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor beta isoform. Specificity and mechanisms of action. *J. Biol. Chem.* 274: 27857-66.
- Ogryzko, V.V., Schiltz, R.L., Russanova, V., Howard, B.H. and Nakatani, Y.** 1996. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 87: 953-9.
- Ohazama, A., Courtney, J.M., Tucker, A.S., Naito, A., Tanaka, S., Inoue, J. and Sharpe, P.T.** 2004a. Traf6 is essential for murine tooth cusp morphogenesis. *Dev. Dyn.* 229: 131-5.
- Ohazama, A., Hu, Y. and Schmidt-Ullrich, R.** 2004b. A dual role for Ikk alpha in tooth development. *Dev. Cell.* 6: 219-227.
- Ohyama, T., Sato, M., Niimi, M., Hizuka, N. and Takahara, J.** 1997. Effects of short- and long-term dexamethasone treatment on growth and growth hormone (GH)-releasing hormone (GRH)-GH-insulin-like growth factor-I axis in conscious rats. *Endocr. J.* 44: 827-35.
- Orange, J.S. and Geha, R.S.** 2003. Finding NEMO: genetic disorders of NFκB activation. *J. Clin. Invest.* 112: 983-985.
- Orth, D.N.** 1978. Metyrapone is useful only as adjunctive therapy in Cushing's disease. *Ann. Intern. Med.* 89: 128-30.
- Otto, C., Reichardt, H.M. and Schutz, G.** 1997. Absence of glucocorticoid receptor-beta in mice. *J. Biol. Chem.* 272: 26665-8.
- Park, J.M., Adam, R.M., Peters, C.A., Guthrie, P.D., Sun, Z., Klagsbrun, M. and Freeman, M.R.** 1999. AP-1 mediates stretch-induced expression of HB-EGF in bladder smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* 277: 294-301.

- Pasparakis, M., Courtois, G., Hafner, M., Schmidt-Supprian, M., Nenci, A., Toksoy, A., Krampert, M., Goebeler, M., Gillitzer, R., Israel, A., Krieg, T., Rajewsky, K. and Haase, I.** 2002. TNF-mediated inflammatory skin disease in mice with epidermis-specific deletion of IKK2. *Nature* 417:861-6.
- Paus, R. and Cotsarelis, G.** 1999. The biology of hair follicles. *N. Engl. J. Med.* 341: 491-7.
- Pazirandeh, A., Xue, Y., Rafter, I., Sjøvall, J., Condal, M. and Okret, S.** 1999. Paracrine glucocorticoid activity produced by mouse thymic epithelial cells. *FASEB J.* 13: 893-901.
- Pérez, P., Page, A., Bravo, A., del Río, M., Gimenez-Conti, I., Budunova, I., Slaga, T.J. and Jorcano, J.L.** 2001. Altered skin development and impaired proliferative and inflammatory responses in transgenic mice overexpressing the glucocorticoid receptor. *FASEB J.* 15: 2030-2.
- Pham-Huu-Trung, M.T., Villette, J.M., Bogyo, A., Duclos, J.M., Fiet, J. and Binoux, M.** 1991. Effects of insulin-like growth factor I (IGF-I) on enzymatic activity in human adrenocortical cells. Interactions with ACTH. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 39: 903-9.
- Philippe, J., Cherifi, M., Fournier, D., Forestier, F. and Salvagnet-Bouccara, A.** 1988. Anhydrotic ectodermal dysplasia. Apropos of a case with severe ocular complications. *J. Fr. Ophthalmol.* 11: 287-92.
- Pinheiro, M. and Freire-Maia N.** 1994. Ectodermal dysplasias: a clinical classification and a causal review. *Am. J. Med. Genet.* 53: 153-62.
- Pinheiro, M. and Freire-Maia, N.** 1979. Christ-Siemens-Touraine syndrome-a clinical and genetic analysis of a large Brazilian kindred: I. Affected females. *Am. J. Med. Genet.* 4: 113-22.
- Pinheiro, M., Ideriha, M.T., Chautard-Freire-Maia, E.A., Freire-Maia, N. and Primo-Parmo, S.L.** 1981. Christ-Siemens-Touraine syndrome. Investigations on two large

Brazilian kindreds with a new estimate of the manifestation rate among carriers. *Hum. Genet.* 57: 428-31.

Pispa, J., Jung, H.S., Jernvall, J., Kettunen, P., Mustonen, T., Tabata, M.J., Kere, J., and Thesleff, I. 1999. Cusp patterning defect in Tabby mouse teeth and its partial rescue by FGF. *Dev. Biol.* 216: 521-534.

Priolo, M., Silengo, M., Lerone, M. and Ravazzolo, R. 2000. Ectodermal dysplasias: not only 'skin' deep. *Clin. Genet.* 58: 415-30.

Puel, A., Picard, C., Ku, C.L., Smahi, A. and Casanova, J.L. 2004. Inherited disorders of NF-kappaB-mediated immunity in man. *Curr. Opin. Immunol.* 16: 34-41.

Purkis, P.E., Steel, J.B., Mackenzie, I.C., Nathrath, W.B.J., Leigh, I.M. and Lane, E.B. 1990. Antibody markers of basal cells in complex epithelia. *J. Cell. Sci* (Pt 1): 39-50.

Radota, N., Komine, M., Jho, S.H., Blumenberg, M. and Tomic-Canic, M. 2000. Novel mechanism of steroid action in skin through glucocorticoid receptor monomers. *Mol. Cell Biol.* 20: 4328-39.

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

Rang, H.P., Dale, M., Ritter, J. and Gardner, P. 1995. *Pharmacology*. Churchill-Livingstone, New York.

Rangarajan, A., Talora, C., Okuyama, R., Nicolas, M., Mammucari, C., Oh, H., Aster, J.C., Krishna, S., Metzger, D., Chambon, P., Miele, L., Aguet, M., Radtke, F. and Dotto, G.P. 2001. Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *Embo J.* 20: 3427-36.

Rao, M.S., Jaszczak, E., and Landis, S.C. 1994. Innervation of footpads of normal and mutant mice lacking sweat glands. *Journal of Comparative Neurology* 346: 613-625.

- Ray, A.K., Marazita, M.L., Pathak R., Beever, C.L., Cooper, M.E., Goldstein, T., Shaw, D.F. and Field, L.L.** 2004. TP63 mutation and clefting modifier genes in an EEC syndrome family. *Clin. Genet.* 66: 217-22.
- Real, J.M., Pearce, P.T., Funder, J.W. and Krozowski, Z.S.** 1989. Type I and type II corticosteroid receptor gene expression in the rat: effect of adrenalectomy and dexamethasone administration. *Mol. Endocrinol.* 3: 1674-80.
- Reichardt, H.M., Kaestner, K.H., Tuckermann, J., Kretz, O., Wessely, O., Bock, R., Gass, P., Schmid, W., Herrlich, P, Angel, P., and Schutz, G.** 1998. DNA binding of the glucocorticoids receptor is not essential for survival. *Cell* 93: 531-541.
- Reichardt, H.M., Tuckermann, J.P., Gottlicher, M., Vujic, M., Weih, F., Angel, P., Herrlich, P. and Schutz, G.** 2001. Repression of inflammatory responses in the absence of DNA binding by the glucocorticoid receptor. *Embo J.* 20: 7168-73.
- Reichardt, H.M., Umland, T., Bauer, A., Kretz, O. and Schutz, G.** 2000. Mice with an increased glucocorticoid receptor gene dosage show enhanced resistance to stress and endotoxic shock. *Mol. Cell Biol.* 20: 9009-17.
- Rentrop, M., Knapp, B., Winter, H. and Schweizer, J.** 1986. Differential location of distinct keratin mRNA-species in mouse tongue epithelium by in situ hybridization with specific cDNA probes. *J. Cell Biol.* 103: 2583-2591.
- Robinson-Rechavi, M., Carpentier, A.S., Duffraisse, M. and Laudet, V.** 2001. How many nuclear hormone receptors are there in the human genome? *Trends Genet.* 17: 554-556.
- Rodini, E.S., Nardi, A., Guion-Almeida, M.L. and Richieri-Costa, A.** 1992. Ectodermal dysplasia, ectrodactyly, clefting, anophthalmia/microphthalmia, and genitourinary anomalies: nosology of Goltz-Gorlin syndrome versus EEC syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 42: 276-80.
- Rodriguez-Puebla, M.L., Robles, A.I., Johnson, D.G. and LaCava, M.** 1998. Synchronized proliferation induced by 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate

treatment of mouse skin: an in vivo model for cell cycle regulation. *Cell Growth & Differentiation* 9: 31-39.

Roelfsema, N.M and Cobben, J.M. 1996. The EEC syndrome: a literature study. *Clin. Dysmorphol.* 5: 115-127.

Roop, D.R., Hawley-Nelson, P., Cheng, C.K. and Yuspa, S.H. 1983. Keratin gene expression in mouse epidermis and cultured epidermal cells. *Proc. Natl. Sci. USA* 80: 716-720.

Roth, S.Y., Denu, J.M. and Allis, C.D. 2001. Histone acetyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* 70: 81-120.

Rouse, C., Siegfried, E., Breer, W. and Nahass, G. 2004. Hair and sweat glands in families with hypohidrotic ectodermal dysplasia: further characterization. *Arch. Dermatol.* 140: 850-5.

Rudolph, D., Yeh, W.C., Wakeham, A., Rudolph, B., Nallainathan, D., Potter, J., Elia, A.J. and Mak, T.W. 2000. Severe liver degeneration and lack of NF-kappaB activation in NEMO/IKK gamma-deficient mice. *Genes Dev.* 14: 854-62.

Rugh, R. 1990. *The Mouse. Its Reproduction and Development.* Ed. Oxford University Press. New York.

Sanchez, E.R., Hirst, M., Scherrer, L.C., Tang, H.Y., Welsh, M.J., Harmon, J.M., Simons, S.S., Ringold, G.M. and Pratt, W.B. 1990. Hormone-free mouse glucocorticoid receptors overexpressed in chinese hamster ovary cells are localized to the nucleus and are associated with both hsp70 and hsp90. *J. Biol. Chem.* 265: 20123-20130.

Scheinman, R.I., Gualberto, A., Jewell, C.M., Cidlowski, J.A. and Baldwin, A.S. Jr. 1995. Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors. *Mol. Cell Biol.* 15: 943-53.

- Schermer, A., Galvin, S. and Sun, T.T.** 1986. Differentiation-related expression of a major 64 kd corneal keratinocytes in vivo and in cultured suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J. Cell Biol.* 103: 49-62.
- Schermer, J., Jester, J.V., Hardy, C., Milano, D. and Sun, T.T.** 1989. Transient synthesis of K6 and K16 keratins in regenerating rabbit corneal epithelium: keratin markers for an alternative pathway of keratinocyte differentiation. *Differentiation* 42: 103-110.
- Schiltz, R.L., Mizzen, C.A., Vassilev, A., Cook, R.G., Allis, C.D. and Nakatani, Y.** 1999. Overlapping but distinct patterns of histone acetylation by the human coactivators p300 and PCAF within nucleosomal substrates. *J. Biol. Chem.* 274: 1189-92.
- Schimmer, B.P. and Parker, K.L.** 1996. ACTH, adrenocortical steroids and their synthetic analogs. In: Godman and Gilman's *Pharmacological Basis of Therapeutics*. Hardman JG, Limbird LE eds. McGraw Hill, New York.
- Schmidt-Suppran, M., Bloch, W., Courtois, G., Addick, K., Israel, A., Rajewsky, K. and Pasparakis, M.** 2000. NEMO/IKK γ -deficient mice model Incontinentia Pigmenti. *Mol. Cell* 5: 981-992.
- Schmidt-Ullrich, R., Aebischer, T., Hulsken, J., Birchmeier, W., Klemm, U. and Scheidereit, C.** 2001. Requirement of NF-kappaB/Rel for the development of hair follicles and other epidermal appendices. *Development* 128: 3843-53.
- Schmidt-Ullrich, R., Memet, S., Lilienbaum, A., Feuillard, J., Raphael, M. and Israel, A.** 1996. NF-kappaB activity in transgenic mice: developmental regulation and tissue specificity. *Development* 122: 2117-2128.
- Schoneshofer, M., Fenner, A. and Claus, M.** 1983. Suppressive effect of metyrapone on plasma corticotrophin immunoreactivity in normal man. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 18: 363-70.

- Schorle, H., Meier, P., Buchert, M., Jaenisch, R. and Mitchell, P.J.** 1996. Transcription factor AP-2 essential for cranial closure and craniofacial development. *Nature* 381: 235-8.
- Schweizer, J., Kinjo, M., Fürstenberg, G. and Winter, H.** 1984. Sequential expression of mRNA-encoded keratin sets in neonatal mouse epidermis: basal cells with properties of terminally differentiating cells. *Cell* 37: 159-170.
- Schweizer, J., Rentrop, M., Nischt, R., Kinjo, M. and Winter, H.** 1988. The intermediate filament system of the keratinizing mouse forestomach epithelium: coexpression of keratins in internal squamous epithelia and of epidermal keratins in differentiating cells. *Cell Tissue Res.* 253: 221-229.
- Seckl, J.R. and Walter, B.R.** 2001. Minireview: 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1- a tissue-specific amplifier of glucocorticoid action. *Endocrinology* 142: 1371-6.
- Sen, R. and Baltimore, D.** 1986 .Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 46: 705-16.
- Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F.R., Krahn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S. and Karin, M.** 2001. Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF κ B signaling pathway. *Science* 293: 1495-1499.
- Shen, H., Wilke, T., Ashique, A.M., Narvey, M., Zerucha, T., Savino, E., Williams, T. and Richman, J.M.** 1997. Chicken transcription factor AP-2: cloning, expression and its role in outgrowth of facial prominences and limb buds. *Dev. Biol.* 188: 248-66.
- Sheppard, K.A., Rose, D.W., Haque, Z.K., Kurokawa, R., McInerney, E., Westin, S., Thanos, D., Rosenfeld, M.G., Glass, C.K. and Collins, T.** 1999. Transcriptional activation by NF-kappaB requires multiple coactivators. *Mol. Cell Biol.* 19: 6367-78.
- Shutte, B. C. and Murray, J. C.** 1999. The many faces and factors of orofacial clefts *Hum. Mol. Genet.* 8: 1853-1859.

- Silverman, N. and Maniatis, T.** 2001. NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev.* 15: 2321-42.
- Slaga, T.J., Budunova, I.V., Gimenez-Conti, I.B. and Aldaz, C.M.** 1996. The mouse skin carcinogenesis model. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 2: 151-156.
- Slauson, D.O. and Cooper, B.J.** 2002. *Mechanisms of Disease. A textbook of Comparative General Pathology.* 3th Ed. Mosby Inc, St. Louis. Missouri, USA.
- Slotkin, T.A., Barnes, G.A., McCook, E.C. and Seidler, F.J.** 1996. Programming of brainstem serotonin transporter development by prenatal glucocorticoids. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 93: 155-61.
- Slotkin, T.A., Seidler, F.J., Kavlock, R.J. and Bartolomé, J.V.** 1991. Fetal dexamethasone exposure impairs cellular development in neonatal rat heart and kidney: effects on DNA and protein in whole tissues. *Teratology* 43: 301-6.
- Slotkin, T.A., Zhang, J., McCook, E.C. and Seidler, F.J.** 1998. Glucocorticoid administration alters nuclear transcription factors in fetal rat brain: implications for the use of antenatal steroids. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 111: 11-24.
- Smahi, A., Courtois, G., Rabia, S.H., Doffinger, R., Bodemer, C., Munnich, A., Casanova, J.L. and Israel, A.** 2002. The NF-kappaB signalling pathway in human diseases: from incontinentia pigmenti to ectodermal dysplasias and immune-deficiency syndromes. *Hum. Mol. Genet.* 11: 2371-5.
- Smith, J.T. and Waddell, B.J.** 2000. Increased Fetal Glucocorticoid Exposure Delays Puberty Onset in Postnatal Life. *Endocrinology* 141: 2422-2428.
- Smoak, K.A. and Cidlowski, J.A.** 2004. Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mech. Ageing. Dev.* 125: 697-706.
- Sofaer, J.A.** 1969. Aspects of the tabby-crinkled-downless syndrome. II. Observations on the reaction to changes of genetic background. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 22: 207-27.

- Sousa, A., Lane, S., Cidlowski, J. and Staynov, D.** 2000. Glucocorticoid resistance in asthma is associated with elevated in vivo expression of the glucocorticoid receptor β isoform. *J. Allergy. Clin. Immun.* 105: 943-50
- Srivastava, A.K., Durmowicz, M.C., Hartung, A.J., Hudson, J., Ouzts, L.V., Donovan, D.M., Cui, C.Y. and Schlessinger, D.** 2001. Ectodysplasin-A1 is sufficient to rescue both hair growth and sweat glands in Tabby mice. *Hum. Mol. Genet.* 10: 2973-81.
- Srivastava, A.K., Pispá, J., Hartung, A.J., Du, Y., Ezer, S., Jenks, T., Shimada, T., Pekkanen, M., Mikkola, M. L., Ko, M. S. H., Thesleff, I., Kere, J. and Schlessinger, D.** 1997. The Tabby phenotype is caused by mutation in a mouse homologue of the EDA gene that reveals novel mouse and human exons and encodes a protein (ectodysplasin-A) with collagenous domains. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 94: 13069-13074.
- Stahl, J., Fulcher, S. and Berkeley, R.** 2000. Corneal subepithelial nodular scarring treated with phototherapeutic keratectomy in a child with Rothmund-Thomson syndrome. *Cornea* 19: 110-5.
- Steinert, P.M. and Liem, R.K.H.** 1990. Intermediate filament dynamics. *Cell* 60: 521-523.
- Steinert, P.M. and Roop, D.R.** 1988. The molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Annu. Rev. Biochem.* 57: 593-625.
- Steinert, P.M., Idler, W.W. and Zimmerman, S.B.** 1976. Self assembly of bovine keratin filaments *in vitro*. *J. Mol. Biol.* 108: 547-567.
- Stenn, K.S. and Paus, R.** 2001. Controls of hair follicle cycling. *Physiol. Rev.* 81: 449-494.
- Stephan, M.J., Smith, D.V., Ponzi, J.W. and Alden, E.R.** 1982. Origin of scalp vertex aplasia cutis. *J. Pediatr.* 101: 850-853.

- Stewart, P.M.** 2003. Tissue-specific Cushing's syndrome, 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases and the redefinition of corticosteroid hormone action. *Eur. J. Endocrinol.* 149: 163-8.
- Stocklin, E., Wissler, M., Gouilleux, F. and Groner, B.** 1996. Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor. *Nature* 383: 726-8.
- Stoler, A., Kopan, R., Duvic, M. and Fuchs, E.** 1988. Use of monospecific antisera and cRNA probes to localize the major changes in keratin expression during normal and abnormal epidermal differentiation. *J. Cell Biol.* 107: 427-446.
- Stoll, C., Alembik, Y., Finck, S. and Janser, B.** 1992. Arthrogryposis, ectodermal dysplasia and other anomalies in two sisters. *Gent. Couns.* 3: 35-39.
- Strauss, J.S., Downing, D.T., Ebling, F.J. and Stewart, M.E.** 1991. Sebaceous glands. In: *Physiology, biochemistry, and molecular biology of the skin.* 2nd ed. Ed. Oxford University Press. New York, pp. 712-740.
- Sun, T.T. and Green, H.** 1978. Keratin filaments in cultured human epidermal cells. *J. Biol. Chem.* 253: 2053-2060.
- Sun, T.T., Eichner, R., Schermer, A., Cooper, D., Nelson, W.G. and Weiss, R.A.** 1984. Classification, expression and possible mechanism of evolution of mammalian epithelial keratins: a unifying model. In: *Cancer cells 1. The transformed phenotype,* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor. New York, pp169-176.
- Sundberg, J. P.** 1994. *Handbook of Mouse Mutations with Skin and Hair Abnormalities.* Ed. Maibach, H. I. Florida.
- Surh, C.D. and Sprent, J.** 1994. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature* 372: 100-3.
- Suster, S. and Rosai, J.** 1997. Thymus. In: *Histology for Pathologists.* 2nd ed. Ed. by Stephen S. Sternberg. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia. New York, pp. 687-706.

- Suzuki, K., Hu, D., Bustos, T., Zlotogora, J., Richieri-Costa, A., Helms, J.A. and Spritz, R.A.** 2000. Mutations of PVRL1, encoding a cell-cell adhesion molecule/herpesvirus receptor, in cleft lip/palate-ectodermal dysplasia. *Nat. Genet.* 25: 427-30.
- Sybert, V.P.** 1989. Scaling skin in the neonate: A clue to the early diagnosis of X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia (Christ-Siemens-Touraine syndrome). *J. Pediatr.* 114: 600-602.
- Tak, H. and LeBarnes, P.** 1996. Molecular mechanisms of steroid action in asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 97: 159-68.
- Takahashi, L.K.** 1998. Prenatal stress: consequences of glucocorticoids on hippocampal development and function. *Int .J. Dev. Neurosci.* 16: 199-207.
- Takeda, K., Takeuchi, O., Tsujimura, T., Itami, S., Adachi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Yoshikawa, K., Terada, N. and Akira, S.** 1999. Limb and skin abnormalities in mice lacking IKK α . *Science* 284: 313-6.
- Tani, H., Morris, R.J. and Kaur, P.** 2000. Enrichment for murine keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 10960-65.
- Tao, Y., Williams-Skipp, C. and Scheinman, R.I.** 2001. Mapping of glucocorticoid receptor DNA binding domain surfaces contributing to transrepression of NF-kappa B and induction of apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276: 2329-32.
- Taylor, G., Lehrer, M.S., Jensen, P.J., Sun, T.T. and Lavker, and R.M.** 2000. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell* 102: 451-61.
- Teelucksingh, S., Mackie, A.D., Buró, D., McIntyre, M.A., Brett, L. and Edwards, C.R.** 1990. Potentiation of hydrocortisone activity in skin by glycyrrhetic acid. *Lancet* 335: 1060-3.

- Tesoriere, G., Vento, R., Taibi, G., Calvaruso, G. and Schiavo, M.R.** 1989. Biochemical aspects of chick embryo retina development: the effects of glucocorticoids. *J. Neurochem.* 52: 1487-94.
- Thesleff, I. and Mikkola, M.** 2002. The role of growth factors in tooth development. *Int. Rev. Cytol.* 217: 93-135.
- Tijmes, N.T., Zaal, M.J., De Jong, P.T. and Volker-Dieben, H.J.** 1997. Two families with dyshidrotic ectodermal dysplasia associated with ingrowth of corneal vessels, limbal hair growth, and Bitot-like conjunctival anomalies. *Ophthalmic. Genet.* 18: 185-92.
- Tomlinson, J.W., Walter, E.A., Bujalska, I.J., Draper, N., Lavery, G.G., Cooper, M.S., Hewison, M. and Stewart, P.M.** 2004. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a tissue-specific regulator of glucocorticoid response. *Endocr. Rev.* 25: 831-66.
- Torchia, J., Rose, D.W., Inostroza, J., Kamei, Y., Westin, S., Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G.** 1997. The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature* 387: 6 77-84.
- Tronche, F., Kellendonk, C., Kretz, O., Gass, P., Anlag, K., Orban, P.C., Bock, R., Klein, R. and Schutz, G.** 1999. Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat. Genet.* 23: 99-103.
- Tronche, F., Kellendonk, C., Reichardt, H.M. and Schutz, G.** 1998. Genetic dissection of glucocorticoid receptor function in mice. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8: 532-8.
- Tschanz, S.A., Makanya, A.N., Haenni, B. and Burri, P.H.** 2003. Effects of neonatal high-dose short-term glucocorticoid treatment on the lung: a morphologic and morphometric study in the rat. *Pediatr. Res.* 53: 72-80.
- Tucker, A.S. and Lumsden, A.** 2004a. Neural crest cells provide species-specific patterning information in the developing branchial skeleton. *Evol. Dev.* 6: 32-40.

- Tucker, A.S., Headon, D.J. and Courtney, J.M.** 2004b. The activation level of the TNF family receptor, Edar, determines cusp number and tooth number during tooth development. *Dev. Biol.* 268: 185-194.
- Tucker, A.S., Headon, D.J. and Schneider, P.** 2000. Edar/Eda interactions regulate enamel knot formation in tooth morphogenesis. *Development* 127: 4691-4700.
- Tucker, A.S., Matthews, K.L. and Sharpe, P.T.** 1998. Transformation of tooth type induced by inhibition of BMP signaling. *Science* 282: 1136-8.
- Tuckermann, J.P., Reichardt, H.M., Arribas, R., Richter, K.H., Schutz, G. and Angel, P.** 1999. The DNA-binding-independent function of the glucocorticoid receptor mediates repression of AP-1-dependent genes in skin. *J. Cell Biol.* 147: 1365–1370.
- Urmacher, C.D.** 1997. Normal Skin in: *Histology for Pathologists*. 2nd ed., chapter 2. Ed. Lippincott-Raven. Philadelphia, pp. 25-45.
- Van Vugt, D.A., Piercy, J., Farley, A.E., Reid, R.L. and Rivest, S.** 1997. Luteinizing hormone secretion and corticotropin-releasing factor gene expression in the paraventricular nucleus of rhesus monkeys following cortisol synthesis inhibition. *Endocrinology* 138: 2249-58.
- Vanden Berghe, W., De Bosscher, K., Boone, E., Plaisance, S. and Haegeman, G.** 1999. The nuclear factor-kappaB engages CBP/p300 and histone acetyltransferase activity for transcriptional activation of the interleukin-6 gene promoter. *J. Biol. Chem.* 274: 32091-8.
- Vanderbilt, J.N., Miesfeld, R., Maler, B.A. and Yamamoto, K.R.** 1987. Intracellular receptor concentration limits glucocorticoid-dependent enhancer activity. *Mol. Endocrinol.* 1: 68-74.
- VanMuijen, G.N.P., Ruiter, D.J. and Franke, W.W.** 1986. Cell type heterogeneity of cytokeratin expression in complex epithelia and carcinomas as demonstrated by monoclonal antibodies specific for cytokeratins nos. 4 and 13. *Exp. Cell Res.* 162: 97-113.

- Vargas, G.A., Fantino, E., George-Nascimento, C., Gargus, J.J. and Haigler, H.T.** 1996. Reduced epidermal growth factor receptor expression in hypohidrotic ectodermal dysplasia and Tabby mice. *J. Clin. Invest.* 97: 2426-2432.
- Verma, U.N., Yamamoto, Y., Prajapati, S. and Gaynor, R.B.** 2004. Nuclear role of I kappa B Kinase-gamma/NF-kappa B essential modulator (IKK gamma/NEMO) in NF-kappa B-dependent gene expression. *J. Biol. Chem.* 279: 3509-15.
- Vlaeminck-Guillem, V., Laudet, V. and Duterque-Coquillaud, M.** 2003. Negative cross-talk between nuclear receptors and transcription factors: implications in inflammation and oncogenesis. *Med. Sci. (Paris)* 19: 1121-7.
- Wagoner, M.D.** 1997. Chemical injuries of the eye: current concepts in pathophysiology and therapy. *Surv. Ophthalmol.* 41: 275-313.
- Wallis, C.E and Beighton, P.** 1992. Ectodermal dysplasia with blindness in sibs on the island of Rodrigues. *J. Med. Genet.* 29: 323-325.
- Warnes, K.E., McMillen, I.C., Robinson, J.S. and Coulter, C.L.** 2004a. Differential actions of metyrapone on the fetal pituitary-adrenal axis in the sheep fetus in late gestation. *Biol. Reprod.* 71: 620-8.
- Warnes, K.E., McMillen, I.C., Robinson, J.S. and Coulter, C.L.** 2004b. Metyrapone infusion stimulates adrenal growth without activating the cell cycle or the IGF system in the late gestation fetal sheep. *Endocr. Res.* 30: 535-9.
- Watt, F.M.** 1989. Terminal differentiation of epidermal keratinocytes. *Curr. Op. Cell Biol.* 1: 1107-1115.
- Watt, F.M. and Hogan, B.L.** 2000. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 287: 1427-30.

- Webster, J.C., Oakley, R.H., Jewell, C.M. and Cidlowski, J.A.** 2001. Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative beta isoform: a mechanism for the generation of glucocorticoid resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 6865-70.
- Wei, Z.G., Cotsarelis, G., Sun, T.T. and Lavker, R.M.** 1995. Label-retaining cells are preferentially located in fornical epithelium: implications on conjunctival epithelial homeostasis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 36: 236-46.
- Wessells, N.K.** 1965. Morphology and proliferation during early feather development. *Dev. Biol.* 12: 131-53.
- West-Mays, J.A, Zhang, J., Nottoli, T., Hagopian-Donaldson, S., Lobby, D., Strissel, K.J. and Williams, T.** 1999. AP-2alpha transcription factor is required for early morphogenesis of the lens vesicle. *Dev. Biol.* 206: 46-62.
- White, P.C., Mune, T. and Agarwal, A.K.** 1997. 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase and the syndrome of apparent mineralocorticoid excess. *Endocr. Rev.* 18: 135-56.
- Widen, C., Gustafsson, J.A. and Wikstrom, A.C.** 2003. Cytosolic glucocorticoid receptor interaction with nuclear factor-kappa B proteins in rat liver cells. *Biochem J.* 373: 211-20.
- Williams, T., Admon, A., Lüscher, B. and Tjian, R.** 1988. Cloning and expression of AP-2, a cell-type-specific transcription factor that activates inducible enhancer elements. *Genes Dev.* 2: 1557-1569
- Wong, F.K. and Hagg, U.** 2004. An update on the aetiology of orofacial clefts. *Hong Kong Med. J.* 10: 331-6.
- Yamamoto, Y. and Gaynor, R.B.** 2004. I κ B kinases: key regulators of the NF κ B pathway. *Trends in biochemical Sciences* 29: 72-79.

- Yamamoto, Y., Verma, U.N., Prajapati, S., Kwak, Y.T. and Gaynor, R.B.** 2003. Histone H3 phosphorylation by IKK-alpha is critical for cytokine-induced gene expression. *Nature* 423: 655-9.
- Yamaoka, S., Courtois, G., Bessia, C., Whiteside, S.T., Weil, R., Agou, F., Kirk, H.E., Kay, R.J. and Israel, A.** 1998. Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell* 93: 1231-40.
- Yan, M.H., Wang, L.C., Hymowitz, S.G., Schilbach, S., Lee, J., Goddard, A., de Vos, A.M., Gao, W.Q. and Dixit, V.M.** 2000. Two-amino acid molecular switch in an epithelial morphogen that regulates binding to two distinct receptors. *Science* 290: 523-527.
- Yang, A., Kaghad, M., Wang, Y., Gillett, E., Fleming, M.D., Dotsch, V., Andrews, N.C., Caput, D. and McKeon, F.** 1998. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol. Cell* 2: 305-316.
- Yang, A., Schweitzer, R., Sun, D., Kaghad, M., Walker, N., Bronson, R.T., Tabin, C., Sharpe, A., Caput, D., Crum, C. and McKeon, F.** 1999. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* 398: 714-8.
- Yang, X.J., Ogryzko, V.V., Nishikawa, J., Howard, B.H. and Nakatani, Y.** 1996. A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* 382: 319-24.
- Yang-Yen, H.F., Chambard, J.C., Sun, Y.L., Smeal, T., Schmidt, T.J., Drouin, J. and Karin, M.** 1990. Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* 62: 1205-15.

- Yao, X.L., Cowan, M.J., Gladwin, M.T., Lawrence, M.M., Angus, C.W. and Shelhamer, J.H.** 1999. Dexamethasone alters arachidonate release from human epithelial cells by induction of p11 protein synthesis and inhibition of phospholipase A2 activity. *J. Biol. Chem.* 274: 17202-8.
- Yates, S. and Rayner, T.E.** 2002. Transcription factor activation in response to cutaneous injury: role of AP-1 in reepithelialization. *Wound Repair Regen.* 10: 5–15.
- Yilmaz, Z.B., Weih, D.S., Sivakumar, V. and Weih, F.** 2003. RelB is required for Peyer's patch development: differential regulation of p52-RelB by lymphotoxin and TNF. *Embo J.* 22: 121-30.
- Yoshida, K., Hu, Y. and Karin, M.** 2000. IkappaB kinase alpha is essential for development of the mammalian cornea and conjunctiva. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41: 3665-9.
- Zenz, R., Scheuch, H., Martin, P., Frank, C., Eferl, R., Kenner, L., Sibilica, M. and Wagner, E.F.** 2003. c-Jun regulates eyelid closure and skin tumor development through EGFR signaling. *Dev. Cell* 4: 879–889.
- Zhang, Y., Zhang, Z. and Zhao, X.** 2000. A new function of BMP4: dual role for BMP4 in regulation of Sonic hedgehog expression in the mouse tooth germ. *Development* 127: 1431-43.
- Zonana, J., Elder, M.E., Schneider, L.C., Orlow, S.J., Moss, C., Golabi, M., Shapira, S.K., Farndon, P.A., Wara, D.W., Emmal, S.A. and Ferguson, B.M.** 2000. A novel X-linked disorder of immune deficiency and hypohidrotic ectodermal dysplasia is allelic to incontinentia pigmenti and due to mutations in IKK-gamma (NEMO). *Am. J. Hum. Genet.* 67: 1555-62.
- Zonana, J., Gault, J., Davies, K. J. P., Jones, M., Browne, D., Litt, M., Brockdorff, N., Rastan, S., Clarke, A. and Thomas, N. S. T.** 1993. Detection of a molecular deletion at the DXS732 locus in a patient with X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia (EDA), with the identification of a unique junctional fragment. *Am. J. Hum. Genet.* 52: 78-84.

Zonana, J., Schnizel, A., Upadhyaya, M., Thomas, N. S. T., Anton-Lamprecht, I. and Harper, P. S. 1990. Prenatal diagnosis of X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia by linkage analysis. *Am. J. Med. Genet.* 35: 132-135.

Zouboulis, C.C. 2000. Human skin: an independent peripheral endocrine organ. *Horm. Res.* 54: 230-42.