



VNIVERSITAT
D^E VALÈNCIA

Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Inactivación selectiva del receptor de
glucocorticoides en la epidermis de ratón.
Defectos en el desarrollo y cáncer de piel.

Trabajo original presentado para optar al grado de doctor en
Biotecnología por la Universidad de Valencia
Valencia, 2014

Firmado: Víctor Latorre Roselló

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

Firmado: Paloma Pérez Sánchez

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

SAF2008-00540

SAF2011-28115

Víctor Latorre Roselló ha disfrutado de una beca predoctoral FPI (BES-2009-021944) otorgada por el Ministerio de Ciencia e Innovación, asociada al proyecto SAF2008-00540.

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

Agradecimientos

Durante este tiempo he compartido laboratorio con muchas personas que, de alguna manera, han participado en esta tesis y que, por tanto, merecen su reconocimiento.

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a mi directora, la Dra. Paloma Pérez. Gracias por darme la oportunidad de realizar mi tesis doctoral, por la ayuda y la guía durante estos años.

También me gustaría agradecer a los Doctores Ángel Ramírez y José Luis Jorcano por la cesión de los ratones K5-Cre, al Profesor Günther Schütz por los ratones GR^{lox/lox} y al Dr. Ian Mills por acogerme en su laboratorio durante mi estancia y por su ayuda con los experimentos de ChIP-sequencing.

En este tiempo he compartido laboratorio con muchas personas, de las cuales he intentado aprender lo máximo posible. Son muchos los que han pasado por aquí, pero he de agradecer especialmente a quienes han compartido más tiempo conmigo y me han hecho pasar buenos momentos. Gracias a Ana, Fátima, José, Julia, Lisa y Lorena.

Por supuesto, también agradecer a mi familia por el apoyo durante estos años de tesis, que a veces parecía que no acaba de escribir. Por último, pero no por ello menos importante, quiero dar las gracias a Marta por apoyarme, escucharme, aconsejarme y soportarme, que no es poco.

Todos formáis parte de esta tesis. Gracias.

Abreviaturas

ACTH	<i>Adrenocorticotropin Hormone</i>	Hormona adrenocorticotropina
AD	<i>Atopic Dermatitis</i>	Dermatitis atópica
AKT/PKB	<i>Protein Kinase B</i>	Proteína quinasa B
AP-1	<i>Activator Protein 1</i>	Proteína activadora 1
BrdU	<i>5-Bromo-2-deoxyuridine</i>	5-Bromo-2-desoxiuridina
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>	Seroalbúmina bovina
CRH	<i>Corticotropin-releasing hormone</i>	Hormona liberadora de corticotropina
DAPI	<i>4'-6-Diamidino-2-phenylindole</i>	4'-6-diamino-2-fenilindol
DBD	<i>DNA Binding Domain</i>	Dominio de unión a DNA
Dex	<i>Dexamethasone</i>	Dexametasona
DMBA	<i>7,12-Dimethylbenz(a)anthracene</i>	7,12-Dimetilbenz(a)antraceno
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>	Ácido desoxirribonucleico
E	<i>Embryonary</i>	Embrionario
EDC	<i>Epidermal Differentiation Complex</i>	Complejo de diferenciación epidérmica
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EOB	<i>Eyelid Open at Birth</i>	Ojo abierto al nacer
ERK	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>	Quinasa regulada por señales extracelulares
EMT	<i>Epithelial Mesenchymal Transition</i>	Transición epitelio mesénquima
FDR	<i>False Discovery Rate</i>	Tasa de falsos positivos
GCs	<i>Glucocorticoids</i>	Glucocorticoides
GR	<i>Glucocorticoid Receptor</i>	Receptor de glucocorticoides
GRE	<i>Glucocorticoid Response</i>	Elementos de respuesta a

	<i>Elements</i>	glucocorticoides
h	<i>Hour</i>	Hora
H-E	<i>Hematoxylin-Eosin</i>	Hematoxilina-eosina
HPA	<i>Hypothalamic-pituitary-adrenal axis</i>	Eje hipotálamo-pituitaria- adrenales
HSD11 β 1	<i>Hydroxisteroid 11-β dehydrogenase 1</i>	11 β hidroxiesteroide deshidrogenasa 1
HSD11 β 2	<i>Hydroxisteroid 11-β dehydrogenase 2</i>	11 β hidroxiesteroide deshidrogenasa 2
IL	<i>Interleukin</i>	Interleuquina
IRnGRE	<i>Inverted Repeated negative GRE</i>	GRE negativo con elementos repetidos invertidos
JNK	<i>Jun N-terminal Kinase</i>	Quinasa N-terminal de c-Jun
K	<i>Keratin</i>	Queratina
LBD	<i>Ligand Binding Domain</i>	Dominio de unión a ligando
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>	Proteína quinasa activada por mitógenos
MPKs	<i>Mouse Primary Keratinocytes</i>	Queratinocitos primarios de ratón
MR	<i>Mineralocorticoid Receptor</i>	Receptor de mineralocorticoides
NF- κ B	<i>Nuclear Factor kappa B</i>	Factor nuclear kappa B
nGREs	<i>Negative GRE</i>	GRE negativo
NTD	<i>N-Terminal Transactivation Domain</i>	Dominio de transactivación N- terminal
P	<i>Postpartum</i>	Post-parto/Post-natal
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>	Tampón fosfato salino
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>	Reacción en cadena de la polimerasa
PFA	<i>Paraformaldehyde</i>	Paraformaldehído
PI3K	<i>Phosphatidyl Inositol 3 Kinase</i>	Fosfatidil inositol 3 quinasa

PMA		
qRT-PCR	<i>Quantitative Real Time PCR</i>	PCR cuantitativa a tiempo real
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>	Ácido ribonucleico
RT	<i>Room Temperature</i>	Temperatura ambiente
SCC	<i>Squamous Cell Carcinoma</i>	Cáncer de células escamosas
TA	<i>Transactivation function</i>	Función de transactivación
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>	Factor de necrosis tumoral- alpha
TR	<i>Transrepression function</i>	Función de transrepresión
WB	<i>Western Blot</i>	Western Blot
WT	<i>Wild Type</i>	Cepa silvestre

Índice general

Introducción

1. Los glucocorticoides (GCs)	1
1.1 Síntesis extra-adrenal de GCs	4
1.2 Uso terapéutico de los GCs	5
2. El receptor de glucocorticoides (GR)	6
2.1 Estructura de GR	7
2.2 Polimorfismos de GR	9
2.3 Modificaciones post-traduccionales de GR	10
3. Mecanismos moleculares de acción de GR	11
3.1 Mecanismos dependientes de la unión de GR al DNA	12
3.2 Mecanismos independientes de la unión de GR al DNA	13
3.2.1 Interacción entre GR y NF- κ B	14
3.2.2 Interacción de GR con la vía de las MAPK	15
3.2.3 Interacción de GR con AP-1	18
3.2.4 Interacción de GR con la vía de STATs	20
3.3 Acciones no genómicas de GR	21
4. La piel	22
4.1 Desarrollo de la epidermis de ratón	25
4.2 Patologías cutáneas inflamatorias	27

4.2.1 Dermatitis atópica	28
4.2.2 Psoriasis	28
4.3 Carcinogénesis de piel	29
4.3.1 Transición epitelio mesénquima	32
5. Modelos animales para el estudio funcional de GR en epidermis	33
Objetivos	39
Materiales y métodos	
1. Experimentación animal	43
1.1 Líneas de ratones transgénicos K5-Cre y GR ^{lox/lox}	44
1.2 Obtención del DNA genómico	45
1.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	46
2. Obtención de muestras para el análisis histopatológico y bioquímico	47
2.1 Obtención de muestras para el análisis histológico	48
2.1.1 Tinción con Hematoxilina-Eosina	48
2.1.2 Análisis inmunohistoquímico	49
2.1.3 Inmunohistoquímica anti-BrdU	51
2.2 Tinción de lípidos mediante Rojo Nilo	51
2.3 Tinción con azul de toluidina para mastocitos	52
2.4 Análisis de la apoptosis <i>in vivo</i> mediante TUNEL	52

2.5 Tinción <i>whole mount</i> de epidermis de cola	53
3. Microscopía electrónica de transmisión	53
4. Ensayo de permeabilidad de barrera con azul de toluidina	54
5. Extracción de proteínas totales	55
5.1 Electroforesis y transferencia	56
5.2 Bloqueo, incubación y revelado	57
6. Extracción de RNA	59
6.1 Síntesis de cDNA (transcripción reversa)	59
6.2 PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)	60
7. Microarrays de expresión	62
8. Tratamientos tópicos	62
8.1 Tratamiento con PMA y Dexametasona	62
8.2 Tratamiento con SDS	63
9. Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)	63
9.1 ChIP-sequencing	66
10. Protocolo de carcinogénesis química en dos pasos	67
10.1 Mutaciones en el gen <i>Hras</i>	69
11. Aislamiento y cultivo de queratinocitos primarios de ratón	70
12. Generación de líneas celulares de queratinocitos adultos	71
12.1 Análisis mediante inmunofluorescencia	73
13. Análisis estadístico	74

Resultados

1. Generación y análisis del fenotipo de los ratones con inactivación específica de GR en queratinocitos (GR ^{EKO})	77
1.1 Generación de los ratones GR ^{EKO}	77
1.2 Análisis de la función de barrera epidérmica en ratones GR ^{EKO}	80
1.3 Análisis histopatológico de la piel de ratones GR ^{EKO} durante el desarrollo	82
1.3.1 Análisis de la diferenciación epidérmica en los ratones GR ^{EKO} recién nacidos	88
1.3.2 Estudio <i>in vivo</i> de la proliferación y apoptosis de los queratinocitos GR ^{EKO}	91
2. Análisis transcriptómico de la epidermis de los ratones GR ^{EKO} recién nacidos	93
3. Alteraciones en vías de señalización en la piel de ratones GR ^{EKO}	99
4. Análisis del fenotipo de los ratones GR ^{EKO} adultos	103
4.1 Respuesta de los ratones GR ^{EKO} a distintos tratamientos tópicos	105
4.2 Los ratones GREKO son más susceptibles al protocolo de carcinogénesis de piel	110
4.2.1 Aparición y desarrollo de tumores cutáneos (papilomas)	112
4.2.2 Formación de tumores sebáceos y focos melanocíticos	121
4.3 Generación de líneas celulares de queratinocitos a partir de ratones adultos	125

5. Identificación mediante ChIP-sequencing de genes que son dianas transcripcionales directas de GR	129
---	-----

Discusión

1. GR durante el desarrollo epidérmico embrionario	137
1.1 La inactivación específica de GR en la epidermis resulta en la formación de una barrera epidérmica defectiva	138
1.2 GR regula la proliferación de los queratinocitos <i>in vivo</i> de manera autónoma-celular	142
1.3 Aumento de la señalización mediada por ERK, AKT y STAT3 en la epidermis de los ratones GR ^{EKO}	143
1.4 Análisis del perfil transcriptómico de los ratones GR ^{EKO}	146
2. Los defectos en la función de barrera condicionan el desarrollo de enfermedades cutáneas: los ratones GR ^{EKO} como modelo de AD y psoriasis	151
3. Papel de GR en piel durante la edad adulta	154
3.1 Papel de GR durante la respuesta inflamatoria	156
3.2 GR en la carcinogénesis de la piel	158
3.2.1 La deficiencia de GR en queratinocitos en cultivo desencadena un fenotipo parcial de transición epitelio mesénquima	162

Conclusiones	167
---------------------	-----

Anexo	171
--------------	-----

Bibliografía	183
---------------------	-----

Introducción

1. Los glucocorticoides (GCs)

Los glucocorticoides (GCs) son hormonas esteroideas que se sintetizan y secretan en las glándulas adrenales como respuesta a señales de estrés externas y cuya síntesis está regulada por el eje hipotálamo-pituitaria-adrenales (HPA) (Taves *et al.*, 2011). Los GCs, cortisol en humanos y corticosterona en ratones, regulan numerosos procesos fisiológicos como el metabolismo de glucosa y lípidos, la respuesta inflamatoria e inmune, el desarrollo fetal y la proliferación y supervivencia celular. Además, son importantes para la maduración de órganos como el pulmón, el riñón y la epidermis entre otros (Gross y Cidlowski, 2008; Pérez, 2011). Se suele tratar con GCs a las mujeres embarazadas con riesgo de tener bebés prematuros, para así acelerar la maduración pulmonar (Morrison *et al.*, 2012).

En respuesta a las señales de estrés, el hipotálamo secreta la hormona liberadora de corticotropina (CRH), que estimula la síntesis de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) en la glándula pituitaria anterior. Ésta, a su vez, induce la síntesis de cortisol en el córtex adrenal (figura 1). El cortisol, una vez liberado, actúa a través de dos tipos de receptores: el receptor de glucocorticoides (GR) y el receptor de mineralocorticoides (MR).

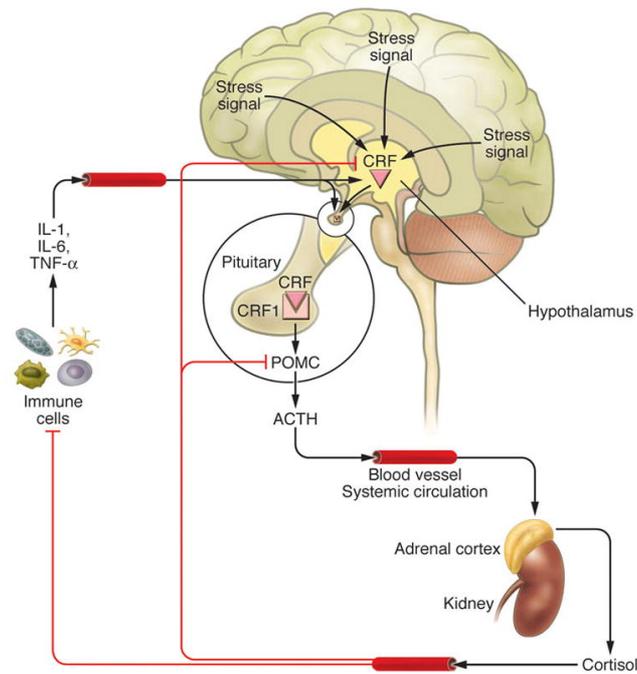


Figura 1. Esquema de la síntesis de glucocorticoides y su regulación por el eje hipotálamo-pituitaria-adrenales (HPA). Modificada de Slominski *et al.*, 2008.

GR regula la síntesis de su propio ligando a través de un mecanismo de retroalimentación negativo a nivel de hipotálamo y pituitaria anterior (Nieuwenhuizen y Rutters, 2008). De hecho, los ratones deficientes en GR presentan alteraciones en el eje HPA, debido a la falta de inhibición de dicho eje mediada por GR (Cole *et al.*, 1995). Además, la importancia funcional de GR en el pulmón queda demostrada en los ratones deficientes en GR, que mueren a las pocas horas después de nacer debido a problemas en la surfactación alveolar pulmonar (Cole *et al.*, 1995).

La concentración plasmática de los GCs excede aproximadamente 100 veces la concentración del mineralocorticoide aldosterona. Además, los GCs presentan una mayor afinidad relativa hacia MR que hacia GR, de forma que *a priori* se favorece la formación de complejos MR-GCs (Odermatt y Atanasov, 2009). Existen 2 enzimas claves en la regulación de la acción de los GCs a nivel de pre-receptor, denominadas 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa 1 y 2 (HSD11B1 y HSD11B2). Su expresión y regulación es muy importante dado que modulan la accesibilidad de GR y MR a los GCs. La HSD11B1 convierte la cortisona inactiva en cortisol activo, mientras que la HSD11B2 cataliza el paso contrario. Así, la HSD11B2 se encuentra principalmente en tejidos que responden a mineralocorticoides con objeto de prevenir la activación ilícita de MR por el exceso de GCs circulante, permitiendo en cambio el acceso de mineralocorticoides a MR; estos mecanismos son específicos de tipo celular (Quinkler y Stewart, 2003).

El eje HPA se caracteriza por seguir un ritmo circadiano, con niveles oscilantes de producción de ACTH y corticoides. En condiciones fisiológicas normales los corticosteroides se secretan siguiendo un ritmo circadiano y ultradiano (de alta frecuencia). Esta secreción, a pulsos, conduce a una regulación transcripcional cíclica en la que GR se une y libera del DNA rápidamente, siguiendo los pulsos de secreción (Stavreva *et al.*, 2009; Walker *et al.*, 2012).

1.1 Síntesis extra-adrenal de GCs

Tradicionalmente se ha pensado que los GCs se sintetizaban únicamente en la corteza adrenal. Sin embargo, la síntesis de GCs no sólo se da a nivel del eje HPA sino que también tiene lugar en otros tipos celulares, incluyendo los queratinocitos (Taves *et al.*, 2011).

La piel (humana y de roedores) expresa los genes necesarios para crear un eje HPA completo, funcional y equivalente al mencionado anteriormente. Así pues, la piel funciona como un órgano neuroendocrino capaz de sintetizar y secretar CRH, ACTH y cortisol (en humanos) o corticosterona (en roedores), así como de regular estos procesos mediante mecanismos de retroalimentación negativa (Slominski *et al.*, 2008; Slominski *et al.*, 2012). Recientemente se ha visto que los queratinocitos son capaces de sintetizar cortisol, así como las enzimas HSD11B1 y HSD11B2 (Cirillo y Prime, 2011).

La piel, al ser el órgano más externo, es el más expuesto a las agresiones del medio (daño mecánico, radiaciones o patógenos). Dichas agresiones inducen la síntesis de CRH y aumentan la síntesis de ACTH y de GCs en la piel; además, se produce una respuesta inflamatoria, con aumento de la síntesis de las citoquinas IL-1 β y TNF α , que a su vez estimula la producción de ACTH y de GCs (figura 2) (Taves *et al.*, 2011). La expresión de todos los genes necesarios para la síntesis local de GCs en la piel sugiere que defectos en dicha síntesis podrían contribuir a la patogénesis observada en las distintas enfermedades cutáneas (Talabér *et al.*, 2013).

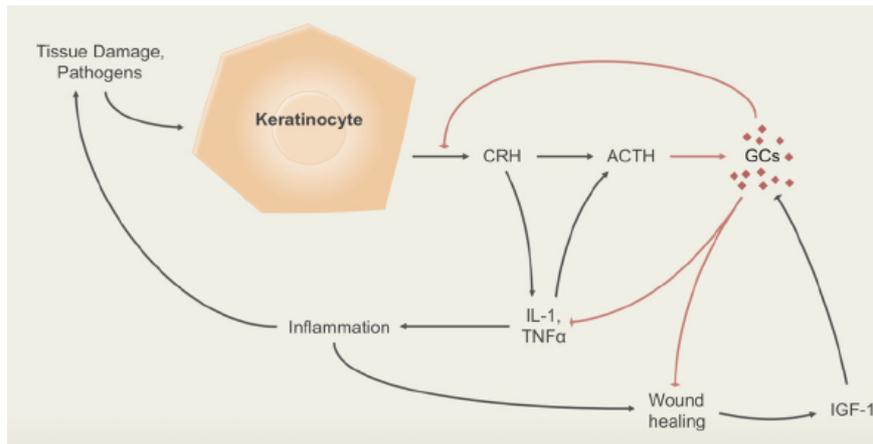


Figura 2. Esquema del eje HPA en la piel. Los queratinocitos expresan los componentes del eje necesarios para la síntesis local de glucocorticoides. Tomada de Taves *et al.*, 2011.

1.2 Uso terapéutico de los GCs

Además de las funciones básicas fisiológicas anteriormente descritas, los análogos de los GCs son los compuestos más prescritos como tratamiento en clínica por sus propiedades anti-inflamatorias, anti-proliferativas e inmunosupresoras. También es frecuente su uso como tratamiento en enfermedades cutáneas y como co-adyuvante en tratamientos de quimioterapia, especialmente en casos de leucemia, dadas sus propiedades anti-proliferativas y pro-apoptóticas en células T (Tissing *et al.*, 2003).

Sin embargo, los GCs no son selectivos y su uso prolongado causa muchos efectos adversos no deseados, como inmunosupresión, hiperglucemia, diabetes, obesidad, glaucoma y osteoporosis, entre otros (Schäcke *et al.*, 2002). En la piel, los efectos secundarios más

frecuentes tras un tratamiento prologando son la atrofia cutánea, el retraso en la cicatrización y la dermatitis (Hengge *et al.*, 2006). Además, un aumento o disminución en la síntesis de GCs produce, entre otras, alteraciones cutáneas. Los pacientes con síndrome de Cushing (OMIM: 219080), con exceso de ACTH y cortisol, presentan atrofia cutánea, siendo la piel más fina, brillante y frágil (Davidovici *et al.*, 2008). En los pacientes con la enfermedad de Addison (OMIM: 240200), con deficiencia de cortisol, se observa una hiperpigmentación de la piel, causada por el incremento de la hormona ACTH (Nieman y Chanco, 2006; Patel *et al.*, 2011).

Desde el punto de vista del tratamiento clínico, es importante poder separar los efectos beneficiosos de los GCs de los adversos. Por ello, resulta fundamental identificar nuevas dianas terapéuticas para el diseño y desarrollo de nuevos fármacos más específicos o terapias combinadas que eliminen los efectos secundarios de los GCs.

2. El receptor de glucocorticoides (GR)

Los GCs ejercen su función a través del denominado receptor de glucocorticoides (GR). GR es un factor de transcripción dependiente de ligando que se expresa de manera ubicua y pertenece a la superfamilia de receptores hormonales nucleares (NHR). Esta superfamilia también incluye los receptores de mineralocorticoides (MR), progesterona, andrógenos y estrógenos (Gronemeyer *et al.*, 2004).

2.1 Estructura de GR

El receptor de glucocorticoides está codificado por un único gen (*Nr3c1*), localizado en el cromosoma 5q31-32 en humanos y en el cromosoma 18 B3 en ratones, compuesto por 9 exones (figura 3a) (Lu y Cidlowski, 2006). Existen múltiples isoformas y variantes, obtenidas por *splicing* alternativo y sitios alternativos de inicio de la traducción respectivamente. Las dos isoformas mejor caracterizadas, GR α y GR β , se obtienen por *splicing* alternativo. GR α es la isoforma mayoritaria, la más abundante y capaz de unir ligando. Por otra parte, GR β es menos abundante y no es capaz de unir ligando, sin embargo se ha postulado que actúa como dominante negativo de GR α (Nicolaidis *et al.*, 2010). La expresión de GR β se incrementa de manera selectiva a través de citoquinas pro-inflamatorias (Webster *et al.*, 2001). Aunque los factores que controlan la expresión de GR β no se conocen en profundidad, se sabe que elevados niveles de esta isoforma se asocian con una resistencia a los GCs en distintas enfermedades inflamatorias, tales como el asma y la artritis reumatoide entre otras (Lewis-Tuffin y Cidlowski, 2006).

En este trabajo denominaremos GR a GR α . A nivel de proteína, GR puede dividirse en 3 dominios funcionales (figura 3b):

- Dominio de transactivación N-terminal (*N-Terminal Transactivation Domain*, NTD): contiene la función de activación 1 (AF-1), independiente de la unión a ligando, importante para la transcripción y la unión a la maquinaria transcripcional. Además, es la principal región que contiene las modificaciones post-traduccionales (Kumar y Thompson, 2003).

- Dominio de unión al DNA (*DNA Binding Domain*, DBD): está altamente conservado entre especies. Está compuesto por 2 dedos de zinc responsables de la dimerización del receptor y de la unión al DNA, a secuencias específicas denominadas elementos de respuesta a glucocorticoides (*Glucocorticoid Response Element*, GRE). En el primer dedo de zinc se localiza la caja P, responsable de la unión a las secuencias GRE. En el segundo se encuentra la caja D, encargada de estabilizar la unión y de la dimerización del receptor (Kumar y Thompson, 1999).
- Dominio de unión a ligando (*Ligand Binding Domain*, LBD): está formado por 12 hélices α y 4 hojas β que forman un bolsillo hidrofóbico para la unión de los GCs. Contiene la función de activación 2 (AF-2), que interacciona con co-reguladores de manera dependiente de ligando. Además, se encarga de la unión a proteínas de choque térmico (*Heat shock proteins*, Hsp) (Bledsoe *et al.*, 2002).
- Entre el DBD y el LBD existe una región bisagra (*Hinge*, H) que contiene la señal de localización nuclear (*Nuclear Localization Signal*, NLS1) y confiere flexibilidad estructural, lo que permite que el dímero de GR interactúe con múltiples GREs. Existe una segunda señal de localización nuclear (NLS2) localizada en el LBD (Oakley y Cidlowski, 2013).

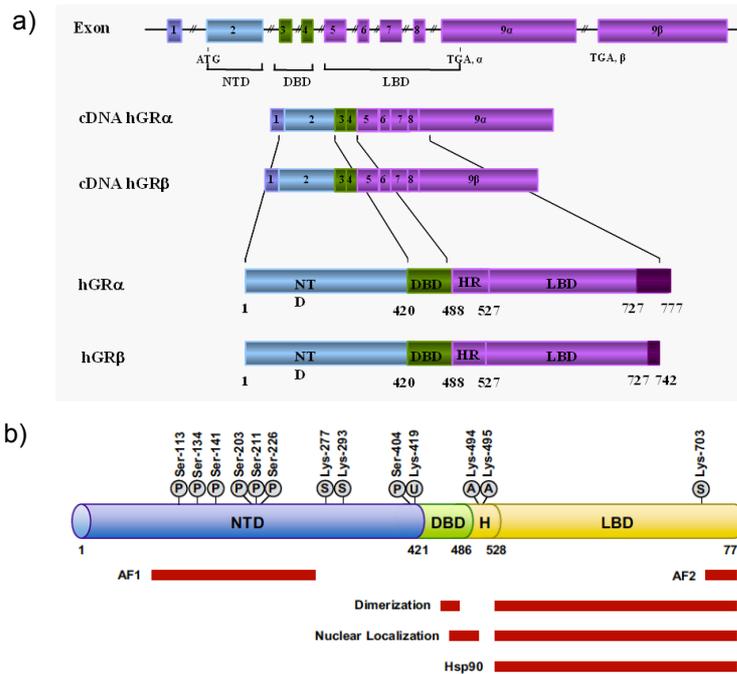


Figura 3. Representación de la estructura génica del gen *Nr3c1* (Gr) humano. (a) Las isoformas mayoritarias GR α y GR β se obtienen por *splicing* alternativo. Tomada de Nicolaidis *et al.*, 2010. (b) Representación de los dominios estructurales de GR a nivel de proteína y las modificaciones post-traduccionales que tienen lugar: fosforilación (P), sumoilación (S), ubiquitinación (U) y acetilación (A). Tomada de Oakley y Cidlowski, 2013.

2.2 Polimorfismos de GR

Se han descrito varios polimorfismos para el gen *Nr3c1* que podrían explicar las variaciones individuales en la respuesta al tratamiento con GCs. La variante *BclI* es el polimorfismo más abundante (se presenta en aproximadamente un 37% de la población). Se asocia con una hipersensibilidad a los GCs, una menor susceptibilidad a

desarrollar variantes severas de trastornos inflamatorios y autoinmunes y anomalías en parámetros metabólicos (Gross y Cidlowski, 2008). El polimorfismo ER22/23EK se da en un 3% de la población. Estos individuos presentan resistencia a los GCs, lo que se asocia con una protección frente al desarrollo de la diabetes de tipo 2 y al daño vascular. El tercer polimorfismo mejor conocido, N363S, aparece en un 4% de la población, y se asocia con una hipersensibilidad a los GCs. Los individuos que portan este polimorfismo presentan un mayor índice de masa corporal y una tendencia a una menor densidad mineral ósea (van Rossum y Lamberts, 2004; Oakley y Cidlowski, 2013).

2.3 Modificaciones post-traduccionales de GR

Cada una de las isoformas de GR originadas, es susceptible de ser sometida a varias modificaciones post-traduccionales que modulan su actividad (figura 3b) (Oakley y Cidlowski, 2013).

La modificación más estudiada, y la primera en ser descrita, es la fosforilación, que cambia la actividad transcripcional y estabilidad del receptor. GR humano se fosforila en al menos 7 residuos de serina (S113, S134, S141, S203, S211, S226 y S404), localizados en el dominio NTD. Esta modificación la llevan a cabo quinasas dependientes de ciclina (CDKs), proteína quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y la glucógeno-sintasa quinasa 3 (GSK-3) (Wang *et al.*, 2002; Galliher-Beckley *et al.*, 2011).

Otras modificaciones post-traduccionales regulan la actividad de GR. La unión de la ubiquitina a residuos específicos de lisina marca la proteína para su degradación mediante el proteosoma. GR de ratón tiene un motivo PEST (Prolina, Glutámico, Serina y Treonina) alrededor

de la serina 412 (que constituye un sitio de fosforilación). En este contexto, la lisina 426 constituye un posible sitio de ubiquitinación (Wallace y Cidlowski, 2001).

GR también se modifica por la unión del pequeño modificador relacionado con la ubiquitina (SUMO) a residuos específicos de lisina (K227, K293 y K703). Dicha modificación regula la actividad transcripcional del receptor (Le Drean *et al.*, 2002).

Por último, GR también es capaz de acetilarse en los residuos de lisina 494 y 495, localizados en la región *Hinge*. La desacetilación de estos dos residuos por medio de la histona deacetilasa 2 (HDAC2) es fundamental para que GR pueda reprimir la actividad transcripcional del factor de transcripción nuclear kappa B (*Nuclear Factor kappa B*; NF- κ B) (Ito *et al.*, 2006).

3. Mecanismos moleculares de acción de GR

En su forma inactiva, GR se encuentra en el citoplasma asociado a un complejo multi-proteico que incluye las proteínas chaperonas de choque térmico (Hsp40, Hsp70 y Hsp90), p23 e inmunofilinas de la familia de FK506 (FKBP51 y FKBP52) (Grad y Picard, 2007). Tras la unión del ligando, tiene lugar un cambio conformacional en el dominio LBD, GR se disocia de dicho complejo, muestra la señal NLS, dimeriza y transloca al núcleo. Una vez allí, regula la transcripción de sus genes diana a través de las denominadas acciones genómicas, dependientes e independientes de la unión directa de GR al DNA (figura 4) (Ratman *et al.*, 2013).

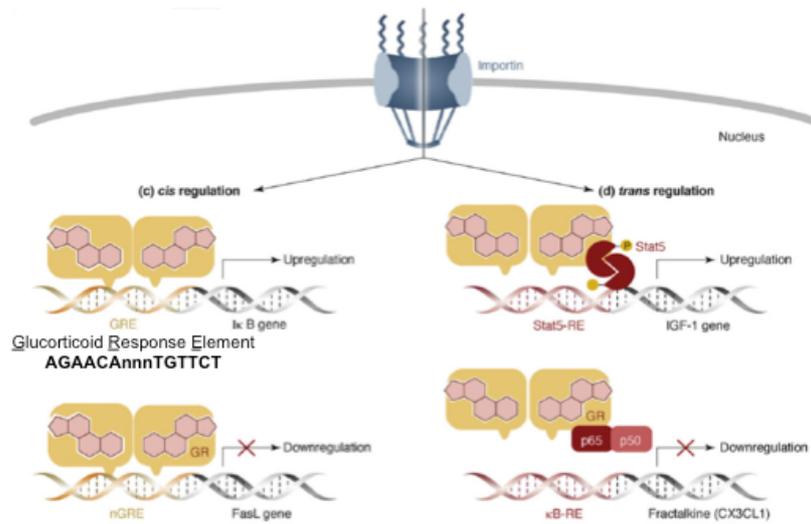


Figura 4. Mecanismos de regulación transcripcional de GR. GR regula la transcripción génica mediante su unión directa al DNA (panel izquierdo, regulación en *cis* a través de la unión de GR a elementos de respuesta a GCs, GRE o nGRE) o indirecta, independiente de su unión al DNA (panel derecho, regulación en *trans* mediante la interacción de GR con otros factores de transcripción). Modificada de Gross y Cidlowski, 2008.

3.1 Mecanismos dependientes de la unión de GR al DNA

Este mecanismo, denominado clásicamente función de transactivación (TA), requiere la unión directa del dímero de GR a las secuencias GRE presentes en los genes diana de este factor de transcripción. Dichas secuencias, distribuidas uniformemente a lo largo del genoma, no necesariamente próximas al sitio de inicio de la transcripción (So *et al.*, 2007), se definen como un palíndromo compuesto por dos mitades hexaméricas invertidas separadas por 3 nucleótidos variables, siendo su secuencia consenso 5'

AGAACAAnnTGTTCT 3' (donde "n" es cualquier nucleótido). Cada uno de los monómeros de GR se une a una de las mitades del palíndromo. Tras la unión del receptor al DNA, se produce un cambio conformacional que permite el reclutamiento de co-activadores y la formación del complejo transcripcional. Además, GR, en forma monomérica, también puede unirse a secuencias GRE positivas o negativas (nGREs) para activar o inhibir la transcripción de genes diana.

Recientemente se ha descrito que GR puede ejercer una regulación negativa de ciertos genes a través de su unión directa a elementos de respuesta negativa (IRnGREs). Estas secuencias, que no guardan relación con las secuencias nGREs descritas anteriormente, están compuestas por dos motivos repetidos e invertidos, separados entre sí por hasta 2 nucleótidos. Las secuencias IRnGREs se han encontrado en numerosos genes reprimidos por GCs, como ciclina D1 (*Ccnd1*), *Il6*, *K5*, *K14*, *Stat3* o *Tslp* (Surjit *et al.*, 2011).

3.2 Mecanismos independientes de la unión de GR al DNA

GR también es capaz de regular la transcripción de sus genes diana a través de interacciones proteína-proteína con otros factores de transcripción, sin unirse de manera directa al DNA. Este mecanismo de acción de GR independiente de su unión a DNA se ha denominado clásicamente función de transrepresión (TR). El efecto anti-inflamatorio de los GCs está causado, al menos en parte, por la interacción de GR con los factores NF- κ B y la proteína activadora 1 (AP-1), conocidos activadores de la transcripción de genes pro-inflamatorios. Por ejemplo, la unión directa de GR a estos dos factores de transcripción inhibe la expresión de citoquinas pro-inflamatorias como IL-6, IL-1 β y TNF- α (De

Bosscher y Haegeman, 2009). Por otro lado GR también activa la transcripción de genes anti-inflamatorios, por ejemplo, a través de su interacción con miembros de la familia de STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*), ya unidos a sus secuencias en el DNA (Gross y Cidlowski, 2008).

Durante mucho tiempo se ha pensado que los efectos anti-inflamatorios de los GCs se ejercían únicamente a través de la función de TR de GR. Sin embargo, la unión de dímeros de GR al DNA también refuerza las acciones anti-inflamatorias de los GCs. Así, GR induce la expresión de *Tsc22d3* (también conocido como *Gilz*; *Glucocorticoid-induced Leucine Zipper*), que se une directamente a la subunidad p65 de NF- κ B, interfiriendo con su actividad pro-inflamatoria (Newton, 2013). Los GCs, a través de GR, también inducen la expresión del gen *Mkp-1*, que codifica para una fosfatasa capaz de inactivar a las MAPKs p38 y JNK (ver apartado 3.2.2) (Goulding, 2004; Newton, 2013).

3.2.1 Interacción entre GR y NF- κ B

NF- κ B es un factor de transcripción que responde a estímulos como el estrés, la radiación UV o estímulos pro-inflamatorios, entre otros, y que juega un importante papel en la proliferación, apoptosis, respuesta inmune y procesos inflamatorios y cancerígenos.

NF- κ B está formado por homodímeros o heterodímeros que incluyen las subunidades p65 (Rel A), Rel B, c-Rel, p52/p100 y p50/p105, siendo el dímero prototípico el formado por las subunidades p50 y p65 (Perkins, 2007).

En el estado basal, los dímeros de NF- κ B se encuentran en el citoplasma unidos a su inhibidor I κ B, que impide la translocación al núcleo al enmascarar las señales de localización nuclear. La presencia de estímulos (citoquinas, factores de crecimiento o radiaciones UV) activa la quinasa de I κ B (*I κ B kinase* o IKK), que fosforila a I κ B. Esta modificación conduce a su ubiquitinación y degradación, permitiendo la translocación de NF- κ B al núcleo y su unión a elementos de respuesta en el DNA para activar la transcripción de genes pro-inflamatorios (Gilmore, 2006).

GR inhibe la actividad de NF- κ B a través de varios mecanismos. En primer lugar (como ya se ha comentado anteriormente), GR puede interactuar físicamente con la subunidad p65 de NF- κ B (mediante una interacción proteína-proteína), impidiendo su unión al DNA (Smoak y Cidlowski, 2004). También en el núcleo, GR regula la actividad de NF- κ B interfiriendo con la fosforilación del dominio C-terminal (CTD) de la RNA polimerasa II (Nissen y Yamamoto, 2000). En algunos tipos celulares, los GCs reprimen la actividad NF- κ B mediante la inducción transcripcional del inhibidor I κ B, que secuestra a NF- κ B en el citoplasma (De Bosscher *et al.*, 2003). Además, GR en el citoplasma puede interferir con la vía PI3K, que modula la actividad IKK, resultando en una menor actividad de NF- κ B (Leis *et al.*, 2004).

3.2.2 Interacción de GR con la vía de las MAPK

La vía de las MAPKs está compuesta por una cascada de señalización que empieza en los receptores tirosina-quinasa en la membrana celular y termina en el núcleo, regulando la transcripción. Tras recibir la señal adecuada, se inicia una activación secuencial de

varias quinasas. Los receptores activan RAS, un pequeña GTPasa, que recluta y activa a una quinasa de la quinasa de MAPK (MAPKKK). Ésta, en su forma activa, fosforila y activa a la quinasa de MAPK (MAPKK), que finalmente fosforila y activa a la MAPK (figura 5.3). Los 3 miembros principales de la familia de las MAPKs son la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK1 y ERK2), p38 (p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ) y la quinasa N-terminal de c-Jun (JNK1, JNK2, JNK3) (Jeffrey *et al.*, 2007; Kyriakis y Avruch, 2012).

En la vía de señalización clásica, RAS fosforila a RAF (una MAPKKK) y ésta a MEK (una MAPKK) que por último fosforila y activa a la MAPK ERK. Esta vía está muy conservada y se encarga de controlar y regular la proliferación, la diferenciación, la apoptosis, la migración y el metabolismo celular (Kolch, 2005). ERK es necesaria para una correcta progresión del ciclo celular, induciendo la expresión de *Ccnd1* en la fase G1/S. Estudios de pérdida de función de ERK en queratinocitos, han demostrado que esta proteína se requiere para que llevar a cabo la fase G2/M del ciclo celular. Además, la piel carente de ERK muestra hipoplasia y una baja tasa de proliferación, lo que confirma la importancia de ERK como proteína reguladora de la proliferación celular (Dumesic *et al.*, 2009). Otros estudios demostraron que la actividad de ERK se requiere para el desarrollo y la correcta renovación de la epidermis. Sin embargo, una sobre-activación de dicha proteína puede causar transformación celular, lo que conduce a cáncer (Khavari y Rinn, 2007). Por otra parte, la activación sostenida de ERK, en respuesta a señales pro-apoptóticas como el daño en el DNA, induce la liberación del citocromo c mitocondrial o activa la caspasa 8 para promover apoptosis (Cagnal y Chambard, 2010). Además, la vía de señalización de ERK está implicada en la migración en diversos tipos celulares. ERK regula la formación de contactos focales a través de proteínas que

degradan el citoesqueleto e inhibien la unión de integrinas a la matriz extracelular (Huang *et al.*, 2004).

Trabajos anteriores del grupo han demostrado que la pérdida total de GR tiene como consecuencia el incremento de la actividad de ERK en queratinocitos de ratón, lo que sugiere un antagonismo entre la quinasa y el receptor, que también ocurre en otros tipos celulares (Ayroldi *et al.*, 2012). Además, los queratinocitos primarios de ratón (MPKs) aislados de ratones deficientes en GR mostraron una mayor tasa de apoptosis, que se redujo al tratar con un inhibidor de ERK (Bayo *et al.*, 2008).

Las MAPKs p38 α y - β se expresan de forma ubicua, y se inducen en queratinocitos como respuesta a estímulos relacionados con el estrés como citoquinas pro-inflamatorias y radiaciones UV. También se ha visto su activación en psoriasis y procesos de cicatrización (Chen y Bowden, 2000).

Estos mismos estímulos descritos también activan a JNK, implicada en procesos de apoptosis y proliferación y diferenciación celular. Además, JNK participa en procesos inflamatorios y en la producción de citoquinas a través de la inducción de AP-1 (Wagner y Nebreda, 2009). En queratinocitos en cultivo, se ha visto que JNK es capaz de inhibir la diferenciación terminal. Consecuentemente, su bloqueo con inhibidores específicos induce todos los aspectos de la diferenciación epidérmica *in vitro* (Gazel *et al.*, 2006).

La vía de señalización de las MAPKs contribuye al proceso inflamatorio. Los GCs interfieren con las MAPKs induciendo la transcripción de genes que regulan negativamente esta vía, como *Gilz* y la fosfatasa de MAPK, *Mkp-1*. La inducción de estas dos proteínas

constituye un mecanismo mediante el cual se pueden inhibir las 3 vías principales de MAPK: JNK, p38 y ERK (Clark y Lasa, 2003; Ayroldi *et al.*, 2012).

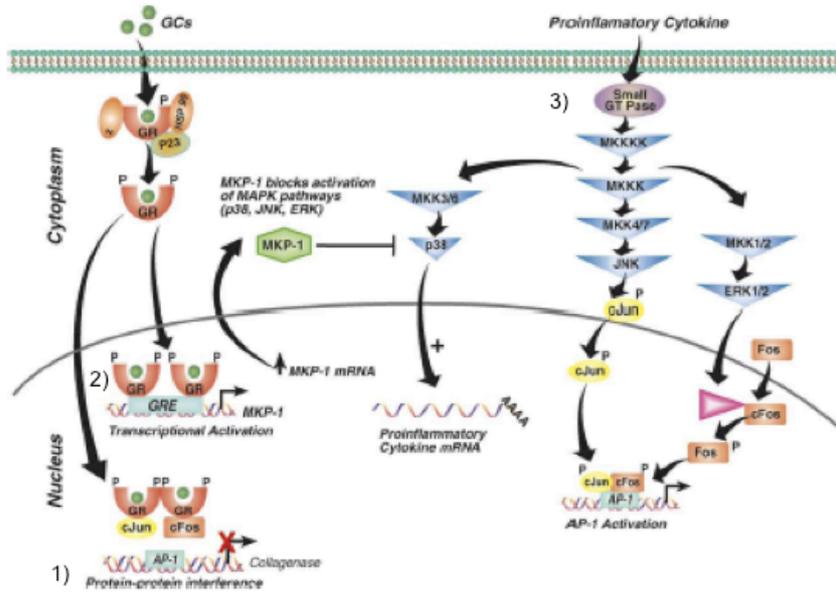


Figura 5. Antagonismo GR/MAPK/AP-1. GR puede inhibir la actividad AP-1 a través de interacciones proteína-proteína (1) o a través de la inducción transcripcional de *Mkp-1* (2), que inhibe la fosforilación de p38, JNK y ERK (3). Tomada de Smoak y Cidlowski, 2004.

3.2.3 Interacción de GR con AP-1

AP-1 es un factor de transcripción compuesto principalmente por homodímeros o heterodímeros de proteínas de las familias Jun (c-Jun, JunB y JunD) y Fos (c-Fos, FosB, Fra-1 y Fra-2). En menor medida también se compone de proteínas de las subfamilias ATF (ATF-a, ATF-2, ATF-3) y JDP (JDP-1 y JDP-2). Como respuesta a distintos estímulos

(citoquinas, factores de crecimiento o señales de estrés), el factor de transcripción AP-1 se une a elementos de respuesta a TPA en el DNA para regular la expresión de genes relacionados con los procesos de proliferación y diferenciación celular (Hess *et al.*, 2004).

En la piel, AP-1 regula la expresión de distintas queratinas (K1, K5, K6 y K14 entre otras), así como la de proteínas estructurales como filagrina, loricrina e involucrina. El diferente patrón de expresión de las distintas subunidades de AP-1 apunta a que este factor es fundamental en la formación y mantenimiento de la epidermis. También se ha visto que AP-1 juega un importante papel en procesos de cicatrización y carcinogénesis de piel (Angel *et al.*, 2001; Gerdes *et al.*, 2006).

El estudio de animales y células en las que se ha modificado genéticamente los distintos componentes de AP-1 ha contribuido a esclarecer las funciones de estas proteínas. De esta manera, se sabe que c-Fos, FosB y JunD no son necesarias para el desarrollo embrionario, mientras que c-Jun, JunB y Fra-1 son esenciales, puesto que la pérdida de función de estas proteínas conduce a la letalidad embrionaria a día de desarrollo embrionario (E)8.5-E12.5 (Jochum *et al.*, 2001). Los ratones adultos con una delección específica de JunB en la epidermis presentan ulceraciones en la piel. Se ha visto también, que los ratones dobles mutantes para JunB y c-Jun muestran signos de psoriasis, como la epidermis engrosada, hiperqueratosis (capas superiores de la epidermis queratinizadas) y paraqueratosis (corneocitos con núcleo) (Zenz *et al.*, 2008).

Los GCs, a través de GR, son capaces de antagonizar la actividad AP-1 mediante dos mecanismos distintos, además de la ya mencionada inducción transcripcional de *Mkp-1*. El primer mecanismo, descrito a principios de los años 90, implica una interacción proteína-

proteína. Dentro del núcleo, GR (sin necesidad de unirse al DNA) se une a AP-1 para inhibir su actividad (Jonat *et al.*, 1990; Schüle *et al.*, 1990; Yang-Yen *et al.*, 1990). Por otra parte, GR es capaz de inhibir la actividad de JNK, lo cual impide la fosforilación de c-Jun, bloqueando, por tanto, la actividad AP-1 (Caelles *et al.*, 1997) (figura 5.1 y 5.2).

3.2.4 Interacción de GR con la vía de STATs

Las proteínas STAT son una familia de factores de transcripción que se activan como respuesta a la unión de citoquinas o interferones a sus receptores. Tras dicha unión, los receptores se fosforilan por la quinasa *Janus* (JAK), creando un lugar de anclaje para las proteínas STAT, que también se fosforilan por JAK. Esto hace que se liberen del receptor, dimerizen y transloquen al núcleo para regular la expresión de sus genes diana, implicados en proliferación, apoptosis y migración. Los 7 miembros de la familia son: Stat1, Stat2, Stat3, Stat4, Stat5a, Stat5b y Stat6 (Leonard y O'shea, 1998).

Estudios previos con ratones revelaron que los embriones deficientes en STAT3 eran inviábiles (Takeda *et al.*, 1997). STAT3 desempeña distintas funciones según el tejido en el que se expresa (Levy y Darnell, 2002). Así, en la piel es importante para el proceso de cicatrización, y en lesiones de pacientes con psoriasis se ha observado una mayor activación y translocación nuclear de STAT3. De la misma manera, los ratones que sobre-expresan STAT3 en epidermis presentan alteraciones similares a la psoriasis (Sano *et al.*, 2005). También se ha observado una activación permanente de esta proteína en algunos cánceres humanos como los de cabeza y cuello, hepatocarcinoma y leucemia. En estudios *in vitro* se ha visto que una expresión constitutiva

de la forma activa de STAT3 transforma los fibroblastos, lo que sugiere que STAT3 desempeña un papel como oncogén (Levy y Darnell, 2002) (ver apartado 4.3).

GR y STAT3 interactúan entre sí. Esta interacción puede resultar en una actuación sinérgica o en la inhibición de STAT3 por GR. Aunque dicha interacción ya se conocía, recientemente se ha descubierto que ocurre a nivel de DNA. Estudios *in vitro* revelaron que en células tratadas con LIF (*Leukaemia Inhibitory Factor*, una citoquina que induce STAT3) y con el análogo sintético de los GCs dexametasona (Dex), se observa un mayor co-reclutamiento de ambas proteínas a los sitios de unión de STAT3. De este modo, un reclutamiento de STAT3 a GR ya unido al DNA resulta en sinergia transcripcional. Por el contrario, cuando GR se une a STAT3 (previamente unido al DNA) se inhibe la transcripción de los genes diana de STAT3 (Langlais *et al.*, 2008 y 2012).

3.3 Acciones no genómicas de GR

Algunas acciones de GR ocurren fuera del núcleo, en un periodo muy corto de tiempo (pocos minutos o segundos), y no pueden explicarse por los mecanismos descritos anteriormente; son las denominadas acciones no genómicas del receptor. A través de este mecanismo, GR no modifica inicialmente la transcripción génica, sino cascadas de señalización. Una posible explicación para estas acciones es la localización de una pequeña fracción de GR en la membrana plasmática, lo que permitiría esa rápida actuación (Goulding, 2004; Stellato, 2004). Aunque la existencia de GR en la membrana plasmática se describió con anterioridad (Bartholome *et al.*, 2004), recientemente se

ha descrito su co-localización con la α -catenina en las uniones adherentes de los queratinocitos primarios de ratón (Stojadinovic *et al.*, 2013).

Las acciones no genómicas tienen efectos anti-inflamatorios, llevados a cabo por la interferencia de GR con la vía de señalización de PI3K/AKT. La actividad AKT se induce por la PI3K que está formada por una subunidad reguladora de 85 kDa (p85 α) y una catalítica de 110 kDa (p110). GR interacciona físicamente con la subunidad reguladora p85 α en diversos tipos celulares, incluyendo los queratinocitos, modulando la actividad PI3K/AKT. Se ha descrito también que los GCs son capaces de activar la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) a través de GR citoplasmático y su interacción con la vía de PI3K y AKT (Lösel y Wehling, 2003).

Trabajos previos del grupo demostraron que la interacción entre GR y PI3K en queratinocitos en cultivos y en la piel de ratón da como resultado la inactivación de la vía PI3K/AKT. En experimentos de carcinogénesis de piel, se observó que la sobre-expresión de GR inhibe el crecimiento de tumores inducidos por AKT, disminuyendo la actividad PI3K/AKT (Leis *et al.*, 2004).

4. La piel

La piel es la capa más externa de los vertebrados y se considera el órgano más grande del cuerpo. La piel es esencial para la supervivencia ya que constituye la primera línea de defensa frente al medio ambiente, protegiendo de infecciones, radiación UV y heridas, entre otros. Además, evita la pérdida de agua, actúa como termoregulador, contiene receptores sensitivos y sintetiza vitamina D.

La piel está compuesta por 2 capas principales: la epidermis y la dermis, que presentan estructuras y funciones diferentes (Fuchs y Raghavan, 2002) (figura 6).

La dermis se sitúa por debajo de la epidermis ejerciendo una función de sostén. Está compuesta por fibroblastos rodeados por fibras de colágeno, embebidos en una matriz de proteoglucanos, y contiene los vasos sanguíneos y los apéndices epidérmicos (glándulas sudoríparas y sebáceas y folículos pilosos).

La epidermis es un epitelio pluriestratificado y queratinizado constituido mayoritariamente por queratinocitos. Está situada sobre la lámina basal, que la separa de la dermis.

La epidermis está compuesta por varias capas o estratos:

- Estrato basal: compuesto por queratinocitos con capacidad proliferativa. Dichos queratinocitos se dividen, migran y diferencian para dar lugar al resto de capas de la epidermis. Estos queratinocitos, anclados a la membrana basal por medio de hemidesmosomas, expresan la pareja de queratinas K5 y K14.

- Estrato espinoso: formado por queratinocitos unidos entre sí por un elevado número de uniones desmosomales (espinas) que contribuyen a la integridad del tejido. En este estrato la expresión de las queratinas K1 y K10 sustituye a la pareja K5/K14. Además en este estrato se expresan marcadores de diferenciación temprana como la involucrina.

- Estrato granular: compuesto por células aplanadas que contienen los gránulos queratohialinos que dan nombre al estrato. Estos gránulos contienen pro-filagrina, el precursor de la filagrina, importante

para la función de barrera de la epidermis. Además, se expresan otros marcadores de diferenciación terminal de queratinocitos, como la loricrina.

- Estrato córneo: formado por corneocitos, células anucleadas, aplanadas y muertas, unidas entre sí por medio de corneodesmosomas. Los corneocitos están formados por agregados de filamentos de queratina, filagrina, involucrina, loricrina y proteínas de la familia *Small Proline Rich Region* (SPRR). Es importante también la composición lipídica de este estrato, ya que determina la permeabilidad y la función de barrera. En conjunto, el estrato córneo constituye la principal barrera de protección del individuo frente al medio.

A lo largo del proceso de diferenciación, los queratinocitos de cada estrato expresan distintas proteínas. Esta compartimentalización es muy útil para identificar alteraciones o patologías cutáneas, indicadas por una expresión anormal o ectópica de dichos marcadores.

Además de estas 2 capas principales, la piel también está formada por la hipodermis. Situada por debajo de la dermis, está formada por tejido adiposo y tiene función de reserva nutricional y energética, además de ayudar a conservar la temperatura corporal.

La piel se encuentra en constante renovación. Durante este proceso intervienen tres tipos distintos de células madre de la piel (epidérmicas, del folículo piloso y de las glándulas sebáceas), que son las responsables del mantenimiento de la homeostasis del tejido. Las células madre de la epidermis interfolicular, situadas en la capa basal, son de división lenta. Cuando reciben las señales adecuadas, las células madre se dividen para dar lugar a las células de amplificación transitoria.

Éstas, a su vez, se dividen para dar lugar al resto de células de la epidermis (Fuchs y Horsley, 2008; Blanpain y Fuchs, 2009).

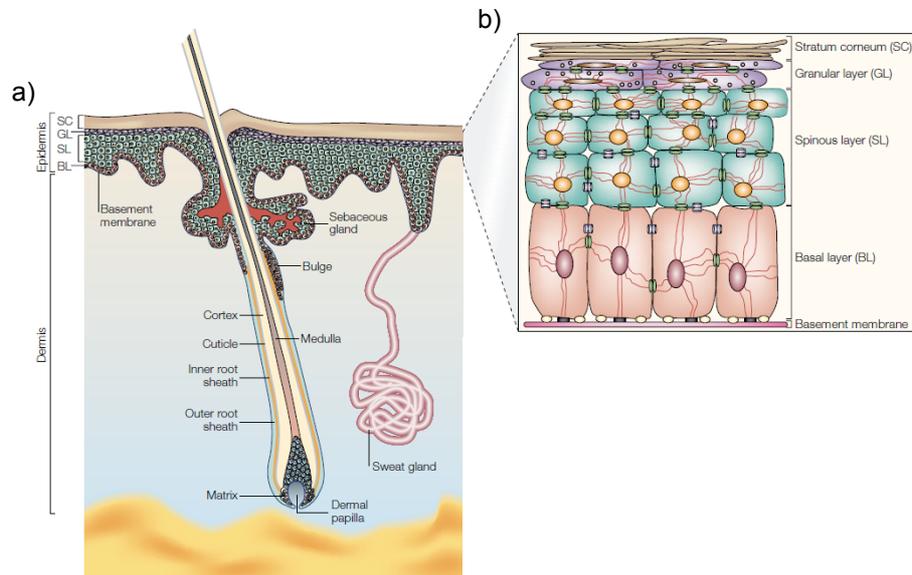


Figura 6. Estructura de la piel y sus apéndices cutáneos. (a) La piel consta de dos compartimentos principales: epidermis y dermis. Se representan también los apéndices cutáneos: folículo piloso, glándula sebácea y glándula sudorípara. (b) Detalle de los estratos que forman la epidermis, de inferior a superior: estrato basal, espinoso, granular y córneo. Tomada de Fuchs y Raghavan, 2002.

4.1 Desarrollo de la epidermis de ratón

La epidermis deriva de una única capa de ectodermo embrionario que se puede observar a día de desarrollo embrionario E8.5-E10. Esta monocapa comienza a estratificar para dar lugar al peridermo (E9-E12).

Alrededor del día E12-E15, se produce la formación de las capas intermedias. Las células de estas capas comienzan a diferenciar, expresando marcadores específicos (K1 y K10) para dar lugar a los estratos espinoso y granular (E15). Alrededor del día E16, la diferenciación terminal se completa y aparece el estrato córneo. A día E19 la epidermis es completamente madura y funcional (figura 7) (Byrne *et al.*, 2003).

Durante la formación y maduración de la epidermis intervienen distintos factores y vías de señalización como BMPs, KLF4, MAPKs, NF- κ B, NOTCH y WNT entre otros. Trabajos anteriores han demostrado paralelismos funcionales entre GR y KLF4 durante el desarrollo de la epidermis. La sobre-expresión de KLF4 en la epidermis de embriones de ratón acelera su desarrollo de la misma manera que lo hace el tratamiento con Dex a las hembras gestantes, regulando un mismo conjunto de genes (Patel *et al.*, 2006). Además, los transgénicos de sobre-expresión en queratinocitos de GR o KLF4 presentan numerosas similitudes fenotípicas en epidermis y otros epitelios estratificados (Pérez *et al.*, 2001; Patel *et al.*, 2006).

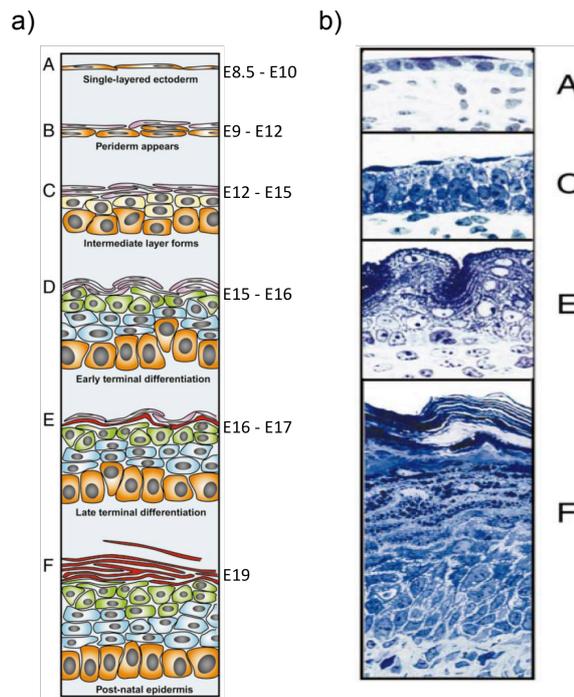


Figura 7. Esquema del desarrollo de la epidermis en ratón. (a) Formación de la epidermis de ratón durante el desarrollo embrionario (E). (b) Histología de piel de ratón que corresponde con el momento del desarrollo de la figura a. Modificada de Byrne *et al.*, 2003.

4.2 Patologías cutáneas inflamatorias

Un desarrollo anómalo de la epidermis es característico de la dermatitis atópica (*Atopic Dermatitis*, AD) y la psoriasis, dos de las enfermedades inflamatorias de la piel más comunes. La AD afecta a un 10-20% de los niños y suele aparecer antes de los 6 primeros meses de vida, mientras que la psoriasis afecta al 2-3% de la población adulta (Segre, 2006). Los GCs son el tratamiento de elección más común para tratar este tipo de patologías por los efectos anti-proliferativos y anti-

inflamatorios que ejercen sobre los queratinocitos y las células inmunes (Schäcke *et al.*, 2002).

4.2.1 Dermatitis atópica

La dermatitis atópica (AD) es una enfermedad congénita y crónica inflamatoria de la piel que cursa con prurito, eritema y descamación. En la mayoría de los casos, además, los pacientes presentan altos niveles de IgE. Una barrera epidérmica defectiva permitiría la entrada de alérgenos a través de la piel, estimulando la respuesta inmune (Cork *et al.*, 2009). Los datos evidencian que la AD puede originarse por alteraciones en el compartimento epitelial, además del inmune. Se ha descrito que alteraciones en la expresión y/o función de proteínas como la filagrina causan deficiencias en la función de barrera epidérmica, que puede derivar en AD. El análisis de pacientes con AD reveló una mutación en el gen que codifica para la filagrina humana (*FLG*), estableciendo un vínculo entre dicha proteína y esta patología cutánea tan prevalente (Palmer *et al.*, 2006).

4.2.2 Psoriasis

La psoriasis es una enfermedad inflamatoria e inmune crónica de la piel que cursa con prurito, irritación y dolor. La piel de los pacientes se caracteriza por presentar inflamación, hiperproliferación y una diferenciación anormal de los queratinocitos. Aunque la causa de esta enfermedad no se conoce con detalle, estos síntomas podrían estar provocados por la liberación de citoquinas (TNF α e IL-22, entre otras) por parte de las células T (Roberson y Bowcock, 2010).

Una función de barrera deficiente es importante en el desarrollo de la psoriasis. En este contexto, cabe destacar un grupo de 3 familias de genes importante para el mantenimiento de dicha función (*Late Cornified Envelope (LCE)1, LCE2 y LCE3*). En condiciones normales *LCE1* y *LCE2* se expresan en la piel humana, sin embargo, en los pacientes con psoriasis se induce la expresión de la familia de genes *LCE3*. Además, en algunos pacientes se ha detectado un polimorfismo que implica la pérdida de *LCE3B* y *LCE3C*. La ausencia de estos genes puede ser la causa de una reparación deficiente de la barrera, aumentando la susceptibilidad del individuo a desarrollar psoriasis (de Cid *et al.*, 2009).

4.3 Carcinogénesis de piel

El cáncer de piel es el tipo de cáncer más común en las poblaciones de piel blanca. Datos recopilados en Estados Unidos muestran que el cáncer de piel no melanoma afecta a más de 2 millones de personas, lo que supone un alto coste económico (Dacosta Byfield *et al.*, 2013). Los tipos más frecuentes de cáncer no melanoma son el cáncer de células basales (BCC) y el de células escamosas (SCC), que representan alrededor del 80% y el 20%, respectivamente, del total de casos (Dacosta Byfield *et al.*, 2013). Los BCCs no suelen ser metastásicos, mientras que los SCCs, que aparecen a partir de un estado precanceroso, sí suelen serlo (Boehnke *et al.*, 2012).

La exposición continua de la piel a la radiación UV tiene como consecuencia la acumulación de mutaciones genéticas en las células que la forman; estas mutaciones en unas pocas células constituyen el origen del cáncer de piel. Uno de los principales genes relacionados con

el cáncer de piel es *Hras1* y en muestras de pacientes con esta enfermedad se han observado mutaciones en los codones 12, 13 y 61 de dicho gen (Boukamp, 2005).

El ratón se usa frecuentemente como modelo de carcinogénesis de piel, siguiendo un protocolo de carcinogénesis química en dos pasos. En este protocolo, los ratones se tratan tópicamente con una única dosis subcarcinogénica del agente iniciador 7,12-Dimetilbenz(a)antraceno (DMBA) y con repetidas dosis del promotor tumoral forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) (Abel *et al.*, 2009; figura 8). La aplicación de DMBA produce mutaciones en el codón 61 de *Hras*. Las células madre de la piel, tanto en el folículo como en la epidermis interfolicular, suelen ser la diana del agente iniciador. La aplicación repetida del promotor tumoral promueve la proliferación celular, que se detecta a nivel histológico como un engrosamiento. Durante la promoción, la proliferación de las células con la mutación predomina sobre el resto dando lugar un crecimiento clonal denominado papiloma, visible macroscópicamente como un pedúnculo. Los papilomas desarrollados son tumores benignos, que en un pequeño porcentaje pueden progresar a SCC (figura 8) (Abel *et al.*, 2009).

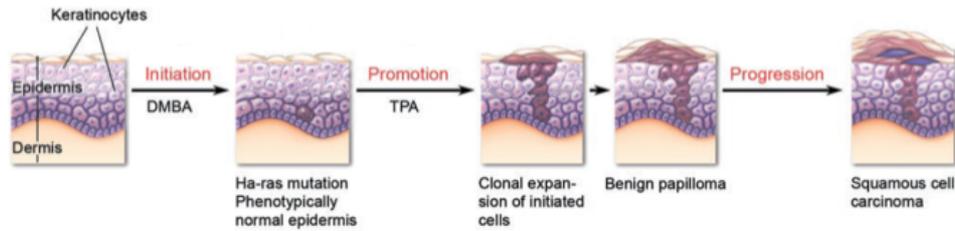


Figura 8. Esquema de la formación de papilomas tras el tratamiento con 7,12-Dimetilbenz(a)antraceno (DMBA)/forbol 12-miristato 13-acetato (PMA). Modificada de Pedranzini *et al.*, 2004.

A nivel histopatológico y a medida que los papilomas progresan hacia SCCs, se observa la pérdida de marcadores de diferenciación como las queratinas K1 y K10 y la loricrina. También es común la pérdida del marcador epitelial E-Cadherina, importante en las interacciones intercelulares. Además, aumenta la expresión de K13, indicativo de un proceso de conversión a tumores malignos (Rundhaug *et al.*, 1997).

En humanos, se ha visto la activación constitutiva de STAT3 en distintos cánceres epiteliales como próstata, pecho, pulmón y cabeza y cuello, entre otros (Chan *et al.*, 2004b). A pesar del incremento en la actividad de esta vía, no se han encontrado mutaciones en STAT3, por lo que el incremento en dicha actividad podría deberse a defectos en otras vías de señalización. Estudios de carcinogénesis *in vivo* han mostrado que la activación constitutiva de STAT3 se da, al menos en parte, a través de la vía de señalización de EGFR (Chan *et al.*, 2004a). Además, los ratones deficientes en STAT3 en la epidermis no desarrollan tumores, lo que pone de manifiesto la importancia de esta proteína en el desarrollo de tumores (Chan *et al.*, 2004a y 2004b).

Por otra parte, también se ha visto que la vía de ERK está deregulada en un tercio de los cánceres humanos, incluyendo mutaciones en distintos componentes de la vía como RAS y RAF. Estudios con ratones han permitido determinar que en las primeras etapas del desarrollo tumoral es importante la activación de AKT, lo que induce una mayor proliferación permitiendo así la formación de los papilomas. En las etapas más tardías y en la conversión de los papilomas a SCC es importante la activación de la vía de ERK (Segrelles *et al.*, 2002 y 2007).

Trabajos previos del grupo han demostrado la importancia de GR en la carcinogénesis de piel. Experimentos con ratones sobre-expresores de GR y el oncogén *Hras* (K5-GR/Tg.AC) en la epidermis, demostraron que tras el tratamiento con PMA, la sobre-expresión de GR en la epidermis inhibía la formación de tumores inducidos por *Hras*. Los ratones K5-GR presentaban menos tumores y de menor tamaño que los ratones Tg.AC, debido, posiblemente, a la inhibición que ejerce GR sobre la vía de NF- κ B (Budunova *et al.*, 2003). Además, los ratones K5-GR eran más resistentes a la formación y el desarrollo de papilomas inducidos por AKT. GR actúa como un supresor de tumores *in vivo*, bloqueando, entre otras, la vía de señalización PI3K/AKT (Leis *et al.*, 2004).

4.3.1 Transición epitelio mesénquima

La transición epitelio mesénquima (*Epithelial Mesenchymal Transition*, EMT) es un proceso durante el cual las células epiteliales pierden sus características y capacidad de adhesión, reorganizan su citoesqueleto y adquieren propiedades de tejido mesenquimal. Dicho

proceso es importante durante el desarrollo embrionario, en la etapa de gastrulación, y la formación de órganos (Acloque *et al.*, 2009; Kalluri, 2009), y juega además un papel importante en el proceso tumoral (Moreno-Bueno *et al.*, 2009).

Durante el proceso de metástasis, las células cancerosas de los tumores primarios adquieren la habilidad de invadir el tejido que las rodea, rompiendo la membrana basal que las mantiene en su compartimento epitelial. A continuación, migran hasta alcanzar un vaso sanguíneo que permite su transporte para colonizar otros tejidos y desarrollar nuevos tumores. En el proceso de EMT participan una serie de represores transcripcionales como Snail, Slug, Zeb1 y Twist que reprimen genes que codifican para proteínas importantes para la adhesión celular, como la E-Cadherina (Nieto y Cano, 2012). En tumores humanos es frecuente observar la pérdida de este marcador epitelial. También se ha visto que tumores con mutaciones en el gen de la E-Cadherina son más susceptibles a EMT (Kalluri y Weinberg, 2009).

5. Modelos animales para el estudio funcional de GR en epidermis

El uso del ratón como sistema modelo presenta ventajas como la facilidad en el manejo y el conocimiento que se tiene sobre su fisiología (en particular, su ciclo reproductivo), así como la posibilidad de realizar modificaciones genéticas para obtener ratones transgénicos que permitan el estudio de las funciones de genes (y por tanto proteínas) de interés biomédico.

Trabajos previos en el grupo, usando ratones transgénicos de ganancia y pérdida de función, nos han permitido estudiar y conocer el papel de GR en la fisiopatología de la piel (Pérez, 2011), además de otros epitelios estratificados como el oral y el ocular, incluyendo defectos en el cierre del paladar y párpado (Cascallana *et al.*, 2005; Sanchis *et al.*, 2010).

Por una parte se generaron y caracterizaron ratones que sobre-expresaban el gen *Nr3c1* (GR) de rata bajo el control del promotor de la K5, lo que restringe su expresión únicamente a la epidermis y otros epitelios estratificados (Pérez *et al.*, 2001). Estos ratones, denominados K5-GR, mostraron defectos en el desarrollo cutáneo, con hipoplasia epidérmica causada por una disminución en la proliferación de los queratinocitos, y alteraciones en los folículos pilosos, que además se vieron disminuidos en un 50% con respecto a los ratones *WT*. Este fenotipo coincide con el observado cuando se trata tópicamente la piel humana con análogos de GCs. Además, dichos ratones presentan menores niveles de mRNA de citoquinas pro-inflamatorias en la piel, tanto en estado basal, como en respuesta al tratamiento con PMA (Pérez *et al.*, 2001). En experimentos de carcinogénesis realizados en ratones K5-GR y *WT*, como ya hemos comentado con anterioridad, GR ejerce un efecto anti-tumoral, inhibiendo las vías de señalización NF- κ B y PI3K/AKT (Budunova *et al.*, 2003; Leis *et al.*, 2004).

Otro modelo animal generado y caracterizado en el grupo son los ratones K5-GR-TR, que expresan un receptor con una doble mutación (P493R y A494S), de modo que el transgén GR es eficiente en TR pero deficiente en TA. Estos ratones han permitido determinar que el efecto anti-proliferativo que ejerce GR se debe a su función de TR, mientras que el efecto anti-inflamatorio se lleva a cabo a través de

ambas funciones (Donet *et al.*, 2008). Además, también han permitido vincular la función de TA de GR a los efectos secundarios no deseados que causan un retraso en el proceso de cierre de una herida (Sanchis *et al.*, 2012).

Por otra parte se caracterizaron los ratones con pérdida parcial ($GR^{dim/dim}$) o total ($GR^{null/null}$) de función de GR. Los ratones $GR^{dim/dim}$ portan una mutación puntual (A458T) en el DBD de GR que impide su dimerización, y por tanto la regulación de la expresión génica a través de su unión al DNA, pero no la regulación a través de la interacción con otros factores (Reichardt *et al.*, 1998). Estos ratones alcanzan la edad adulta y no muestran diferencias en el desarrollo de la epidermis frente a los ratones *WT*, lo que sugiere que las acciones de GR independientes de su unión al DNA son suficientes para el desarrollo de la epidermis (Bayo *et al.*, 2008). Además, este modelo ha contribuido a entender mejor los mecanismos de acción (TA y TR) de GR. Experimentos realizados en estos ratones mostraron que el mutante de dimerización $GR^{dim/dim}$ es suficiente para mediar una respuesta anti-inflamatoria en piel tras un tratamiento tópico con PMA (Tuckermann *et al.*, 1999). Sin embargo, hoy en día se asume que ambas funciones de TA y TR contribuyen a las acciones anti-inflamatorias de GR.

Los ratones $GR^{null/null}$ mueren perinatalmente por problemas de surfactación pulmonar, y exhiben niveles plasmáticos anormales de ACTH y corticosterona (Cole *et al.*, 1995). El estudio de embriones tardíos de los ratones $GR^{null/null}$, reveló graves defectos en el desarrollo de la epidermis, y por tanto en su función de barrera. Los ratones con inactivación total de GR presentan también un retraso en la diferenciación terminal de queratinocitos y una mayor tasa de proliferación y muerte celular. Cuando los queratinocitos epidérmicos se

cultivaron *in vitro*, mostraron los mismos defectos proliferativos, sin embargo y de manera sorprendente, eran capaces de diferenciar cuando el medio de cultivo contenía altas concentraciones de Ca^{2+} , lo que apunta a un defecto en la captación de Ca^{2+} *in vivo* (Bayo et al., 2008). Además, se realizó un estudio del perfil transcriptómico de pieles de embriones $\text{GR}^{\text{null/null}}$ de edad E18.5 mediante el uso de microarrays de expresión (Sevilla et al., 2010). El análisis comparativo de piel de embriones $\text{GR}^{\text{null/null}}$ respecto a ratones control demostró cambios en la expresión de un grupo de genes implicados en el proceso de diferenciación de los queratinocitos. Entre ellos se detectó la represión de genes de diferenciación tardía (*Cdsn* y *Spr2d*), y la inducción de genes de diferenciación temprana (*Elf5* y *Krt77*). Así pues, GR induce la expresión de genes de diferenciación tardía (*Cdsn* y *Spr2d*) mientras que inhibe los de diferenciación temprana (*Elf5* y *Krt77*) de acuerdo con lo publicado anteriormente en cultivos de queratinocitos humanos tratados con Dex (Stojadinovic et al., 2007; Sevilla et al., 2010).

El análisis fenotípico y transcriptómico de los ratones $\text{GR}^{\text{null/null}}$ ha aportado información novedosa y relevante para el estudio funcional de GR en queratinocitos (Bayo et al., 2008); sin embargo, este modelo presenta algunas limitaciones. Los ratones $\text{GR}^{\text{null/null}}$ mueren perinatalmente, lo que impide el estudio del fenotipo en piel (y su progresión) en la edad adulta. El aumento de los niveles de ACTH y corticosterona descrito en estos ratones supone una complicación adicional, puesto que al tratarse de un *knock-out* completo, no se puede descartar la contribución de GR en otros tejidos como la dermis al fenotipo observado. Por ello, y con objeto de estudiar los efectos de la pérdida de GR restringida a la epidermis, hemos generado y caracterizado los ratones transgénicos con inactivación funcional de GR específica de epidermis (*Epidermal-specific GR knock-out*, GR^{EKO}).

Objetivos

Debido a la importancia de GR en la fisiopatología de la piel, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Generación y caracterización de los ratones transgénicos con inactivación funcional de GR específica de epidermis (GR^{EKO}).
2. Estudio del perfil transcriptómico de la epidermis de ratones GR^{EKO} recién nacidos.
3. Análisis de la respuesta de ratones GR^{EKO} adultos a distintos protocolos experimentales de inflamación y tumorigénesis de piel. Estudio de las vías de señalización implicadas.
4. Identificación de dianas transcripcionales primarias de GR mediante CHIP-seq.

Materiales y métodos

1. Experimentación animal

La experimentación animal se realizó en el animalario del Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV-CSIC), de acuerdo con la normativa vigente, respetando los procedimientos de manejo y sacrificio recomendados por la legislación española y europea (Real Decreto 53/2013, BOE 34, 8 de febrero de 2013). Los animales se estabularon en jaulas convencionales en condiciones de temperatura, humedad y luz controladas.

Para llevar a cabo los experimentos se realizaron cruces entre ratones transgénicos K5-Cre machos (Ramírez *et al.*, 2004) y ratones hembra GR^{lox/lox} (Tronche *et al.*, 1999), hasta conseguir un macho K5-Cre^{+/-}//GR^{lox/lox}. Mediante cruces sucesivos entre machos K5-Cre^{+/-}//GR^{lox/lox} y hembras 0Cre//GR^{lox/lox}, generamos la colonia de ratones K5-Cre^{+/-}//GR^{lox/lox} (a partir de ahora GR^{EKO}). Los ratones 0Cre//GR^{lox/lox} se utilizaron como ratones control. Es importante que en la programación de cruces, el portador de la recombinasa CRE sea siempre el macho, ya que si es la hembra la portadora, y bajo el control del promotor de la K5, la recombinasa CRE se expresará en el oocito (Ramírez *et al.*, 2004), transmitiéndose por tanto a toda la descendencia (independientemente de que expresen o no CRE). En este caso, se obtendrían ratones con inactivación total del gen, es decir, ratones GR^{null/null} en lugar de GR^{EKO} (datos no mostrados).

Para el mantenimiento de la colonia se realizaron cruces programados y a las 3 semanas del nacimiento se recogió una biopsia de cola para extraer el DNA genómico y proceder a su genotipado. Al mismo tiempo, los ratones se destetaron, separando machos y hembras, que se estabularon en nuevas jaulas. A las 6 semanas de edad, los ratones eran fértiles y podían ser cruzados. El fondo genético de las líneas independientes de ratones

transgénicos es un fondo híbrido C57BL/6J/DBA/2J, y su mantenimiento se realiza mediante cruces con ratones C57BL/6J/DBA/2J obtenidos de proveedor autorizado (Janvier Labs, Francia).

1.1 Líneas de ratones transgénicos K5-Cre y GR^{lox/lox}

Los ratones GR^{lox/lox} (Tronche *et al.*, 1999) fueron cedidos por el Profesor Günther Schütz del *Centro Alemán de Investigaciones contra el Cáncer (Deutsches Krebsforschungszentrum, DKFZ, Heidelberg, Alemania)*. En los ratones GR^{lox/lox} el exón 3 del gen que codifica para GR está flanqueado por las secuencias *loxP* (figura 9). Únicamente en presencia de la recombinasa CRE, las secuencias *loxP* se delecionan, eliminándose el exón que flanquean, dando lugar a una proteína no funcional (Reichardt *et al.*, 1999).

Los ratones K5-Cre (Ramírez *et al.*, 2004) fueron cedidos por los Doctores Ángel Ramírez y José Luis Jorcano del *Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (Ciemat, Madrid)*. Estos ratones expresan la recombinasa CRE bajo el control del promotor de la queratina 5 (K5) bovino. De esta manera se consigue que la expresión de dicha recombinasa ocurra únicamente en la epidermis y otros epitelios estratificados.

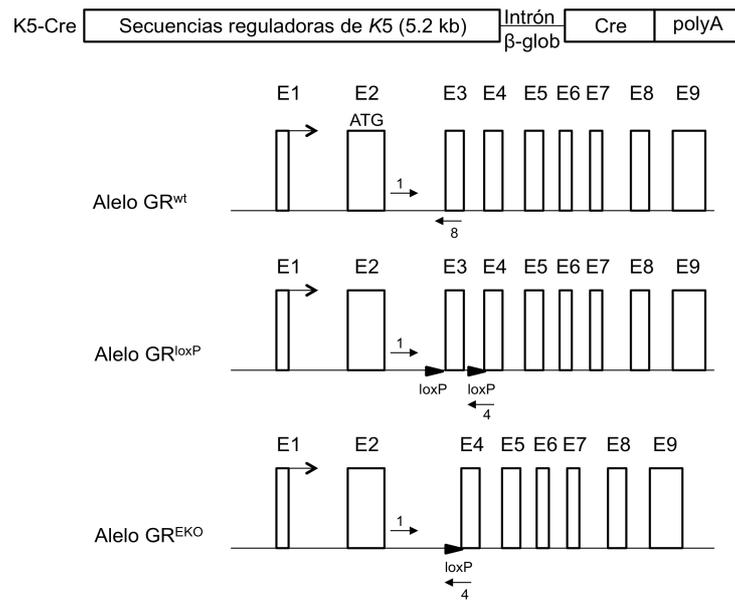


Figura 9. Esquema representativo de la generación de los ratones GR^{EKO}. El transgen K5-Cre contiene el gen de la recombinasa CRE bajo el control de las secuencias reguladoras de K5 bovina. El alelo GR^{loxP} se generó introduciendo dos secuencias loxP flanqueando el exón 3. En los ratones dobles transgénicos K5-Cre^{+/-}//GR^{loxP/loxP} o GR^{EKO}, la recombinasa CRE deletiona el fragmento de DNA contenido entre las secuencias loxP, generando un ratón *knock-out* específico de epidermis.

1.2 Obtención del DNA genómico

Para identificar los ratones pertenecientes a cada genotipo, se analizó el DNA genómico de biopsias de cola mediante PCR. La biopsia de cola se tomó al destete (día 21 postnatal). Una vez obtenidas las colas, se digirieron en una solución compuesta por Tris-HCl 1 M pH 8.0, NaCl 5 M, SDS al 10% y proteinasa K 10 mg/ml, incubando en un termo-bloque (Eppendorf) durante 3 h a 300 rpm y 55°C. Finalizada la incubación se añadió agua desionizada para

obtener una dilución 1/10. El DNA se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm mediante el uso de un Nanodrop (Thermo Scientific). Dado que la concentración de DNA obtenido es muy alta, es conveniente ajustar la cantidad de molde para la reacción de PCR.

1.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Una vez obtenido el DNA genómico se amplificaron los fragmentos específicos y necesarios para identificar los ratones, mediante la técnica de la PCR. Para ello se utilizaron los cebadores específicos para cada gen. La secuencia de los cebadores y las condiciones de PCR se detallan en la tabla 1 (Tronche *et al.*, 1999; Ramirez *et al.*, 2004). Para llevar a cabo la reacción de amplificación se usó un termociclador Mastercycler (Eppendorf).

La mezcla de reacción para GR contenía: 1 μ l de DNA (25-50 ng/ μ l), tampón de reacción sin $MgCl_2$ 1x (Biotools), 2 mM $MgCl_2$ (Biotools), 1.25 mM de una mezcla de dNTPs (Thermo Scientific), 200 ng/ μ l de cada uno de los cebadores (Roche) y 0.5 unidades de polimerasa (Biotools), en un volumen final de 20 μ l.

Los productos obtenidos se resolvieron en un gel de agarosa al 2% que contenía 4 μ l de GelRed™ 10000x (Biotium), en tampón TAE (40 mM Tris-acetato pH 8.3, 1 mM EDTA) durante 40 min a 100 v constantes, con una fuente Power Pac 3000 (Bio-Rad). Para el visionado y fotografiado de geles se usó un transiluminador de luz ultravioleta Ultima 16si Plus (Isogen).

Tabla 1. Secuencias de los cebadores utilizados para el genotipado de los ratones.

Gen	Cebadores	Secuencia oligonucleótidos	Condiciones	Fragmentos
GR	GR1	GGCATGCACAATTACGGCCTTCT	95°C 1'	225 pb
	GR4	GTGTAGCAGCCAGCTTACAGGA	95°C 30"	
	GR8	CCTTCTCATTCCATGTCAGCATGT	65°C 1'	}x40 390 pb
			72°C 1'	
		72°C 5'		
K5Cre	β-globCre F	TTCAGGGTGTGTTTAGAATGG	94°C 5'	
		β-globCre R	CAATAAGAATATTTCCACGCCA	
		94°C 30"		
		58°C 30"		
		72°C 50"		
		72°C 5'		

2. Obtención de muestras para análisis histopatológico y bioquímico

Tras el sacrificio de los animales (tanto embriones como adultos) se recogió piel dorsal y se congeló en nitrógeno líquido para ser procesada para la extracción de RNA o proteínas totales, o se almacenó a -80°C para futuras determinaciones.

Para la obtención de epidermis, después de recoger la piel dorsal, ésta se incubó con dispa II (10 mg/ml, Roche) durante 1 h a temperatura ambiente (*Room Temperature*, RT). Transcurrido el tiempo de incubación, y con la ayuda de unas pinzas, se procedió a la separación de la epidermis de la dermis. Las muestras recogidas se procesaron como en el caso anterior, congelando en nitrógeno líquido.

2.1 Obtención de muestras para análisis histológico

En este caso, la piel dorsal obtenida tras el sacrificio se fijó durante 48 h en etanol al 70% (Panreac) o en paraformaldehído (PFA) al 4% (Sigma). Tras la fijación las muestras se deshidrataron en un procesador de tejidos (STP 120; Myr, Micron), pasando por baños de concentraciones crecientes de etanol y xileno. A continuación, fueron incluidas en parafina en una estación de inclusión (EC-350; Myr, Micron). Posteriormente se realizaron cortes seriados de 4 µm de grosor con un micrótopo de rotación (HM-340E; Micron), que fueron adheridos a portaobjetos tratados con poli-lisina (Thermo Scientific).

2.1.1 Tinción con Hematoxilina-Eosina

Como paso previo a la tinción, los cortes de parafina se desparafinaron mediante una incubación durante 30 min a 65°C y dos pases por xileno. A continuación se hidrataron las muestras en sucesivos pases por soluciones de etanol en concentraciones decrecientes (100%, 90%, 70% y 50%), finalizando en agua.

Tras la hidratación de los cortes, éstos se sumergieron en soluciones de hematoxilina de Harris (Panreac), Bluing Reagent (Thermo Scientific) y eosina amarilla (Panreac). Una vez teñidas se deshidrataron en sucesivos pases por concentraciones crecientes de etanol (50%, 70%, 90% y 100%) y xileno y se montaron con una resina sintética (DPX; Merck).

Las preparaciones fueron visualizadas y fotografiadas con una cámara Leica EC3 acoplada a un microscopio de campo claro Leica DM 1000.

2.1.2 Análisis inmunohistoquímico

Una vez desparafinadas las muestras, se pasaron por dos baños de xileno y otros dos baños de etanol 100% (10 min cada uno). Seguidamente, se sumergieron durante 20 min en una solución de metanol:H₂O₂ (29:1) para bloquear la actividad peroxidasa endógena.

Llegados a este punto, las muestras fijadas en PFA 4% se incubaron durante 10 min en un tampón 10mM citrato (pH 6.0) al baño maría y se dejaron atemperar a RT.

A continuación, para reducir el marcaje inespecífico, se incubaron las muestras durante 20 min en una solución de suero fetal bovino (Lonza) al 5% en PBS (PBS/FBS). Finalizado el tiempo de incubación, se retiró la solución de bloqueo y se incubó con el anticuerpo primario correspondiente (tabla 2) durante toda la noche a 4°C. En todos los casos, los anticuerpos estaban diluidos en seroalbúmina bovina al 1% en PBS (PBS/BSA). Seguidamente, y tras lavar las muestras con PBS para eliminar el exceso de anticuerpo primario, se incubó durante 45 min a RT con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con biotina (tabla 2) diluido en PBS/BSA 1%. Transcurrido el tiempo, se lavaron las muestras de nuevo con PBS y se incubaron durante 30 min a RT con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC, Vectastain; Vector Laboratories).

Para revelar la reacción se utilizó un kit de diaminobencidina como sustrato cromogénico para la peroxidasa (DAB; Vector Laboratories), siguiendo las recomendaciones del proveedor. La reacción química se paró sumergiendo las muestras en agua, visualizando las muestras en un microscopio óptico para determinar el tiempo adecuado de revelado. Para

poder contrastar la señal se hizo una tinción suave con hematoxilina. Las muestras se deshidrataron y montaron según lo descrito anteriormente.

Tabla 2. Anticuerpos utilizados para inmunohistoquímica

Anticuerpo primario	Dilución	Compañía	Especie	Fijación del tejido
BrdU (1170376)	1/100	Roche	Ratón	EtOH 70%
β -Catenina (sc. 7199)	1/500	Santa Cruz	Conejo	EtOH 70%
Corneodesmosina (F28-27)	1/500	Lab. Serre	Ratón	PFA 4%
CycD1 (sc. 450)	1/50	Santa Cruz	Ratón	PFA 4%
E-Cadherina (610181)	1/500	BD	Ratón	EtOH 70%
Filagrina (PRB-417P)	1/1000	Covance	Conejo	EtOH 70%
IL-6 (407670)	1/250	Calbiochem	Conejo	EtOH 70%
K10 (PRB-159P)	1/3000	Covance	Conejo	EtOH 70%
K13 (Ab16112)	1/100	Abcam	Ratón	EtOH 70%
K5 (PRB-160P)	1/3000	Covance	Conejo	EtOH 70%
K6 (PRB-169P)	1/2000	Covance	Conejo	EtOH 70%
Laminina-A (Ab11575)	1/200	Abcam	Conejo	PFA 4%
Loricrina (PRB-145P)	1/1000	Covance	Conejo	EtOH 70%
p-AKT (Ser437) (#9271)	1/100	Cell Signaling	Conejo	PFA 4%
p-c-Jun (sc. 822)	1/100	Santa Cruz	Ratón	EtOH 70%
p-ERK (Thr202/Tyr204) (#4376)	1/100	Cell Signaling	Conejo	PFA 4%
STAT3 (#9132)	1/100	Cell Signaling	Conejo	PFA 4%

Anticuerpo secundario	Dilución	Compañía
Conejo biotilado	1/1000	Jackson ImmunoResearch Laboratories
Ratón biotilado	1/1000	Jackson ImmunoResearch Laboratories

2.1.3 Inmunohistoquímica anti-BrdU

Una hora antes del sacrificio, los ratones se inyectaron con 10 mg de BrdU por Kg de peso (a partir de una solución stock 10mg/ml BrdU, disuelto en suero salino al 0.7%), permitiendo el estudio de la proliferación celular *in vivo*.

Para poder determinar el grado de incorporación de BrdU en las muestras de tejido de los ratones que habían sido inyectados previamente, se realizó un paso adicional a los citados en el apartado anterior. Tras el bloqueo con metanol:H₂O₂ (29:1), se incubaron las muestras en 1 N HCl (Merck) durante 40 min a 37°C, favoreciendo la desnaturalización del DNA y por tanto la detección del BrdU. A continuación, se realizaron lavados con PBS y se procedió como se ha descrito en el apartado anterior.

Para el análisis de la proliferación se contó el número de núcleos basales positivos para BrdU con respecto al número total de núcleos basales interfoliculares. El recuento se realizó al menos en 3 secciones de cada genotipo, contando al menos 400 núcleos por sección.

2.2 Tinción de lípidos mediante Rojo Nilo

Para determinar la composición lipídica de la epidermis se procedió a teñir piel de lomo de ratones recién nacidos con el colorante Rojo Nilo (Sigma). Las muestras de piel, previamente fijadas en etanol 70%, se desparafinaron y rehidrataron. A continuación, se incubaron durante 5 min a RT con una solución de Rojo Nilo 1 µg/ml en PBS (incluyendo DAPI, Life Technologies). Tras la incubación, se lavó con PBS y se montó con FluorSave™ Reagent (Calbiochem). Las muestras se visualizaron y

fotografiaron con un microscopio de fluorescencia Leica DM RXA2. Los lípidos polares adquieren un color rojo mientras que los no polares se tiñen de verde (Fowler y Greenspan, 1985).

2.3 Tinción con azul de toluidina para mastocitos

Para la detección de mastocitos en la dermis se realizó una tinción con el colorante azul de toluidina (Sigma). Las muestras de piel de lomo, fijadas en PFA 4%, se desparafinaron y rehidrataron, finalizando en agua. Seguidamente se sumergieron durante 3 min en una solución de trabajo de azul de toluidina (1% azul de toluidina en 70% etanol, disuelto en una solución 1% de cloruro de sodio pH 2.3). Tras la tinción se realizaron lavados con agua destilada y se procedió a la deshidratación. En esta ocasión el paso por los distintos baños de etanol fue muy rápido ya que de otro modo el color adquirido durante la tinción desaparece. Por último, las muestras se pasaron por los baños de xileno y se montaron. Las muestras se visualizaron y fotografiaron como se ha descrito con anterioridad. Los mastocitos teñidos adquieren un color azul/violeta.

2.4 Análisis de la apoptosis *in vivo* mediante TUNEL

Se analizó el porcentaje de células apoptóticas en secciones de piel de lomo, fijadas en PFA 4% e incluidas en parafina, mediante el uso del kit *In Situ* Cell Death Detection Kit Fluorescein (Roche).

Las muestras, fijadas en PFA 4% e incluidas en parafina, se procesaron de manera habitual, a diferencia del bloqueo, que se realizó con

una solución 0.1 M Tris-HCl pH 7.5/FBS 40%/BSA 10%, incubando durante 30 min a RT. A continuación, y tras lavar con PBS, se incubó con la mezcla TUNEL Reaction Mixture durante 1 h a 37°C en oscuridad. Al finalizar la incubación, se lavó con PBS y se montó con FluorSave™ Reagent conteniendo DAPI. Las muestras se visualizaron y fotografiaron en un microscopio de fluorescencia Leica DM RXA 2 con los filtros adecuados.

2.5 Tinción *whole mount* de epidermis de cola

Después del sacrificio, la cola de los ratones adultos se cortó en pequeños trozos y se separó la epidermis de la dermis incubando la muestra de piel en una solución 5 mM EDTA en PBS durante 4 h a 37°C. Tras la separación, la epidermis se fijó en PFA 4% durante 1 h a RT y se lavó 3 veces con PBS. Seguidamente se incubó con los anticuerpos anti-GR (sc. 1004, Santa Cruz) y anti-K14 (PRB-155P, Covance) durante toda la noche a RT. Al día siguiente las muestras se lavaron durante 1 h con PBS-0.2% Tween 20 y se incubaron con el anticuerpo secundario en PBS durante toda la noche a RT. De nuevo, al día siguiente se lavaron las muestras y se montaron con Mowiol (Sigma). Las muestras se visualizaron y fotografiaron con un microscopio confocal Leica TCS SL.

3. Microscopía electrónica de transmisión

Las muestras de piel se fijaron en 2.5% glutaraldehído/ 2.5% paraformaldehído/ PBS (pH 7.2) durante 15 h a RT. A continuación se fijaron durante 1 h con 1% OsO₄/PBS en oscuridad a 4°C. Se deshidrataron en una

serie creciente de una solución agua/acetona y se embebieron en AGAR 100 resina epoxy (Agar Scientific, Stansted, UK). Se realizaron secciones en un ultramicrotomo (Reichert Ultracut S; Leica, Wetzlar, Alemania) y se tiñeron con 2% acetato de uranilo y citrato de plomo a diferentes concentraciones. Las secciones se visualizaron con un microscopio electrónico de transmisión (CEM 902^a; Zeiss, Oberkochen, Alemania) a un voltaje de aceleración que ascendió a 80kV (Centro de Investigaciones Príncipe Felipe, Valencia).

4. Ensayo de permeabilidad de barrera con azul de toluidina

Este ensayo modifica la composición lipídica de la piel, de manera que permite discriminar las zonas que poseen la función de barrera de las que no a medida que se va desarrollando la epidermis. Las regiones de epidermis todavía inmaduras (y que no poseen, por tanto, función de barrera) dejan pasar el colorante (azul de toluidina), mientras que las maduras (que ya han adquirido la función de barrera) no permiten el paso del colorante y se ven blancas (Hardman *et al.*, 1998).

Tras practicar una cesárea a la hembra gestante se recogieron embriones de E16.5, E17.5 y E18.5. Antes de comenzar con el ensayo, es importante identificar los embriones y tomar una biopsia de cola para su posterior genotipado. Una vez hecho esto, y con la ayuda de unos *cassettes* introducimos los embriones en baños en gradiente de metanol, 30 s en cada baño, como sigue:

- Metanol al 25% en agua
- Metanol al 50% en agua

- Metanol al 75% en agua
- Metanol al 100%
- Metanol al 75% en agua
- Metanol al 50% en agua
- Metanol al 25% en agua
- PBS

Terminado este paso, se dejaron los embriones en una solución de azul de toluidina al 1% en agua durante 1 min. A continuación, se destiñeron los embriones en PBS pH 7.4 hasta que el patrón aparece (el alto pH del PBS facilita la eliminación del exceso de colorante). Cuando el patrón de tinción fue claro, los embriones se fotografiaron en una lupa Leica MZ 1125.

5. Extracción de proteínas totales

Se recogió muestra de tejido fresco (piel de lomo y epidermis, tanto de adulto como de embrión) y se pulverizó en un mortero con nitrógeno líquido, procurando siempre que la muestra no llegara a calentarse. Las muestras pulverizadas se lisaron con tampón C (20 mM HEPES pH 7.9, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA y 25% de glicerol) conteniendo inhibidores de proteasas (complete Mini EDTA-free; Roche) y fosfatasa (PhosStop; Roche) mediante tres ciclos de congelación, en nitrógeno líquido, y descongelación a 37°C. A continuación, se añadió detergente NP-40 a una concentración final del 1% y se incubaron las muestras durante 15 min en hielo, para después centrifugar durante 20 min a 10000 rpm y 4°C. Se recogió el sobrenadante y se determinó la concentración de proteínas mediante un ensayo colorimétrico usando el reactivo de Bradford (Bio-Rad), que presenta un máximo de emisión a 595 nm. Se utilizó seroalbúmina bovina (BSA) para realizar una recta patrón

con concentraciones conocidas. La medida de absorbancia se llevó a cabo en un lector de microplacas Modelo 550 (Bio-Rad).

5.1 Electroforesis y transferencia

Se usaron 30 μg de proteínas de cada una de las muestras, a los que se añadieron tampón de carga (que contiene 6% de SDS y 1% de β -mercaptoetanol) y se hirvieron durante 10 min a 95°C, permitiendo así la desnaturalización de las proteínas. A continuación, se cargaron las muestras en un gel de SDS-Poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% (la composición de los geles se detalla en la tabla 3). Para poder estimar el tamaño de las bandas de interés, se cargó un marcador de pesos moleculares (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder; Thermo Scientific). Los geles se corrieron a 12 mA constantes durante 3 h, con la fuente citada anteriormente.

Al finalizar, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Hybond ECL, Amersham), usando un tampón de transferencia (25 mM Tris, 192 mM glicina y metanol al 20%). El proceso se llevó a cabo empleando un método semi-seco (Trans Blot SD Semi-dry Transfer Cell, Bio-Rad), durante 1 h a 0.8 mA/cm³. Para comprobar la eficiencia de la transferencia se tiñó la membrana con una solución de rojo Ponceau (0.1% Ponceau-S, 5% ácido acético glacial; Sigma).

Tabla 3. Composición de los geles de poliacrilamida

Gel de concentración (5%)		Gel de separación (10%)	
H ₂ O	1.46 ml	H ₂ O	2.4 ml
1M Tris-HCl pH 6.8	250 µl	1.5M Tris-HCl pH 8.8	1.25 ml
poliacrilamida 40%	250 µl	poliacrilamida 40%	1.25 ml
SDS 10%	20 µl	SDS 10%	50 µl
APS 10%	20 µl	APS 10%	50 µl
TEMED	2 µl	TEMED	4 µl

5.2 Bloqueo, incubación y revelado

La membrana se bloqueó con tampón PBS con 0.1% Tween 20 (Sigma), y un 5% de leche desnatada en polvo, en agitación y RT durante 1 h. Tras el bloqueo, se incubó con el anticuerpo primario correspondiente, en la misma solución anterior, durante toda la noche a 4°C. Transcurrido la incubación, se realizaron 3 lavados, de 10 min cada uno, en agitación, con PBS-0.1% Tween 20 y el filtro se hibridó con el correspondiente anticuerpo secundario (diluido en la misma solución de bloqueo) conjugado con peroxidasa durante 1 h, en agitación y a RT. Tras 3 nuevos lavados en las mismas condiciones, se procedió al revelado. Para detectar la señal, se hizo uso de la solución Enhanced Chemiluminescence (ECL; Amersham) o ECL plus (Amersham) (las condiciones para cada anticuerpo se detallan en la tabla 4) y del sistema de detección ImageQuant™ LAS 4000 mini (GE Healthcare).

Las bandas obtenidas se cuantificaron con el software Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Tras la cuantificación, se corrigieron los posibles errores de carga referenciando los valores obtenidos al de la β -Actina (control de carga). Además, los valores se normalizaron asignando a las muestras

control un valor arbitrario. Los experimentos se realizaron en, al menos, 3 individuos de cada genotipo.

Tabla 4. Anticuerpos utilizados en Western Blot

Anticuerpo primario	Dilución	Compañía	Especie	Revelado
Actina (A-2066)	1/1000	Sigma	Conejo	ECL
AKT (sc. 1619)	1/1000	Santa Cruz	Cabra	ECL
Caspasa 14 (sc. 5628)	1/1000	Santa Cruz	Conejo	ECL +
E-Cadherina (610181)	1/1000	BD	Ratón	ECL
ERK 2 (C-14) (sc. 154)	1/1000	Santa Cruz	Conejo	ECL
Filagrina (PRB-417P)	1/500	Covance	Conejo	ECL +
GR (sc. 1004)	1/500	Santa Cruz	Conejo	ECL +
K5 (PRB-160P)	1/1000	Covance	Conejo	ECL +
p65 (sc. 372)	1/1000	Santa Cruz	Conejo	ECL +
p-AKT (Ser437) (#9271)	1/500	Cell Signaling	Conejo	ECL +
p-ERK (Thr202/Tyr204) (#4376)	1/500	Cell Signaling	Conejo	ECL +
p-SAP/JNK (Thr183/Tyr185) (#9251)	1/500	Cell Signaling	Conejo	ECL +
p-STAT3 (Tyr705) (#9145)	1/1000	Cell Signaling	Conejo	ECL
S100A9	1/500	R&D Systems	Conejo	ECL +
SMA (Ab18147)	1/500	Abcam	Ratón	ECL
SNAIL (#3895)	1/1000	Cell Signaling	Ratón	ECL
SLUG (#9585)	1/1000	Cell Signaling	Ratón	ECL
STAT3 (#9132)	1/1000	Cell Signaling	Conejo	ECL
Tubulina (clon DM1A)	1/4000	Sigma	Ratón	ECL

Anticuerpo secundario	Dilución	Compañía
anti-conejo HRP	1/1000	Amersham
anti-cabra HRP	1/1000	Jackson ImmunoResearch Laboratories
anti-ratón HRP	1/1000	Amersham

6. Extracción de RNA

El RNA total de las muestras se extrajo mediante el uso del TRIzol Reagent (Invitrogen). Se introdujo el tejido en 1 ml de TRIzol y se procedió a homogeneizarlo usando el Polytron a máxima velocidad durante 1 min. Una vez disgregado el tejido, las muestras se centrifugaron durante 10 min a 10000 rpm y 4°C para eliminar los restos de tejido. Tras recoger el sobrenadante en un nuevo tubo, se incubaron durante 5 min a RT. A continuación se añadieron 200 µl de cloroformo y, tras agitar durante 15 s, se incubaron otros 5 min a RT para después centrifugarlas durante 15 min a 11000 rpm y 4°C. La fase acuosa (superior) se transfirió a un nuevo tubo, al que se añadieron 500 µl de isopropanol frío. Se incubaron las muestras durante 5 min a RT y se centrifugaron 10 min a 11000 rpm y 4°C. El sobrenadante se eliminó, el *pellet* de RNA se lavó con 1 ml de etanol frío al 75%, centrifugando 5 min a 11000 rpm y 4°C. El etanol se eliminó y el *pellet* se dejó secar a RT. Una vez seco, se resuspendió en 30 µl de agua libre de nucleasas (NF) y se incubó a 55°C durante 10 min. Acabada la extracción se cuantificó el RNA, mediante el uso del NanoDrop, midiendo la absorbancia a 260 nm y la relación de absorbancia 260/280 para determinar su pureza.

6.1 Síntesis de cDNA (transcripción reversa)

Para la síntesis de cDNA se tomó 1 µg de RNA, se añadieron olido(dT) (Thermo Scientific) como cebadores y se completó con agua NF hasta un volumen de 12 µl. Tras incubar la reacción a 65°C durante 5 min, se añadieron 8 µl de una mezcla que contenía tampón 5x, una mezcla de nucleótidos (10 mM), 40 unidades de inhibidor de RNasa (Thermo Scientific) y 200 unidades

de transcriptasa reversa (Revertaid, Thermo Scientific). Una vez preparada la reacción de retrotranscripción, ésta se incubó a 42°C durante 1 h. Seguidamente, se inactivó el enzima calentando a 70°C durante 10 min y se pasó a hielo. Por último el cDNA se diluyó 1/10 para su posterior uso.

6.2 PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)

La PCR se desarrolló en un termociclador 7500 Fast (Applied Biosystems). La mezcla de reacción contenía 8 µl de la dilución 1/10 de la reacción de síntesis de cDNA, los distintos cebadores (10 µM) (las secuencias de los cebadores se muestran en la tabla 5) y 10 µl de FastStart Universal SYBR Green Master (Roche), en un volumen final de 20 µl. En un primer paso, la reacción se incubó primero a 50°C durante 20 s y seguidamente a 95°C durante 10 min para activar la polimerasa. A continuación se amplificó durante 40 ciclos, consistentes en un primer paso de desnaturalización durante 15 s a 95°C seguido de otro de hibridación y extensión de 1 min a 60 °C.

Tabla 5. Secuencia de los cebadores utilizados en qRT-PCR.

Gen		Secuencia oligonucleótidos
<i>Bcl3</i>	Fwd	CACGCCGTGGAGAACAACAGC
	Rev	GGTCTGGGGATGGCTCAGGCT
<i>CycD1</i>	Fwd	CATCAAGTGTGACCCGGACTG
	Rev	CCTCCTCCTCAGTGGCCTTG
<i>Elf5</i>	Fwd	GATGTGGGGACAAAGGAAGA
	Rev	GTCCGGTGTCCATCAGAGTT
<i>Ereg</i>	Fwd	AGACGCTCCCTGCCTCTTGGG
	Rev	CTGCACTTGAGCCACACGGGG

<i>Fkbp51</i>	Fwd	CTTGGACCACGCTATGGTTT
	Rev	AACGACTCTGAGGCTTTGGA
<i>Gilz</i>	Fwd	CTGTTGGCCTCGACTGCTG
	Rev	GCCGAAAGTTGCTCACGAAG
<i>Hprt1</i>	Fwd	TCAGTCAACGGGGGACATAAA
	Rev	GGGGCTGTAAGCTTAACCAG
<i>Il-1β</i>	Fwd	GCAACTGTTCTGAACTCAACT
	Rev	ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT
<i>Il-6</i>	Fwd	GATGCTACCAAAGTGGATATAATC
	Rev	GGTCCTTAGCCACTCCTTCTGTG
<i>Krt77</i>	Fwd	GAGCAAAGATGAGGCTGAGG
	Rev	CCTCCGCATCAGAAATCAAT
<i>Mmp3</i>	Fwd	CCAGGTGTTGACTCAAGGGTGGGA
	Rev	ACACAGGATGCCTTCCTTGGATCTC
<i>Per1</i>	Fwd	GGGAGACAAGAAGCCCCCGGA
	Rev	GTGTCGGCGACCAGGGGGAA
<i>S100a8</i>	Fwd	GGAGTTCCTTGCGATGGTGAT
	Rev	TCTGCTACTCCTTGTGGCTGTCT
<i>S100a9</i>	Fwd	TGACAGCTGCCCAACCAA
	Rev	TTCCCAGAACAAAGGCCATT
<i>Spi</i>	Fwd	TGGCACCTGGACTGTGGAAGG
	Rev	CCCGTCCCTCTGGCAGACAT
<i>Stat3</i>	Fwd	CTGGCGGGGCTCTTGTGAGC
	Rev	GACTAAGGGCCGGTCCGGGT
<i>Tnf-α</i>	Fwd	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT
	Rev	GCTACGACGTGGGCTACAG
<i>Tsfp</i>	Fwd	CCAGGCTACCCTGAACTGA
	Rev	TCTGGAGATTGCATGAAGGA
<i>Zfp36</i>	Fwd	CCACCTCCTCTCGATACAAGA
	Rev	GCTTGGCGAAGTTCACCCA

7. Microarrays de expresión

Para el análisis de microarrays se utilizó RNA de epidermis dorsal de ratones recién nacidos GR^{EKO} y control. La extracción de RNA se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito anteriormente. A continuación, se purificaron 20 µg del RNA, para lo cual se hizo uso del kit RNeasy (Qiagen). El RNA purificado se envió a la Unidad de Genómica y Proteómica del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca (CIC-CSIC). La calidad del RNA fue analizada mediante un Bioanalyzer 2100 de Agilent (Agilent Technologies).

Comprobada la calidad del RNA, se procedió a sintetizar cDNA y a su hibridación con el chip GeneChip® Mouse Gene 1.0 ST Array. En este chip se analiza, a partir de un set de 770000 sondas, el nivel de expresión de aproximadamente 29000 genes de ratón bien caracterizados.

8. Tratamientos tópicos

8.1 Tratamiento con PMA y Dexametasona

Los tratamientos se realizaron en ratones adultos de 8 semanas de edad. En primer lugar se afeitó el lomo de los ratones y 48 h después, los ratones se trataron tópicamente con una única dosis de 8 µg de PMA (Sigma) o vehículo (acetona). A las 48 h, los ratones se sacrificaron para la toma de muestras. Una hora antes de ser sacrificados se inyectó intraperitonealmente BrdU.

Para el tratamiento con dexametasona (Dex; Sigma), se aplicó de manera tópica una única dosis de 8 µg de Dex o vehículo. A las 24 h, un grupo de ratones se trató con una única dosis de 8 µg de PMA. Transcurridas 48 y

72 h desde el primer tratamiento se sacrificaron los ratones tratados con Dex y vehículo, y los tratados con Dex + PMA. Una hora antes de ser sacrificados se inyectó intraperitonealmente BrdU.

En ambos casos se recogieron muestras de piel de lomo para su posterior análisis histopatológico y bioquímico.

8.2 Tratamiento con SDS

De la misma manera que en el caso anterior, un grupo de ratones adultos de 8 semanas de edad se afeitaron 48 h antes del inicio del tratamiento. En este caso al afeitar se delimitaron dos flancos (izquierdo y derecho), cada uno de los cuales recibió el tratamiento o el vehículo (agua). Los ratones se trataron tópicamente con una dosis diaria de 200 µl de 10% SDS (Merck) o agua durante 5 días. Al finalizar el tratamiento, los ratones se inyectaron de manera intraperitoneal con BrdU, se sacrificaron y recogieron muestras para el posterior análisis.

9. Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

Los ensayos de ChIP se llevaron a cabo tanto en queratinocitos primarios de ratón (MPKs) como en la línea celular OLL (ver la descripción en el apartado 12). Las células se sembraron en placas p100 con 10 ml de medio de cultivo DMEM, suplementado como se indica a continuación y se trataron con Dex (concentración final 100 nM) a los tiempos indicados. Al finalizar el tratamiento, se añadió formaldehído 37% (concentración final 1%) y se incubó 10 min a RT para unir las proteínas al DNA. A continuación se añadió glicina

1M para neutralizar el formaldehído y se incubó 5 min a RT. Una vez finalizada la fijación, las células se lavaron con PBS frío y se recogieron en PBS con inhibidores de proteasas centrifugando 5 min a 2000 rpm y 4°C. En este punto, las células se pueden guardar a -80°C o seguir con la inmunoprecipitación.

Seguidamente se añadieron 200 µl de tampón de lisis, con inhibidores de proteasas, al *pellet* de células y se dejó sobre el hielo durante 10 min. Para fragmentar la cromatina, las células se sonicaron mediante el uso del Bioruptor (Diagenode) durante 15 min a máxima potencia, con ciclos de 30 s encendido y 30 s apagado, para después centrifugar durante 10 min, 13000 rpm a 6°C y eliminar los restos celulares, pasando el sobrenadante a un nuevo tubo. Siguiendo con la inmunoprecipitación, se añadieron 1.8 ml de tampón de dilución (con inhibidores de proteasas) y 15 µl de *beads* magnéticas con proteína A (Dynabeads® Protein A, Invitrogen) y se incubó en rotación durante 2 h a 4°C para eliminar proteínas o DNA que puedan unirse inespecíficamente a la proteína A. Transcurrido el tiempo de incubación, se recuperó el sobrenadante, con la ayuda de un imán (DynaMag™-2, Invitrogen) para eliminar las *beads* magnéticas, se guardaron 40 µl del sobrenadante que constituirán la fracción *Input* y se añadieron 2 µg de anticuerpo anti-GR (sc. 1004, Santa Cruz) y se incubó en rotación durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se añadieron 20 µl de *beads* y se incubó en rotación durante 1 h a 4°C. En esta ocasión el sobrenadante se elimina, aunque se puede guardar una pequeña fracción para comprobar la fragmentación de la cromatina en un gel de agarosa. Las *beads* se lavaron resuspendiéndolas con 1 ml de cada uno de los siguientes tampones: Low Salt, High Salt, LiCl, TE (la composición de los tampones se detalla en la tabla 6). Después de los lavados, se eluyeron los complejos de proteínas/DNA incubando las muestras en 500 µl de tampón de elución durante 15 min, a 300 rpm y 25°C. Estas muestras constituyen la

fracción inmunoprecipitada o IP. Al resto de fracciones se añadió el volumen necesario de tampón de elución para tener un total de 500 µl. Para revertir la unión de las proteínas con el DNA se añadieron a todas las fracciones 20 µl de NaCl 5M y se dejaron toda la noche a 65°C. A continuación, se trataron las muestras con 2.5 µl de RNasa A 10 mg/ml (Sigma), para eliminar el RNA contaminante, incubando durante 30 min a 37°C. En un siguiente paso se eliminaron las proteínas, incubando las muestras con una mezcla de EDTA 0.5 M, Tris-HCl 1 M y proteinasa K (10 mg/ml) durante 2 h a 300 rpm y 55°C. Seguidamente, se procedió a purificar el DNA. Para ello, se añadieron 500 µl de una solución de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, se agitaron las muestras y se centrifugaron durante 15 min a 13000 rpm a 4°C. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo y se añadieron 500 µl de cloroformo. Una vez más, las muestras se agitaron y centrifugaron en las mismas condiciones. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo, se añadió 1 ml de etanol frío al 100% y 18.8 µl de NaCl 5 M y se dejó toda la noche en el congelador -20°C. Por último, se centrifugó durante 30 min a 13000 rpm y 4°C. Se descartó el sobrenadante, se dejó secar y resuspendió en 30 µl de agua NF. El DNA obtenido se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm mediante el uso del Nanodrop.

Tabla 6. Composición de los distintos tampones usados para el lavado de las *beads* magnéticas.

Low Salt	High Salt
0.1% SDS	0.1% SDS
1% Triton X-100	1% Triton X-100
2 mM EDTA	2 mM EDTA
20 mM Tris-HCl pH 8.1	20 mM Tris-HCl pH 8.1
150 mM NaCl	500 mM NaCl

LiCl	TE
0.25 M LiCl	1 mM EDTA
1% IGEPAL-CA630	10 mM Tris-HCl pH 8.0
1% ácido deoxicolato	
1 mM EDTA	
10 mM Tris-HCl pH 8.1	

9.1 ChIP-sequencing

El DNA obtenido se envió al centro de secuenciación de Noruega (Norwegian Sequencing Centre, Ullevål, Oslo, Noruega) para su secuenciación, que se llevó a cabo en un secuenciador HiSeq 2000 (Illumina).

El análisis y estudio de los resultados de ChIP-sequencing se llevó a cabo en colaboración con el grupo del Dr. Ian Mills (Centre for Molecular Medicine Norway, NCMM-EMBL, Oslo, Noruega).

Para la validación de la unión se llevó a cabo una reacción de PCR. La mezcla contenía 1 μ l de DNA, 300 nM de cada cebador y 10 μ l de TaKaRa *Premix Ex Taq*TM (TaKaRa), en un volumen final de 20 μ l. Las secuencias de los cebadores específicos usados se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Secuencia de los cebadores utilizados para la validación del ChIP-sequencing.

Gen		Secuencia oligonucleótidos
<i>Gilz</i>	Fwd	GGAGGGAATGCAACTGGGAG
	Rev	CCCCTCCCTTGAATGCTGAA
<i>Neg2</i>	Fwd	CTTTCCTAGATGGGCACCAA
	Rev	AGTCATGCCAGCCTAGAGGA
<i>Per1</i>	Fwd	TACAGGACCGCTGTCGTTGGGT
	Rev	CGTCAAAGCGGAGGCAGGAGG
<i>Zfp36</i>	Fwd	TCCTCTATCAAGTCCGCCCA
	Rev	AGGAACGGGATGTTTCCGTC

10. Protocolo de carcinogénesis química en dos pasos

Este protocolo consta de un primer paso en el que se administra tópicamente una única dosis sub-carcinogénica del carcinógeno DMBA, que causa una mutación en el gen de *Hras* de manera irreversible (cambio de una A por una T en el codón 61). El segundo paso consiste en la aplicación tópica de repetidas dosis del éster de forbol y promotor tumoral PMA. La ventaja más clara de este protocolo es la posibilidad de ir observando la aparición de los papilomas a lo largo de las semanas. Típicamente, los primeros papilomas pueden observarse a las 6-12 semanas. A partir de la semana 20 de tratamiento algunos de los papilomas pueden convertirse en carcinomas escamosos. Estos plazos pueden cambiar en función de la cepa de ratón utilizada y las combinaciones de iniciador/promotor utilizadas (Abel *et al.*, 2009).

En nuestro caso se usaron dos protocolos de carcinogénesis con distintas dosis de DMBA/PMA. Para ambos protocolos se usaron ratones adultos de 8 semanas de edad que se afeitaron 48 h antes de tratarlos tópicamente con DMBA.

En el primer protocolo se aplicó una única dosis de 25 nmoles de DMBA. A las 2 semanas se empezó a aplicar el PMA, 2 dosis por semana de 10 µg de PMA cada una durante 19 semanas. Los ratones se siguieron afeitando semanalmente mientras duró el protocolo. Una vez a la semana se registró la aparición de tumores (papilomas) y su tamaño. Al finalizar el protocolo se recogieron muestras de papilomas y piel adyacente para su análisis histopatológico y bioquímico. En este primer protocolo se utilizaron un total de 38 ratones (18 machos y 20 hembras).

En el segundo protocolo se aplicó una única dosis de 390 nmoles de DMBA. A las 2 semanas se empezó a aplicar el PMA, 3 dosis por semana de 6 µg de PMA cada una durante un total de 31 semanas. De igual modo que en el protocolo anterior, semanalmente se afeitó y registró la aparición de tumores. En este caso aparecieron muy pocos papilomas. Sin embargo, a causa de las dosis de DMBA/PMA aplicadas, aparecieron tumores sebáceos y manchas negras en la piel indicativas de acúmulos de melanina. Al finalizar el protocolo se recogieron muestras de tumores y piel para su análisis histopatológico. En este segundo protocolo se utilizaron un total de 18 ratones (7 machos y 11 hembras).

10.1 Mutaciones en el gen de *Hras*

Se extrajo el DNA genómico de piel intacta, papilomas y tumores sebáceos. En el caso de los papilomas la extracción se realizó de manera habitual. Sin embargo, y dado que todos los tumores sebáceos estaban fijados e incluidos, la extracción de DNA genómico se realizó a partir de la muestra embebida en parafina, mediante el kit TaKaRa DEXPAT™ Easy (TaKaRa), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

El análisis de la mutación en el gen *Hras* causada por el DMBA se realizó mediante amplificación y digestión, utilizando el enzima de restricción *XbaI* (Thermo Scientific). En un primer paso se llevó a cabo una amplificación que resultaba en un producto de 329 pb (*HRasA*), que se purificó del gel (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen) y se usó como DNA molde para una segunda ronda de amplificación (*HRasB*) que daba lugar a un producto de 269 pb. Este fragmento se digirió a 37°C durante toda la noche resultando en dos fragmentos de 145 pb y 124 pb si la mutación estaba presente. Las secuencias de los cebadores específicos usados en ambas amplificaciones se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Secuencia de los cebadores utilizados para la detección de la mutación en el gen de *HRas*.

Gen		Secuencia oligonucleótidos
<i>HRasA</i>	Fwd	GGTGTAGGCTGGTTCTGTGGATTCTC
	Rev	GCACACGGAACCTTCCTCAC
<i>HRasB</i>	Fwd	TGTGGATTCTCTGGTCTGAGGAGAG
	Rev	CATAGGTGGCTCACCTGTACTIONGATG

11. Aislamiento y cultivo de queratinocitos primarios de ratón

Se recogieron ratones recién nacidos y se sacrificaron. Se tomó una muestra de biopsia de cola para su genotipado como se ha descrito anteriormente. Se sumergieron en betadine, agua destilada estéril, etanol al 70% y por último en PBS. Se separaron las extremidades y tras practicar una incisión longitudinal en la región ventral, se procedió a separar la piel procurando no arrastrar grasa o músculo. La piel se estiró, con la dermis hacia abajo, sobre una placa de cultivo con 1 ml de tripsina 0.25% (Sigma) durante 18 h a 4°C. Tras la incubación se procedió a separar la epidermis de la dermis y se homogenizó, con ayuda de material quirúrgico, en medio mínimo esencial estéril (EMEM; Lonza). Para desprender las células se transfirió a un tubo, se agitó durante 1 min y se dejó otros 10 min a 4°C. A continuación, se filtró y se centrifugó durante 5 min a 1200 rpm y 4°C para recoger los queratinocitos. Éstos se resuspendieron en medio de siembra (composición detallada en la tabla 9) y se sembró 1 millón de células sobre placas de cultivo p35 (BD Biosciences) cubiertas con colágeno I (BD Biosciences). Tras 24 h se retiró el medio de cultivo y se sustituyó por un medio de crecimiento (tabla 9). Las células se dejaron crecer (en una atmósfera con un 5% de CO₂ y a 37°C) hasta alcanzar subconfluencia, cambiando el medio cada 48 h, momento en el que se recogieron para la extracción de RNA o bien se les aplicó un tratamiento con Dex (100 nM, durante 2 h).

Tabla 9. Composición de los distintos medios de cultivo utilizados para los MPKs.

Medio de extracción	Medio de siembra	Medio de crecimiento
EMEM 4% Suero Fetal Bovino- Chelex 0.05 mM CaCl ₂	EMEM 4% Suero Fetal Bovino- Chelex 0.06 mM CaCl ₂ Penicilina/estreptomicina Anfotericina B	EMEM 4% Suero Fetal Bovino- Chelex 0.05 mM CaCl ₂ Penicilina/estreptomicina Anfotericina B 10 ng/ml EGF

12. Generación de líneas celulares de queratinocitos adultos

Para la generación de las líneas celulares, los queratinocitos se aislaron de la epidermis de ratones adultos de 8 semanas de edad. Los ratones se afeitaron tras ser sacrificados y la piel dorsal se trató de la misma manera que se hizo en el apartado anterior, lavándola e incubándola con tripsina 0.25%. Es muy importante eliminar, en la medida de lo posible, todos los restos de grasa y músculo, ya que esto permite una mejor actuación de la tripsina sobre la dermis. Una vez separada, la epidermis se rompió en pequeños fragmentos con ayuda de material quirúrgico, se resuspendió en medio de cultivo con bajo calcio y se filtró, para después centrifugar durante 5 min a 1200 rpm y 4°C. Los queratinocitos se recogieron en medio con bajo calcio (composición del medio en la tabla 10) y se sembraron y crecieron sobre fibroblastos 3T3 J2 (*feeders*) en botellas T75, en una atmósfera con un 5% de CO₂ y 32°C.

Los queratinocitos se crecieron hasta alcanzar subconfluencia, cambiando el medio cada 48 h. En este estado se procedió a realizar un pase. En primer lugar se eliminó el medio de cultivo y se lavaron las células con EDTA 0.02% para eliminar los fibroblastos. Para despegar los queratinocitos de la botella, éstos se incubaron con tripsina 0.25% durante 10 min a 37°C. A continuación los queratinocitos se centrifugaron, resuspendieron en medio, se contaron y se sembraron de nuevo sobre *feeders* confluentes.

Para el mantenimiento de los *feeders*, éstos se crecieron en botellas T75 cubiertas con colágeno I en medio DMEM suplementado con 100 u/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y un 10% de suero bovino. Cuando alcanzaron confluencia se realizaron pases incubando las células con EDTA 0.02%.

Tabla 10. Composición del medio de cultivo utilizado en las líneas celulares.

Medio con bajo calcio
DMEM-Ham's F12 (3:1)
7,5% Suero Fetal Bovino-Chelex
0.35 mM CaCl ₂
0.18 mM Adenina
100 u/ml Penicilina
100 µg/ml estreptomycin
5 µg/ml Insulina
10 ⁻¹⁰ M Toxina colérica
10 ng/ml EGF

12.1 Análisis mediante inmunofluorescencia

Tras crecer los queratinocitos sobre cristales, éstos se fijaron con PFA 4% durante 10 min a RT. Para permeabilizar las células se trataron con 0.2% Triton X-100 (disuelto en PBS) durante 5 min y se lavaron varias veces con PBS. A continuación, se incubaron los queratinocitos en una solución de bloqueo, conteniendo 0.5% BSA y 5% de suero de cabra o burro (según el anticuerpo secundario), durante 1 h a RT. Finalizado este paso, las células se incubaron con el anticuerpo primario (tabla 11) diluido en la solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se retiró el anticuerpo primario y tras lavar varias veces con PBS, se incubó durante 1 h a RT con el anticuerpo secundario adecuado (conteniendo DAPI) (tabla 11). A continuación, se retiró el anticuerpo secundario, los cristales se lavaron con PBS y se montaron sobre los portas con Mowiol conteniendo DAPI. Para teñir las fibras de actina, tras los lavados se incubaron las células con faloidina conjugada con TRITC (Sigma). Las muestras se visualizaron y fotografiaron con un microscopio confocal Leica TCS SL.

Tabla 11. Anticuerpos utilizados en inmunofluorescencia.

Anticuerpo primario	Dilución	Compañía	Especie
β -Catenina (sc. 7199)	1/200	Santa Cruz	Conejo
Desmoplaquina (Ab14418)	1/200	Abcam	Ratón
E-Cadherina (610181)	1/200	BD	Ratón
K5 (PRB-160P)	1/2000	Covance	Conejo
SMA (Ab18147)	1/200	Abcam	Ratón

Anticuerpo secundario	Dilución	Compañía
Alexa fluor 555 conejo	1/1000	Life Technologies
Alexa fluor 488 ratón	1/1000	Life Technologies

13. Análisis estadístico

Las posibles diferencias estadísticas entre genotipos se analizaron mediante el estadístico t de Student. Los valores con un p_valor menor que 0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

Resultados

1. Generación y análisis del fenotipo de los ratones con inactivación específica de GR en queratinocitos (ratones GR^{EKO})

1.1 Generación de los ratones GR^{EKO}

Para obtener el macho fundador GR^{EKO} se realizaron cruces entre machos K5-Cre^{+/-} (portadores de la recombinasa CRE en heterocigosis) y hembras 0Cre//GR^{lox/lox}. Los machos heterocigotos K5-Cre^{+/-}//GR^{lox/+} resultantes se usaron para retrocruzar con hembras 0Cre//GR^{lox/lox} y así obtener el macho fundador K5-Cre^{+/-}//GR^{lox/lox} (GR^{EKO}). La programación habitual de experimentación animal se realizó a partir de cruces programados entre machos GR^{EKO} y hembras 0Cre//GR^{lox/lox}.

Todos los ratones se genotiparon mediante la extracción de DNA genómico de una biopsia de cola seguida de un análisis por PCR usando los cebadores específicos. En la figura 10a se muestra un ejemplo de genotipado donde se pueden ver las distintas bandas correspondientes a los alelos GR⁺ (225 pb), GR^{lox} (275 pb) y GR^{null} (390 pb). Aunque la detección del alelo GR^{null} implica la presencia de la recombinasa CRE, también se puede detectar la presencia del transgén cre mediante PCR utilizando cebadores específicos, observándose una única banda (350 pb) en los ratones transgénicos (figura 10b).

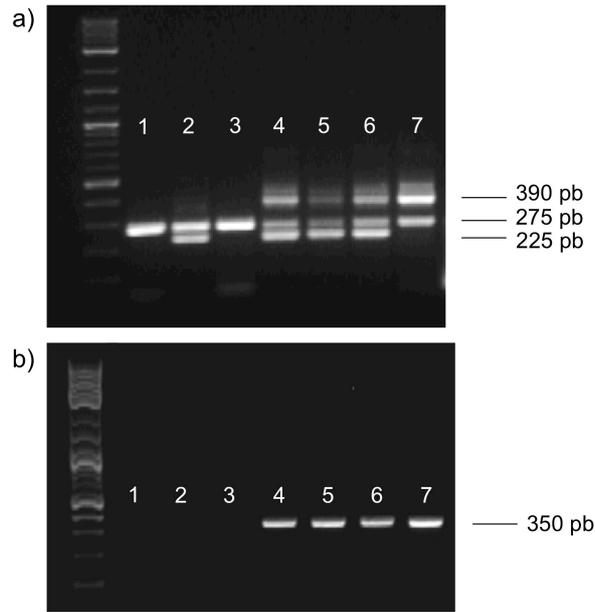


Figura 10. Genotipado de los ratones mediante PCR. El DNA obtenido mediante biopsia de cola se amplificó con (a) cebadores específicos para obtener bandas GR⁺ (225 pb), GR^{lox} (275 pb) y GR^{null} (390 pb) y (b) cebadores específicos para obtener la banda correspondiente a la recombinasa CRE (350 pb). El gel muestra el genotipado de ratones 0Cre//GR^{lox/+} (carril 2), 0Cre//GR^{lox/lox} (carriles 1 y 3), K5Cre^{+/+}//GR^{lox/+} (carriles 4,5 y 6) y GR^{EKO} (carril 7).

Los ratones GR^{EKO} eran indistinguibles a simple vista de los ratones 0Cre//GR^{lox/lox} (a partir de ahora los denominaremos control) y alcanzaban la edad adulta sin ninguna anomalía fenotípica (macroscópica).

En primer lugar quisimos comprobar que la inactivación de GR era específica de queratinocitos. Para ello, evaluamos la expresión de

GR en la epidermis de ratones GR^{EKO} y control, tanto recién nacidos (o postnatal (P)0) como adultos, así como en otros tejidos mediante *Western Blot* (WB) (figura 11a). La figura muestra la presencia de GR en la epidermis de los ratones control, en contraste con la ausencia de esta proteína en los ratones GR^{EKO} (tanto recién nacidos como adultos). En otros tejidos, como el riñón o el pulmón, que no expresan K5, y por tanto no son diana de la acción de la recombinasa CRE bajo el control de las secuencias reguladores de K5, no se apreciaron diferencias en los niveles de expresión de GR entre ambos genotipos. Mediante inmunofluorescencia realizada en epidermis de cola pudimos comprobar la ausencia de GR en los folículos pilosos y las glándulas sebáceas de los ratones GR^{EKO}, a diferencia de los controles (figura 11b, en verde). Sin embargo, detectamos la expresión de K14 en la vaina radicular externa del folículo y glándulas sebáceas de epidermis de ratones GR^{EKO} y control (figura 11b, en rojo).

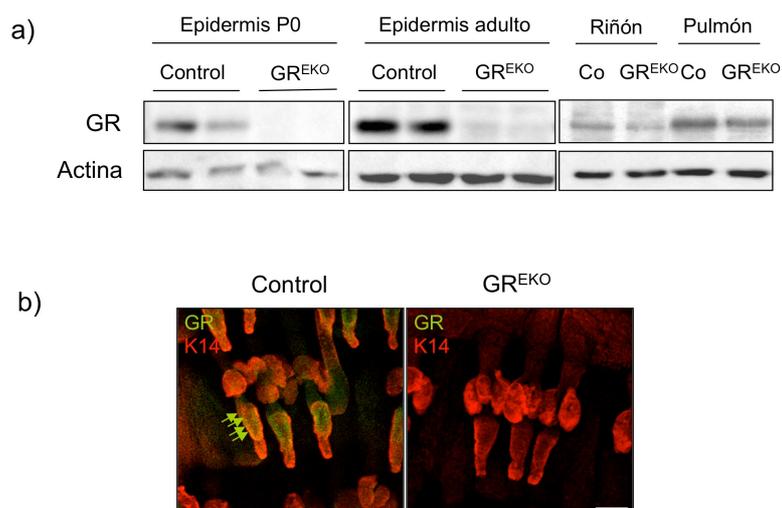


Figura 11. Inactivación de GR en epidermis y derivados epidérmicos. (a) El WB muestra la pérdida de GR en la epidermis de ratones GR^{EKO} P0 y adulto pero no en otros tejidos que no expresan K5. (b) Inmunofluorescencia de epidermis de cola que muestra la pérdida de GR en los folículos pilosos y glándulas sebáceas de ratones GR^{EKO}. Barra: 100 μ m.

1.2 Análisis de la función de barrera epidérmica en ratones GR^{EKO}

Quisimos investigar si la inactivación de GR en la epidermis afectaba a la formación de la barrera epidérmica durante el desarrollo. En condiciones normales la adquisición de la función de barrera comienza a día E16.5 del desarrollo embrionario y finaliza a día E18.5, cuando la piel es completamente madura, siguiendo un patrón dorso-ventral y antero-posterior. Para ello, realizamos un ensayo de barrera

epidérmica sumergiendo los ratones control y GR^{EKO} en una solución de azul de toluidina.

En los embriones control la epidermis maduró siguiendo el patrón establecido y esperado (figura 12). A día E16.5 ya se observan los sitios de iniciación de la barrera epidérmica (figura 12, control, flechas blancas). La formación de la barrera va avanzando según el patrón correspondiente y a día E17.5 se observa el frente en la región lateral (figura 12, control, línea blanca). A día E18.5 la maduración ya es completa, lo que correlaciona con la total falta de tinción (figura 12). Por el contrario, en los embriones GR^{EKO} (E16.5 y E17.5) se observó la presencia de sitios de iniciación a lo largo de toda la epidermis (figura 12, GR^{EKO} E16.5 y E17.5, flechas rojas) y un retraso en la formación de la barrera, que además no seguía el patrón correcto (figura 12, GR^{EKO}, línea roja). La adquisición de la barrera es irregular a lo largo del desarrollo embrionario y a día E18.5 todavía se apreciaban zonas teñidas en la región ventral (figura 12, GR^{EKO} E18.5, flechas rojas), indicando zonas inmaduras de la epidermis. Estos datos ponen de manifiesto la importancia de GR en la maduración de la epidermis, y la adquisición de la función de barrera, tanto en el inicio como en el desarrollo de la misma.

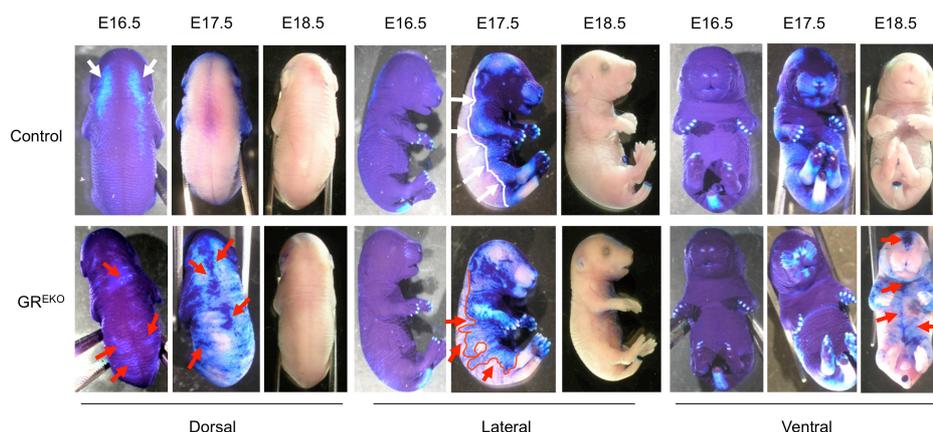


Figura 12. Alteraciones en la permeabilidad de la barrera epidérmica en ratones GR^{EKO}. Ensayo de la permeabilidad al azul de toluidina durante el desarrollo (E16.5, E17.5 y E18.5) en ratones GR^{EKO} y control. Los ratones GR^{EKO} muestran un retraso en la formación de la barrera además de un desarrollo irregular que no sigue el patrón dorso-ventral de los controles. Las zonas teñidas de azul indican zonas inmaduras mientras que las que permanecen sin teñir son completamente maduras. Las flechas blancas en los controles indican los sitios de inicio de la maduración y la línea blanca el frente de maduración. Las flechas rojas en los GR^{EKO} indican la presencia de múltiples sitios de inicio de la maduración y el retraso en la misma a día E18.5. La línea roja indica un frente de maduración irregular.

1.3 Análisis histopatológico de la piel de ratones GR^{EKO} durante el desarrollo

El análisis histológico mostró que la epidermis de los embriones E17.5 GR^{EKO} era más fina que la de los controles y que en algunas regiones estaba compuesta por pocas capas de células. A día E18.5 se seguía observando esta diferencia en el grosor epidérmico (figura 13a). En ambos estadios del desarrollo, las diferencias en el grosor

epidérmico observadas en los ratones GR^{EKO} fueron estadísticamente significativas respecto a los controles hermanos de camada (figura 13b). Además, se apreciaba una disminución de los estratos granular y córneo y la separación de éste del resto de la epidermis (figura 13a, asterisco). Por el contrario, después del nacimiento (P0 y P2) los ratones GR^{EKO} presentaban una epidermis hiperplásica (figura 14) con defectos en la diferenciación de los queratinocitos. Además, mostraron regiones con hiperqueratosis y paraqueratosis (figura 14a, flechas) así como la separación del estrato córneo del resto de la epidermis (figura 14a, asterisco). A día P5 las diferencias entre los ratones control y los GR^{EKO} eran indetectables. Se observó una reducción de las zonas con hiperqueratosis, paraqueratosis y separación del estrato córneo en los ratones GR^{EKO} . Además, las diferencias en el grosor de la epidermis se redujeron (figura 14a). Estos datos sugieren que la aparición del pelo podría proteger a los ratones GR^{EKO} del daño en la epidermis causado por la pérdida de GR.

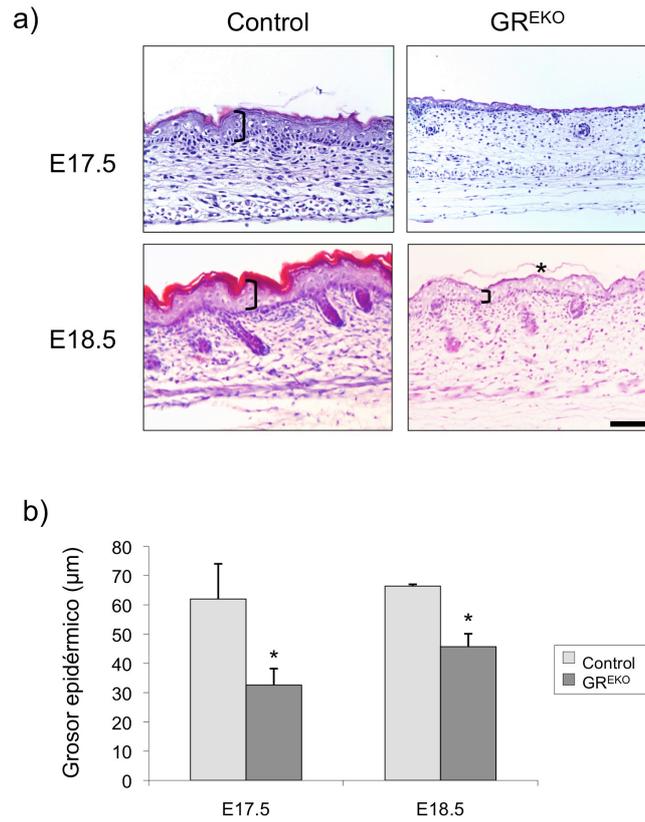


Figura 13. Alteración en el desarrollo de la epidermis en embriones GR^{EKO}. (a) Los embriones GR^{EKO} presentan una epidermis más fina tanto a día E17.5 como a E18.5 (corchetes), consistiendo en unas pocas capas en algunas regiones. La epidermis de los embriones E18.5 presentaba una disminución de las capas granular y córnea con zonas frágiles del SC (asterisco). Barra: 100 µm. (b) La cuantificación muestra diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos a E17.5 y E18.5. Prueba t de Student, * p < 0.05.

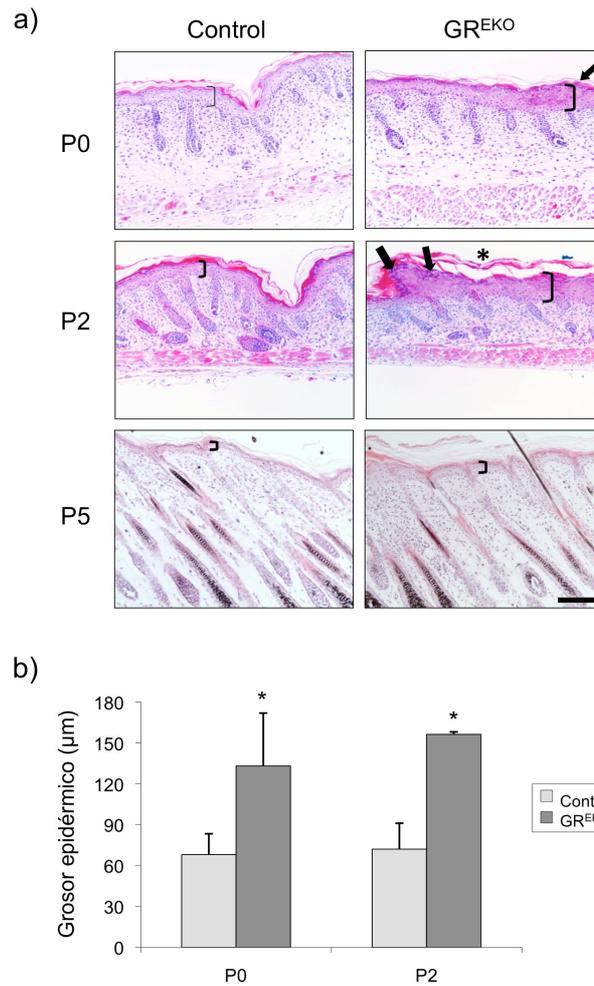


Figura 14. Alteraciones en el desarrollo de la epidermis en ratones GR^{EKO}. (a) Los ratones GR^{EKO} recién nacidos (P0, P2) presentan hiperplasia de la epidermis (corchetes) con regiones de fragilidad córnea (asterisco). A día P5 no existen diferencias en el grosor epidérmico entre los controles y los GR^{EKO}. Barra: 100 μm. (b) La cuantificación muestra diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos a P0 y P2. Prueba t de Student, * p < 0.05.

Para estudiar con mayor detalle las alteraciones en la epidermis de ratones GR^{EKO}, analizamos muestras de epidermis GR^{EKO} y control mediante microscopía electrónica de transmisión. Los ratones GR^{EKO} mostraban regiones de ruptura entre el estrato granular y la primera capa del estrato córneo (figura 15a, asteriscos).

Dada la importancia de la composición y distribución de lípidos en el estrato córneo y las alteraciones detectadas en la piel de ratones GR^{EKO} durante el desarrollo, realizamos un estudio de la composición lipídica de la epidermis mediante el uso del colorante rojo nilo, que permite identificar los lípidos polares (rojo) y apolares (verde). Esta tinción mostró un cambio en la composición lipídica en la epidermis de los GR^{EKO}, con una menor cantidad de lípidos polares en relación con los apolares (figura 15b).

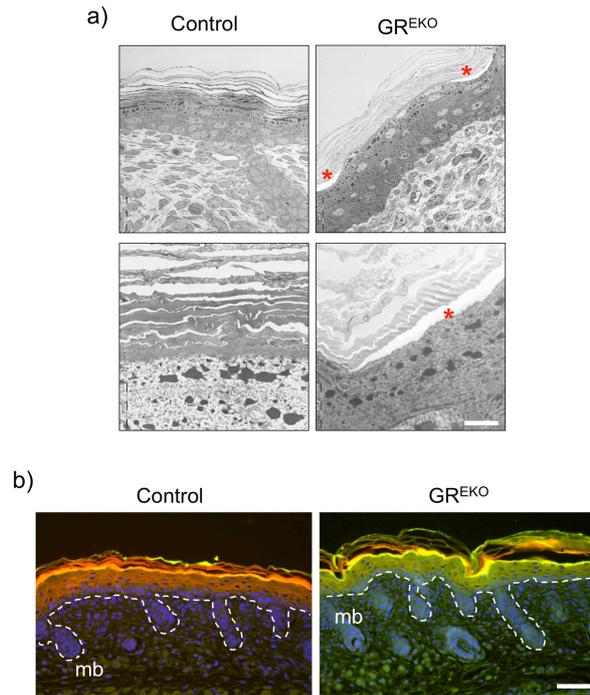


Figura 15. Alteraciones en el estrato córneo de ratones GR^{EKO}. (a) Imágenes de microscopía electrónica de transmisión mostrando detalle de la fragilidad del estrato córneo en ratones GR^{EKO}. La rotura del estrato se produce entre la última capa del estrato granular y la primera del estrato córneo (asterisco). Barra: 20 μm . (b) Tinción con rojo nilo que muestra el cambio en la composición lipídica del estrato córneo en los ratones GR^{EKO}. En rojo los lípidos polares; en verde los apolares. La membrana basal (mb) está representada por la línea de puntos blanca. Barra: 100 μm .

1.3.1 Análisis de la diferenciación epidérmica en los ratones GR^{EKO} recién nacidos

A continuación analizamos la expresión de distintos marcadores de diferenciación epidérmica en la piel dorsal de ratones recién nacidos. Los diferentes estratos de los que se compone la epidermis expresan distintos marcadores, y alteraciones en su expresión y/o localización son un indicativo de anomalías y, por tanto, posibles patologías. Analizamos la expresión de marcadores de diferenciación tardía (filagrina, loricrina y corneodesmosina) y de hiperproliferación (K6) en ratones GR^{EKO} y control hermanos de camada.

En ratones control P0, la filagrina y loricrina se expresan de manera específica en el estrato granular de la epidermis (figura 16, control). La corneodesmosina, componente mayoritario de los corneodesmosomas, es importante para la cohesión de los corneocitos que forman el estrato córneo, y se detecta en este estrato (figura 16, control). En todos los casos, las inmunodetecciones mostraron regiones parcheadas, negativas para la tinción específica de filagrina, loricrina y corneodesmosina, en la epidermis de los ratones GR^{EKO} (figura 16, flechas blancas). Estas regiones carentes de dichas proteínas, correspondían a zonas con paraqueratosis (figura 16, flechas negras). El patrón de expresión de K6, restringido al folículo piloso en condiciones normales, también aparecía alterado, detectándose su expresión en la epidermis interfolicular de los ratones GR^{EKO}, indicativo de proliferación anómala en la epidermis.

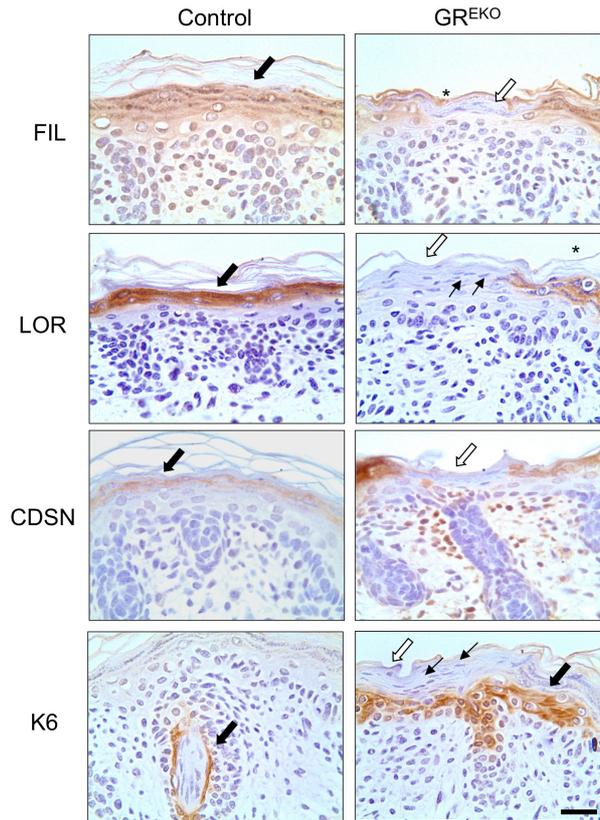


Figura 16. Diferenciación anormal de la epidermis de ratones GR^{EKO} recién nacidos. Expresión parcheada de los marcadores filagrina (FIL), loricrina (LOR), corneodesmosina (CDSN) y K6. Las flechas negras gruesas indican la expresión de la proteína y las flechas blancas su ausencia. Las flechas negras finas indican zonas con paraqueratosis. Barra: 50 μ m.

Todos los datos obtenidos hasta el momento muestran defectos en la diferenciación terminal de los queratinocitos GR^{EKO} . Durante este proceso de diferenciación terminal es esencial la participación de la caspasa 14. La caspasa 14 es una caspasa no apoptótica que se expresa específicamente en la epidermis y se encarga del

procesamiento de la pro-filagrina, contribuyendo, de este modo, al proceso de diferenciación terminal de los queratinocitos (Denecker *et al.*, 2008). A su vez, la caspasa 14 se expresa como un precursor (pro-caspasa 14) que es procesado para dar lugar a un fragmento activo (caspasa 14), también denominado p20. Trabajos anteriores del grupo en ratones GR^{null/null}, ya mostraron que esta caspasa es necesaria para la diferenciación terminal de los queratinocitos y que además su expresión se regula a través de GR (Bayo *et al.*, 2008). Así pues, también estudiamos por WB la expresión y procesamiento, tanto de la filagrina como de la caspasa 14, en la epidermis de ratones GR^{EKO} y controles hermanos de camada. Como se puede observar en la figura 17a, los ratones GR^{EKO} mostraron bajos niveles tanto del precursor como del monómero de filagrina (ya procesada). Asimismo, estos ratones mostraron una menor actividad de la caspasa 14 procesada (figura 17a y b) con respecto a los controles.

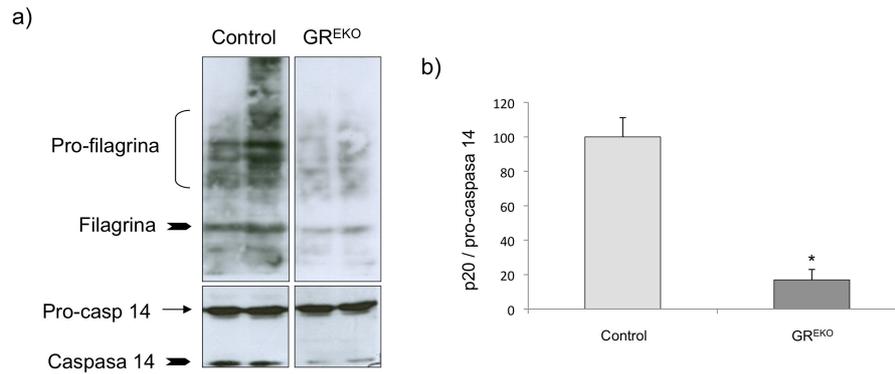


Figura 17. Alteraciones en el procesamiento de la pro-filagrina y la caspasa 14 en la epidermis de los ratones GR^{EKO}. (a) El WB muestra un procesamiento defectivo de la caspasa 14 y como consecuencia de la pro-filagrina en los ratones GR^{EKO}. (b) La cuantificación de la caspasa-14 activa muestra diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos. Prueba t de Student, * p < 0.05.

1.3.2 Estudio *in vivo* de la proliferación y apoptosis de los queratinocitos GR^{EKO}

Quisimos estudiar los efectos de la pérdida del receptor hormonal GR sobre la proliferación de los queratinocitos epidérmicos basales. Para ello se realizó un ensayo de incorporación de BrdU, contando los núcleos con marcaje positivo para BrdU respecto del total de núcleos basales interfoliculares. Los ratones control mostraron incorporación de BrdU en los núcleos de los queratinocitos de la capa basal y en la vaina radicular externa del folículo piloso. Igualmente, en los ratones GR^{EKO} la incorporación de BrdU siguió el mismo patrón, aunque la tasa de incorporación fue 4 veces mayor, como indica la cuantificación (figura 18a y b). Es importante destacar que estudios

previos han demostrado que GR ejerce una función anti-proliferativa sobre los queratinocitos *in vivo* (Pérez *et al.*, 2001; Bayo *et al.*, 2008).

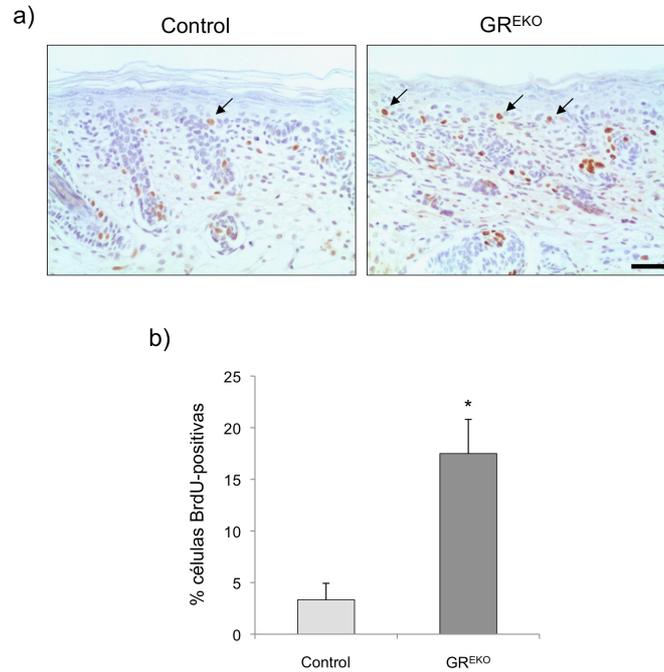


Figura 18. Aumento de proliferación de los queratinocitos basales interfolliculares en los ratones GR^{EKO} recién nacidos. (a) La inmunohistoquímica muestra un mayor número de núcleos basales que han incorporado BrdU (flechas negras) en los ratones transgénicos respecto a los controles. Barra: 100 μ m. (b) Los ratones GR^{EKO} presentan una tasa de proliferación de queratinocitos 4 veces mayor que los controles. n=12. Prueba t de Student, * p < 0.05.

Por el contrario, el análisis de la apoptosis mediante TUNEL no reveló diferencias significativas entre los genotipos. En ambos casos fue

posible observar núcleos apoptóticos en las capas más suprabasales (figura 19, flechas blancas).

Los queratinocitos GR^{EKO} mantienen la misma tasa de muerte celular pero muestran una mayor tasa de proliferación, lo cual explica la hiperplasia observada en la epidermis de estos ratones.

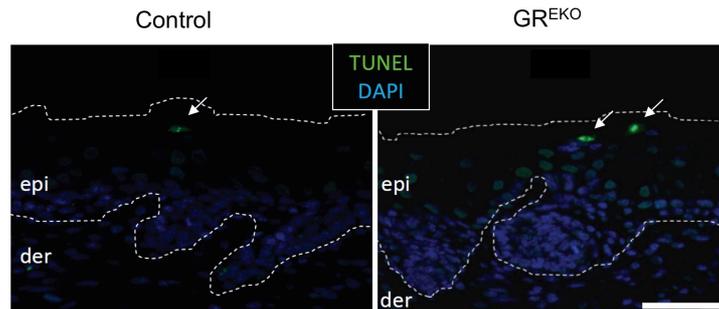


Figura 19. Medida de la apoptosis en la epidermis de recién nacidos GR^{EKO} y control. Tinción con TUNEL de secciones de piel embebidas en parafina. Las líneas de puntos delimitan la epidermis y la dermis. La epidermis de los ratones GR^{EKO} presenta más núcleos apoptóticos (flechas blancas), aunque la diferencia con los controles no es estadísticamente significativa. Barra: 50 μm .

2. Análisis transcriptómico de la epidermis de ratones GR^{EKO} recién nacidos

Para investigar los efectos de la inactivación selectiva de GR en la epidermis de los ratones GR^{EKO} , realizamos un análisis de *microarrays* de expresión a partir de RNA de muestras de epidermis

dorsal de ratones P0 GR^{EKO} y control (n=8). Tras sintetizar el cDNA, éste se hibridó en un chip GeneChip® Mouse Gene 1.0 ST Array de Affymetrix.

Se seleccionaron 1518 genes significativos con un FDR=0.06, lo cual equivale a admitir un 6% de falsos positivos. De todos estos genes se seleccionaron aquellos con una inducción o represión de 1.5 veces. De este modo identificamos un total de 293 genes con expresión diferencial, de los cuales 189 se inducían y 104 se reprimían. En la figura 20 se muestra una distribución de los genes agrupados según el proceso biológico en el que participan (hay que tener en cuenta que un gen puede aparecer representado en más de una categoría). Únicamente se representan las categorías con un mayor número de genes. La lista completa de 293 se incluye en el anexo I.

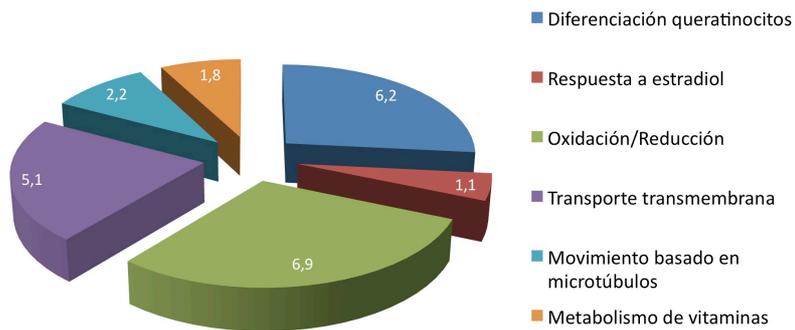


Figura 20. Distribución de los genes expresados diferencialmente en ratones GR^{EKO} vs control, según el proceso biológico en el que participan (Gene Ontology, DAVID Bioinformatics Resources). Los genes deregulados más importantes pertenecen al grupo de desarrollo y diferenciación de los queratinocitos.

Cabe destacar el segundo grupo más representado, que incluye los genes que participan en el proceso de diferenciación de los queratinocitos. En concreto, detectamos que muchos de los genes inducidos en la epidermis de los ratones GR^{EKO} respecto a los controles, pertenecían al *cluster* denominado complejo de diferenciación epidérmica (EDC). El complejo EDC está compuesto por genes tanto de diferenciación de la epidermis como de defensa frente a patógenos (Kyriiotou *et al.*, 2012), y a él pertenecen el grupo de genes que codifica para las proteínas pequeñas ricas en prolinas (*Sprrs*), el grupo de genes que codifica para proteínas de la cornificación/envuelta córnea o *late cornified envelope* (*Lces*), los genes *S100a8* y *S100a9* y la repetina (*Rptn*) (figura 21). Es destacable la identificación del grupo de genes *Lce* en la epidermis de ratones GR^{EKO}, ya que su expresión en la epidermis solo se induce en condiciones de estrés (de Cid *et al.*, 2009).

La epidermis de los ratones GR^{EKO} mostró una clara inducción de las queratinas *Krt6a*, *Krt6b* y *Krt16*, consideradas marcadores de hiperproliferación (figura 21). El aumento en la expresión del gen *Krt6* es consistente con el incremento en K6 observado por inmunohistoquímica en las pieles de los ratones GR^{EKO} (figura 16). También identificamos una fuerte inducción de genes que codifican para proteasas e inhibidores de proteasas que participan en el mantenimiento del estrato córneo, como los genes de la familia de las calicreínas (*Klks*) (figura 21).

Por último, observamos una clara inducción de un grupo de genes que forma parte de la respuesta inmune innata en la piel (figura 21). La inducción de los genes *Bcl3*, *Tslp* y *Stat3* en la epidermis de los ratones GR^{EKO} sugiere una alteración en la respuesta inmune.

Resultados

Gen	Descripción del gen	Tasa de cambio	Gen	Descripción del gen	Tasa de cambio
Proliferación/diferenciación de queratinocitos			Peptidasas e inhibidores de peptidasas		
<i>Krt6a</i>	keratin 6A	13	<i>Sipi</i>	secretory leukocyte peptidase inhibitor	3,5
<i>Krt6b</i>	keratin 6B	8	<i>Mmp3</i>	matrix metallopeptidase 3	2,8
<i>Krt16</i>	keratin 16	5,9	<i>Klk6</i>	kallikrein related-peptidase 6	2,9
<i>Krt77</i>	keratin 77	5,2	<i>Klk12</i>	kallikrein related-peptidase 12	2,1
<i>Spr2e</i>	small proline-rich protein 2E	7,4	<i>Klk9</i>	kallikrein related-peptidase 9	2,0
<i>Spr2f</i>	small proline-rich protein 2F	6,6	<i>Klk10</i>	kallikrein related-peptidase 10	1,9
<i>Spr2h</i>	small proline-rich protein 2H	5,0	<i>Adam8</i>	a disintegrin and metallopeptidase domain 8	1,8
<i>Spr2b</i>	small proline-rich protein 2B	3,7	<i>Serpina3h</i>	serine peptidase inhibitor, clade A, member 3H	0,5
<i>Spr2d</i>	small proline-rich protein 2E	3,1	<i>Serpnb3c</i>	serine peptidase inhibitor, clade B, member 3C	0,3
<i>Spr2i</i>	small proline-rich protein 2I	2,6	Respuesta inmune		
<i>Spr1b</i>	small proline-rich protein 1B	2,4	<i>Tslp</i>	thymic stromal lymphopoietin	2,6
<i>Spr1a</i>	small proline-rich protein 1A	2,2	<i>Ifi202b</i>	interferon activated gene 202A	4,7
<i>Spr3</i>	small proline-rich protein 3	2,2	<i>Cxcr2</i>	chemokine (C-X-C motif receptor)	3,7
<i>Spr2k</i>	small proline-rich protein 2K	1,6	<i>Cxcl16</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 16	1,8
<i>Lce3a</i>	late cornified envelope 3A	8,4	<i>Il33</i>	interleukin 33	2,6
<i>Lce3f</i>	late cornified envelope 3F	6,7	<i>Ereg</i>	epiregulin	2,9
<i>Lce3e</i>	late cornified envelope 3C	2,6	<i>Bcl3</i>	B-cell leukemia 3	3,3
<i>S100a9</i>	S100 calcium binding protein A9	3,6	<i>Defb1</i>	defensin beta 1	0,6
<i>S100a8</i>	S100 calcium binding protein A8	2,1	<i>Tnc</i>	tenascin C	2,5
<i>Rptn</i>	repelin	5,7	<i>Psors1c2</i>	psoriasis susceptibility 1 candidate 2	3,3
<i>Pglyrp3</i>	peptidoglycan recognition protein 3	2,6	<i>Stat3</i>	signal transducer and activator of transcription 3	1,3
<i>Elf5</i>	E74-like factor 5	3,4			

Figura 21. Selección de genes con expresión diferencial en epidermis de ratones GR^{EKO} recién nacidos respecto a los controles agrupados según su función biológica.

Además, se ha visto que gran parte de los genes identificados en este análisis están inducidos en pacientes con patologías inflamatorias de la piel como AD y psoriasis (Cork *et al.*, 2009; Roberson y Bowcock, 2010), por lo que postulamos que los ratones GR^{EKO} pueden ser un modelo de estudio de estas patologías cutáneas (ver apartado 2 de la discusión).

Para validar los datos obtenidos del *microarray* de expresión, llevamos a cabo experimentos de PCR cuantitativa a tiempo real a partir de RNA extraído de muestras de epidermis dorsal de ratones P0 GR^{EKO} y control obtenidas en un experimento independiente. Para dicha validación escogimos un grupo de genes cuya regulación por GR fue descrita en trabajos previos del grupo (*Elf5*, *Fkbp51* y *Krt77*; Sevilla *et*

al., 2010) y un grupo representativo de distintas categorías funcionales, incluyendo genes de la respuesta inmune, cuya deregulación es indicativa de una patología cutánea, como *Bcl3*, *S100a8*, *S100a9*, *Slpi*, *Stat3* y *Tslp* (figura 22). Los datos obtenidos por qRT-PCR correlacionan con los datos de expresión del *microarray*.

A pesar de que la inducción del gen *Stat3* no llega a ser de 1.5 veces (lo que constituye el punto de corte), se incluyó en la lista de genes ya que en la validación su inducción es de 3 veces y se ha visto que su expresión aumenta en lesiones cutáneas de pacientes con psoriasis (Sano *et al.*, 2008).

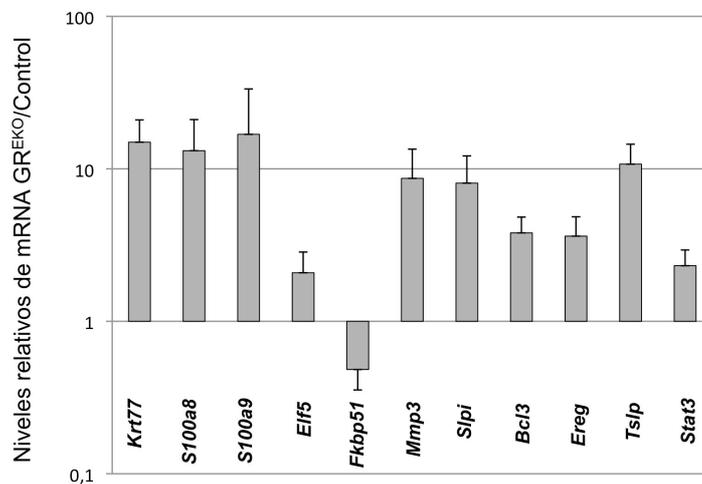


Figura 22. Validación de los resultados del *microarray* de expresión realizado en epidermis de GR^{EKO} y controles mediante qRT-PCR. Los valores están representados en escala logarítmica. Se usaron al menos 3 muestras de cada genotipo. Prueba t de Student. Todos los valores son estadísticamente significativos, $p < 0.05$.

En pacientes con dermatitis atópica se ha observado un incremento en los niveles del gen *IL33*, lo que activa la degranulación de los mastocitos (Liew *et al.*, 2010). De este modo, la inducción de la expresión de *IL33* en la epidermis de los GR^{EKO} podría estar activando dicha degranulación.

Para comprobarlo, llevamos cabo una tinción con azul de toluidina de piel dorsal de embriones E18.5 y P0 transgénicos y control. Los ratones GR^{EKO} de ambas edades mostraron regiones con degranulación de los mastocitos en la dermis (figura 23, flechas rojas), en comparación con los controles, en los que no se observó degranulación (figura 23, flechas negras). Es importante destacar que la degranulación ocurre a E18.5, es decir, antes del nacimiento, lo que sugiere que esta respuesta inmune es independiente de la exposición al medio y que por tanto es consecuencia directa de la inactivación de *GR* en la epidermis.

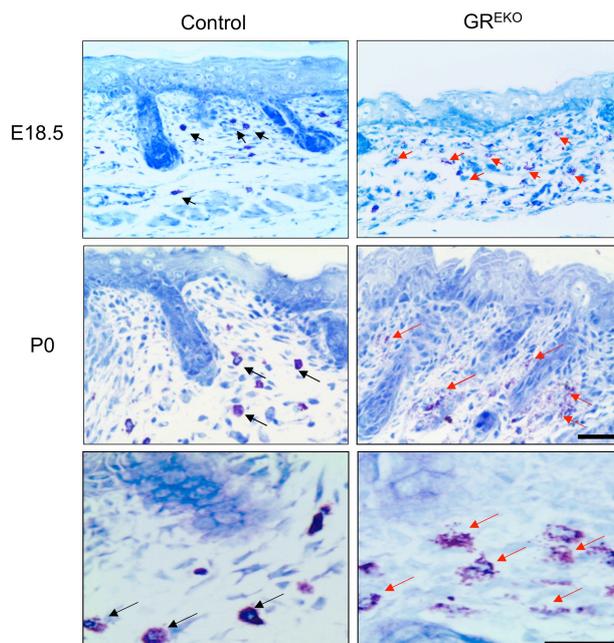


Figura 23. Degranulación de mastocitos en la piel de ratones GR^{EKO} . La presencia de mastocitos degranulados (flechas rojas) en la piel de los ratones GR^{EKO} (E18.5 y P0), que se demuestra mediante tinción con azul de toluidina, es indicativa de un desorden en la piel. Las flechas negras indican mastocitos sin degranular en ratones control. Los paneles inferiores muestran una magnificación de los mastocitos en ratones P0. Barras: 50 μ m.

3. Alteraciones en vías de señalización en la piel de ratones GR^{EKO}

A continuación, estudiamos las consecuencias de la inactivación específica de GR en la epidermis en la expresión y/o activación de las MAPKs. Estudios previos del grupo habían demostrado que la pérdida total de GR resultaba en un incremento de la actividad de la proteína

ERK en los queratinocitos (Bayo *et al.*, 2008). La forma fosforilada de ERK (p-ERK) se expresa de manera normal en las capas suprabasales de la epidermis como reveló el análisis por inmunohistoquímica de ratones control E18.5 y P0 (figura 24, flechas negras). Sin embargo, en los ratones GR^{EKO} observamos una expresión ectópica de p-ERK, detectando esta quinasa tanto en las capas suprabasales como en la capa basal (figura 24, flechas rojas). A pesar de esta expresión ectópica, no fuimos capaces de detectar un incremento estadísticamente significativo en la actividad de ERK mediante WB (figura 25a y b). Tampoco detectamos cambios en los niveles de expresión de JNK o de su sustrato, c-Jun (datos no mostrados).

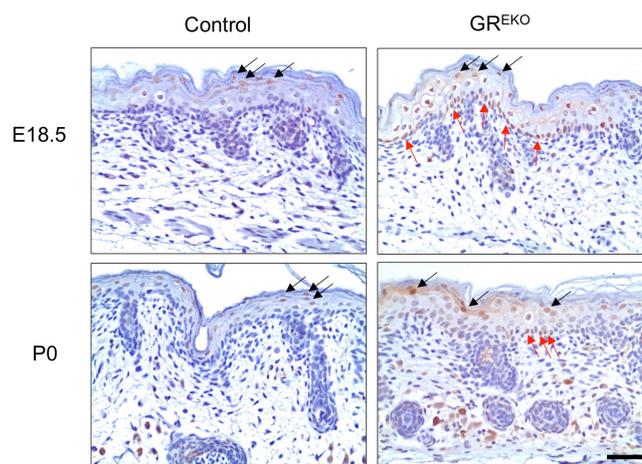


Figura 24. Alteración de la actividad ERK en epidermis de ratones GR^{EKO}. La inmunohistoquímica muestra expresión ectópica de p-ERK en la epidermis de los ratones GR^{EKO} (flechas rojas) en relación a los controles (las flechas negras indican la expresión normal de p-ERK en la capa granular). Barra: 100 μ m.

Además, dado que GR interfiere con la actividad AKT, evaluamos la expresión y actividad de esta proteína, la cual es necesaria para un correcto desarrollo de la epidermis, ya que participa en su diferenciación terminal (O'Shaughnessy *et al.*, 2009). La figura 25 muestra un incremento estadísticamente significativo en la actividad de AKT en la epidermis de los ratones GR^{EKO}.

También quisimos investigar si el incremento en la expresión del gen *Stat3* detectado en el *microarray* correlacionaba con un aumento en la expresión y la actividad de la proteína STAT3. El análisis por WB mostró un incremento en la expresión de la proteína fosforilada con respecto a la total en la epidermis de los ratones GR^{EKO} P0 (figura 25a y

b), lo cual coincide con la mayor expresión de STAT3 observada en lesiones de pacientes con psoriasis (Sano *et al.*, 2008). Además, detectamos en la epidermis de los GR^{EKO} un aumento en la expresión de la proteína S100A9 (figura 25a y b), un marcador de psoriasis y dermatitis atópica.

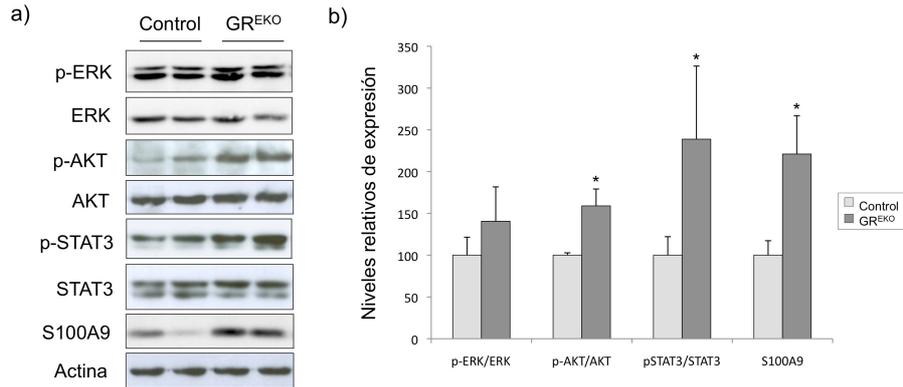


Figura 25. Alteración de la actividad de AKT y STAT3 en piel de ratones GR^{EKO}. (a) El WB y (b) la cuantificación muestran un incremento en la actividad de AKT y STAT3, además de elevados niveles de S100A9 en la epidermis de los ratones GR^{EKO} recién nacidos (n=12). Prueba t de Student, * p < 0.05.

4. Análisis del fenotipo de los ratones GR^{EKO} adultos

Los ratones GR^{EKO} eran viables y fértiles, siendo macroscópicamente indistinguibles de los ratones control.

El análisis histológico de la piel de ratones adultos GR^{EKO} mostró un fenotipo más moderado que en los recién nacidos. No se observaron diferencias en la expresión de las queratinas K5 y K10, ni tampoco en el patrón de expresión de K6, que a diferencia de lo que ocurría en los recién nacidos, se restringe al folículo piloso (figura 26). Sin embargo, y pese a esta “normalización” del fenotipo, se seguía observando una mayor proliferación de los queratinocitos interfoliculares de la capa basal (figura 27a, flechas negras), así como parches negativos para loricrina y filagrina (figura 27b, flechas negras).

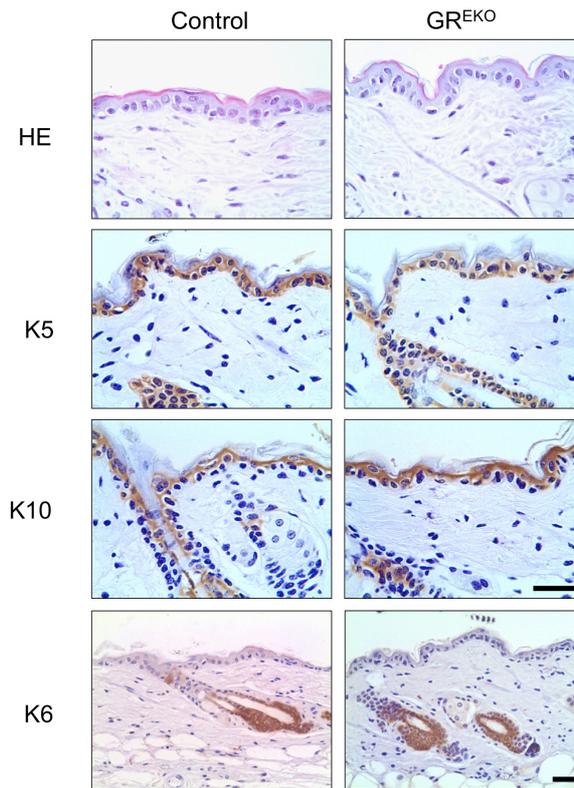


Figura 26. Análisis histopatológico de la epidermis de ratones adultos GR^{EKO} y control. No se observaron diferencias en la expresión de K5, K10 y K6 entre los genotipos. Barras: 50 μ m.

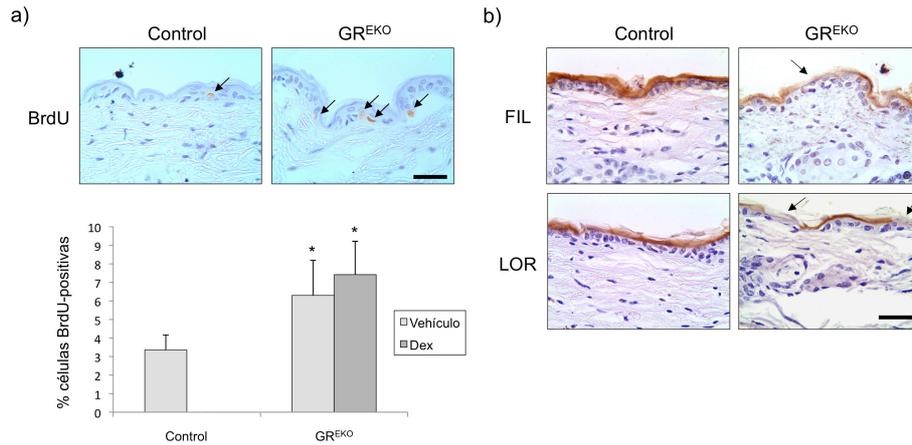


Figura 27. Defectos en la proliferación y diferenciación de la epidermis en los ratones GR^{EKO} adultos. (a) La inmunohistoquímica anti-BrdU muestra una imagen representativa del aumento en la proliferación de los queratinocitos basales en los ratones GR^{EKO}. La cuantificación muestra que dichos cambios en GR^{EKO} son estadísticamente significativos, tanto en presencia como en ausencia de Dex (n=8). (b) Expresión parcheada de los marcadores filagrina y lorricrina en los ratones GR^{EKO} (flechas negras). Barra 50 μ m. Prueba t de Student, * $p < 0.05$.

4.1 Respuesta de los ratones GR^{EKO} a distintos tratamientos tópicos

Dado que GR es funcionalmente inactivo en los queratinocitos epidérmicos de los ratones GR^{EKO}, y considerando los efectos anti-proliferativos de los GCs aplicados tópicamente (Schäcke *et al.*, 2002), quisimos evaluar la respuesta de los ratones GR^{EKO} a un tratamiento tópico con el análogo sintético de GCs dexametasona (Dex). Como era de esperar, el tratamiento tópico con Dex no causó ni atrofia ni inhibición de la proliferación de los queratinocitos de los ratones GR^{EKO} (figura 27a

y 28), al contrario de lo que sucedió con los ratones control, en los cuales causó el efecto anti-proliferativo esperado (figura 27a y 28). Así pues, podemos concluir que el efecto de Dex en queratinocitos epidérmicos es mediado por GR y no por otro receptor hormonal.

Además, evaluamos el resultado del tratamiento tópico con el éster de forbol PMA en la epidermis de ratones de ambos genotipos que indujo una clara hiperplasia (5-6 capas, figura 28). Aunque de manera general la respuesta de los GR^{EKO} al PMA fue similar a la de los controles, en los primeros pudimos observar zonas de destrucción epitelial que incluían infiltrados intraepiteliales (figura 28, asterisco).

El tratamiento con el detergente SDS, un agente irritante que simula la dermatitis de contacto, causó una respuesta similar a la del PMA. En este caso, las diferencias entre los genotipos fueron mayores que las descritas anteriormente. Los ratones GR^{EKO} mostraron una mayor hiperplasia e hiperqueratosis (figura 28) y, al igual que sucedió con el PMA, regiones de destrucción epitelial (figura 28, asterisco).

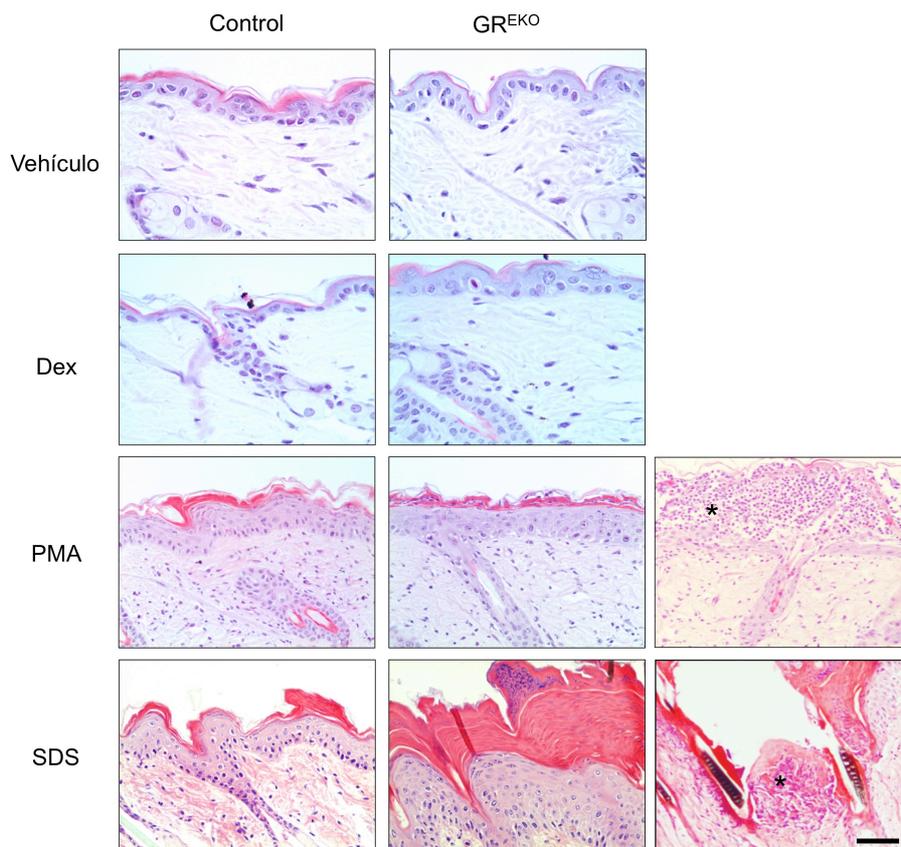


Figura 28. El tratamiento tópico con Dex no induce hipoplasia epidérmica en los ratones GR^{EKO}. Respuesta inflamatoria exacerbada en los ratones GR^{EKO} frente al tratamiento con PMA y SDS. Los asteriscos marcan zonas de destrucción epitelial. Barra: 50 μ m.

Ambos tratamientos indujeron la expresión de K6 en la epidermis de controles y transgénicos, aunque dicha expresión era suprabasal en controles y en todas las capas en los ratones GR^{EKO} (figura 29a). También se indujo la expresión de p-ERK tras el tratamiento con PMA y

SDS, otra vez más elevada en los ratones GR^{EKO}, los cuales presentaban mayor actividad de la proteína incluso en ausencia de tratamiento (figura 29b). Estos datos son consistentes con los obtenidos en la epidermis de los ratones GR^{EKO} recién nacidos, en los que observamos mayor expresión tanto de K6 como de p-ERK.

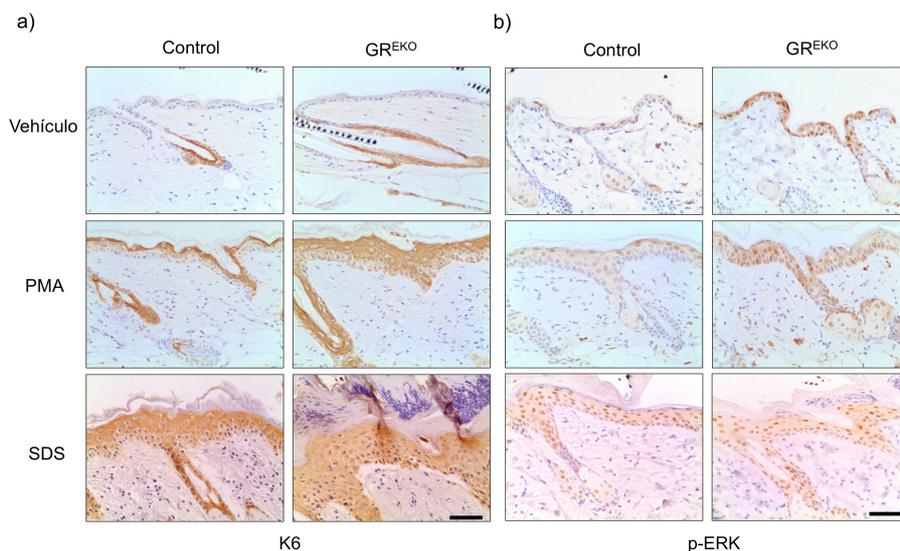


Figura 29. Respuesta de los ratones GR^{EKO} a tratamientos tópicos con PMA y SDS. Ambos tratamientos inducen la expresión de (a) K6 y (b) p-ERK, con una mayor inducción en los ratones GR^{EKO} respecto a los controles. La expresión de p-ERK, además de ectópica, es más elevada incluso en ausencia de tratamiento en los ratones GR^{EKO}. Barra: 50 μ m.

Además, evaluamos la expresión y actividad de STAT3 antes y después del tratamiento con SDS. El análisis inmunohistoquímico reveló un mayor número de núcleos que expresaban STAT3 en los ratones GR^{EKO}, especialmente en la capa basal (figura 30a). Asimismo, el WB

mostró que los ratones GR^{EKO} presentaban mayor actividad STAT3 (p-STAT3) en ausencia de tratamiento (figura 30a-c). El tratamiento con SDS indujo un incremento de la actividad STAT3 en ambos genotipos. Sin embargo, no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre los ratones control y los GR^{EKO} tratados con SDS, lo que podría deberse a la destrucción epitelial (figura 30c).

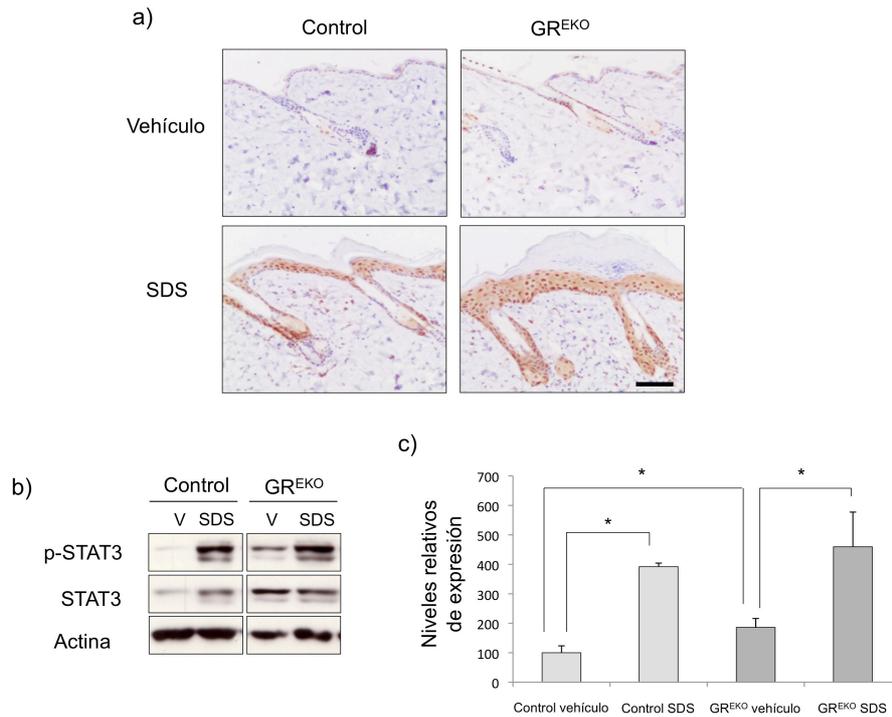


Figura 30. Incremento en la actividad de STAT3 en la piel de ratones GR^{EKO} (a) El tratamiento con SDS induce una mayor expresión y translocación de STAT3 en ambos genotipos, siendo más pronunciado en los ratones GR^{EKO} . Barra: 50 μ m. (b) El WB y (c) la cuantificación muestran los cambios significativos en la actividad STAT3 en la piel de ratones GR^{EKO} y control, antes y después del tratamiento. Prueba t de Student, * $p < 0.05$.

4.2 Los ratones GR^{EKO} son más susceptibles al protocolo de carcinogénesis de piel

Después de comprobar que los ratones GR^{EKO} eran más sensibles al tratamiento con PMA y SDS, quisimos estudiar su susceptibilidad a la formación de tumores cutáneos aplicando un protocolo de carcinogénesis química en dos pasos (DMBA/PMA; Abel *et al.*, 2009; figura 9). El primer paso del protocolo consiste en la aplicación tópica de una única dosis sub-carcinogénica del iniciador tumoral 7,12-Dimetilbenz(a)antraceno (DMBA). A continuación, se realizaron aplicaciones tópicas repetidas del promotor tumoral PMA. En este trabajo, hemos realizado dos experimentos independientes utilizando distintas combinaciones de dosis y tiempos de aplicación de DMBA y PMA. En el primer experimento utilizamos una única dosis de DMBA de 25 nmoles seguida de dos aplicaciones semanales de 10 µg de PMA cada una durante 19 semanas. En el segundo, se aplicó una única dosis de 390 nmoles de DMBA y 3 dosis semanales de 6 µg de PMA cada una durante 31 semanas. Transcurrido el tiempo indicado, tomamos muestras de los tumores y piel adyacente para su posterior análisis histopatológico y bioquímico. En el primer experimento se obtuvieron papilomas, mientras que en el segundo se obtuvieron tumores sebáceos y crecimientos melanocíticos.

En primer lugar comprobamos que el iniciador DMBA había causado la mutación esperada en el codón 61 del gen *Hras* tanto en los papilomas como en los tumores sebáceos pero no en la piel adyacente, de acuerdo con lo publicado anteriormente (Park *et al.*, 2007). Tras amplificar la banda deseada con los cebadores específicos, se digirió el producto con el enzima de restricción *XbaI*, dando lugar a dos productos

de digestión (145 pb y 124 pb) cuando la mutación estaba presente, tanto en papilomas como tumores sebáceos de ratones control y transgénicos (figura 31a).

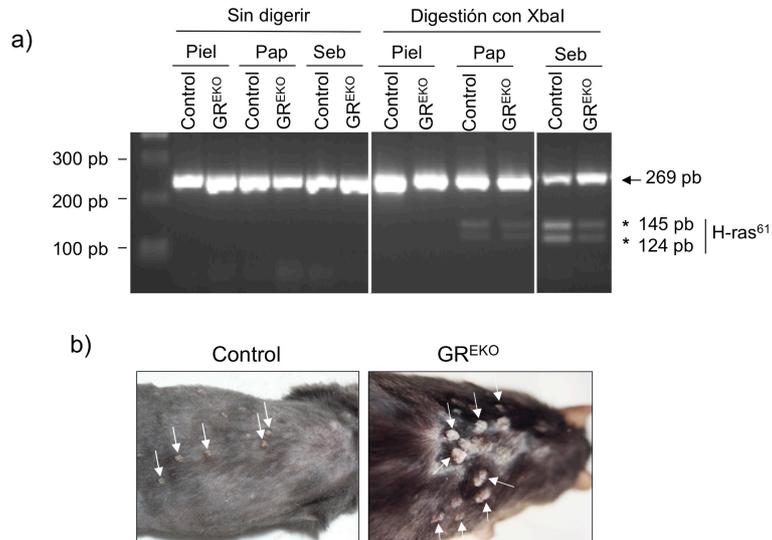


Figura 31. Protocolo de carcinogénesis química en dos pasos (DMBA/PMA) en ratones GR^{EKO} y control. (a) Detección mediante PCR de la mutación en el codón 61 del gen *Hras*, indicada por la presencia de las bandas de 145 pb y 124 pb. Todos los tumores generados (pap, seb) presentan la mutación, no así la piel adyacente sin tratar. (b) Imagen representativa de los papilomas (flechas blancas) generados en ratones GR^{EKO} y control tras realizar un protocolo de carcinogénesis DMBA/PMA de 19 semanas.

4.2.1 Aparición y desarrollo de tumores cutáneos (papilomas)

Los papilomas empezaron a observarse en la semana 8 en los ratones GR^{EKO} y en la semana 10 en los controles. A partir de este momento los GR^{EKO} mostraron siempre un mayor número de papilomas (figura 32a) y de mayor tamaño comparados con los controles (figura 32b), lo cual, además, se podía observar a simple vista (figura 31b, flechas blancas).

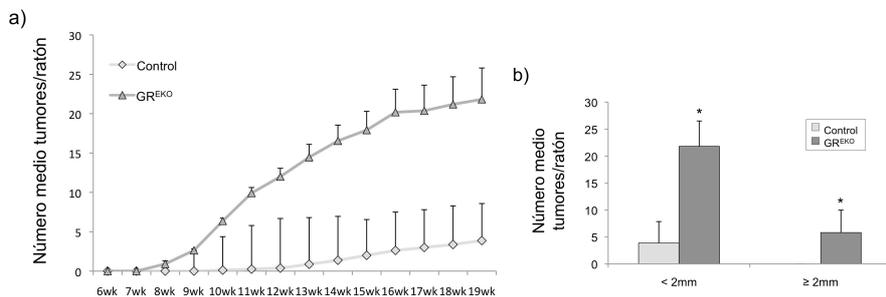


Figura 32. Aparición y desarrollo de papilomas en ratones GR^{EKO} y control. (a) Los ratones GR^{EKO} presenta un mayor número de papilomas durante el protocolo de carcinogénesis de 19 semanas (wk) y (b) el tamaño medio de los papilomas GR^{EKO} es mayor en comparación con el de los controles (n=38, 18 machos y 20 hembras).

El análisis histopatológico mostró que todos los tumores generados en los controles eran papilomas bien diferenciados, como se deduce de la presencia de las llamadas perlas de queratina (figura 33a, asterisco), y mostraban un claro borde delimitando la epidermis y el

estroma (figura 33a, línea negra). Del mismo modo, la mayoría de los tumores detectados en GR^{EKO} eran papilomas, aunque algunos presentaban signos de una menor diferenciación, con queratinocitos atípicos (figura 33a, flechas); además, el borde epidermis-estroma no era tan claro (figura 33a, línea discontinua). El análisis inmunohistoquímico reveló una expresión normal de K5, K10, loricrina y E-cadherina en los papilomas control (figura 34, control). Sin embargo, los papilomas obtenidos en los GR^{EKO} presentaban una pérdida de expresión de K10, loricrina y E-Cadherina en comparación con los controles (figura 34, GR^{EKO}). La expresión de laminina A, marcador de la lámina basal, era normal en los papilomas control (figura 33b, control), delimitando el borde epidermis-estroma, mientras que en los GR^{EKO} su expresión era difusa, lo que correlaciona con el borde epidermis-estroma poco establecido (figura 33b). En algunos casos detectamos la presencia de queratinocitos en la dermis, como revela la inmunodetección con K5, demostrando signos de invasividad de los queratinocitos de ratones GR^{EKO} (figura 33b, flechas negras). Además, el 30% de los papilomas de los ratones GR^{EKO} mostraron expresión de K13, un marcador que indica una posible malignización temprana de estos papilomas, y que no se detectó en ninguno de los papilomas control (figura 34).

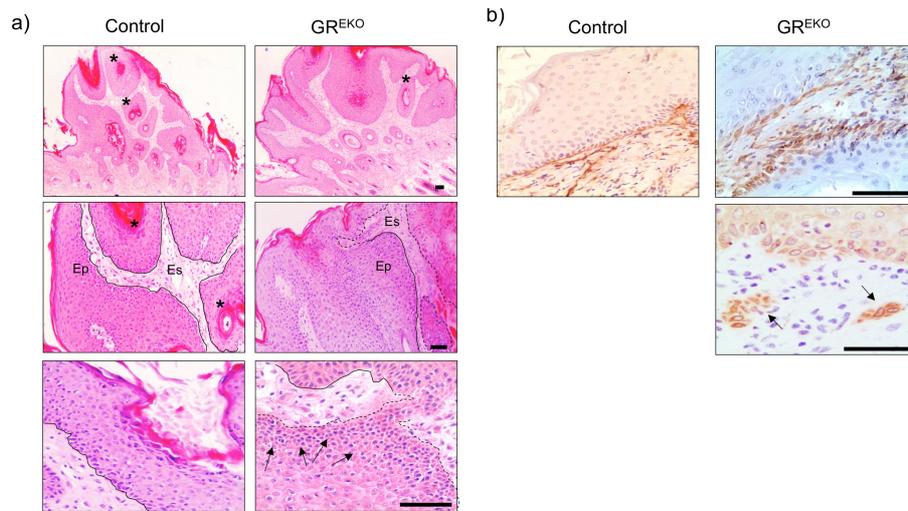


Figura 33. Análisis histopatológico de papilomas cutáneos en ratones GR^{EKO} y control tras la aplicación de DMBA/PMA. (a) Los asteriscos indican las perlas de queratina. La línea delimita el borde epidermis/estroma, difuso en los papilomas GR^{EKO} (línea discontinua). Las flechas indican queratinocitos atípicos en los papilomas GR^{EKO}. Barras: 100 μ m. (b) Expresión deslocalizada de laminina A en los GR^{EKO}. Barra: 100 μ m. Las flechas indican la presencia de queratinocitos positivos para K5 invadiendo la dermis de los papilomas GR^{EKO}. Barra: 50 μ m.

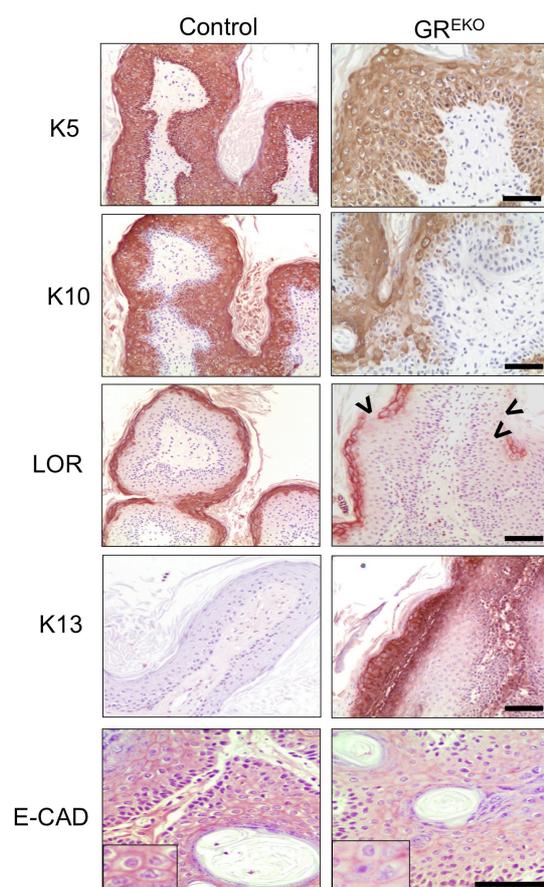


Figura 34. Histopatología alterada en los papilomas de los ratones GR^{EKO}. El análisis inmunohistoquímico con los marcadores que se indican demuestra que los papilomas GR^{EKO} presentan alteraciones en el grado de diferenciación de los tumores (LOR, flecha abierta), una reducción en los niveles de expresión del marcador epitelial E-CAD, y expresión de K13, indicativo de una malignización temprana de los tumores. Barras: 100 μ m.

La pérdida de GR en los papilomas de los ratones GR^{EKO} causó un incremento de 2 veces de la proliferación de los queratinocitos basales. Estos ratones también mostraron una mayor tasa de proliferación de los queratinocitos suprabasales en comparación con los controles, como muestran los experimentos de incorporación de BrdU *in vivo* (figura 35a); la cuantificación de la tasa de proliferación de queratinocitos basales de los tumores demostró ser estadísticamente significativa (figura 35b). Además, los papilomas de los ratones GR^{EKO} mostraron una mayor expresión de ciclina D1, detectada tanto por inmunohistoquímica como por qRT-PCR (figura 35a y c). La ciclina D1 es una proteína importante para la regulación del ciclo celular, ya que permite su progresión. Su actividad se regula por el oncogén *Hras* y su sobre-expresión en la piel conduce a una mayor proliferación y una mayor susceptibilidad al desarrollo de papilomas (Yamamoto *et al.*, 2002). Estos datos son consistentes con el papel inhibitorio que ejerce GR sobre la expresión del gen de la ciclina D1 a nivel transcripcional (Surjit *et al.*, 2011).

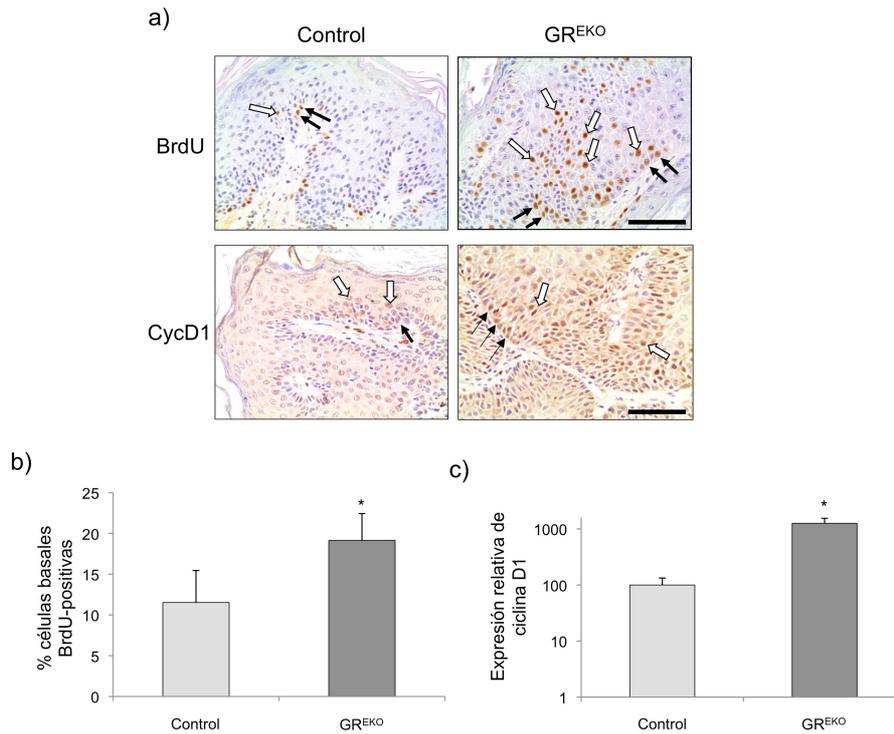


Figura 35. Incremento de la tasa de proliferación de los queratinocitos en los papilomas GR^{EKO} . (a) Aumento en la incorporación de BrdU y en la expresión de la ciclina D1 (CycD1). Las flechas negras indican los queratinocitos basales BrdU-positivos y las blancas los suprabasales. Barra: 100 μ m. (b y c) La cuantificación del porcentaje de células BrdU-positivas y de los niveles de mRNA de CycD1/Ccdn1 muestra cambios estadísticamente significativos en ambos casos. Prueba t de Student, * $p < 0.05$.

Como se ha visto en experimentos anteriores, GR tiene un importante papel anti-inflamatorio. La falta de GR en los GR^{EKO} resultó en una mayor presencia de infiltrados inmunes tanto en el estroma como en la epidermis (figura 36a, GR^{EKO} , flechas negras y blancas), lo que

correlaciona con el aumento en la expresión de IL-6 (figura 36a). La IL-6 es una citoquina pro-inflamatoria secretada por queratinocitos, con un papel relevante en este tipo celular que además se inhibe transcripcionalmente por GR. En la piel no tratada de los ratones GR^{EKO} también se encontraron niveles elevados de los transcritos correspondientes a esta citoquina, así como de *Tnf-α* e *Il-1β*, también citoquinas pro-inflamatorias (figura 36b). Estos datos indican que la falta de GR aumenta la inflamación cutánea, lo cual, junto con la hiperproliferación observada, contribuye al mayor desarrollo de tumores en los ratones GR^{EKO}.

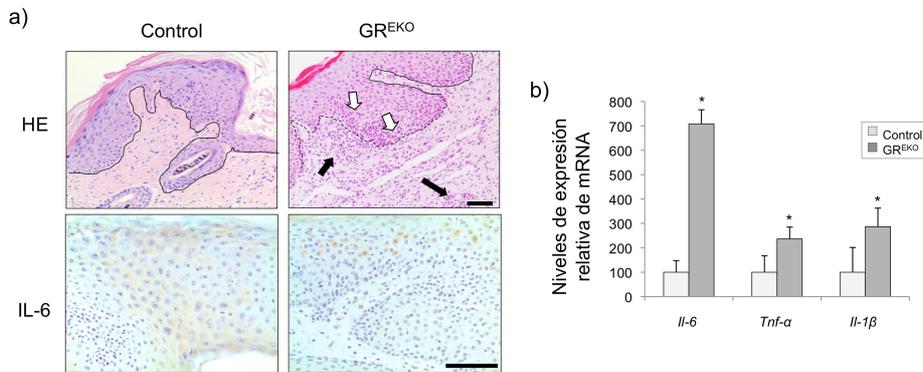


Figura 36. Aumento de marcadores de inflamación en los papilomas GR^{EKO}. (a) Presencia de infiltrados inmunes intraepidérmicos (flechas blancas) y dérmicos (flechas negras). La inmunohistoquímica muestra una mayor expresión de IL-6 en la epidermis de los papilomas GR^{EKO} respecto al control. Barras: 100 μm. (b) Elevados niveles de expresión de citoquinas pro-inflamatorias en la piel de los ratones GR^{EKO}. Prueba t de Student, * p < 0.05.

En trabajos anteriores se ha visto que las vías de señalización que hemos estudiado en este trabajo (AKT, ERK y STAT3) aparecen alteradas en procesos de carcinogénesis (Levy y Darnell, 2002; Leis *et al.*, 2004; Khavari y Rinn, 2007). También hemos descrito que dichas vías están constitutivamente activas en los ratones GR^{EKO} tanto recién nacidos como adultos (figuras 24, 25, 29 y 30). Por todo ello, quisimos evaluar el estado de activación de las mencionadas vías de señalización y su correlación con la aparición de papilomas en los ratones GR^{EKO}.

En la piel normal y en tumores generados en ratones no transgénicos, la expresión de p-ERK está restringida a las capas más suprabasales de la epidermis (figura 37a, control, flechas blancas). En cambio, en los papilomas de los GR^{EKO} encontramos expresión de esta proteína en todas las capas de la epidermis, incluyendo la basal (figura 37a, GR^{EKO}, flechas negras). A pesar de estos cambios observados en el análisis histopatológico, no detectamos cambios estadísticamente significativos en la actividad de ERK por WB, determinada por el ratio p-ERK/ERK (figura 37b y c). Detectamos expresión de p-AKT en papilomas de ambos genotipos, aunque en mayor medida en los papilomas GR^{EKO} (figura 37a, flechas blancas). Del mismo modo, sólo unos pocos núcleos en los papilomas control mostraban expresión de STAT3, mientras que se expresaba en todos los núcleos de los papilomas GR^{EKO} (figura 37a, flechas blancas y negras). En ambos casos se confirmó por WB la mayor actividad de estas vías de señalización (figura 37b y c).

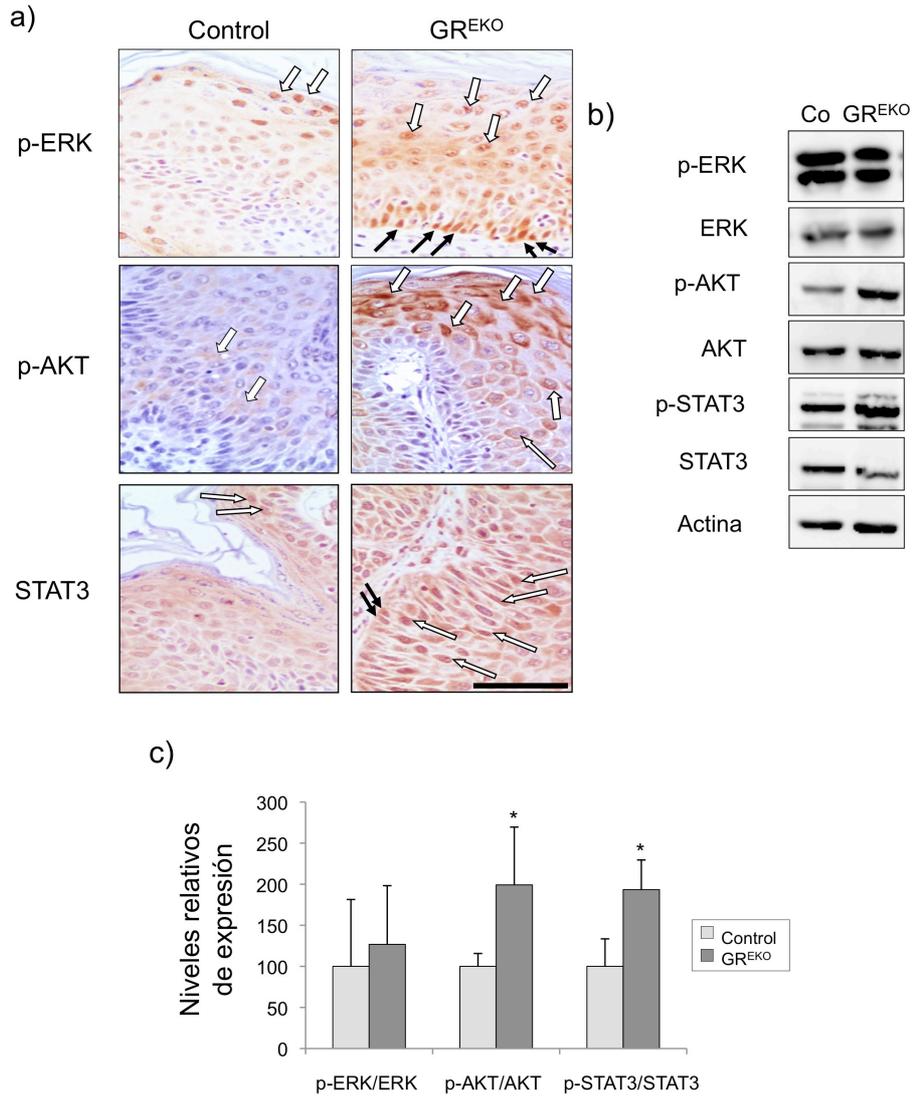


Figura 37. Aumento en la actividad AKT y STAT3 en los papilomas GR^{EKO}. Tanto la (a) inmunohistoquímica como el (b) WB muestran cambios, que son estadísticamente significativos para AKT y STAT3 (c). La actividad ERK sólo muestra cambios cualitativos en la inmunohistoquímica. Barra: 100 μ m. Prueba t de Student, * $p < 0.05$.

4.2.2 Formación de tumores sebáceos y focos melanocíticos

El segundo protocolo, con una alta dosis de DMBA, dio lugar a la formación de tumores sebáceos (figura 38) y focos melanocíticos (o nevi) tanto en los controles como en los GR^{EKO} (figura 40).

De la misma manera que en el experimento anterior, en primer lugar quisimos comprobar si los tumores sebáceos generados contenían la mutación en el codón 61 del gen *Hras*, de acuerdo con lo descrito en la literatura (Gerdes *et al.*, 2006). Tras la amplificación y posterior digestión, observamos que los tumores de ambos genotipos presentaron dicha mutación (figura 31a).

Los tumores sebáceos aparecieron en los ratones GR^{EKO} (semana 13) antes que en los controles (semana 19) (figura 38b). Los ratones GR^{EKO} presentaron siempre un mayor número de tumores a lo largo del experimento (figura 38b).

A pesar de estas diferencias, los tumores de ambos genotipos eran indistinguibles a nivel histopatológico (figura 38a, panel inferior). Los tumores sebáceos se caracterizan por presentar una menor expresión de β -Catenina y p-c-Jun en la parte sebácea con respecto a la epidermis (Gerdes *et al.*, 2006). Tanto los tumores sebáceos control como los GR^{EKO} mostraron dicha reducción en la expresión de estas dos proteínas en la parte sebácea con respecto a la epidérmica (figura 39).

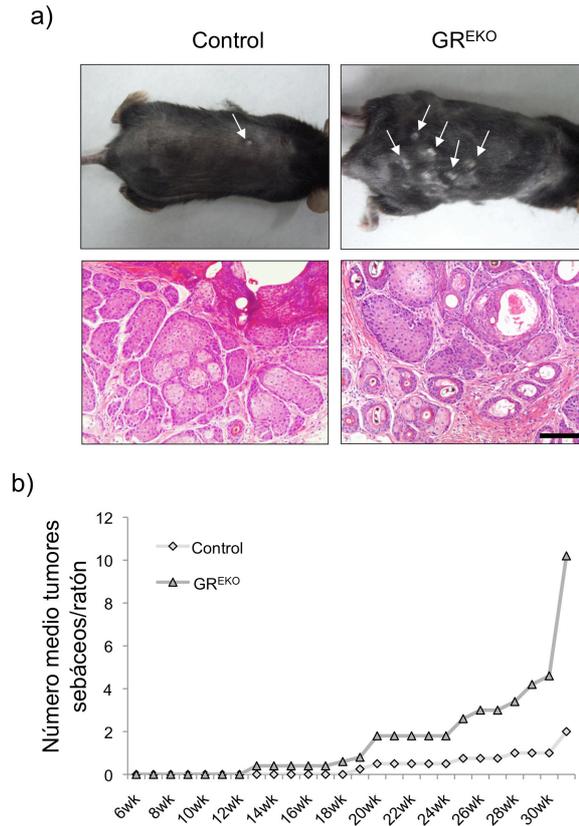


Figura 38. Aparición y desarrollo de tumores sebáceos en ratones GR^{EKO} y control. (a) Panel superior: aspecto macroscópico de los tumores sebáceos. Panel inferior: la histología muestra el carácter sebáceo de los tumores generados. Barra: 100 μ m. (b) Los ratones GR^{EKO} mostraron una mayor número de tumores a lo largo del experimento, especialmente en las últimas semanas (n=18, 7 machos y 11 hembras).

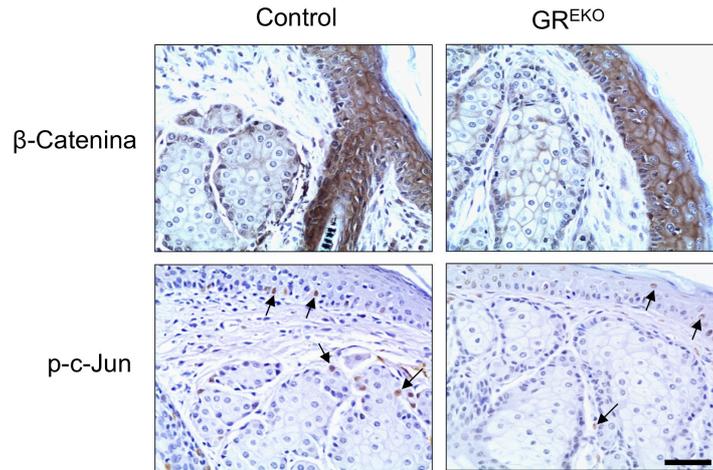


Figura 39. Expresión de los marcadores β -Catenina y p-c-Jun en los tumores sebáceos. Tanto en los tumores control como en los GR^{EKO} se aprecia una disminución en la expresión de ambos marcadores en las células sebáceas con respecto a la epidermis, sin existir diferencias entre los tumores de los distintos genotipos. Las flechas indican la tinción correspondiente a p-c-Jun. Barra: 100 μ m.

Al igual que sucedió con los tumores sebáceos, los focos melanocíticos aparecieron antes (3 semanas) y en mayor número en los ratones GR^{EKO} (figura 40b). El análisis histopatológico reveló un mayor tamaño de los focos melanocíticos en los GR^{EKO} , que invadían la dermis profunda (figura 40a, panel inferior).

Llegados a este punto, es importante aclarar que los melanocitos no expresan la recombinasa CRE y que por tanto expresan GR con normalidad. Nuestros datos ponen de manifiesto un *cross-talk* entre los queratinocitos y los melanocitos, siendo los primeros importantes para regular el crecimiento en otros tipos celulares; este tipo de regulación

cruzada se ha descrito en otros receptores hormonales (apartado 3.2 de la discusión).

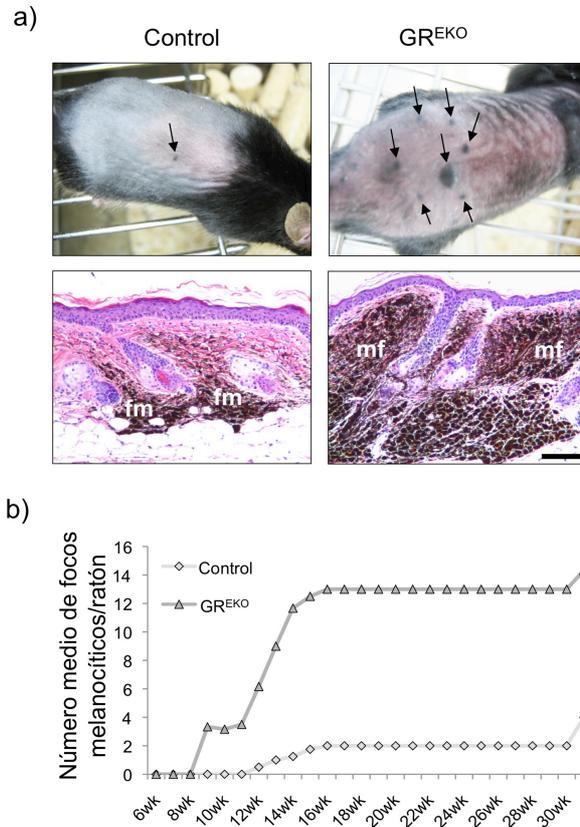


Figura 40. Formación de focos melanocíticos en ratones GR^{EKO} y control. (a) Panel superior: aspecto macroscópico de los focos melanocíticos. Panel inferior: la histología muestra la mayor extensión de los nevi generados en los ratones GR^{EKO} en relación a los controles. Barra: 100 μ m. (b) Los ratones GR^{EKO} mostraron un mayor número de focos melanocíticos a lo largo de las 31 semanas que duró el experimento (n=18, 7 machos y 11 hembras).

4.3 Generación de líneas celulares de queratinocitos a partir de ratones adultos

Generamos una línea celular estable de queratinocitos a partir de epidermis dorsal de ratones control y GR^{EKO} adultos, que nos permitió confirmar que los cambios observados en los ratones GR^{EKO} ocurrían de manera específica en queratinocitos.

En primer lugar quisimos realizar una caracterización básica de las líneas generadas, empezando por la morfología. Los queratinocitos control presentaban una morfología poligonal, mientras que las células GR^{EKO} mostraban una forma de huso, más alargada, que se puede ver con mayor claridad en la tinción para K5 (figura 41a). La tinción con faloidina revela además la presencia de fibras de estrés de actina a lo largo de toda la célula (figura 41a), contribuyendo al fenotipo mencionado.

A continuación, analizamos el estado de las vías de señalización que encontramos alteradas en la piel de los ratones GR^{EKO} (tanto P0 como adultos) y en los papilomas generados con el protocolo de carcinogénesis. En estado basal, los queratinocitos GR^{EKO} presentaban una mayor activación de las vías de ERK y STAT3 (figura 41b).

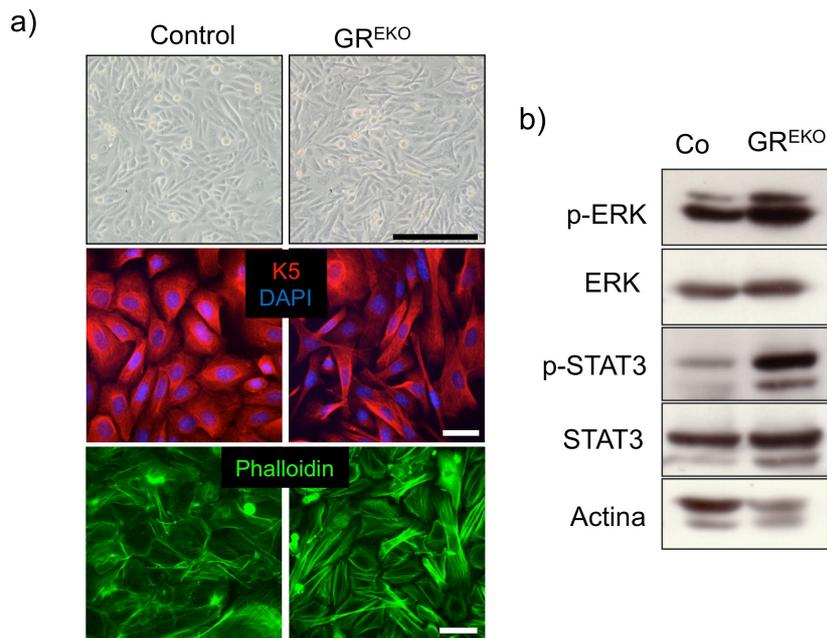


Figura 41. Caracterización de las líneas establecidas de queratinocitos adultos control y GR^{EKO}. (a) La microscopía de contraste de fases (panel superior) y las inmunodetecciones muestran alteraciones morfológicas en la línea celular GR^{EKO}. Barras: 50 μ m. (b) La línea celular GR^{EKO} presenta mayor tasa de fosforilación de las proteínas ERK (1.35) y STAT3 (2.45).

La presencia de signos de invasión y malignización en los papilomas GR^{EKO}, junto con la morfología de los queratinocitos GR^{EKO} y la presencia de fibras de estrés sugerían un fenotipo (al menos parcial) de transición epitelio mesénquima (EMT). Durante este proceso, las células epiteliales pierden las características que las definen como tal y adoptan un fenotipo mesenquimal (Acloque *et al.*, 2009). Los queratinocitos GR^{EKO} mostraron una clara pérdida del marcador epitelial

E-Cadherina, importante para las uniones intercelulares, a la vez que expresaban actina de músculo liso (SMA), un marcador mesenquimal (figura 42a). La pérdida de E-Cadherina en las uniones entre los queratinocitos GR^{EKO} correlaciona con la ausencia de β -Catenina y desmoplaquina en la membrana celular y la acumulación de β -Catenina en el citoplasma (figura 42a).

Estos resultados se confirmaron por WB. Además, detectamos un incremento en la expresión de SNAIL en los queratinocitos GR^{EKO}. Sin embargo, no detectamos cambios en la expresión de SLUG (figura 42b y c). Ambos factores de transcripción se unen a una determinada secuencia, denominada caja E, del promotor del gen de la E-Cadherina para inhibir su transcripción, lo que constituye un evento esencial para el proceso de EMT (Moreno-Bueno *et al.*, 2009).

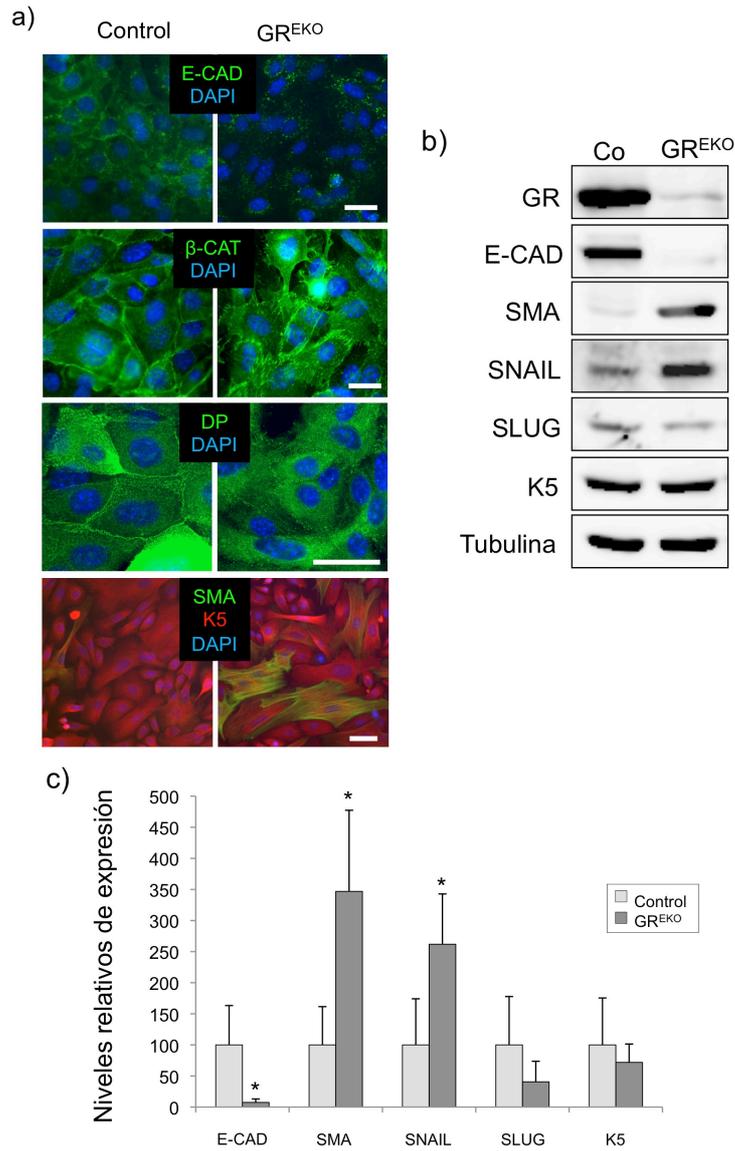


Figura 42. Expresión de marcadores de transición epitelio mesénquima (EMT) en la línea celular GR^{EKO}. (a) Pérdida de expresión de E-Cadherina, ausencia de β-Catenina y desmoplaquina (DP) en la membrana celular y expresión de SMA en los queratinocitos GR^{EKO}. (b) El WB y (c) la cuantificación muestran la ganancia y pérdida de marcadores indicativos de EMT en los queratinocitos GR^{EKO}. Prueba t de Student, * p < 0.05.

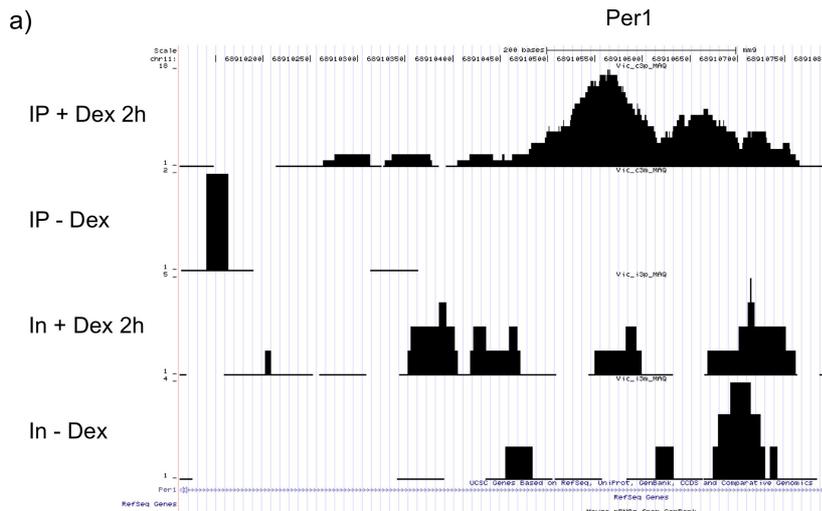
5. Identificación mediante CHIP-sequencing de genes que son dianas transcripcionales directas de GR

El análisis del perfil transcriptómico de la epidermis de los ratones GR^{EKO} nos ha permitido identificar genes regulados por GR en queratinocitos, sin embargo, no sabemos si se trata de una regulación transcripcional directa o no. Además, sabemos que el tratamiento prolongado con GCs tiene efectos secundarios no deseados, por lo que es importante conocer con más detalle los efectos de los GCs y poder diseñar nuevos fármacos para mejorar el tratamiento y eliminar los efectos no deseados. Así pues, para conocer si esta regulación es directa e identificar nuevas dianas primarias de GR en queratinocitos decidimos llevar a cabo un experimento de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) combinada con la secuenciación masiva (ChIP-sequencing o ChIP-seq; Massie y Mills, 2012). La técnica de ChIP-seq presenta ventajas frente a las técnicas anteriores (ChIP-on-ChIP) ya que permite identificar las secuencias a las cuales se une un factor de transcripción de forma no sesgada con mayor precisión. Además, permite identificar dichas secuencias *in vivo*, lo que supone una ventaja frente a las predicciones bioinformáticas *in silico*.

En un primer experimento utilizamos cultivos de queratinocitos primarios de ratones (MPKs) *WT* P0 tratados y sin tratar con Dex 100 nM durante 2 h. Tras el tratamiento, las células se fijaron, se sonicaron y se precipitaron los complejos de DNA-proteína con la ayuda de un anticuerpo anti-GR. De este modo, y tras las 2 h de tratamiento con el ligando, identificamos 106 “picos” o secuencias GREs a las cuales se une GR de manera directa para regular la transcripción génica (figura 43a). En este experimento identificamos genes previamente descritos

como dianas transcripcionales de GR en otros tipos celulares, como *Gilz*, *Per1* y *Zfp36*. Sin embargo, es la primera vez que se identifica la unión directa de GR al promotor de estos genes en queratinocitos. *Per1* es una conocida diana de GR que actúa como regulador del ciclo circadiano (Stojadinovic et al., 2007; Reddy et al., 2009), Por otra parte, *Gilz* y *Zfp36* son genes activados por GCs que participan en procesos anti-inflamatorios (Onda et al., 2006; Smoak y Cidlowski, 2006).

En un experimento independiente validamos la unión de GR a algunas de estas regiones pertenecientes a distintos genes (figura 43b). Además, también examinamos la expresión de mRNA de estos mismos genes al tratar los MPKs con Dex durante 3 h, observando que existe una relación directa entre la unión de GR y la expresión del gen (figura 43c).



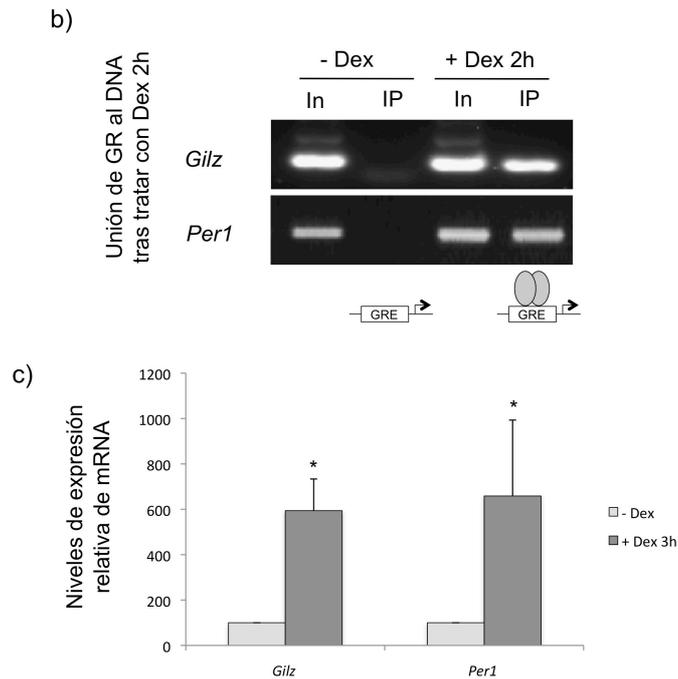


Figura 43. Identificación de sitios de unión de GR al DNA mediante ChIP-seq en queratinocitos tratados con Dex. (a) Representación de la unión de GR a las secuencia reguladora del gen *Per1* identificada mediante ChIP-seq. (b) Validación por ChIP-PCR de la unión de GR a secuencias de *Gilz* y *Per1* en queratinocitos primarios (MPKs) aislados de ratón *WT* tratados con Dex 100 nM durante 2 h. (c) Cambios en la expresión de *Gilz* y *Per1* tras el tratamiento con Dex. Prueba t de Student, * $p < 0.05$.

El bajo número de genes identificados con unión directa de GR, sugería limitaciones técnicas en el experimento debidas al bajo rendimiento obtenido al cultivar los MPKs, y/o a la resistencia de éstos a la sonicación. Para confirmar que los picos identificados son dianas transcripcionales de GR, utilizamos una línea celular establecida en el

grupo a partir de queratinocitos de ratón adulto *WT* (denominada también OLL; descrita en el apartado 4.3). Esta línea presenta ventajas respecto a los MPKs, al permitir obtener réplicas más homogéneas entre sí, con mayor número de células. Además, teniendo en cuenta que Dex induce la diferenciación *in vitro* de los queratinocitos aproximadamente a las 24-48 h, realizamos una cinética de tratamiento con Dex, para identificar genes relacionados con este proceso. Así pues, tratamos la línea celular OLL con Dex durante 3, 6, 12 y 24 h y analizamos la expresión de genes que son dianas conocidas de GR por qRT-PCR. Además, comprobamos que GR estaba unido al DNA tras tratar con Dex durante 2, 10 y 20 h (datos no mostrados).

Nuestros datos muestran la validez de la línea OLL para el estudio de dianas transcripcionales de GR, dado que el tratamiento con Dex a 3 y 24 h indujo la expresión de los genes previamente identificados mediante ChIP-seq (figura 44b), y pudimos detectar la unión de GR a las secuencias reguladoras correspondientes en los genes *Gilz*, *Per1* y *Zfp36* (figura 44a).

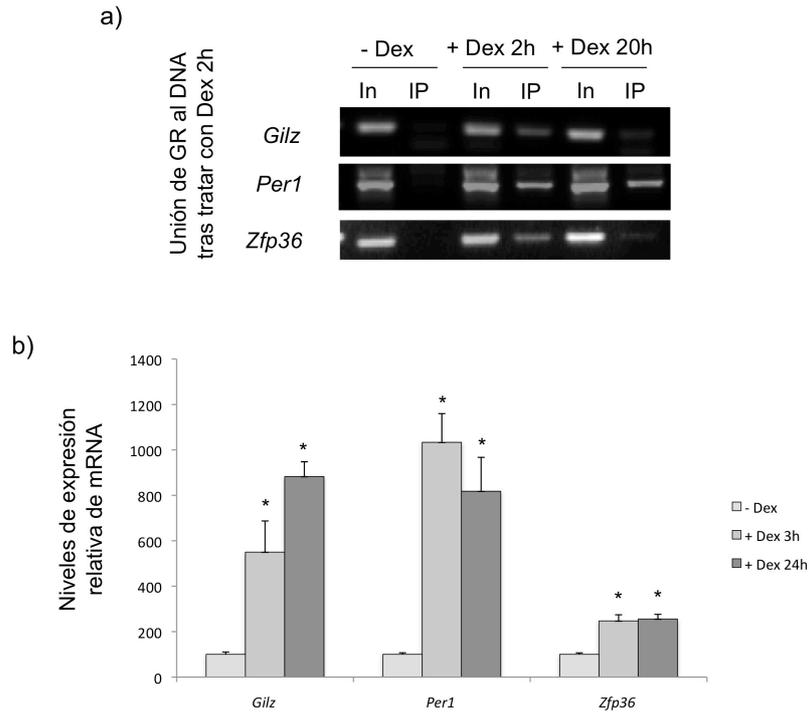


Figura 44. Validación del ChIP-seq en la línea de queratinocitos control OLL. (a) Unión de GR a las regiones reguladoras de los genes *Gilz*, *Per1* y *Zfp36* después de tratar las células con Dex durante 2 y 20 h. (b) Expresión de los genes *Gilz*, *Per1* y *Zfp36* tras tratar con Dex durante 3 y 24 h. El tratamiento induce la expresión de los 3 genes. Prueba t de Student, * $p < 0.05$.

Discusión

1. GR durante el desarrollo epidérmico embrionario

Trabajos anteriores han demostrado la importancia de los GCs, actuando a través de GR, durante el desarrollo embrionario. Por ejemplo, la inyección de GCs a hembras gestantes de roedores a día E16.5 acelera el proceso de adquisición de barrera epidérmica (Williams *et al.*, 1998; Patel *et al.*, 2006). Consistente con estos datos, nuestros análisis de ratones GR *knock-out* demostraron previamente que GR es necesario para una correcta adquisición de la barrera epidérmica. Así, los ratones GR^{null/null} muestran una falta de diferenciación terminal de los queratinocitos, además de una mayor tasa de proliferación y muerte celular (Bayo *et al.*, 2008). El análisis comparativo del perfil transcriptómico de la piel de ratones GR^{+/+} y GR^{null/null} mostró alteraciones en la expresión de genes implicados en la diferenciación de la epidermis, y por tanto en la adquisición de función de barrera. El papel de GR es dual, puesto que inhibe genes de diferenciación temprana como la *Krt77* y *Elf5* e induce genes de diferenciación tardía como *Cdsn* y *Spr2d* (Sevilla *et al.*, 2010). Nuestros resultados concuerdan con lo publicado por otros autores en cultivos primarios de queratinocitos humanos (Stojadinovic *et al.*, 2007).

Sin embargo, el fenotipo complejo de los ratones GR^{null/null} con alteraciones en los niveles de hormonas circulantes y letalidad perinatal, no permite discriminar la contribución de GR epidérmico al fenotipo observado. El sistema Cre/loxP permite delecionar el gen deseado en un tejido en concreto sin afectar al resto, expresando la recombinasa CRE bajo el control de un promotor específico (Reichardt *et al.*, 1999). El uso del promotor de la K5 restringe la expresión de la recombinasa CRE a los queratinocitos basales de la epidermis (Ramirez *et al.*, 2004), lo que

nos ha permitido generar ratones con pérdida específica de la función de GR en la epidermis (GR^{EKO}).

1.1 La inactivación específica de GR en la epidermis resulta en la formación de una barrera epidérmica defectiva

Nuestros datos muestran alteraciones en el desarrollo de la epidermis y la adquisición de la función de barrera en los ratones GR^{EKO} . La tinción con azul de toluidina mostró varios sitios de iniciación de la barrera epidérmica que no siguen el patrón dorso-ventral y antero-posterior ortodoxos, así como un retraso en la maduración epidérmica de los embriones GR^{EKO} , todavía incompleta a día E18.5. Esta falta de maduración durante el desarrollo se relaciona con la epidermis más fina que exhibían los ratones GR^{EKO} durante el desarrollo embrionario (E17.5 y E18.5; figura 13). Por el contrario y tras el nacimiento (P0 y P2; figura 14), los ratones GR^{EKO} presentaban una epidermis más engrosada, con defectos en la diferenciación terminal y fragilidad del estrato córneo. Se apreciaban parches negativos en las tinciones para filagrina, loricrina y corneodesmosina (marcadores de diferenciación) coincidentes con células con paraqueratosis en los estratos más suprabasales (figura 14). Además, la expresión de K6 en capas suprabasales de la epidermis de ratones GR^{EKO} (que contrasta con una expresión de K6 restringida al folículo en condiciones normales) (figura 16), es indicativa de una patología de la piel. Sorprendentemente, a día P5 y coincidiendo con la aparición del pelo, el fenotipo cutáneo de los ratones GR^{EKO} se normalizó (figura 14), siendo prácticamente indistinguible de los

controles a nivel histológico. Aunque no tenemos una explicación sencilla que explique la desaparición del fenotipo en piel de los ratones GR^{EKO} en la etapa perinatal, puede argumentarse que la aparición del pelo ofrece una protección natural frente al medio, evitando la exposición directa de la epidermis, y atenuando el fenotipo observado. Por otra parte, y como ya hemos comentado en la introducción, no podemos olvidar que existe síntesis de GCs en los queratinocitos (Taves *et al.*, 2011). La ausencia total de GR en los ratones GR^{null/null} provoca una deregulación del eje HPA, con el consecuente incremento en los niveles de corticosterona circulante (Cole *et al.*, 1995). De un modo similar, la falta de GR en la epidermis de los ratones GR^{EKO} podría alterar la síntesis local de GCs. El exceso de GCs locales podría actuar a través de MR, que supliría la función de GR y permitiría la resolución del fenotipo epidérmico.

De forma aparentemente paradójica, y a pesar de las anomalías que dan lugar a defectos en la función de barrera epidérmica de los ratones GR^{EKO}, nuestro análisis transcriptómico detectó un aumento significativo en la expresión de genes implicados en la diferenciación terminal, muchos de los cuales mapeaban en el complejo EDC, como los *Sprrs* (ver apartado 1.4 de la discusión). Estos cambios de expresión pueden interpretarse como un fenómeno de compensación, previamente descrito en otros modelos transgénicos. Por ejemplo, los ratones deficientes en loricrina presentan un retraso en el desarrollo de la epidermis y nacen con una piel más brillante y translúcida. Este fenotipo, al igual que sucede en los ratones GR^{EKO}, desaparece a los 4-5 días. Además, estos ratones presentan niveles elevados de los genes *Sprr2d*, *Sprr2h* y *Rptn* como mecanismo compensatorio (Koch *et al.*, 2000). Por

otro lado, los ratones deficientes en el factor de transcripción KLF4, importante para el desarrollo de la epidermis y la adquisición de su función de barrera, también muestran defectos en la diferenciación terminal de la epidermis, con niveles elevados de varios genes de la familia *Sprr* (Segre *et al.*, 1999; Patel *et al.*, 2003). Es importante señalar que algunos de los genes regulados por KLF4 también están regulados a través de GR (Patel *et al.*, 2006), lo que apunta a una acción conjunta de ambos factores de transcripción durante el desarrollo de la epidermis y la adquisición de la función de barrera.

El fenotipo observado en los ratones GR^{EKO} presenta similitudes con el de los ratones GR^{null/null} (Bayo *et al.*, 2008). Ambos modelos muestran defectos en el desarrollo de la barrera epidérmica, aunque los ratones GR^{null/null} muestran un fenotipo más severo, con una epidermis más fina y una mayor reducción de marcadores de diferenciación terminal (involucrina, filagrina y loricrina). Esta diferencia entre ambos fenotipos puede deberse a los niveles normales de ACTH y corticosterona en los ratones GR^{EKO} respecto a los embriones GR^{null/null} (datos no mostrados; Cole *et al.*, 1995) y/o a la presencia de GR en la dermis. En este sentido, la descripción reciente de ratones *knock-out* condicionales para GR en tejido mesenquimal, denominados GR^{Dermo1} (Li *et al.*, 2013), muestra un fenotipo cutáneo muy leve, con inmadurez en los estratos espinoso y granular. En conjunto, nuestros datos indican que la presencia de GR en la epidermis es necesaria para el desarrollo correcto de la piel, si bien el GR dérmico también contribuye al desarrollo cutáneo.

Por otra parte, y al contrario de lo que sucede en los ratones GR^{null/null}, los ratones GR^{EKO} no presentan el fenotipo de ojo abierto al

nacer (EOB) (Bayo *et al.*, 2008 y datos nos mostrados). La pérdida de GR únicamente en la epidermis no es suficiente para provocar el retraso en el cierre del párpado observado en los ratones GR^{null/null}. La formación del párpado se inicia a día E12.5, pero la expresión de la recombinasa CRE (y la pérdida asociada de GR) no comienza hasta el día E15.5. Quizá esta ventana de tiempo en la que GR aún está presente es suficiente para la correcta formación del párpado y sólo la pérdida de GR desde el inicio del desarrollo causa el fenotipo EOB (Pérez *et al.*, 2001). Además, los ratones GR^{null/null} presentan elevados niveles de corticosterona que podrían estar actuando a través del receptor de MR en ausencia de GR. Esta idea viene refrendada por la descripción de los ratones que sobre-expresan el gen de MR humano en queratinocitos, ya que muestran un fenotipo de EOB idéntico al observado en los ratones GR^{null/null} (Sainte Marie *et al.*, 2007). Por otra parte, trabajos anteriores del grupo mostraron que los ratones con ganancia de función K5-GR y K5-GR-TR presentaban el fenotipo EOB, demostrando que la sobre-expresión de la función de TR es suficiente para interferir con el correcto desarrollo del párpado (Pérez *et al.*, 2001; Donet *et al.*, 2008). La similitud fenotípica que existe entre los ratones sobre-expresores de GR y MR, refuerza la idea de que el exceso de corticosterona que presentan los ratones GR^{null/null} esté actuando a través de MR para causar el fenotipo EOB. Tampoco podemos olvidar que la pérdida de GR ocurre únicamente en la epidermis por lo que no podemos descartar que la dermis esté ejerciendo un papel importante en el proceso de cierre del párpado.

1.2 GR regula la proliferación de los queratinocitos *in vivo* de manera autónoma-celular

La detección de K6 en la epidermis interfolicular de los ratones GR^{EKO} recién nacidos era indicativa de alteraciones en la proliferación de queratinocitos debidas a la ausencia de GR en este tipo celular. Los ensayos de incorporación de BrdU *in vivo* mostraron una tasa de proliferación 4 veces mayor en los queratinocitos basales de ratones GR^{EKO} respecto a los controles (figura 18), lo cual es consistente con la hiperplasia observada en la piel de estos ratones (figura 14) y la expresión ectópica de K6 (figura 16).

De forma complementaria, los ratones K5-GR presentan hipoplasia epidermica causada por una menor tasa de proliferación de los queratinocitos. En los ratones GR^{null/null}, no se detectaron cambios estadísticamente significativos en la proliferación de queratinocitos epidérmicos respecto a los controles *in vivo* pero sí en cultivos de queratinocitos primarios *in vitro* (Bayo *et al.*, 2008). Por tanto, y dado que la sobre-expresión e inactivación de GR específicas de epidermis muestran resultados consistentes, nuestros datos confirman que GR regula la proliferación de los queratinocitos de manera autónoma-celular. Nuestros resultados son también consistentes con los publicados anteriormente y con los efectos anti-proliferativos, ya conocidos, que ejercen los GCs en la piel de humanos y roedores (Hengge *et al.*, 2006; Pérez, 2011). Además, muestran un papel de GR en la fisiología de la piel y no sólo en circunstancias patológicas.

1.3 Aumento de la señalización mediada por ERK, AKT y STAT3 en la epidermis de los ratones GR^{EKO}

Trabajos previos del grupo determinaron que la inactivación total de GR resultaba en un incremento de la actividad de ERK en los queratinocitos, tanto *in vivo* como *in vitro* (Bayo *et al.*, 2008). En este trabajo, mostramos alteraciones en la expresión de la forma fosforilada, y por tanto activa, de ERK (p-ERK) en la epidermis de ratones GR^{EKO} respecto a los controles (E18.5 y P0), tanto por técnicas inmunohistoquímicas como por WB. En los controles, la expresión de p-ERK queda restringida a las capas más suprabasales de la epidermis; sin embargo, en los ratones GR^{EKO} podemos observar la expresión de p-ERK en todas las capas de la epidermis, incluyendo la capa basal (figura 24). Los cambios observados en la histología no se reflejaban en la cuantificación del WB, ya que no detectamos un incremento estadísticamente significativo en la actividad de ERK en la piel de ratones GR^{EKO} vs control, a pesar de observar una clara tendencia al alza (figura 25). Dado que ERK activa la vía de señalización AP-1, y que este factor de transcripción induce la transcripción de varios genes marcadores de proliferación, como *Krt6* y *Krt16* (Ramot *et al.*, 2009), es posible que el aumento de la actividad de ERK en queratinocitos GR^{EKO} contribuya a la hiperproliferación y al fenotipo inflamatorio observado en este modelo animal (figura 21).

Estudios anteriores demostraron la importancia de la vía de señalización RAS/ERK para la formación normal de la epidermis y su renovación. De hecho, mientras que los ratones deficientes en ERK1 son viables y fértiles, los ratones deficientes en ERK2 son letales (Khavari y Rinn, 2007). Además, los ratones ERK1^{-/-} no responden al

tratamiento tópico con PMA, muestran una baja tasa de proliferación de los queratinocitos basales, incluso después del tratamiento, y una menor formación y crecimiento de tumores inducidos por DMBA/PMA (Bourcier *et al.*, 2006). Por tanto, los resultados obtenidos en los ratones GR^{EKO} son compatibles con los obtenidos en los ratones deficientes en ERK1. Además, estudios adicionales demostraron que la pérdida de las dos isoformas de ERK en queratinocitos humanos daba lugar a una epidermis hipoplásica con una menor tasa de proliferación (Dumesic *et al.*, 2009), lo cual es compatible con nuestros resultados en los ratones GR^{EKO}. Así pues, nuestros datos refuerzan los obtenidos anteriormente en el grupo sobre las funciones antagónicas de GR y ERK en la proliferación de los queratinocitos.

Sin embargo, y a pesar del antagonismo existente entre GR y JNK en varios tipos celulares, no detectamos cambios en los niveles de expresión totales y de las formas fosforiladas de JNK y c-Jun (datos no mostrados). Este resultado coincide con el obtenido en los ratones GR^{null/null} y sugiere que la señalización mediada por JNK durante el desarrollo epidérmico embrionario no se ve afectada por la ausencia de GR.

AKT es una quinasa que regula la supervivencia y diferenciación celular en queratinocitos. De hecho, los ratones deficientes en las isoformas *Akt1* y *Akt2* presentan una falta del estrato córneo de la epidermis y mueren perinatalmente por defectos en la barrera (Peng *et al.*, 2003). Durante el proceso de adquisición de la barrera es necesario un pulso transitorio de actividad de AKT, ya que su inhibición impide la formación de la barrera (O'Shaughnessy *et al.*, 2009). En nuestro análisis encontramos un incremento de 2 veces de la actividad de AKT

en la epidermis de los ratones GR^{EKO} (figura 25), que podría ser, al menos parcialmente, responsable de los defectos observados en la formación de la barrera en estos transgénicos. Además, otros modelos de ratón que presentan una mayor actividad de AKT, como el transgénico que sobre-expresa AKT en epidermis (Segrelles *et al.*, 2007) o el *knock-out* específico de PTEN en epidermis (Suzuki *et al.*, 2003), mostraron una piel hiperplásica con hiperqueratosis, similar a la de los ratones GR^{EKO}.

También detectamos una activación de más de 2 veces de STAT3 en la epidermis de los ratones GR^{EKO} (figura 25). STAT3 regula distintos procesos celulares, tales como proliferación, diferenciación y supervivencia, en función del tejido en el que se expresa. Los ratones deficientes en STAT3 en epidermis muestran una piel normal, lo que indica que STAT3 es prescindible durante el desarrollo de la piel (Sano *et al.*, 1999). Por el contrario, una sobre-activación de STAT3 en la epidermis conduce a alteraciones similares a la psoriasis (Sano *et al.*, 2005). De hecho, recientemente se ha descrito que el uso, tanto *in vitro* como *in vivo*, de un compuesto natural con propiedades anti-inflamatorias sobre queratinocitos humanos y de ratón, impide la activación y translocación nuclear de STAT3, reduciendo la inflamación e hiperplasia características de la psoriasis (Andrés *et al.*, 2013). GR puede actuar con las proteínas STAT para activar o reprimir la expresión génica de manera conjunta (Langlais *et al.*, 2012). En nuestro caso, GR regula negativamente la fosforilación, y por tanto actividad de STAT3, cuya expresión aumenta en lesiones de pacientes con psoriasis, siendo esta activación necesaria para el desarrollo de la enfermedad (Sano *et*

al., 2008). Este dato es importante ya que los GCs se usan para tratar pacientes con psoriasis.

Por otra parte, también detectamos un incremento en la expresión de *Stat3* en el análisis de *microarrays* y posterior validación realizado en la epidermis de los ratones GR^{EKO} y controles (figura 21). A pesar de que la inducción no es muy elevada (1.3 veces), pudimos validarla y confirmarla por qRT-PCR (inducción de 3 veces) (figura 22). La sobre-expresión y activación de STAT3 va acompañada de un aumento en la expresión de S100A9 (figura 25) (ver apartado 1.4 de la discusión), ambos marcadores de psoriasis. Trabajos anteriores han descrito que STAT3 puede controlar la expresión de S100A8 y S100A9 durante procesos inflamatorios (Kerkhoff *et al.*, 2012). Así pues, la ausencia de GR durante el desarrollo de la epidermis de los ratones GR^{EKO} tiene como consecuencia la sobre-expresión y activación de STAT3, lo que podría contribuir al desarrollo de enfermedades cutáneas como la psoriasis.

1.4 Análisis del perfil transcriptómico de los ratones GR^{EKO}

En trabajos anteriores del grupo, el análisis del perfil de expresión génica de los ratones GR^{null/null} nos permitió identificar nuevos genes regulados por GR. Sin embargo, este análisis no permitía discriminar la función específica de GR en queratinocitos ya que las muestras utilizadas eran de piel completa (Sevilla *et al.*, 2010).

El análisis del perfil transcriptómico de la epidermis de los ratones control y GR^{EKO} recién nacidos nos permitió conocer qué genes

se expresaban de manera diferencial como consecuencia de la pérdida específica de GR en la epidermis. Aplicando algunas restricciones (FDR = 0.06 e inducción o represión de la transcripción de 1.5 veces) obtuvimos 293 genes expresados diferencialmente, que se agruparon según su función biológica, siendo el grupo más relevante el que contenía genes implicados en el proceso de diferenciación de los queratinocitos (figura 20). De estos genes, encontramos que un 59% se inducía mientras que el 41% se reprimía. A pesar de esta pequeña diferencia, no podemos concluir si GR posee fundamentalmente un papel represor o activador en la biología cutánea.

Nuestros datos indican que GR juega un papel importante en la regulación de los genes *Krt77* y *Elf5*, dado que éstos estaban sobre-expresados tanto en la epidermis de ratones GR^{EKO} como en la piel de ratones GR^{null/null}. La *Krt77* es una queratina embrionaria que se expresa en las capas suprabasales de la epidermis en desarrollo (Bazzi *et al.*, 2007). *Elf5* codifica para un factor de transcripción que se expresa en distintos epitelios, como el pulmonar, las glándulas mamarias y la piel (Metzger *et al.*, 2007). Aunque su función en la piel no está clara, se sabe que se expresa en queratinocitos en diferenciación (Oettgen *et al.*, 1999). Ambos son genes de diferenciación temprana, y su pico de expresión se da durante las primeras etapas del desarrollo embrionario, aproximadamente a día E15.5 (Tummala y Sinha, 2006; Bazzi *et al.*, 2007). Por tanto, la deregulación de *Krt77* y *Elf5* indica alteraciones en el patrón de maduración epidérmica de ambos modelos transgénicos. Cabe mencionar que los cambios en los niveles de expresión de *Krt77* y *Elf5* son menores en ratones GR^{EKO} que en ratones GR^{null/null} (tasa de cambio *Krt77*: 5.2 y 23.45, *Elf5*: 3.4 y 11.4, en GR^{EKO} y GR^{null/null}

respectivamente). Dicha diferencia en la expresión génica se corresponde con las diferencias fenotípicas observadas, es decir, la piel de los ratones GR^{null/null} es más inmadura que la de los ratones GR^{EKO}. Sin embargo, hay que considerar otras diferencias en las muestras utilizadas para el análisis del perfil transcriptómico de ambos modelos: las muestras de los ratones GR^{null/null} procedían de piel completa de embriones E18.5, mientras que las de los ratones GR^{EKO} se aislaron a partir de epidermis dorsal de P0.

Muchos de los genes identificados en el microarray pertenecen al complejo de diferenciación epidérmica EDC, localizado en el cromosoma 1q21 humano (cromosoma 3 en ratones) y compuesto por un grupo de genes que codifican proteínas esenciales para el proceso de diferenciación de los queratinocitos. Dichos genes se pueden agrupar en 3 familias: 1) proteínas precursoras de la envuelta córnea (involucrina, loricrina, SPRRs y LCEs), 2) proteínas de unión a calcio S100 y 3) proteínas de “genes fusionados” (filagrina y repetina) (Kyriiotou *et al.*, 2012).

Es interesante comentar el comportamiento del gen *Spr2d*, importante en la formación del estrato córneo. Trabajos anteriores del grupo han determinado que se trata de un gen que se induce durante el proceso de diferenciación de los queratinocitos, tanto *in vivo* como *in vitro*, tras el tratamiento de MPKs con Dex (Sevilla *et al.*, 2010). Además, de manera concomitante, su expresión se reprime en los ratones GR^{null/null} (tasa de cambio: 0.1) (Bayo *et al.*, 2008). Sin embargo, en los ratones GR^{EKO} encontramos una sobre-expresión de *Spr2d* (tasa de cambio: 3.1), que puede deberse a un mecanismo de compensación por parte de la epidermis de los ratones recién nacidos, que trataría de

reparar la mala formación del estrato córneo que hemos observado en la histología. Además, y como ya se ha comentado en los resultados, es importante destacar que la expresión de los genes *Lces* solo se induce en la epidermis en condiciones de estrés (de Cid *et al.*, 2009).

Es también destacable la sobre-expresión de los genes *S100a8* y *S100a9* (tasa de cambio: 2.1 y 3.6, respectivamente). Aunque su función no se conoce con detalle, se ha visto su expresión en la piel en condiciones de estrés. De hecho, estos dos genes aparecen sobre-expresados en lesiones cutáneas de pacientes con psoriasis (Kerkhoff *et al.*, 2012). Además, en modelos murinos de psoriasis también se ha observado la sobre-expresión de *S100a8* y *S100a9* (Zenz *et al.*, 2005).

Por otra parte, encontramos la sobre-expresión de genes involucrados en la respuesta inmune de la piel, como *Bcl3*, *Ereg*, *Il33* y *Tslp* (tasa de cambio: 3.3, 2.9, 2.6 y 2.6, respectivamente). De hecho, un alto porcentaje de los genes sobre-expresados en la piel de los ratones GR^{EKO} se consideran marcadores de enfermedades inflamatorias de la piel (Roberson y Bowcock, 2010), además de aparecer sobre-expresados en la piel de pacientes con AD (Cork *et al.*, 2009). *Tslp* es un gen importante para el desarrollo de la AD; su sobre-expresión en queratinocitos es suficiente para desencadenar una respuesta similar a la AD en la piel de ratones (Li *et al.*, 2005). Además, la sobre-expresión de *Tslp* en la epidermis de los GR^{EKO} correlaciona con la represión por GCs y la presencia de un sitio negativo IRnGRE en la región promotora del mismo gen (Surjit *et al.*, 2011).

La sobre-expresión de *Bcl3*, *Il33* y *Tslp* en la epidermis de los ratones GR^{EKO}, tiene como consecuencia la presencia de un infiltrado de

macrófagos y áreas con degranulación de mastocitos en la dermis (figura 23 y datos no mostrados), incluso a día E18.5, lo que indica que esta respuesta inmune tiene lugar independientemente de la exposición de los ratones al medio terrestre. Estos datos sugieren que la falta de GR en queratinocitos repercute en otros tipos celulares, entre los que se encuentran las células inmunes.

A pesar de que los ratones GR^{null/null} mostraron un fenotipo epidérmico más severo que los ratones GR^{EKO}, los *knock-out* completos no mostraron, como cabría esperar, más inflamación que los transgénicos condicionales. Estas diferencias pueden deberse a que el análisis realizado en los ratones GR^{null/null} fue a día E18.5 en lugar de a P0 (ya que mueren perinatalmente). El hecho de que no tengamos muestras de este estadio, nos impide valorar la existencia de un posible fenotipo inflamatorio en ratones GR^{null/null}. Al comparar el análisis realizado en ambos modelos de ratones transgénicos (GR^{EKO} y GR^{null/null}), observamos que no se detectaron cambios en los niveles de expresión de estos genes de respuesta inmune en los ratones GR^{null/null} (Sevilla *et al.*, 2010), lo cual coincide con la falta de infiltrado inmune observado en el análisis histológico de estos mismos ratones (Bayo *et al.*, 2008).

Por último, también encontramos la inducción de genes relacionados con el mantenimiento del estrato córneo y con el transporte y metabolismo lipídico. En el primer grupo encontramos proteasas e inhibidores de proteasas tales como la metalopeptidasa de matriz *Mmp3*, calicreinas (*Klks*) y el inhibidor de peptidasa *Sipi*. En el segundo grupo encontramos la lipasa endotelial *Lipg*, las proteínas de unión a ATP *Abcg1* y *Abca12*, la lipoxigenasa *Alox12* y la fosfolipasa *Pla2g4e*.

Los genes *Abcg1* y *Abca12*, se expresan en queratinocitos en diferenciación y codifican para proteínas transportadoras de colesterol y lípidos (respectivamente), siendo importantes en la función de barrera (Jiang *et al.*, 2010; Akiyama, 2011). *Alox12*, que también se expresa en queratinocitos en diferenciación, se induce por $\Delta Np63\alpha$ (Kim *et al.*, 2009). Aunque en este trabajo no hemos evaluado la expresión de p63, trabajos anteriores del grupo han demostrado un antagonismo entre GR y p63 (Cascallana *et al.*, 2005; Sanchis *et al.*, 2010).

La alteración de estos dos grupos de genes en la epidermis de los ratones GR^{EKO} conduce a la fragilidad del estrato córneo y la alteración en la composición lipídica observadas (figura 15). Cambios en la actividad de enzimas que producen y procesan los lípidos que forman parte del SC y que confieren la función de barrera epidérmica, son causantes de enfermedades cutáneas como la AD (Levin *et al.*, 2013).

2. Los defectos en la función de barrera condicionan el desarrollo de enfermedades cutáneas: los ratones GR^{EKO} como modelo de AD y psoriasis

La AD es una enfermedad inflamatoria y congénita de la piel, que se manifiesta localmente con inflamación y descamación. Una de las causas más comunes de la AD es la presencia de una barrera epidérmica defectiva que permite la entrada de patógenos, desencadenando una respuesta inmune (Cork *et al.*, 2009)

El SC de la epidermis es el principal componente de la barrera. Una de las evidencias más fuertes que respalda la hipótesis de una

barrera defectiva como causa de la AD, es la presencia de mutaciones de pérdida de función en el gen de la filagrina humana (*FLG*) en pacientes con AD. De hecho, hasta un 60% de pacientes europeos con AD presenta mutaciones en uno o los dos alelos de la *FLG* (Elias y Wakefield, 2011).

Los ratones *flaky tail* (*ft/ft*) constituyen un buen modelo para el estudio de la pérdida de filagrina. Estos ratones han sufrido una mutación espontánea en el gen de la filagrina que resulta en un fenotipo similar al que presentan los pacientes de Ichthyosis Vulgaris (IV) (OMIM: 146700) (piel seca y escamosa con hiperqueratosis), lo que predispone a desarrollar AD (Presland *et al.*, 2000). En otros estudios se han generado y caracterizado los ratones *knock-out* para el gen de la filagrina. Estos ratones muestran el mismo fenotipo que los anteriores y que los pacientes con IV, es decir, piel seca y escamosa con queratosis anormal (Kawasaki *et al.*, 2012). En ambos modelos, el fenotipo desaparece con la edad. Cuando los ratones alcanzan los 15-21 días de edad son indistinguibles de los controles, únicamente en la cola (que no está cubierta por pelo) se aprecian regiones que siguen mostrando una piel más seca y escamosa.

Una forma más severa de ictiosis es el denominado síndrome de Netherton (NS) (OMIM: 256500). La piel de los pacientes es hiperplásica y presenta paraqueratosis e hiperqueratosis. El NS está causado por mutaciones en el gen *SPINK5*, que codifica para el inhibidor de serina-proteasas LEKTI. La deficiencia en la expresión de este inhibidor provoca el incremento en la expresión de las peptidasas *KLK5* y *KLK7*, que se encargan de degradar componentes del SC (Hachem *et al.*, 2006). Los ratones *Spink*^{-/-}, que mueren a las pocas horas después de

nacer, muestran los mismos defectos en la barrera y la rotura del SC que los pacientes de NS (Descargues *et al.*, 2005). Estudios más recientes han identificado una nueva proteasa (ELA2) que se expresa en las capas suprabasales de la epidermis (tanto de humanos como de ratón) y que se encarga de degradar la pro-filagrina. La sobre-expresión del gen *Ela2a* en el SG de la epidermis de ratón da lugar a una barrera defectiva que causa un fenotipo de NS (Bonnart *et al.*, 2010). Los ratones GR^{EKO} presentan similitudes histológicas con estos modelos de NS. Sin embargo, el análisis transcripcional no mostró alteraciones en el perfil transcriptómico de ninguno de los genes mencionados, por lo que no podemos considerar los ratones GR^{EKO} como modelo de ictiosis tales como el NS.

El análisis por WB de la epidermis de los recién nacidos, reveló una menor expresión de la caspasa 14 en su forma activa en los ratones GR^{EKO}, concomitante con una menor expresión de filagrina, tanto en su forma precursora como procesada (figura 17), lo que conduce a la ya descrita fragilidad del estrato córneo. La caspasa 14 es una caspasa no apoptótica que se expresa en la epidermis en diferenciación, durante el proceso de cornificación y formación de barrera (Denecker *et al.*, 2008). Los ratones deficientes en caspasa 14 muestran un procesamiento alterado de la pro-filagrina, acumulando gránulos queratohialinos en el estrato granular, además de una mayor sensibilidad a la radiación UV (Denecker *et al.*, 2007).

Aunque el fenotipo observado en los ratones GR^{EKO} no es tan severo como el que presentan estos dos modelos de AD, sí que encontramos similitudes. El procesamiento anómalo de la filagrina y su baja expresión en la epidermis de los ratones GR^{EKO}, pueden ser la

causa de la fragilidad del estrato córneo observada (junto con los cambios en la composición lipídica, figura 15). Estas características, además de los cambios en el perfil transcriptómico (ver apartado 1.4 de la discusión), nos hacen pensar que los ratones GR^{EKO} constituyen un buen modelo para el estudio de enfermedades cutáneas como la AD y la psoriasis.

Es importante recordar que el fenotipo de los ratones GR^{EKO} desaparece aproximadamente a los 5 días de edad, de la misma manera que la AD remite en los niños, lo cual podría deberse al mecanismo de compensación explicado anteriormente (ver apartado 1.1 de la discusión).

3. Papel de GR en piel durante la edad adulta

Los ratones GR^{EKO} eran viables y fértiles y alcanzaban la edad adulta mostrando un fenotipo cutáneo leve. El análisis histopatológico de la piel de los ratones GR^{EKO} no mostró alteraciones en el patrón de expresión de las queratinas K5, K6 y K10 (figura 26). Sin embargo, observamos una expresión parcheada de los marcadores de diferenciación filagrina y loricrina, y un aumento en la proliferación de los queratinocitos basales (figura 27), de la misma manera que ocurría en los ratones GR^{EKO} P0. Además, el análisis de los corneocitos no mostró diferencias entre los genotipos, obteniendo la misma proporción de corneocitos frágiles y rígidos (datos no mostrados). Con estos datos podemos decir que la función de barrera permanece intacta en los ratones GR^{EKO} adultos.

Los GCs ejercen distintos efectos en la piel, según el momento del desarrollo en que se apliquen. Durante la gestación, los GCs aceleran el desarrollo de la epidermis, mientras que en la edad adulta causan hipoplasia epidérmica. Nuestros datos obtenidos en los ratones GR^{EKO} junto con la información conocida acerca de los efectos de los GCs, sugieren distintos papeles para GR durante el desarrollo embrionario y la edad adulta. En las primeras etapas del desarrollo GR es esencial para un correcto desarrollo de la epidermis y la adquisición de la función de barrera. Por el contrario, durante la edad adulta, GR es prescindible para el mantenimiento de la homeostasis de la epidermis, si bien es necesario para una correcta respuesta inflamatoria (ver apartado 3.1 de la discusión). En este sentido, es importante señalar que los ratones GR^{EKO} adultos no respondieron al tratamiento tópico con Dex, mientras que los ratones control mostraron una clara hipoplasia epidérmica y una menor tasa de proliferación de queratinocitos basales (figuras 27 y 28), lo que demuestra que los efectos anti-proliferativos de los GCs requieren GR funcional en la epidermis.

Las distintas funciones de GR pueden deberse a su interacción con distintos factores de transcripción según el proceso que regula. Así pues, como ya hemos propuesto en el apartado 1.1 de la discusión, GR y KLF4 pueden actuar conjuntamente durante el desarrollo embrionario. Durante la etapa adulta, como se ha comentado en la introducción, GR interacciona y antagoniza con las vías de NF- κ B y AP-1 para ejercer efectos anti-inflamatorios.

3.1 Papel de GR durante la respuesta inflamatoria

Los GCs son ampliamente utilizados para el tratamiento de enfermedades cutáneas por sus efectos anti-inflamatorios. Clásicamente, se ha relacionado el mecanismo de TR de GR con los efectos anti-inflamatorios de los GCs. Sin embargo, hoy en día sabemos que en dichos efectos también participa el mecanismo de TA, mediante el cual se inducen genes anti-inflamatorios como *Mkp-1* e *Ikba* (Pérez, 2011; Newton, 2013). Conocer más a fondo los mecanismos por los cuales GR ejerce sus efectos anti-inflamatorios (y sus efectos secundarios asociados) nos permitiría desarrollar terapias más adecuadas.

Estudios anteriores del grupo han demostrado que los ratones K5-GR, que sobre-expresan GR en la epidermis, son menos susceptibles a un tratamiento agudo con el agente pro-proliferativo y pro-inflamatorio PMA, mostrando una respuesta inflamatoria reducida en relación a los controles (Pérez *et al.*, 2001). Consistentemente, los ratones GR^{EKO} mostraron una respuesta inflamatoria exagerada, en comparación a los controles, frente al tratamiento tópico con PMA y el detergente SDS, que imita una dermatitis de contacto. En ambos casos se observó una mayor hiperplasia, hiperqueratosis e infiltrado inmune en la piel de los ratones GR^{EKO}, incluyendo regiones con destrucción epitelial (figura 28).

Por otra parte, ambos tratamientos indujeron una mayor expresión de K6 (coincidente con la hiperplasia) y p-ERK (figura 29), así como una mayor translocación nuclear de STAT3 (figura 30). Los ratones GR^{EKO} adultos ya mostraban una expresión ectópica de p-ERK

en su estado basal, así como una mayor actividad de STAT3 (figura 30), tal y como sucedía en el momento del nacimiento. La mayor actividad de estas dos proteínas puede ser causante, al menos en parte, de la respuesta anti-inflamatoria deficiente que presentan los ratones GR^{EKO}.

En este contexto inflamatorio, el estudio de ChIP-seq llevado a cabo en MPKs nos ha permitido identificar nuevas regiones reguladoras génicas a las cuales se une GR en queratinocitos. Mediante esta técnica identificamos 119 genes regulados por GR tras tratar las células con Dex durante 2 h, de los cuales podemos destacar los que participan en procesos inflamatorios (*Gilz* y *Zfp36*) y cáncer (*Axin2*, *Hipk2*, *Ror1* y *Zbtb16*). Tras el tratamiento con GCs exógenos, GR se une de manera directa a las secuencias reguladoras de *Gilz* y *Zfp36* para inducir su expresión (figura 43 y 44). *Gilz* es una diana clásica de GCs en muchos tipos celulares (Wang *et al.*, 2004). Trabajos anteriores han descrito, por una parte, la unión de dímeros GR a las secuencias GRE en la región promotora de *Gilz* en células epiteliales de pulmón (So *et al.*, 2007) y, por otra, su inducción por GCs en queratinocitos humanos (Onda *et al.*, 2006; Stojadinovic *et al.*, 2007). Sin embargo, nuestros datos ponen de manifiesto por primera vez la unión directa de GR al promotor de *Gilz* en queratinocitos, que resulta en su inducción transcripcional. GILZ ejerce sus efectos anti-inflamatorios en otros tipos celulares a través de su unión con la subunidad p65 de NF- κ B inhibiendo su translocación nuclear y la unión al DNA. Además, GILZ interacciona con RAS y RAF, inhibiendo la vía de ERK y AKT, e impidiendo en última instancia la unión de AP-1 al DNA y la transcripción de genes pro-inflamatorios (Ayroldi y Riccardi, 2009). Por su parte, *Zfp36* se induce por GCs y codifica para una proteína de unión a RNA que promueve la

degradación, o impide la traducción, de mRNAs de genes pro-inflamatorios, como por ejemplo *Tnf- α* (Smoak y Cidlowski, 2006).

A pesar de que GR es prescindible para el mantenimiento y la homeostasis de la piel durante la edad adulta, es necesario para llevar a cabo una respuesta anti-inflamatoria correcta. La ausencia del receptor en los ratones GR^{EKO} resulta en una mayor susceptibilidad frente a los estímulos nocivos del medio.

3.2 GR en la carcinogénesis de la piel

Los GCs se usan frecuentemente como co-adyuvantes en tratamientos anti-cancerígenos, especialmente en leucemia, por sus propiedades anti-inflamatorias, anti-proliferativas y pro-apoptóticas sobre los linfocitos (Tissing *et al.*, 2003; Gross y Cidlowski, 2008).

Para evaluar la susceptibilidad de los ratones GR^{EKO} a la formación de tumores, realizamos dos protocolos que implicaban la aplicación tópica de distintas dosis del agente iniciador DMBA y del promotor tumoral PMA.

El primer protocolo, con una baja dosis de DMBA y alta de PMA, indujo la formación de papilomas, mientras que el segundo, con una alta dosis de DMBA y baja de PMA, indujo la formación de tumores sebáceos y focos melanocíticos. Con ambos protocolos, los ratones GR^{EKO} mostraron una cinética más temprana de aparición de tumores, que además eran más grandes y abundantes comparados con los controles.

Todos los papilomas generados estaban bien diferenciados, mostrando una delimitación clara entre la dermis y la epidermis. Sin embargo, algunos papilomas generados en los ratones GR^{EKO} mostraban una menor diferenciación (incluyendo la pérdida de los marcadores K10, loricrina y E-Cadherina), un límite estroma-epidermis más difuso, presencia de queratinocitos en la dermis y la expresión de K13, marcador de malignización de tumores epidérmicos (figura 34). Además, comparados con los papilomas control, los queratinocitos de los papilomas GR^{EKO} mostraban un incremento de la tasa de proliferación, con una mayor tasa de incorporación de BrdU *in vivo* y mayor expresión del gen *Ccnd1*. Estos datos coinciden con el papel anti-proliferativo de GR y la presencia de un sitio de regulación negativa IRnGRE en la región promotora del gen *Ccnd1* (Surjit *et al.*, 2011). Los papilomas GR^{EKO}, de manera consistente con el papel anti-inflamatorio de GR, también mostraron un mayor infiltrado inmune intra-epidérmico así como una mayor expresión de genes que codifican para citoquinas pro-inflamatorias (figura 36). Estos datos demuestran que la falta de GR tiene como consecuencia un incremento en la proliferación y la inflamación, lo que contribuye al desarrollo y la formación de tumores.

Por otra parte, los papilomas generados en los ratones GR^{EKO} presentaban una mayor actividad de las vías de señalización de AKT, ERK y STAT3 (figura 37). Estudios anteriores han puesto de manifiesto la importancia de estas proteínas en los procesos tumorales. La importancia de STAT3 en la carcinogénesis queda reflejada en los ratones deficientes en dicha proteína, los cuales son resistentes a la formación de tumores inducidos por DMBA/PMA en la piel. Este trabajo demostró que la actividad de STAT3 es importante durante la iniciación

y promoción tumoral (Kataoka *et al.*, 2008). Además, en humanos, STAT3 está constitutivamente activa en distintos tipos de cáncer, mientras que los ratones deficientes en STAT3 en epidermis no desarrollan tumores (Chan *et al.*, 2004a y 2004b). A pesar de que en algunos tejidos la activación de ERK ejerce efectos anti-tumorales (pro-apoptóticos), los ratones deficientes en ERK1 muestran una menor proliferación de los queratinocitos basales y son menos susceptibles a desarrollar papilomas tras el tratamiento con DMBA/PMA (Bourcier *et al.*, 2006). Otros estudios mostraron que la señalización mediada por AKT es importante durante la primera fase de la carcinogénesis, mientras que ERK se requiere en una etapa más tardía (Segrelles *et al.*, 2002). Además, trabajos anteriores del grupo demostraron la importancia de GR en la carcinogénesis de piel y su antagonismo con AKT. Los ratones K5-GR son más resistentes a la formación y desarrollo de papilomas inducidos por el oncogén *Hras* y por AKT (Budunova *et al.*, 2003; Leis *et al.*, 2004). Así pues, la falta de GR induce la formación de tumores y una mayor malignización de éstos, debido, al menos en parte, a un incremento en la actividad de AKT y STAT3.

El segundo protocolo, con una alta dosis de iniciador y baja de promotor tumoral, indujo la formación de tumores sebáceos y focos melanocíticos (también denominados nevi) en los ratones de ambos genotipos. De nuevo, los ratones GR^{EKO} presentaron una cinética de aparición de tumores y nevi más temprana, así como un mayor número de ambos, siendo más acentuado en el caso de los nevi (figuras 38 y 40). La histología de los tumores sebáceos de los ratones GR^{EKO} era indistinguible de la de los controles. En ambos casos se apreció una disminución equivalente en la expresión de β -Catenina y p-c-Jun con

respecto a la epidermis (figura 39), lo que favorece la formación de tumores sebáceos frente a los papilomas (Gerdes *et al.*, 2006; Niemann *et al.*, 2007).

Los focos melanocíticos en los ratones GR^{EKO} invadieron la dermis profunda (figura 40). En este punto es importante recordar que las células de la dermis (incluyendo los melanocitos) siguen expresando GR, lo que indica que GR en los queratinocitos ejerce un papel regulador sobre otros tipos celulares en la piel. En esta regulación podrían intervenir otros receptores hormonales como el receptor α de retinoides X (RXR α) y el receptor de vitamina D (VDR). De manera similar a lo ocurrido en ratones GR^{EKO}, en un protocolo de carcinogénesis química en dos pasos, en los ratones deficientes en RXR α en epidermis y en los ratones *knock-out* para VDR, se observó una mayor formación de nevi con respecto a los controles, aunque no en los ratones deficientes en VDR en epidermis (Indra *et al.*, 2007). Estos datos apuntan a una señalización paracrina en la que los queratinocitos producen factores solubles, como ET-1, FGF2, SCF y POMC, que controlan el crecimiento de los melanocitos (Wang *et al.*, 2011).

Estudios epidemiológicos apuntan a que el tratamiento continuado con GCs incrementa el riesgo de desarrollar un cáncer de piel, debido a sus efectos inmunosupresores (Karagas *et al.*, 2001; Sørensen *et al.*, 2004; Jensen *et al.*, 2009). Sin embargo, el mayor riesgo de desarrollar cáncer podría deberse al tratamiento con inmunosupresores de enfermedades crónicas inflamatorias, y no a los GCs. Por el contrario, nuestros datos obtenidos en ratones GR^{EKO}, apuntan a un papel de GR como represor tumoral en el cáncer de piel.

3.2.1. La deficiencia de GR en queratinocitos en cultivo desencadena un fenotipo parcial de transición epitelio mesénquima

El estudio de la carcinogénesis de piel reveló que los papilomas obtenidos en ratones GR^{EKO} mostraban signos de invasión y conversión, lo que hacía sospechar de un posible fenotipo de EMT. El posterior análisis *in vitro* de las líneas celulares de queratinocitos establecidas confirmaron estas características de los queratinocitos GR^{EKO}.

Durante el proceso de EMT, los queratinocitos pierden sus características y reorganizan su citoesqueleto para adoptar un fenotipo de célula mesenquimal (Acloque *et al.*, 2009). En un primer lugar observamos que los queratinocitos GR^{EKO} presentaban forma de huso, característica de las células mesenquimales (figura 41a). Además, mostraron una disminución en la expresión del marcador epitelial E-Cadherina y un incremento en la expresión del marcador mesenquimal SMA (figura 42) y de SNAIL, características típicas de EMT. Sorprendentemente, no encontramos cambios estadísticamente significativos en la expresión de SLUG (miembro de la familia de proteínas SNAIL), aunque podría deberse a que SNAIL y SLUG activan programas distintos de EMT (Moreno-Bueno *et al.*, 2006).

Los ratones transgénicos que sobre-expresan SNAIL en la epidermis presentan una epidermis hiperplásica con unos queratinocitos basales que adquieren forma de huso (Du *et al.*, 2010). También muestran una mayor actividad de AKT y STAT3 y una menor expresión de E-Cadherina. A pesar de ésto, no pierden la expresión de las queratinas ni expresan marcadores mesenquimales y es necesario un

proceso inflamatorio para desencadenar el proceso de EMT (Du *et al.*, 2010). Como ya hemos visto, los papilomas de los ratones GR^{EKO} presentan una mayor actividad de AKT y STAT3, una menor expresión de E-Cadherina y una mayor expresión de citoquinas pro-inflamatorias, lo que constituye el contexto idóneo para que se desarrolle el proceso de EMT. Así pues, nuestros datos *in vitro* son consistentes con los datos obtenidos *in vivo*, que muestran que la pérdida de GR incrementa la capacidad para malignizar de los tumores.

Además, estudios recientes en varios tipos celulares han demostrado que los GCs regulan negativamente el proceso de EMT (Godoy *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010; Ferrand *et al.*, 2012). Nuestros datos, que muestran una represión de la E-Cadherina y un incremento de SNAIL como consecuencia de la pérdida de GR en queratinocitos, son consistentes con el bloqueo de la unión de SNAIL al promotor de la E-Cadherina observado en células epiteliales de pulmón tras el tratamiento con GCs (Zhang *et al.*, 2010).

En un intento de revertir el fenotipo EMT observado en la línea GR^{EKO}, infectamos esta línea celular con GR α clonado en un vector retroviral (datos no mostrados). Tras la infección, el análisis por WB mostró unos niveles de expresión de GR muy bajos en la línea celular GR^{EKO} infectada. Como consecuencia de esta baja expresión de GR, tampoco observamos cambios en los niveles de expresión de SNAIL y E-Cadherina con respecto a las células infectadas con el vector vacío (no mostrado). Así pues, con estas condiciones únicamente podemos especular que se requieren unos niveles mínimos (umbral) de GR para revertir el fenotipo EMT de la línea GR^{EKO}. También es formalmente posible que la línea celular posea mutaciones que contribuyan al

fenotipo EMT (generadas durante el proceso de establecimiento de la línea) y/o que dicho fenotipo se deba a alteraciones en la expresión/actividad de otras proteínas, de manera que la re-introducción de GR en queratinocitos GR^{EKO} no sea suficiente para revertir el fenotipo descrito.

Conclusiones

1. La generación y análisis de ratones con inactivación selectiva del receptor de glucocorticoides (GR) en epidermis (GR^{EKO}) demostró que GR es necesario para un correcto desarrollo y maduración de la epidermis, así como para la adquisición de la función de barrera cutánea durante el desarrollo embrionario.
2. El análisis del perfil transcriptómico de la epidermis de ratones GR^{EKO} recién nacidos mostró numerosas alteraciones en la expresión de genes implicados en el proceso de diferenciación de los queratinocitos así como de respuesta inmune.
3. Los defectos en la función de barrera epidérmica de los ratones GR^{EKO} junto con los cambios en su perfil transcriptómico hacen de estos ratones un modelo de estudio de patologías cutáneas como la dermatitis atópica y psoriasis.
4. La pérdida de GR en epidermis induce la activación constitutiva de la actividad de ERK, AKT y STAT3 en los ratones recién nacidos, lo que contribuye al incremento en la proliferación e inflamación cutáneas observado.
5. La pérdida de GR en los queratinocitos resulta en una mayor susceptibilidad de los ratones adultos GR^{EKO} a protocolos de estrés, que correlaciona con una mayor actividad de ERK y STAT3.
6. Los ratones GR^{EKO} son más susceptibles a la formación de tumores cutáneos (papilomas y sebáceos), así como focos melanocíticos. Los papilomas GR^{EKO} son más grandes y abundantes y presentan signos de malignización.
7. Los queratinocitos adultos en cultivo deficientes en GR muestran un fenotipo parcial de transición epitelio mesénquima (EMT). Dicho fenotipo, junto con la mayor susceptibilidad de los ratones

GR^{EKO} a un protocolo de carcinogénesis química de piel, pone de manifiesto un papel supresor de tumores para GR en este tejido.

8. El análisis de ChIP-seq realizado en queratinocitos en cultivo en ausencia y presencia del análogo de GCs dexametasona (Dex) ha identificado nuevas dianas transcripcionales de GR en este tipo celular relacionadas con procesos inflamatorios, como *Gilz* y *Zfp36*.

Anexos

Anexo I. Tabla que recoge los 293 genes con expresión diferencial entre la epidermis de ratones control y GR^{EKO} recién nacidos con un FDR < 0.06, considerando una inducción y represión de 1.5 veces. En rojo se muestran los genes inducidos, mientras que en verde se muestran los reprimidos.

Nombre del gen	p_valor	FDR	Tasa de cambio
Gm5416	4,31E-05	0,037325618	13,34564292
Krt6a	0,000299127	0,042082804	13,01036496
Sprr2j-ps	5,03E-05	0,037325618	8,98521684
Lce3a	0,000344594	0,042082804	8,441895236
Krt6b	0,003086992	0,050654509	8,0993519
Sprr2e	2,03E-05	0,037325618	7,384697689
Lce3f	0,000721495	0,042606656	6,662505053
Sprr2f	8,26E-05	0,037573932	6,589433635
Krt16	6,70E-05	0,03755081	5,885777747
Krt77	0,00055159	0,042082804	5,233708549
Rptn	0,000831573	0,042819253	5,152234299
AC129296.1	3,11E-05	0,037325618	5,102325785
Sprr2h	0,000193834	0,03766411	4,9732022
AC132274.1	5,38E-05	0,037325618	4,752140313
Ifi202b	0,001859374	0,046705985	4,743353986
Cxcr2	0,000537232	0,042082804	3,68437806
Dhrs9	4,43E-05	0,037325618	3,678616967
S100a9	0,000613809	0,042082804	3,602742629
Slpi	0,000946438	0,042819253	3,483025427
Akr1b8	0,000135205	0,037573932	3,466619211
Krt84	0,000581503	0,042082804	3,420127998
Elf5	8,61E-05	0,037573932	3,38902314
Psors1c2	0,000570735	0,042082804	3,351547656

Bcl3	0,001791173	0,046352971	3,28272474
2010109K11Rik	0,000859093	0,042819253	3,117229747
Sprr2d	5,50E-05	0,037325618	3,108090405
Thbs2	0,000564752	0,042082804	2,942713509
Ereg	0,000290752	0,042082804	2,921498062
Klk6	0,001297015	0,043944159	2,903078221
Gne	0,001030194	0,043263635	2,892792397
Pla2g4e	0,001142666	0,043944159	2,872444783
Mthfd2	0,000362542	0,042082804	2,845956809
Tubb6	0,000274	0,041992303	2,826657448
9930013L23Rik	0,000927294	0,042819253	2,79078778
Dnase1l3	0,000698761	0,042606656	2,753137179
Fgf1	0,000571931	0,042082804	2,713794741
Rab31	0,001664343	0,045508149	2,709930399
AC119952.1	0,000149564	0,037573932	2,687543125
Psca	0,000543215	0,042082804	2,633441403
Ccdc80	0,002711288	0,050189281	2,621327335
Sprr2i	0,000619791	0,042082804	2,596065791
Lce3c	0,000111275	0,037573932	2,592669182
Pglyrp3	0,000183066	0,03766411	2,589791629
Il33	0,001068482	0,043944159	2,574453911
Tnfrsf23	5,98E-05	0,037325618	2,572064719
Tslp	0,002040047	0,047307347	2,564841183
AC162792.1	0,001359234	0,044195748	2,534237236
Tnc	0,000902167	0,042819253	2,528995809
Ndrp1	0,00090815	0,042819253	2,52018805
BC117090	0,000459459	0,042082804	2,508185249
Slc7a11	0,002708895	0,050189281	2,506455784
Neu2	0,000961993	0,042819253	2,480961603
Capn2	0,000792089	0,042819253	2,43977582
Rhof	0,000513302	0,042082804	2,40487287
Gyk	0,000485782	0,042082804	2,393008153
Sprr1b	0,000680813	0,042606656	2,365894057
Gm5414	0,001565033	0,044785683	2,329703215
Tubb2a	0,000378097	0,042082804	2,312010872

Slc5a8	0,000710726	0,042606656	2,301217521
Gjb6	0,000392455	0,042082804	2,256796583
Slc26a9	0,000673634	0,042606656	2,239316944
Sprr1a	0,000116061	0,037573932	2,214378577
Sprr3	0,001122325	0,043944159	2,18969897
Abcg1	0,000580307	0,042082804	2,189138413
Klk12	0,002212344	0,04793117	2,14606144
Tpm2	0,002232685	0,04793117	2,145205461
Gjb2	0,000514499	0,042082804	2,131018021
Ccrn4l	0,001804335	0,046383237	2,115055921
Flnb	0,000210586	0,03766411	2,110936391
Tubb2b	9,09E-05	0,037573932	2,106014377
Cyp4f39	0,001593749	0,0449441	2,096412662
Cgref1	0,00032545	0,042082804	2,087996817
Ehf	0,002284135	0,048190397	2,070183064
Aqp3	0,000616202	0,042082804	2,049032701
Klk9	0,000319468	0,042082804	2,013418798
Pvr	0,001477688	0,044195748	2,009223706
Irak3	0,000251267	0,039907738	1,962214868
Nkain1	0,001572212	0,044808816	1,945416227
Tbc1d2	0,001084037	0,043944159	1,924164658
Slc5a1	0,001530334	0,044390851	1,923392111
Mast4	0,000948831	0,042819253	1,905842274
Pla2g4b	0,001383164	0,044195748	1,905304592
Klk10	0,000197424	0,03766411	1,898502934
Yars	0,000993102	0,043191573	1,873717804
Ephx3	0,000863879	0,042819253	1,869951522
Pp11r	0,000971565	0,042819253	1,851501306
Tjp2	0,000671241	0,042606656	1,843269995
Por	9,93E-05	0,037573932	1,83294995
Aars	0,000923705	0,042819253	1,829657225
2310033E01Rik	0,001842623	0,046705985	1,829005618
Capns1	0,000717905	0,042606656	1,825075425
Adam8	0,000238105	0,039409308	1,824375758
Pcsk6	0,001442989	0,044195748	1,822836206

Nol6	0,000542018	0,042082804	1,819441395
Kdelr3	0,000187852	0,03766411	1,819043769
Sema7a	0,001918003	0,046846344	1,817485749
Ripk3	0,000817215	0,042819253	1,81442222
Cxcl16	0,002443271	0,048687301	1,810604278
Rps6ka4	0,003047507	0,050654509	1,80684588
Grhl3	0,000750211	0,042819253	1,780655121
Slc35f2	0,001228814	0,043944159	1,773233357
Rrp12	0,000776534	0,042819253	1,765091897
Fam38a	0,003103743	0,050654509	1,74900416
Ddx21	0,002024493	0,047307347	1,741120603
Uck2	0,000691582	0,042606656	1,733417653
Itgb4	0,001423845	0,044195748	1,712746235
Siah2	0,000758586	0,042819253	1,71126791
Kif13b	0,002010134	0,047307347	1,71087337
Slc7a1	0,00138436	0,044195748	1,706093683
Shb	0,002120213	0,047573033	1,698716254
Plec1	0,002410965	0,048548746	1,697964645
Utp20	0,001669129	0,045508149	1,695196359
Tmem125	1,68E-05	0,037325618	1,67661728
Plekhb2	0,001259924	0,043944159	1,667060599
Pcdh1	0,001628448	0,045376241	1,663892
Eea1	0,000766962	0,042819253	1,663353581
Tuba8	0,001834248	0,046705985	1,662756417
Igfbp5	0,000628167	0,042082804	1,661989401
Ahnak2	0,002714878	0,050189689	1,659359725
Camk2d	0,000421171	0,042082804	1,654325928
Nomo1	0,000544411	0,042082804	1,650650138
Lypd3	0,000804054	0,042819253	1,645764232
Prdm1	0,00275197	0,050218453	1,64035153
Col18a1	0,00052766	0,042082804	1,635890731
Sprr2k	0,002363104	0,048392162	1,633148556
Asns	0,001501618	0,044195748	1,631061642
Prep	0,001401112	0,044195748	1,623522262
Uaca	0,002412161	0,048548746	1,62095846

Pprc1	0,003116905	0,050654509	1,619363833
Tdrd1	0,00297811	0,050654509	1,615453243
Fscn1	0,001836641	0,046705985	1,612122236
Pfkfb3	0,001337697	0,043985849	1,611772049
Rdh11	2,75E-05	0,037325618	1,604308981
Ifnk	0,001226421	0,043944159	1,601701534
Abhd6	0,000291948	0,042082804	1,60059442
Ddx39	0,000405616	0,042082804	1,593988045
Atp2c2	0,001457347	0,044195748	1,592559645
Ipo4	0,000521678	0,042082804	1,591105879
Heatr1	0,001419059	0,044195748	1,590852164
Kcnc4	0,000723888	0,042606656	1,590063897
Slc16a1	0,001407094	0,044195748	1,587236595
Plxna2	0,003171944	0,050881936	1,587082688
Nolc1	0,002765131	0,050218453	1,584953367
Ugcg	0,000415188	0,042082804	1,58338795
Igf2bp2	0,002020903	0,047307347	1,582682426
Cars	0,002043637	0,047307347	1,575191103
Ppif	0,001703828	0,045721965	1,574871496
Wdr36	0,001014639	0,043191573	1,571777152
Lrrc59	0,000220158	0,038238202	1,564393738
Aldh18a1	0,00148726	0,044195748	1,561590968
2310046K01Rik	0,000811233	0,042819253	1,560431976
Tmem43	0,000926098	0,042819253	1,556802383
Duox1	0,002840511	0,050393496	1,553787116
Polr1b	0,000632953	0,042082804	1,552848351
Ippk	0,000704744	0,042606656	1,550398266
Myo1e	0,001270692	0,043944159	1,532530732
Sbno2	0,002253026	0,04793117	1,531540978
Samd4b	0,002160895	0,047575302	1,529828925
Noc4l	0,001023015	0,043191573	1,516234649
Smox	0,000122044	0,037573932	1,514669765
Slc2a1	0,001726562	0,045825252	1,513224906
Adrm1	0,000490569	0,042082804	1,50339973
Abca12	0,000643722	0,042082804	1,503130132

Slc9a1	0,001005067	0,043191573	1,502721935
CT010439.1	0,00080884	0,042819253	0,708855227
Cbr4	0,000741835	0,042819253	0,708327961
Asnsd1	0,000592272	0,042082804	0,708231244
Ormdl1	0,001304194	0,043950919	0,707871883
Prkra	0,000737049	0,042819253	0,706487474
Manea	0,002397803	0,048491967	0,706417935
Polr3k	0,002698127	0,050189281	0,705890291
AC162797.1	0,003182713	0,050881936	0,704188838
AC121821.3	0,003189892	0,050919239	0,702629365
Cox7a2l	0,001961078	0,047161515	0,700146038
Ube2v2	0,001179757	0,043944159	0,699980992
Nol3	0,000641329	0,042082804	0,697614406
Rpl26	0,002236275	0,04793117	0,694359914
SNORD49	0,000963189	0,042819253	0,693925538
Gpm6a	0,001721776	0,045825252	0,690734072
Trim23	0,00043194	0,042082804	0,687400995
Kif18a	0,001243172	0,043944159	0,687223856
4833442J19Rik	0,002060388	0,047307347	0,686983889
Slc24a5	0,000224944	0,038593011	0,685363072
Krt35	0,002245847	0,04793117	0,683993055
Atp5e	0,001536317	0,044472692	0,682832167
A630033E08Rik	0,003078617	0,050654509	0,681887795
Slc25a30	0,000920115	0,042819253	0,681093909
Hist2h2ab	0,00237148	0,048491967	0,679760139
Rpa3	0,002025689	0,047307347	0,677372705
SNORA24	0,001238386	0,043944159	0,675843229
Sdhb	0,000857897	0,042819253	0,675533833
Prei4	0,002302083	0,048190397	0,674402244
Elmod2	0,000208192	0,03766411	0,673956923
2300005B03Rik	0,000938063	0,042819253	0,673610588
Cdkn3	0,001573409	0,044808816	0,673139373
Mcee	0,002723254	0,050218453	0,672983582
Ddt	0,000814822	0,042819253	0,672751585
3830406C13Rik	0,002432502	0,048634332	0,672662504

Zfp386	0,00277231	0,050218453	0,671686994
Sprr2a1	0,001945523	0,0471558	0,671285026
Zfp101	0,002291314	0,048190397	0,670511011
Sema4g	0,002669411	0,050189281	0,670328611
Slc46a3	0,000845932	0,042819253	0,669522366
Chchd1	0,002176449	0,047619671	0,668754314
Chpt1	0,001129504	0,043944159	0,668668707
Porcn	0,001403505	0,044195748	0,668231611
Ascl2	0,002846494	0,050393496	0,667645708
Npl	0,002202772	0,04793117	0,666481067
Ndufc1	0,000375704	0,042082804	0,666243446
Pcmdt1	0,001484867	0,044195748	0,666195441
1810030N24Rik	0,002701716	0,050189281	0,663468174
AC155307.1	0,001329321	0,043985849	0,661924557
9530008L14Rik	0,002460022	0,048882624	0,659835094
Dynlt3	0,002415751	0,048551532	0,659323488
Ndufa6	0,001024211	0,043191573	0,658177179
Eid1	0,001999366	0,047307347	0,657675624
Trappc2	0,003028363	0,050654509	0,657158968
Gsto1	0,000600647	0,042082804	0,656760631
Slc36a2	0,00017469	0,03766411	0,652216018
Cbs	0,002059191	0,047307347	0,651870045
Zfp825	0,002883586	0,050394941	0,651670697
AC131780.10	0,002725647	0,050218453	0,651487544
Decr2	0,00229969	0,048190397	0,651169873
Cyb5	0,001015836	0,043191573	0,648102645
Tpk1	0,000314682	0,042082804	0,647941337
Pts	0,00118215	0,043944159	0,644931879
Mt4	0,000941652	0,042819253	0,643502683
4933426I21Rik	0,002574886	0,049534848	0,643361229
Slc46a1	0,001524352	0,044390851	0,642567549
Ednrb	0,000719102	0,042606656	0,642208482
Ccdc53	0,001736134	0,045825252	0,641771805
Hoxc13	0,003092975	0,050654509	0,641169747
N28178	0,000575521	0,042082804	0,63634679

Mybl1	0,000331433	0,042082804	0,635020331
Defb1	0,001377181	0,044195748	0,634781053
Ccr9	0,000824394	0,042819253	0,633876444
Lrrcc1	0,001250351	0,043944159	0,633116547
AY172335.2	0,002538991	0,04945599	0,626892104
Fam33a	0,001845016	0,046705985	0,626801419
Cyb5r4	0,001448972	0,044195748	0,626711781
Dsg4	0,001527941	0,044390851	0,621574333
Dynlt1c	0,001635627	0,045386346	0,61744717
SNORD116	0,001155827	0,043944159	0,614706717
Dapl1	0,001176168	0,043944159	0,607326038
Pex13	0,002537795	0,04945599	0,606773326
Krt73	0,000148367	0,037573932	0,60566298
Ddx26b	0,002578476	0,049534848	0,592146345
2810408A11Rik	0,003114512	0,050654509	0,589039467
1110018J18Rik	0,001630841	0,045376241	0,588935569
SCARNA13	0,001456151	0,044195748	0,586622639
Plscr1	0,00017828	0,03766411	0,585269911
Ankrd23	0,000653294	0,04216002	0,583796876
2310038E17Rik	0,000204603	0,03766411	0,581158299
Insig2	0,000369721	0,042082804	0,578063869
Fam83d	0,000708333	0,042606656	0,573535767
Mospd1	0,000848325	0,042819253	0,569398966
Mgst2	0,003051097	0,050654509	0,56546917
Gng4	0,000144778	0,037573932	0,560279348
Krt28	0,0001029	0,037573932	0,55876931
Qpct	0,002209951	0,04793117	0,555068823
Gabrp	0,000793285	0,042819253	0,553037006
Paqr7	0,000494158	0,042082804	0,536188396
Pla2g5	5,14E-05	0,037325618	0,530397596
Otop3	0,000186655	0,03766411	0,510743505
Rnf125	0,002139357	0,047575302	0,508774579
Ror1	0,00082918	0,042819253	0,507510745
Nlrp10	0,000248874	0,039907738	0,496237973
Serpina3h	0,000783713	0,042819253	0,485339054

Fmo2	0,001328125	0,043985849	0,47832675
Bbox1	0,003213822	0,050935358	0,466046415
Nmu	0,001405898	0,044195748	0,46136606
Nr3c1	8,38E-06	0,037325618	0,437265857
1700055N04Rik	3,71E-05	0,037325618	0,430350456
Skint10	0,000893792	0,042819253	0,429271514
H2-Ea	0,002107052	0,047487688	0,401655684
Awat1	0,000838753	0,042819253	0,363040904
Ii22ra2	0,000862683	0,042819253	0,319308108
Ear5	0,000131616	0,037573932	0,279390605
Serpinb3c	0,000900971	0,042819253	0,250352711

Bibliografía

Abel EL, Angel JM, Kiguchi K, DiGiovanni J. (2009). Multi-stage chemical carcinogenesis in mouse skin: Fundamentals and applications. *Nat Protoc.* 4(9):1350–62.

Acloque H, Adams MS, Fishwick K, Bronner-Fraser M, Nieto MA. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest.* 119(6):1438–49.

Akiyama M. (2011). The roles of ABCA12 in keratinocyte differentiation and lipid barrier formation in the epidermis. *Dermatoendocrinol.* 3(2):107-12.

Andrés RM, Montesinos MC, Navalón P, Payá M, Terencio MC. (2013). NF- κ B and STAT3 inhibition as a therapeutic strategy in psoriasis: *in vitro* and *in vivo* effects of BTH. *J Invest Dermatol.* 133(10):2362-71.

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

Ayroldi E, Riccardi C. (2009). Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ): a new important mediator of glucocorticoid action. *FASEB J.* 23(11):3649-58.

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

Bartholome B, Spies CM, Gaber T, Schuchmann S, Berki T, Kunkel D, Bienert M, Radbruch A, Burmester GR, Lauster R, Scheffold A, Buttgereit F. (2004). Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after *in vitro* stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. *FASEB J.* 18(1):70–80.

Bayo P, Sanchis A, Bravo A, Cascallana JL, Buder K, Tuckermann J, Schütz G, Pérez P. (2008). Glucocorticoid receptor is required for skin barrier competence. *Endocrinology.* 149(3):1377–88.

Bazzi H, Fantauzzo KA, Richardson GD, Jahoda CAB, Christiano AM. (2007). Transcriptional profiling of developing mouse epidermis

reveals novel patterns of coordinated gene expression. *Dev Dyn.* 236(4):961–70.

Blanpain C, Fuchs E. (2009). Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10(3):207–17.

Bledsoe RK, Montana VG, Stanley TB, Delves CJ, Apolito CJ, McKee DD, Consler TG, Parks DJ, Stewart EL, Willson TM, Lambert MH, Moore JT, Pearce KH, Xu HE. (2002). Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition. *Cell.* 110(1):93–105.

Boehnke K, Falkowska-Hansen B, Stark H-J, Boukamp P. (2012). Stem cells of the human epidermis and their niche: composition and function in epidermal regeneration and carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 33(7):1247–58.

Bonnart C, Deraison C, Lacroix M, Uchida Y, Besson C, Robin A, Briot A, Gonthier M, Lamant L, Dubus P, Monsarrat B, Hovnanian A. (2010). Elastase 2 is expressed in human and mouse epidermis and impairs skin barrier function in Netherton syndrome through filaggrin and lipid misprocessing. *J Clin Invest.* 120(3):871–82.

Bosscher KD, Berghe WV, Haegeman G. (2003). The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor- κ B or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocrine Reviews.* 24(4):488–522.

Bosscher KD, Haegeman G. (2009). Minireview: Latest Perspectives on Antiinflammatory Actions of Glucocorticoids. *Molecular Endocrinology.* 23(3):281–91.

Boukamp P. (2005). Non-melanoma skin cancer: what drives tumor development and progression? *Carcinogenesis.* 26(10):1657–67.

Bourcier C, Jacquél A, Hess J, Peyrottes I, Angel P, Hofman P, Auberger P, Pouysségur J, Pagès G. (2006). p44 mitogen-activated protein kinase (extracellular signal-regulated kinase 1)-dependent signaling contributes to epithelial skin carcinogenesis. *Cancer Res.* 66(5):2700–7.

Budunova IV, Kowalczyk D, Pérez P, Yao YJ, Jorcano JL, Slaga TJ. (2003). Glucocorticoid receptor functions as a potent suppressor of mouse skin carcinogenesis. *Oncogene*. 22(21):3279–87.

Byrne C, Hardman M, Nield K. (2003). Covering the limb - formation of the integument. *J Anat*. 202(1):113–24.

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

Cagnol S, Chambard J-C. (2010). ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS J*. 277(1):2–21.

Cascallana JL, Bravo A, Donet E, Leis H, Lara MF, Paramio JM, Jorcano JL, Pérez P. (2005). Ectoderm-targeted overexpression of the glucocorticoid receptor induces hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Endocrinology*. 146(6):2629–38.

Chan KS, Carbajal S, Kiguchi K, Clifford J, Sano S, DiGiovanni J. (2004a). Epidermal growth factor receptor-mediated activation of Stat3 during multistage skin carcinogenesis. *Cancer Res*. 64(7):2382–9.

Chan KS, Sano S, Kiguchi K, Anders J, Komazawa N, Takeda J, DiGiovanni J. (2004b). Disruption of Stat3 reveals a critical role in both the initiation and the promotion stages of epithelial carcinogenesis. *J Clin Invest*. 114(5):720–8.

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

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

Clark AR, Lasa M. (2003). Crosstalk between glucocorticoids and mitogen-activated protein kinase signalling pathways. *Curr Opin Pharmacol*. 3(4):404–11.

Cole TJ, Blendy JA, Monaghan AP, Krieglstein K, Schmid W, Aguzzi A, Fantuzzi G, Hummler E, Unsicker K, Schütz G. (1995).

Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes Dev.* 9(13):1608–21.

Cork MJ, Danby SG, Vasilopoulos Y, Hadgraft J, Lane ME, Moustafa M, Guy RH, Macgowan AL, Tazi-Ahnini R, Ward SJ. (2009). Epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 129(8):1892–908.

Dacosta Byfield S, Chen D, Yim YM, Reyes C. (2013). Age distribution of patients with advanced non-melanoma skin cancer in the United States. *Arch Dermatol Res.* 305(9):845-50

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

de Cid R, Riveira-Munoz E, Zeeuwen PLJM, Robarge J, Liao W, Dannhauser EN, Giardina E, Stuart PE, Nair R, Helms C, Escaramis G, Ballana E, Martin-Ezquerria G, den Heijer M, Kamsteeg M, Joosten I, Eichler EE, Lazaro C, Pujol RM, Armengol L, Abecasis G, Elder JT, Novelli G, Armour JAL, Kwok P, Bowcock A, Schalkwijk J, Estivill X. (2009). Deletion of the late cornified envelope (LCE) 3B and 3C genes as a susceptibility factor for psoriasis. *Nat Genet.* 41(2):211–5.

Denecker G, Hoste E, Gilbert B, Hochepeid T, Ovaere P, Lippens S, Van den Broecke C, Van Damme P, D'Herde K, Hachem JP, Borgonie G, Presland RB, Schoojaans L, Libert C, Vandekerckhove J, Gevaert K, Vandabeele P, Declercq W. (2007). Caspase-14 protects against epidermal UVB photodamage and water loss. *Nat Cell Biol.* 9(6):666–74.

Denecker G, Ovaere P, Vandabeele P, Declercq W. (2008). Caspase-14 reveals its secrets. *J Cell Biol.* 180(3):451–8.

Descargues P, Deraison C, Bonnart C, Kreft M, Kishibe M, Ishida-Yamamoto A, Elias P, Barrandon Y, Zambruno G, Sonnenberg A, Hovnanian A. (2005). Spink5-deficient mice mimic Netherton syndrome through degradation of desmoglein 1 by epidermal protease hyperactivity. *Nat Genet.* 37(1):56–65.

Donet E, Bosch P, Sanchis A, Bayo P, Ramírez A, Cascallana JL, Bravo A, Pérez P. (2008). Transrepression function of the glucocorticoid receptor regulates eyelid development and keratinocyte

proliferation but is not sufficient to prevent skin chronic inflammation. *Mol Endocrinol.* 22(4):799–812.

Du F, Nakamura Y, Tan T-L, Lee P, Lee R, Yu B, Jamora C. (2010). Expression of snail in epidermal keratinocytes promotes cutaneous inflammation and hyperplasia conducive to tumor formation. *Cancer Res.* 70(24):10080–9.

Dumesic PA, Scholl FA, Barragan DI, Khavari PA. (2009). Erk1/2 MAP kinases are required for epidermal G2/M progression. *J Cell Biol.* 185(3):409–22.

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

Ferrand N, Stragier E, Redeuilh G, Sabbah M. (2012). Glucocorticoids induce CCN5/WISP-2 expression and attenuate invasion in oestrogen receptor-negative human breast cancer cells. *Biochem J.* 447(1):71–9.

Fowler SD, Greenspan P. (1985). Application of Nile red, a fluorescent hydrophobic probe, for the detection of neutral lipid deposits in tissue sections: comparison with oil red O. *J Histochem Cytochem.* 33(8):833–6.

Fuchs E, Horsley V. (2008). More than one way to skin... *Genes Dev.* 22(8):976–85.

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

Gallagher-Beckley AJ, Williams JG, Cidlowski JA. (2011). Ligand-independent phosphorylation of the glucocorticoid receptor integrates cellular stress pathways with nuclear receptor signaling. *Mol Cell Biol.* 31(23):4663–75.

Gazel A, Banno T, Walsh R, Blumenberg M. (2006). Inhibition of JNK promotes differentiation of epidermal keratinocytes. *J Biol Chem.* 281(29):20530–41.

Gerdes MJ, Myakishev M, Frost NA, Rishi V, Moitra J, Acharya A, Levy MR, Park S, Glick A, Yuspa SH, Vinson C. (2006). Activator

protein-1 activity regulates epithelial tumor cell identity. *Cancer Res.* 66(15):7578–88.

Gilmore TD. (2006). Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene.* 25(51):6680–4.

Godoy P, Lakkapamu S, Schug M, Bauer A, Stewart JD, Bedawi E, Hammad S, Amin J, Marchan R, Schormann W, Maccoux L, von Recklinghausen I, Reif R, Hengstler JG. (2010). Dexamethasone-dependent versus -independent markers of epithelial to mesenchymal transition in primary hepatocytes. *Biol Chem.* 391(1):73–83.

Goulding NJ. (2004). The molecular complexity of glucocorticoid actions in inflammation - a four-ring circus. *Curr Opin Pharmacol.* 4(6):629–36.

Grad I, Picard D. (2007). The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 275(1–2):2–12.

Gronemeyer H, Gustafsson J-Å, Laudet V. (2004). Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov.* 3(11):950–64.

Gross KL, Cidlowski JA. (2008). Tissue-specific glucocorticoid action: a family affair. *Trends Endocrinol Metab.* 19(9):331–9.

Hachem J-P, Wagberg F, Schmuth M, Crumrine D, Lissens W, Jayakumar A, Houben E, Mauro TM, Leonardsson G, Brattsand M, Egelrud T, Roseeuw D, Clayman GL, Feingold KR, Williams ML, Elias PM. (2006). Serine protease activity and residual LEKTI expression determine phenotype in Netherton syndrome. *J Invest Dermatol.* 126(7):1609–21.

Hardman MJ, Sisi P, Banbury DN, Byrne C. (1998). Patterned acquisition of skin barrier function during development. *Development.* 125(8):1541–52.

Hengge UR, Ruzicka T, Schwartz RA, Cork MJ. (2006). Adverse effects of topical glucocorticosteroids. *J Am Acad Dermatol.* 54(1):1–15; quiz 16–18.

Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M. (2004). AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci.* 117(25):5965–73.

Huang C, Jacobson K, Schaller MD. (2004). MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci.* 117(20):4619–28.

Indra AK, Castaneda E, Antal MC, Jiang M, Messaddeq N, Meng X, Loehr CV, Gariglio P, Kato S, Wahli W, Desvergne B, Metzger D, Chambon P. (2007). Malignant transformation of DMBA/TPA-induced papillomas and nevi in the skin of mice selectively lacking retinoid-X-receptor alpha in epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 127(5):1250–60.

Ito K, Yamamura S, Essilfie-Quaye S, Cosio B, Ito M, Barnes PJ, Adcock IM. (2006). Histone deacetylase 2-mediated deacetylation of the glucocorticoid receptor enables NF- κ B suppression. *J Exp Med.* 203(1):7–13.

Jeffrey KL, Camps M, Rommel C, Mackay CR. (2007). Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune responses. *Nat Rev Drug Discov.* 6(5):391–403.

Jensen AØ, Thomsen HF, Engebjerg MC, Olesen AB, Friis S, Karagas MR, Sørensen HT. (2009). Use of oral glucocorticoids and risk of skin cancer and non-Hodgkin's lymphoma: a population-based case-control study. *Br J Cancer.* 100(1):200–5.

Jiang YJ, Lu B, Tarling EJ, Kim P, Man M-Q, Crumrine D, Edwards PA, Elias PM, Feingold KR. (2010). Regulation of ABCG1 expression in human keratinocytes and murine epidermis. *J. Lipid Res.* 51(11):3185-3195.

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

Jonat C, Rahmsdorf HJ, Park KK, Cato AC, Gebel S, Ponta H, Herrlich P. (1990). Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell.* 62(6):1189–204.

Kalluri R, Weinberg RA. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 119(6):1420–8.

Kalluri R. (2009). EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Invest.* 119(6):1417–9.

Karagas MR, Cushing GL Jr, Greenberg ER, Mott LA, Spencer SK, Nierenberg DW. (2001). Non-melanoma skin cancers and glucocorticoid therapy. *Br J Cancer.* 85(5):683–6.

Kataoka K, Kim DJ, Carbajal S, Clifford JL, DiGiovanni J. (2008). Stage-specific disruption of Stat3 demonstrates a direct requirement during both the initiation and promotion stages of mouse skin tumorigenesis. *Carcinogenesis.* 29(6):1108–14.

Kawasaki H, Nagao K, Kubo A, Hata T, Shimizu A, Mizuno H, Yamada T, Amagai M. (2012). Altered stratum corneum barrier and enhanced percutaneous immune responses in filaggrin-null mice. *J Allergy Clin Immunol.* 129(6):1538–1546.e6.

Kerkhoff C, Voss A, Scholzen TE, Averill MM, Zänker KS, Bornfeldt KE. (2012). Novel insights into the role of S100A8/A9 in skin biology. *Exp Dermatol.* 21(11):822–6.

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

Kim E-A, Kim JE, Sung KS, Choi DW, Lee BJ, Choi CY. (2010). Homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) targets β -catenin for phosphorylation and proteasomal degradation. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 394(4):966–71.

Kim S, Choi IF, Quante JR, Zhang L, Roop DR, Koster MI. (2009). p63 directly induces expression of Alox12, a regulator of epidermal barrier formation. *Exp. Dermatol.* 18(12):1016–21.

Koch PJ, de Viragh PA, Scharer E, Bundman D, Longley MA, Bickenbach J, Kawachi Y, Suga Y, Zhou Z, Huber M, Hohl D, Kartasova T, Jarnik M, Steven AC, Roop DR. (2000). Lessons from loricrin-deficient mice: compensatory mechanisms maintaining skin barrier function in the absence of a major cornified envelope protein. *J Cell Biol.* 151(2):389–400.

Kolch W. (2005). Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6(11):827–37.

Kumar R, Thompson EB. (1999). The structure of the nuclear hormone receptors. *Steroids*. 64(5):310–9.

Kumar R, Thompson EB. (2003). Transactivation functions of the N-terminal domains of nuclear hormone receptors: protein folding and coactivator interactions. *Mol Endocrinol*. 17(1):1–10.

Kypriotou M, Huber M, Hohl D. (2012). The human epidermal differentiation complex: cornified envelope precursors, S100 proteins and the “fused genes” family. *Exp Dermatol*. 21(9):643–9.

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

Langlais D, Couture C, Balsalobre A, Drouin J. (2008). Regulatory network analyses reveal genome-wide potentiation of LIF signaling by glucocorticoids and define an innate cell defense response. *PLoS Genet*. 4(10):e1000224.

Langlais D, Couture C, Balsalobre A, Drouin J. (2012). The Stat3/GR interaction code: predictive value of direct/indirect DNA recruitment for transcription outcome. *Mol Cell*. 47(1):38–49.

Le Drean Y, Mincheneau N, Le Goff P, Michel D. (2002). Potentiation of glucocorticoid receptor transcriptional activity by sumoylation. *Endocrinology*. 143(9):3482–9.

Leis H, Page A, Ramírez A, Bravo A, Segrelles C, Paramio J, Baretino D, Jorcano JL, Pérez P. (2004). Glucocorticoid receptor counteracts tumorigenic activity of Akt in skin through interference with the phosphatidylinositol 3-Kinase signaling pathway. *Mol Endocrinol*. 18(2):303–11.

Leonard WJ, O’Shea JJ. (1998). Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol*. 16:293–322.

Levin J, Friedlander SF, Del Rosso JQ. (2013). Atopic dermatitis and the stratum corneum: part 2: other structural and functional characteristic of the stratum corneum barrier in atopic skin. *J Clin Aesthet Dermatol*. 6(11):49-54.

Levy DE, Darnell JE Jr. (2002). Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3(9):651–62.

Lewis-Tuffin LJ, Cidlowski JA. (2006). The physiology of human glucocorticoid receptor beta (hGRbeta) and glucocorticoid resistance. *Ann N Y Acad Sci.* 1069:1–9.

Li A, Hardy R, Stoner S, Tuckermann J, Seibel M, Zhou H. (2013). Deletion of mesenchymal glucocorticoid receptor attenuates embryonic lung development and abdominal wall closure. *PLoS ONE.* 8(5):e63578.

Li M, Messaddeq N, Teletin M, Pasquali J-L, Metzger D, Chambon P. (2005). Retinoid X receptor ablation in adult mouse keratinocytes generates an atopic dermatitis triggered by thymic stromal lymphopoietin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102(41):14795–800.

Liew FY, Pitman NI, McInnes IB. (2010). Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nat Rev Immunol.* 10(2):103–10.

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

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

Massie CE, Mills IG. (2012). Mapping protein-DNA interactions using CHIP-sequencing. *Methods Mol Biol.* 809:157–73.

Metzger DE, Xu Y, Shannon JM. (2007). Elf5 is an epithelium-specific, fibroblast growth factor-sensitive transcription factor in the embryonic lung. *Developmental Dynamics.* 236:1175-1192.

Moreno-Bueno G, Cubillo E, Sarrió D, Peinado H, Rodríguez-Pinilla SM, Villa S, Bolós V, Jordá M, Fabra A, Portillo F, Palacios J, Cano A. (2006). Genetic profiling of epithelial cells expressing E-cadherin repressors reveals a distinct role for Snail, Slug, and E47 factors in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res.* 66(19):9543–56.

Moreno-Bueno G, Peinado H, Molina P, Olmeda D, Cubillo E, Santos V, Palacios J, Portillo F, Cano A. (2009). The morphological and

molecular features of the epithelial-to-mesenchymal transition. *Nat Protoc.* 4(11):1591–613.

Morrison JL, Botting KJ, Soo PS, McGillick EV, Hiscock J, Zhang S, McMillen IC, Orgeig S. (2012). Antenatal steroids and the IUGR fetus: are exposure and physiological effects on the lung and cardiovascular system the same as in normally grown fetuses? *J Pregnancy.* 2012:839656.

Newton R. (2013). Anti-inflammatory glucocorticoids: changing concepts. *Eur J Pharmacol.* pii: S0014-2999(13)00452-4

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

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

Niemann C, Owens DM, Schettina P, Watt FM. (2007). Dual role of inactivating Lef1 mutations in epidermis: tumor promotion and specification of tumor type. *Cancer Res.* 67(7):2916–21.

Nieto MA, Cano A. (2012). The epithelial-mesenchymal transition under control: global programs to regulate epithelial plasticity. *Semin Cancer Biol.* 22(5-6):361–8.

Nieuwenhuizen AG, Rutters F. (2008). The hypothalamic-pituitary-adrenal-axis in the regulation of energy balance. *Physiology & Behavior.* 94(2):169–77.

Nissen RM, Yamamoto KR. (2000). The glucocorticoid receptor inhibits NFkappaB by interfering with serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev.* 14(18):2314–29.

O'Shaughnessy RFL, Welti JC, Sully K, Byrne C. (2009). Akt-dependent Pp2a activity is required for epidermal barrier formation during late embryonic development. *Development.* 136(20):3423–31.

Oakley RH, Cidlowski JA. (2013). The biology of the glucocorticoid receptor: New signaling mechanisms in health and disease. *J Allergy Clin Immunol.* 132(5):1033-44.

Odermatt A, Atanasov AG. (2009). Mineralocorticoid receptors: emerging complexity and functional diversity. *Steroids*. 74(2):163–71.

Oettgen P, Kas K, Dube A, Gu X, Grall F, Thamrongsak U, Akbarali Y, Finger E, Boltax J, Endress G, Munger K, Kunsch C, Libermann TA. (1999). Characterization of ESE-2, a novel ESE-1-related Ets transcription factor that is restricted to glandular epithelium and differentiated keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 274:29439-29452.

Onda K, Nagashima M, Kawakubo Y, Inoue S, Hirano T, Oka K. (2006). Mitogen-activated protein kinase kinase 1/extracellular signal-regulated kinase (MEK-1/ERK) inhibitors sensitize reduced glucocorticoid response mediated by TNF α in human epidermal keratinocytes (HaCaT). *Biochem Biophys Res Commun.* 351(1):266-72.

Palmer CNA, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP, Goudie DR, Sandilands A, Campbell LE, Smith FJD, O'Regan GM, Watson RM, Cecil JE, Bale SJ, Compton JG, DiGiovanna JJ, Fleckman P, Lewis-Jones S, Arseculeratne G, Sergeant A, Munro CS, El Houate B, McElreavey K, Halkjaer LB, Bisgaard H, Mukhopadhyay S, McLean WHI. (2006). Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet.* 38(4):441–6.

Park E, Zhu F, Liu B, Xia X, Shen J, Bustos T, Fischer SM, Hu Y. (2007). Reduction in IkappaB kinase alpha expression promotes the development of skin papillomas and carcinomas. *Cancer Res.* 67(19):9158–68.

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

Patel S, Kartasova T, Segre JA. (2003). Mouse Sprr locus: a tandem array of coordinately regulated genes. *Mamm Genome.* 14(2):140–8.

Patel S, Xi ZF, Seo EY, McGaughey D, Segre JA. (2006). Klf4 and corticosteroids activate an overlapping set of transcriptional targets to accelerate in utero epidermal barrier acquisition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(49):18668–73.

Pedranzini L, Leitch A, Bromberg J. (2004). Stat3 is required for the development of skin cancer. *J Clin Invest.* 114(5):619–22.

Peng X-D, Xu P-Z, Chen M-L, Hahn-Windgassen A, Skeen J, Jacobs J, Sundararajan D, Chen WS, Crawford SE, Coleman KG, Hay N. (2003). Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. *Genes Dev.* 17(11):1352–65.

Pérez P, Page A, Bravo A, Del Río M, Giménez-Conti I, Budunova I, Slaga TJ, Jorcano JL. (2001). Altered skin development and impaired proliferative and inflammatory responses in transgenic mice overexpressing the glucocorticoid receptor. *FASEB J.* 15(11):2030-2.

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

Perkins ND. (2007). Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(1):49–62.

Presland RB, Boggess D, Lewis SP, Hull C, Fleckman P, Sundberg JP. (2000). Loss of normal profilaggrin and filaggrin in flaky tail (ft/ft) mice: an animal model for the filaggrin-deficient skin disease ichthyosis vulgaris. *J Invest Dermatol.* 115(6):1072–81.

Ramírez A, Page A, Gandarillas A, Zanet J, Pibre S, Vidal M, Tusell L, Genesca A, Whitaker DA, Melton DW, Jorcano JL. (2004). A keratin K5Cre transgenic line appropriate for tissue-specific or generalized cre-mediated recombination. *Genesis.* 39(1):52–7.

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

Ratman D, Vanden Berghe W, Dejager L, Libert C, Tavernier J, Beck IM, De Bosscher K. (2013). How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: a scope beyond tethering. *Mol Cell Endocrinol.* 380(1-2):41-54.

Reddy TE, Pauli F, Sprouse RO, Neff NF, Newberry KM, Garabedian MJ, Myers RM. (2009). Genomic determination of the glucocorticoid response reveals unexpected mechanisms of gene regulation. *Genome Res.* 19(12):2163–71.

Reichardt HM, Kaestner KH, Tuckermann J, Kretz O, Wessely O, Bock R, Gass P, Schmid W, Herrlich P, Angel P, Schütz G. (1998). DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell*. 93(4):531–41.

Reichardt HM, Kellendonk C, Tronche F, Schütz G. (1999). The Cre/loxP system - a versatile tool to study glucocorticoid signalling in mice. *Biochem Soc Trans*. 27(2):78–83.

Roberson EDO, Bowcock AM. (2010). Psoriasis genetics: breaking the barrier. *Trends Genet*. 26(9):415–23.

Rundhaug JE, Gimenez-Conti I, Stern MC, Budunova IV, Kiguchi K, Bol DK, Coghlan LG, Conti CJ, DiGiovanni J, Fischer SM, Winberg LD, Slaga TJ. (1997). Changes in protein expression during multistage mouse skin carcinogenesis. *Mol Carcinog*. 20(1):125–36.

Sainte Marie Y, Toulon A, Paus R, Maubec E, Cherfa A, Grossin M, Descamps V, Clemessy M, Gasc JM, Peuchmaur M, Glick A, Farman N, Jaisser F. (2007). Targeted skin overexpression of the mineralocorticoid receptor in mice causes epidermal atrophy, premature skin barrier formation, eye abnormalities, and alopecia. *Am J Pathol*. 171(3):846–60.

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

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

Sano S, Chan KS, Carbajal S, Clifford J, Peavey M, Kiguchi K, Itami S, Nickoloff BJ, DiGiovanni J. (2005). Stat3 links activated keratinocytes and immunocytes required for development of psoriasis in a novel transgenic mouse model. *Nat Med*. 11(1):43–9.

Sano S, Chan KS, DiGiovanni J. (2008). Impact of Stat3 activation upon skin biology: a dichotomy of its role between homeostasis and diseases. *J Dermatol Sci*. 50(1):1–14.

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

Schüle R, Rangarajan P, Kliewer S, Ransone LJ, Bolado J, Yang N, Verma IM, Evans RM. (1990). Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell.* 62(6):1217–26.

Segre JA, Bauer C, Fuchs E. (1999). Klf4 is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin. *Nat Genet.* 22(4):356–60.

Segre JA. (2006). Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders. *J Clin Invest.* 116(5):1150–8.

Segrelles C, Lu J, Hammann B, Santos M, Moral M, Cascallana JL, Lara MF, Rho O, Carbajal S, Traag J, Beltrán L, Martínez-Cruz AB, García-Escudero R, Lorz C, Ruiz S, Bravo A, Paramio JM, DiGiovanni J. (2007). Deregulated activity of Akt in epithelial basal cells induces spontaneous tumors and heightened sensitivity to skin carcinogenesis. *Cancer Res.* 67(22):10879–88.

Segrelles C, Ruiz S, Pérez P, Murga C, Santos M, Budunova IV, Martínez J, Larcher F, Slaga TJ, Gutkind JS, Jorcano JL, Paramio JM. (2002). Functional roles of Akt signaling in mouse skin tumorigenesis. *Oncogene.* 21(1):53–64.

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

Slominski A, Wortsman J, Paus R, Elias PM, Tobin DJ, Feingold KR. (2008). Skin as an endocrine organ: implications for its function. *Drug Discov Today Dis Mech.* 5(2):137–44.

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

Smoak KA, Cidlowski JA. (2004). Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mechanisms of Ageing and Development*. 125(10–11):697–706.

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

So AY-L, Chaivorapol C, Bolton EC, Li H, Yamamoto KR. (2007). Determinants of cell- and gene-specific transcriptional regulation by the glucocorticoid receptor. *PLoS Genet*. 3(6).

Sørensen HT, Møller M, Nielsen GL, Baron JA, Olsen JH, Karagas MR. (2004). Skin cancers and non-hodgkin lymphoma among users of systemic glucocorticoids: a population-based cohort study. *J Natl Cancer Inst*. 96(9):709–11.

Stavreva DA, Wiench M, John S, Conway-Campbell BL, McKenna MA, Pooley JR, Johnson TA, Voss TC, Lightman SL, Hager GL. (2009). Ultradian hormone stimulation induces glucocorticoid receptor-mediated pulses of gene transcription. *Nat Cell Biol*. 11(9):1093–102.

Stellato C. (2004). Post-transcriptional and nongenomic effects of glucocorticoids. *Proc Am Thorac Soc*. 1(3):255–63.

Stojadinovic O, Lee B, Vouthounis C, Vukelic S, Pastar I, Blumenberg M, Brem H, Tomic-Canic M. (2007). Novel genomic effects of glucocorticoids in epidermal keratinocytes: inhibition of apoptosis, interferon-gamma pathway, and wound healing along with promotion of terminal differentiation. *J Biol Chem*. 282(6):4021–34.

Stojadinovic O, Sawaya A, Pastar I, Tomic-Canic M. (2013). Glucocorticoid receptor localizes to adherens junctions at the plasma membrane of keratinocytes. *PLoS ONE*. 8(4):e63453.

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

Suzuki A, Itami S, Ohishi M, Hamada K, Ioune T, Komazawa N, Senoo H, Sasaki T, Takeda J, Manabe M, Mak TW, Nakano T. (2003).

Keratinocyte-specific Pten deficiency results in epidermal hyperplasia, accelerated hair follicle morphogenesis and tumour formation. *Cancer Res.* 63(3):674-81.

Takeda K, Noguchi K, Shi W, Tanaka T, Matsumoto M, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S. (1997). Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94(8):3801-4.

Talabér G, Jondal M, Okret S. (2013). Extra-adrenal glucocorticoid synthesis: Immune regulation and aspects on local organ homeostasis. *Mol Cell Endocrinol.* 380(1-2):89-98.

Taves MD, Gomez-Sanchez CE, Soma KK. (2011). Extra-adrenal glucocorticoids and mineralocorticoids: evidence for local synthesis, regulation, and function. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 301(1):E11-24.

Tissing WJE, Meijerink JPP, den Boer ML, Pieters R. (2003). Molecular determinants of glucocorticoid sensitivity and resistance in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 17(1):17-25.

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

Tuckermann JP, Reichardt HM, Arribas R, Richter KH, Schütz G, Angel P. (1999). The DNA binding-independent function of the glucocorticoid receptor mediates repression of AP-1-dependent genes in skin. *J Cell Biol.* 147(7):1365-70.

Tummala R, Sinha S. (2006). Differentiation-specific transcriptional regulation of the ESE-2 gene by a novel keratinocyte-restricted factor. *J Cell Biochem.* 97(4):766-81.

van Rossum EFC, Lamberts SWJ. (2004). Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and their associations with metabolic parameters and body composition. *Recent Progress in Hormone Research.* 59(1):333.

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

Walker JJ, Spiga F, Waite E, Zhao Z, Kershaw Y, Terry JR, Lightman SL. (2012). The origin of glucocorticoid hormone oscillations. *PLoS Biology*. 10(6).

Wallace AD, Cidlowski JA. (2001). Proteasome-mediated glucocorticoid receptor degradation restricts transcriptional signaling by glucocorticoids. *J Biol Chem*. 276(46):42714–21.

Wang J-C, Derynck MK, Nonaka DF, Khodabakhsh DB, Haqq C, Yamamoto KR. (2004). Chromatin immunoprecipitation (ChIP) scanning identifies primary glucocorticoid receptor target genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101(44):15603–8.

Wang Z, Frederick J, Garabedian MJ. (2002). Deciphering the phosphorylation “code” of the glucocorticoid receptor in vivo. *J Biol Chem*. 277(29):26573–80.

Wang Z, Coleman DJ, Bajaj G, Liang X, Ganguli-Indra G, Indra AK. (2011). RXR α ablation in epidermal keratinocytes enhances UVR-induced DNA damage, apoptosis, and proliferation of keratinocytes and melanocytes. *J Invest Dermatol*. 131(1):177–87.

Webster JC, Oakley RH, Jewell CM, Cidlowski JA. (2001). Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative? isoform: A mechanism for the generation of glucocorticoid resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98(12):6865–70.

Williams ML, Hanley K, Elias PM, Feingold KR. (1998). Ontogeny of the epidermal permeability barrier. *J Invest Dermatol Symp Proc*. 3(2):75–9.

Yamamoto H, Ochiya T, Takeshita F, Toriyama-Baba H, Hirai K, Sasaki H, Sasaki H, Sakamoto H, Yoshida T, Saito I, Terada M. (2002). Enhanced skin carcinogenesis in cyclin D1 conditional transgenic mice: cyclin D1 alters keratinocyte response to calcium-induced terminal differentiation. *Cancer Res*. 62(6):1641–7.

Yang-Yen HF, Chambard JC, Sun YL, Smeal T, Schmidt TJ, Drouin J, 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(6):1205–15.

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

Zenz R, Eferl R, Scheinecker C, Redlich K, Smolen J, Schonhaler HB, Kenner L, Tschachler E, Wagner E. (2008). Activator protein 1 (Fos/Jun) functions in inflammatory bone and skin disease. *Arthritis Res Ther*. 10(1):201.

Zhang H, Hara M, Seki K, Fukuda K, Nishida T. (2005). Eyelid fusion and epithelial differentiation at the ocular surface during mouse embryonic development. *Jpn J Ophthalmol*. 49(3):195–204.

Zhang L, Lei W, Wang X, Tang Y, Song J. (2010). Glucocorticoid induces mesenchymal-to-epithelial transition and inhibits TGF- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and cell migration. *FEBS Lett*. 584(22):4646–54.