



Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Mecanismos moleculares que median las acciones biológicas de los receptores de mineralocorticoides y glucocorticoides en la homeostasis cutánea

Trabajo original presentado para optar al grado de doctor en
Biomedicina y Biotecnología por la Universidad de Valencia
Valencia, Abril 2017

Firmado: JULIA BOIX TARÍN

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:

SAF2011-28115

SAF2014-59474-R

ADMIRE COST BM1301

Julia Boix Tarín ha disfrutado de una beca predoctoral FPI (BES-2012-0578) otorgada por el Ministerio de Economía y Competitividad, asociada al proyecto SAF2011-28115.

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

Agradecimientos

Este trabajo ha sido posible gracias al apoyo de mucha gente. En primer lugar, me gustaría dar las gracias a todo el grupo de investigación “Unidad de Modelos Animales de Patologías Cutáneas” dirigido por la Dra. Paloma Pérez. Gracias Paloma, por darme la oportunidad de empezar este camino en investigación de una forma tan rigurosa y profesional. Gracias también a Lisa, Jose, Víctor, Elena, Zara y Judit. Gracias por vuestro tiempo, por todo lo que he aprendido con vosotros y por haber compartido tantos momentos durante estos cuatro años.

Por otra parte, no puedo olvidarme de toda la gente que ha estado ahí, fuera del laboratorio. Gracias a mi familia, amigos y a Joan. Gracias por escucharme, por “aguantarme”, por comprenderme y, sobre todo, por apoyarme.

Abreviaturas

ACTH	<i>Adrenocorticotropin Hormone</i>	Hormona adrenocorticotropa
Aldo	<i>Aldosterone</i>	Aldosterona
BrdU	<i>5-Bromo-2-deoxyuridine</i>	5-Bromo-2-desoxiuridina
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>	Seroalbúmina bovina
cDNA	<i>Complementary DNA</i>	DNA complementario
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
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>	Ácido desoxirribonucleico
E	<i>Embryonic</i>	Embrionario
EDC	<i>Epidermal Differentiation Complex</i>	Complejo de diferenciación epidérmica
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>	Factor de crecimiento epidérmico
Eple	<i>Eplerenone</i>	Eplerenona
Espiro	<i>Spirolactone</i>	Espironolactona
ERK	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>	Quinasa regulada por señales extracelulares
EMT	<i>Epithelial Mesenchymal Transition</i>	Transición epitelio mesénquima
ENaC	<i>Epithelial Sodium Channel</i>	Canal epitelial de sodio
GCs	<i>Glucocorticoids</i>	Glucocorticoides
GR	<i>Glucocorticoid Receptor</i>	Receptor de glucocorticoides
GRE	<i>Glucocorticoid Response Elements</i>	Elementos de respuesta a 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

11 β HSD1	<i>11-β Hydroxysteroid dehydrogenase 1</i>	11 β hidroxisteroide deshidrogenasa 1
11 β HSD2	<i>11-β Hydroxysteroid dehydrogenase 2</i>	11 β hidroxisteroide deshidrogenasa 2
IL	<i>Interleukin</i>	Interleuquina
K	<i>Keratin</i>	Queratina
LBD	<i>Ligand Binding Domain</i>	Dominio de unión a ligando
MR	<i>Mineralocorticoid Receptor</i>	Receptor de mineralocorticoides
mRNA	<i>Messenger RNA</i>	RNA mensajero
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
PMA	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>	Forbol-12-miristato-13-acetato
RT-qPCR	<i>Real Time Quantitative PCR</i>	PCR cuantitativa a tiempo real
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>	Ácido ribonucleico
RT	<i>Room Temperature</i>	Temperatura ambiente
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>	Transductor de señal y activador de la transcripción
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

Índice general

Introducción

1. Los glucocorticoides (GCs)	17
1.1. Síntesis local de GCs	20
2. Los receptores de GCs	22
2.1. Estructura de los receptores nucleares	23
2.2. El receptor de mineralocorticoides (MR)	25
2.3. El receptor de glucocorticoides (GR)	26
2.4. Patologías asociadas a la disfunción de MR	27
3. Mecanismos de acción de los receptores nucleares	29
3.1. Acciones genómicas	30
3.2. Acciones no genómicas	32
4. La piel como sistema modelo	33
4.1. Patologías inflamatorias	36
4.2. Efectos adversos de los tratamientos con GCs en piel	37
4.2.1. Atrofia cutánea	39
4.2.2. Retraso en el cierre de heridas	40
5. Modelos animales transgénicos para estudiar la función de los receptores de GCs en piel	43

Objetivos

Materiales y métodos

1. Experimentación animal	55
1.1. Obtención de DNA genómico	57
1.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	58
1.3. Test de funcionalidad de glándulas sudoríparas	59
1.4. Seguimiento del ciclo de pelo	59
1.5. Tratamientos tópicos	60
1.6. Ensayo de cierre de herida <i>in vivo</i>	60
1.7. Recogida de las muestras	61

2. Explantes de piel humana	61
2.1. Cultivo y tratamiento de explantes de piel humana	61
3. Análisis histológico	62
3.1. Tinción con Hematoxilina-Eosina	63
3.2. Análisis inmunohistoquímico	63
3.3. Tinción de lípidos mediante Rojo Nilo	64
3.4. Tinción con tricrómico de Masson	65
3.5. Visualización, documentación, cuantificación y análisis de imagen de muestras histopatológicas	66
4. Ensayo de permeabilidad de barrera con azul de toluidina	66
5. Generación y caracterización de líneas de queratinocitos inmortales	67
5.1. Generación de las líneas de queratinocitos	67
5.2. Ensayo de proliferación	69
5.3. Análisis de diferenciación	69
5.4. Ensayo de cierre de herida <i>in vitro</i>	70
5.5. Transfección con lipofectamina	70
5.6. Inmunofluorescencia	71
5.7. Proximity Ligation Assay (PLA)	72
5.8. Tratamientos de queratinocitos en cultivo	74
5.9. Análisis de activación transcripcional mediante ensayo de luciferasa	75
6. Análisis de la expresión de proteínas y <i>western blot</i>	76
6.1. Extracción de proteínas a partir de tejido	76
6.2. Extracción de proteínas a partir de células	77
6.3. <i>Western Blot</i>	77
7. Análisis de expresión génica	79
7.1. Extracción de RNA	79
7.2. Síntesis de DNA complementario (cDNA)	80
7.3. PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)	80
7.4. Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)	82
8. Análisis estadístico	85

Resultados y Discusión

1. Análisis de la expresión de MR, GR, 11 β HSD1 y 11 β HSD2 en desarrollo cutáneo	89
2. Generación y análisis del fenotipo de los ratones con inactivación total de MR (ratones MR ^{-/-}) durante la etapa perinatal	93
2.1. Generación de los ratones MR ^{-/-}	93
2.2. Análisis de la función de barrera epidérmica en ratones MR ^{-/-}	94
2.3. Análisis histopatológico perinatal de la piel de ratones MR ^{-/-}	96
2.4. Análisis de la expresión génica en piel de ratones MR ^{-/-} recién nacidos	97
3. Generación y caracterización de los ratones con inactivación de MR específica de la epidermis (MR ^{EKO}) en la edad adulta	99
3.1. Generación de los ratones MR ^{EKO}	99
3.2. Análisis del fenotipo de los ratones MR ^{EKO} en la edad adulta	100
3.3. Generación y caracterización del fenotipo de queratinocitos MR ^{EKO}	105
4. Análisis de la respuesta de los ratones MR ^{EKO} adultos a distintos protocolos de patología cutánea	108
4.1. Respuesta de ratones MR ^{EKO} a un tratamiento tópico con SDS	108
4.2. Respuesta de ratones MR ^{EKO} a un tratamiento tópico con PMA	112
4.3. El proceso de cicatrización cutánea en ratones MR ^{EKO}	116
5. Análisis de la respuesta a GCs en condiciones de inactivación de MR en piel	122
5.1. Respuesta de los ratones MR ^{EKO} a un tratamiento tópico crónico con Dexametasona	122
5.2. Respuesta en explantes de piel humana a un	

tratamiento conjunto de GCs y antagonistas de MR	128
5.3. Análisis comparativo de la respuesta a GCs en ratones control, MR ^{EKO} , y GR ^{EKO}	134
5.4. Respuesta transcripcional de queratinocitos control, MR ^{EKO} y GR ^{EKO} a un tratamiento con Dexametasona	136
Conclusiones	147
Bibliografía	151
Anexo	169

Introducción

1. Los glucocorticoides (GCs)

Los glucocorticoides (GCs) son hormonas esteroideas derivadas del colesterol sintetizadas en el córtex de las glándulas adrenales en respuesta a los ritmos circadianos y el estrés. Su síntesis y secreción está regulada por el eje hipotálamo-pituitaria-adrenales (HPA): en respuesta a diversos estímulos, el hipotálamo secreta la hormona liberadora de corticotropina (CRH) que hace que la glándula pituitaria libere la hormona adrenocorticotropa (ACTH) y ésta estimula la producción de GCs en el córtex adrenal y los libera a la circulación (Figura 1) (Ramamoorthy y Cidlowski, 2016, Taves *et al.*, 2011).

Debido a su naturaleza lipofílica, los GCs no pueden pre-sintetizarse y almacenarse en las glándulas adrenales por lo que su síntesis es muy rápida tras la estimulación por ACTH. Este mecanismo de regulación del eje HPA está contrarrestado por un mecanismo de retroalimentación negativa de los GCs, que actúan a nivel de la pituitaria anterior y el hipotálamo para inhibir la producción de ACTH y CRH (Figura 1) (Ramamoorthy y Cidlowski, 2016).

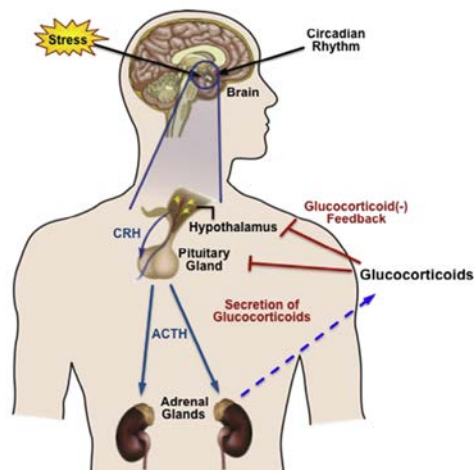


Figura 1. Esquema de la síntesis y regulación de GCs por el eje hipotálamo-pituitaria-adrenales (HPA). Tomada de Ramamoorthy y Cidlowski, 2016.

Los GCs endógenos, cortisol en humanos y corticosterona en roedores, tienen numerosos efectos en la fisiología de prácticamente todos los órganos, como la regulación de la actividad metabólica, el desarrollo, la homeostasis celular, la función inmune, el comportamiento y la respuesta a estrés, entre otros (Nicolaidis *et al.*, 2016, Ramamoorthy y Cidlowski, 2016, Taves *et al.*, 2011).

Además, existe una gran variedad de derivados sintéticos de GCs, análogos a los GCs endógenos, que son agentes terapéuticos ampliamente usados como uno de los tratamientos anti-inflamatorios más efectivos. Los GCs sintéticos se han usado durante más de 50 años para tratar enfermedades inflamatorias, tanto agudas como crónicas, y enfermedades autoinmunes como asma, alergia, artritis reumatoide, esclerosis múltiple o enfermedad inflamatoria intestinal entre otras (Terao y Katayama, 2016, Ramamoorthy y Cidlowski, 2016).

En piel, los GCs se usan para tratar enfermedades inflamatorias como la dermatitis atópica o la psoriasis y se ha descrito que son potentes inhibidores de la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Slominski *et al.*, 2014, Segre, 2006). Sin embargo, los beneficios terapéuticos de los GCs están limitados por los efectos secundarios adversos, que se asocian con una dosis alta o una aplicación continuada. Los efectos secundarios incluyen osteoporosis, diabetes, obesidad, cataratas, retraso en el crecimiento y, en piel, atrofia cutánea y retraso en el cierre de heridas (Ramamoorthy y Cidlowski, 2016). En humanos existen algunas enfermedades que cursan con altos niveles de cortisol en sangre, como es el síndrome de Cushing. Estos pacientes presentan los mismos efectos secundarios asociados a un tratamiento continuado con GCs, incluyendo la atrofia cutánea (Davidovici *et al.*, 2008).

En el cortex adrenal también se sintetizan otro tipo de hormonas esteroideas o corticoides derivados del colesterol, como son los

mineralocorticoides (MCs). El principal MC endógeno es la aldosterona (Aldo), que se sintetiza en la zona glomerular del córtex adrenal en respuesta a altas concentraciones de potasio o bajas concentraciones de sodio; la función de Aldo es estimular la reabsorción de sodio renal y la excreción de potasio en la nefrona distal, controlando de esta forma la presión sanguínea y la homeostasis del volumen extracelular (Jaisser y Farman, 2016, Martinerie *et al.*, 2012, Farman y Rafestin-Oblin, 2001). Los GCs también afectan la reabsorción de sodio, sin embargo, es difícil separar los efectos de los MCs y los GCs ya que actúan de forma complementaria (Farman y Rafestin-Oblin, 2001).

En este trabajo nos hemos centrado en el estudio de los GCs, que ejercen sus acciones a través del receptor de GCs (GR) y el receptor de MCs (MR), ambos receptores nucleares hormonales que actúan como factores de transcripción dependientes de ligando. La afinidad de MR por GCs es 10 veces mayor que la que presenta GR (Figura 2), es por ello que a MR se le denomina receptor de alta afinidad y a GR receptor de baja afinidad. Por otra parte, MR es capaz de unir tanto GCs como Aldo con una afinidad similar (en el rango de nM), por tanto, y dado que la concentración de GCs en sangre es entre 100 y 1000 veces mayor a la de Aldo (Figura 2), teóricamente MR estaría permanentemente ocupado por GCs (Jaisser y Farman, 2016, Gómez-Sánchez y Gómez-Sánchez, 2014, Martinerie *et al.*, 2012). En los tejidos en los que es importante que MR se active por Aldo existe un mecanismo pre-receptor que previene su activación por GCs. Este mecanismo consiste en la co-expresión de MR y el enzima 11beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2 (11 β HSD2) que metaboliza los GCs activos (cortisol y corticosterona) en las formas inactivas (cortisona y 11-dehidrocortisona, respectivamente), que poseen una afinidad muy baja por MR (Figura 2, Jaisser y Farman, 2016, Martinerie *et al.*, 2012).

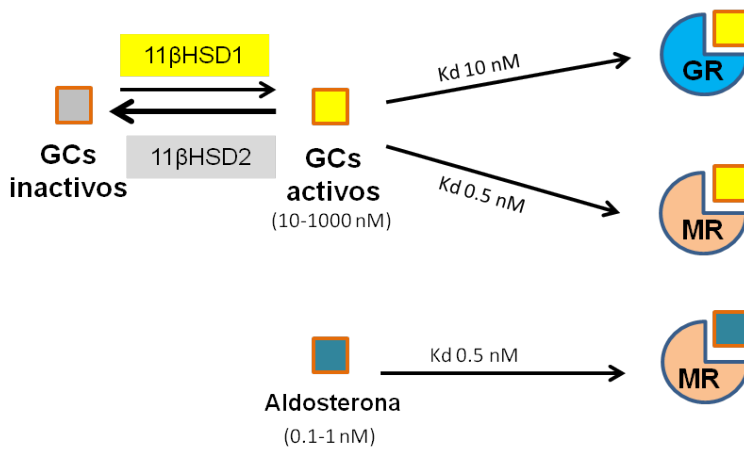


Figura 2. Los GCs activos se unen a los receptores de GCs (GR/NR3C1) y mineralocorticoides (MR/NR3C2) con distinta afinidad relativa, determinada por la constante de disociación (K_d). MR también es capaz de unir aldosterona con la misma afinidad que GCs, sin embargo, dada la mayor concentración plasmática de los GCs en relación con aldosterona (entre paréntesis), MR debería unir preferentemente GCs. En tejidos donde es relevante que MR se active por aldosterona, la co-expresión del enzima 11β HSD2, que convierte los GCs activos en inactivos, impide su ocupación por GCs.

1.1. Síntesis local de GCs

Los niveles de GCs sistémicos se mantienen por la síntesis adrenal de GCs, sin embargo, en algunos tejidos, la disponibilidad de GCs también está regulada de forma autocrina o paracrina (Ramamoorthy y Cidlowski, 2016, Gómez-Sánchez y Gómez-Sánchez, 2014). Durante la última década, buena parte de la investigación se ha centrado en la producción local o extra-adrenal de estas hormonas mediante su síntesis *de novo*. Se ha demostrado que la síntesis local ocurre en tejidos como el colon, corazón, pulmones, cerebro, intestino, próstata, timo, sistema inmune y piel (Terao y Katayama, 2016, Slominski *et al.*, 2014).

La piel es un tejido metabólicamente muy activo que posee la maquinaria enzimática necesaria para la síntesis local de GCs (CYP11A1, CYP17, CYP21A2, CYP11B1, 3β -HSD, MC2 y MLN64). Gracias a todos esos enzimas, la piel puede producir distintas hormonas *de novo* y sus

precursores, como son deoxicorticosterona (DOC), 18(OH)DOC, corticosterona y cortisol a partir de colesterol (Figura 3). Además, se ha descrito que en piel la glucocorticosteroidogénesis ocurre en queratinocitos epidérmicos y del folículo, melanocitos y en fibroblastos dérmicos (Nikolakis *et al.*, 2016).

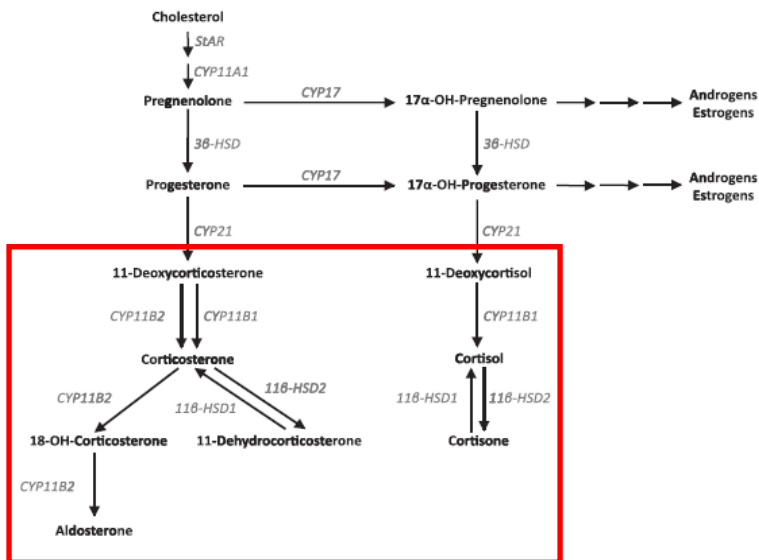


Figura 3. Ruta de síntesis de cortisol, corticosterona y aldosterona a partir de colesterol y enzimas implicados en la ruta de síntesis de esteroides. Tomada de Taves *et al.*, 2011.

La producción local ocurre también por la expresión del enzima 11-beta hidroxisteroide deshidrogenasa tipo 1 (11 β HSD1), que convierte los GCs inactivos (cortisona y 11-dehidrocorticosterona) en activos (cortisol y corticosterona). El enzima con la función inversa, como ya hemos comentado, es 11 β HSD2 (Figuras 2 y 3).

La expresión y actividad de estos enzimas regula la disponibilidad de los GCs endógenos y, por tanto, la activación de los receptores por uno u otro ligando de forma específica de tipo celular. De forma contraria, la mayoría de GCs sintéticos no son susceptibles de ser metabolizados por el enzima 11 β HSD2. Ambos enzimas residen en la membrana del retículo

endoplasmático y se expresan en diversos tejidos (hígado, pulmón, tejido adiposo, ovarios, sistema nervioso central y piel).

En piel, 11 β HSD1 y 11 β HSD2 se expresan en queratinocitos y regulan la inflamación y proliferación en este tipo celular (Terao y Katayama, 2016, Nikolakis *et al.*, 2016, Gómez-Sánchez y Gómez-Sánchez, 2014). Se ha descrito que la expresión del enzima 11 β HSD2 aumenta en respuesta a GCs en queratinocitos humanos en cultivo como mecanismo de regulación de los niveles de GCs intracelulares (Stojadinovic *et al.*, 2007). Por otra parte, el uso de inhibidores de 11 β HSD1 tiene una aplicación importante en clínica al limitar los efectos adversos de altas concentraciones de GCs endógenos, como por ejemplo en el síndrome de Cushing (Ramamoorthy y Cidlowski, 2016).

La producción de Aldo también puede ocurrir en tejidos periféricos (Figura 3, Jaisser y Farman, 2016). Algunos estudios sugieren la síntesis local de Aldo en el sistema nervioso central y cardiovascular, dado que estos tejidos expresan algunos de los enzimas de su ruta de síntesis (Martinerie *et al.*, 2012). Sin embargo, hasta el momento no se ha documentado la producción local de Aldo en las células de la piel (Nikolakis *et al.*, 2016, Farman *et al.*, 2010).

2. Los receptores de GCs

Como ya hemos mencionado, las hormonas esteroideas regulan sus funciones a través de dos receptores intracelulares, MR (NR3C2) y GR (NR3C1). Estos receptores pertenecen a la subfamilia de receptores nucleares hormonales NR3C que incluye los receptores de progesterona (NR3C3) y andrógenos (NR3C4), y todos ellos son miembros de la superfamilia de receptores nucleares que incluyen además los receptores de hormonas tiroideas, vitamina D₃, receptor activado por proliferadores de peroxisomas y receptores de retinoides (Weikum *et al.*, 2017, Gómez-

Sánchez y Gómez-Sánchez, 2014). Los receptores nucleares son factores de transcripción dependientes de ligando con un papel importante en la regulación de la homeostasis de la piel. De hecho, estos receptores constituyen las dianas terapéuticas más frecuentes en el tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel (Schmuth *et al.*, 2007).

MR y GR actúan normalmente como homodímeros en respuesta a sus ligandos (MR-MR y GR-GR). Sin embargo, en trabajos puntuales se ha descrito la formación de heterodímeros MR-GR apoyada por el hecho de que ambos receptores se unen a las mismas secuencias reguladoras en el DNA (ver más abajo) y comparten muchas proteínas co-reguladoras requeridas para un inicio eficiente de la transcripción. No obstante, se cree que los efectos de MR y GR son diferentes en función del ligando que los active (Oakley y Cidlowski, 2015, Gómez-Sánchez y Gómez-Sánchez, 2014, Farman y Rafestin-Oblin, 2001).

Por otra parte, el concepto de cantidad relativa o ratio MR:GR es importante para determinar la respuesta a ligando dependiendo del tejido o el tipo celular (Gómez-Sánchez y Gómez-Sánchez, 2014, Farman *et al.*, 2010). El grupo de Farman y colaboradores estimó la ratio MR:GR entre 1:1 y 1:30 en hipocampo y cardiomiocitos respectivamente (Farman y Rafestin-Oblin, 2001).

2.1. Estructura de los receptores nucleares

MR y GR, al igual que el resto de receptores nucleares hormonales, tienen una estructura modular que comprende tres dominios funcionales (Figura 4): dominio de transactivación amino-terminal (*N-Terminal Transactivation Domain*, NTD), dominio de unión a DNA (*DNA Binding Domain*, DBD) y dominio de unión a ligando (*Ligand Binding Domain*, LBD) (Martinerie *et al.*, 2012).

- El NTD es el dominio de transactivación que permite asociarse a la maquinaria basal de transcripción. Además, este dominio contiene la región AF-1, con función de activación autónoma o independiente de hormona.

- El DBD está altamente conservado y está compuesto por dos dedos de zinc. El primero forma la caja proximal (P) que permite la unión de los receptores a las secuencias reguladoras de sus genes diana, que se conocen como elementos de respuesta a glucocorticoides (*Glucocorticoid Response Elements*, GREs). El segundo dedo de zinc forma la caja distal (D) y es importante para la dimerización de los receptores y su translocación al núcleo.

- Entre el DBD y el LBD hay una región hidrofílica que forma una bisagra entre ambos. Esta región contiene la señal de localización nuclear 1 (*nuclear localization signal 1*, NLS1).

- El LBD es el dominio carboxi-terminal, al cual se unen los ligandos para activar a los receptores. Este dominio contiene la región AF-2 y la señal NLS2. La homología entre los LBDs de MR y GR permite que ambos receptores sean capaces de unir GCs y Aldo, si bien con distinta afinidad, como se ha descrito (Weikum *et al.*, 2017, Gómez-Sánchez y Gómez-Sánchez, 2014, Farman y Rafestin-Oblin, 2001).

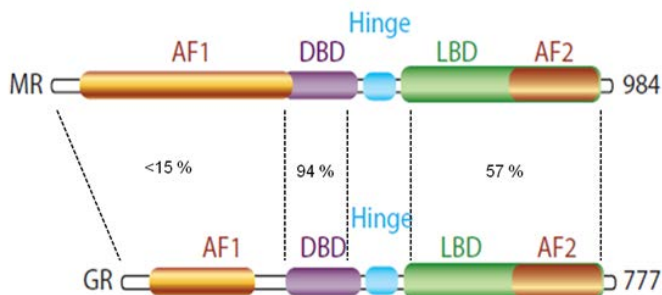


Figura 4. Representación esquemática de la estructura en dominios funcionales de MR y GR humano. Se indica el porcentaje de identidad aminoacídica entre los dominios de ambos receptores. La región N-terminal contiene el dominio de activación AF-1, seguido del dominio de unión a DNA (DBD), la región bisagra (*Hinge*) y el dominio de unión a ligando (LBD) que contiene el dominio AF-2. A la derecha de cada esquema se indica el número total de aminoácidos de cada receptor. Modificado de Sacta *et al.*, 2016.

La homología entre MR y GR es muy elevada, siendo del 15% en el dominio NTD, 94% en el DBD y 57% en el LBD (Figura 4, Gómez-Sánchez y Gómez-Sánchez, 2014, Farman y Rafestin-Oblin, 2001).

2.2. El receptor de mineralocorticoides (MR)

MR está codificado, en ratón, por el gen *Nr3c2* que se localiza en el cromosoma 8 y por el gen *NR3C2*, en humanos, que está en el cromosoma 4. El gen está compuesto por 10 exones y 8 intrones. Los dos primeros exones, 1 α y 1 β , codifican para la región 5'UTR. La proteína consta de 984 aminoácidos (Martinerie *et al.*, 2012, Viengchareun *et al.*, 2007).

Se ha demostrado que la función principal de MR es regular la reabsorción de sodio en el riñón, donde se expresa en la nefrona distal y, de esta forma, contribuye a la regulación de la presión sanguínea (Jaisser y Farman, 2016, Viengchareun *et al.*, 2007). La función de MR es crucial en mamíferos, como demuestra el hecho de que los ratones *Nr3c2 knock-out* mueren tras el nacimiento debido a la deshidratación por una pérdida masiva de sales (Berger *et al.*, 1998). En las últimas décadas, el estudio de la función de MR se ha extendido a otros tejidos, sobre todo tejido vascular y adiposo, donde se ha demostrado la expresión de MR y su función en determinadas patologías (Jaisser y Farman, 2016, Martinerie *et al.*, 2012).

En la piel, MR se expresa en la epidermis, los folículos pilosos, las glándulas sebáceas y las glándulas sudoríparas (Jaisser y Farman, 2016, Kenouch *et al.*, 1994). Sin embargo, la función de MR en piel se desconoce en gran medida y se postula que en mamíferos, al contrario de lo que ocurre en anfibios, este tejido haya perdido la capacidad para regular la homeostasis de sodio (Farman *et al.*, 2010).

MR puede sufrir distintas modificaciones post-traduccionales como son fosforilación, ubiquitinación, sumoilación y acetilación entre otras (Faresse, 2014). Estas modificaciones permiten regular la señalización de MR de una manera muy precisa dependiendo del contexto fisiopatológico,

incluyendo la unión del ligando y la translocación nuclear que controlan la actividad transcripcional en última instancia (Muñoz-Durango *et al.*, 2015).

2.3. El receptor de glucocorticoides (GR)

En ratón, GR está codificado por el gen *Nr3c1* que se localiza en el cromosoma 18 y, en humanos, por el gen homólogo *NR3C1* que está en el cromosoma 5. El gen está codificado por 9 exones y 8 intrones de los cuales el exón 1 codifica para la región 5'UTR. La proteína está formada por 777 aminoácidos (Weikum *et al.*, 2017, Ramamoorthy y Cidlowski, 2013).

Existen dos isoformas mayoritarias de GR producidas por *splicing* alternativo en el exón 9, GR α y GR β . Ambas isoformas se expresan de forma ubicua en todos los órganos y tejidos, incluyendo la piel. Mientras que GR α es la isoforma mayoritaria y la que une GCs, GR β se expresa a niveles más bajos y no es capaz de unir ligando (Weikum *et al.*, 2017, Ramamoorthy y Cidlowski, 2013, Pérez, 2011). Se ha descrito que un aumento en GR β correlaciona con resistencia a GCs en algunos tipos celulares (Hinds *et al.*, 2010). A partir de este momento centraremos nuestro trabajo en GR α , al que nos referiremos como GR.

GR es esencial para la supervivencia celular y los ratones GR *knock-out* mueren perinatalmente debido a problemas respiratorios por falta de surfactación alveolar (Cole *et al.*, 1995). En piel, GR juega un papel importante en la competencia de la barrera epidérmica y homeostasis de este tejido, como demuestra la generación y caracterización de varios modelos transgénicos de ratón con ganancia y pérdida de función de este gen (Sevilla *et al.*, 2013, Sevilla *et al.*, 2010, Donet *et al.*, 2008, Bayo *et al.*, 2008, Pérez *et al.*, 2001).

Aunque el único ligando fisiológico de GR son los GCs, se ha descrito que niveles farmacológicos de Aldo y deoxicorticosterona son capaces de unirse y activar a GR, añadiendo mayor complejidad al estudio integrado de GR y MR en respuesta a ligando (Gómez-Sánchez y Gómez-Sánchez, 2014).

2.4. Patologías asociadas a la disfunción de MR

En humanos, las mutaciones en la región codificante del gen de MR (*NR3C2*) resultan en pseudohipoaldosteronismo (PHA) tipo I autosómico dominante que se caracteriza por una resistencia renal a Aldo (Riepe, 2009). Estos pacientes presentan deshidratación, altos niveles de potasio en sangre (hiperkalemia), bajos niveles de sodio (hiponatremia) y altos niveles de Aldo y renina (Korkut *et al.*, 2015, Martinerie *et al.*, 2012). Los ratones con inactivación total de MR ($MR^{-/-}$) también presentan síntomas de PHA durante el desarrollo, ya que tienen hiperkalemia, hiponatremia y niveles altos de renina, angiotensina y Aldo en sangre a día postnatal 8. Finalmente, mueren por deshidratación debido a una pérdida masiva de sales (Marterinie *et al.*, 2012, Berger *et al.*, 1998). Sin embargo, no se han encontrado defectos en piel en pacientes con mutaciones en MR y tampoco se habían estudiado los efectos de la pérdida de función global de MR en la piel de los ratones $MR^{-/-}$.

Existe otro tipo de PHA tipo I, con herencia autosómica recesiva, que se conoce como PHA tipo I sistémico y afecta a riñones, colon distal, pulmones, órganos reproductores, glándulas salivares y glándulas sudoríparas. Esta forma más grave, está causada por mutaciones en alguna de las subunidades del canal epitelial de sodio (*epithelial sodium channel* or ENaC) α , β o γ codificadas por los genes *SCNN1A*, *SCNN1B* o *SCNN1G*. Cursa con deshidratación severa, pérdida de sales y defectos oftalmológicos y cutáneos como la miliaria rubra, que es la excreción y acumulación de sodio en las glándulas sudoríparas causante de erupciones en la piel (Korkut *et al.*, 2015, Eliwa *et al.*, 2014, Riepe, 2009).

En los últimos años, se ha ampliado el estudio de MR a diversos tejidos, incidiendo en su posible contribución en patología. Se ha descrito la importancia del sistema MR/Aldo/GCs en cardiomiocitos, células endoteliales y del músculo liso, y neuronas. La activación patológica de MR por GCs o la sobreactivación de MR por niveles elevados de Aldo daría

lugar a enfermedad renal, patologías cardiovasculares severas incluyendo hipertensión y fibrosis entre otros, causadas por un aumento de las especies reactivas de oxígeno e inflamación (Figura 5, Jaisser y Farman, 2016, Martinerie *et al.*, 2012).

Los estudios clínicos han demostrado que el uso combinado de antagonistas de MR como espironolactona (Espiro) o eplerenona (Eple) junto con la terapia estándar son efectivos para el fallo cardíaco crónico, aportando beneficios en términos de morbilidad y mortalidad (Figura 5). A pesar de que se desconocen los mecanismos moleculares responsables de estos efectos beneficiosos, los antagonistas de MR se están usando como medicamentos para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca y el fallo renal (Jaisser y Farman, 2016, Muñoz-Durango *et al.*, 2015, Gómez-Sánchez y Gómez-Sánchez, 2014). Sin embargo, el bloqueo farmacológico de MR no es siempre beneficioso ya que en estudios de función cognitiva una disminución en MR o la ratio MR:GR se ha asociado, en algunas áreas del cerebro, con depresión y deterioro cognitivo en humanos (Gómez-Sánchez y Gómez-Sánchez, 2014).

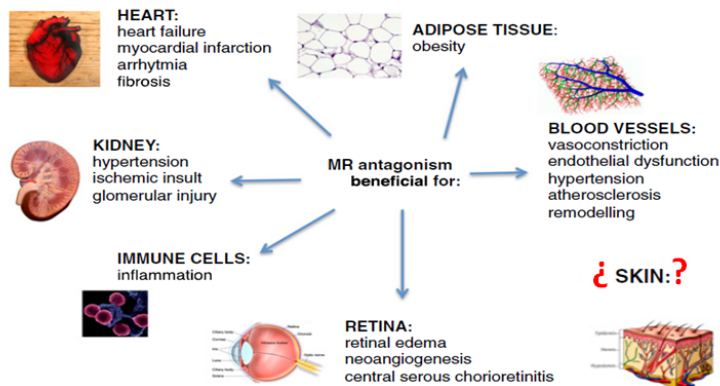


Figura 5. La activación de MR está asociada con distintos procesos patológicos en varios tejidos. La inactivación farmacológica de MR mediante el uso de antagonistas es beneficiosa en las patologías descritas. Modificada de Jaisser y Farman, 2016.

El antagonista de MR más usado hasta el momento es la Espiro junto con el canrenoato (Canre), otro metabolito activo derivado del primero, que son antagonistas de primera generación. Éstos son compuestos esteroideos potentes; desafortunadamente, no son muy selectivos ya que son también antagonistas del receptor de andrógenos y de GR (a altas dosis) y agonistas del receptor de progesterona, lo que da lugar a diversos efectos secundarios. Más recientemente, se han utilizado antagonistas de segunda generación como la Eple, que es un antagonista esteroideo más selectivo por MR pero, por el contrario, menos potente por lo que requiere dosis más altas. Actualmente, existen antagonistas de MR de tercera y cuarta generación no esteroideos, potentes y selectivos de MR como la finerenona. Estos compuestos se han utilizado para el tratamiento de hipertensión, fallo cardiaco, disfunción renal y aldosteronismo primario (Jaisser y Farman, 2016, Hawkins *et al.*, 2012, Kolkhof y Borden, 2012).

3. Mecanismos de acción de los receptores nucleares

Las hormonas esteroideas actúan a través de diversos mecanismos para regular la expresión génica. En este trabajo nos referiremos exclusivamente a las acciones hormonales dependientes de receptor, si bien existen acciones independientes de los receptores, como en el caso de MR, donde los ligandos son capaces de activar otras vías de señalización (Meinel *et al.*, 2014).

Las acciones hormonales dependientes del receptor incluyen acciones no genómicas, donde el receptor actúa en la membrana y citoplasma interaccionando con otras proteínas y modulando por ejemplo la vía de señalización PI3K/AKT (Mitts *et al.*, 2012), y acciones genómicas, que implican la función del receptor como factor de transcripción, de forma dependiente e independiente de su unión directa a DNA (Figura 6) (Sacta *et al.*, 2016). Las acciones del receptor dependientes de su unión directa a DNA se denominan funciones de transactivación (TA), e implican el

reconocimiento con alta afinidad de secuencias GREs. Las acciones del receptor independientes de su unión directa a DNA denominadas funciones de transrepresión (TR) consisten, mayoritariamente, en la interferencia con otros factores de transcripción, ejemplificados por NF- κ B y AP-1, mediante interacciones físicas directas proteína-proteína y generalmente dan lugar a una inhibición de dichas vías (Ramamoorthy y Cidlowski, 2016, Sacta *et al.*, 2016).

3.1. Acciones genómicas

En ausencia de ligando, la fracción mayoritaria de la célula, tanto de MR como de GR, se encuentra en el citoplasma unida a chaperonas y proteínas de andamiaje específicas de cada receptor y tipo celular. Las chaperonas más estudiadas de unión a MR y GR son las proteínas de choque térmico 90 y 70 (HSP90 y HSP70) y las inmunofilinas. Estas proteínas facilitan la unión del ligando al receptor, facilitan las modificaciones post-traduccionales de los receptores, que son importantes en su activación y translocación desde el citoplasma al núcleo, e impiden la translocación de los receptores al núcleo y su dimerización (Weikum *et al.*, 2017, Sacta *et al.*, 2016, Gómez-Sánchez y Gómez-Sánchez, 2014).

La unión del ligando al LBD de MR y GR, genera un cambio conformacional en el receptor donde la región bisagra se dobla permitiendo que sus extremos N- y C-terminal se aproximen. Este cambio conformacional permite, por una parte, desenmascarar la señal NLS1 en la región bisagra y NLS2 en el LBD, que ayuda a la translocación de los receptores al núcleo. Por otra parte, desenmascara el sitio AF2, esencial para la unión de factores co-reguladores de la transcripción de DNA. Además, la unión del ligando al receptor hace que se disocien las chaperonas (Weikum *et al.*, 2017, Sacta *et al.*, 2016, Gómez-Sánchez y Gómez-Sánchez, 2014).

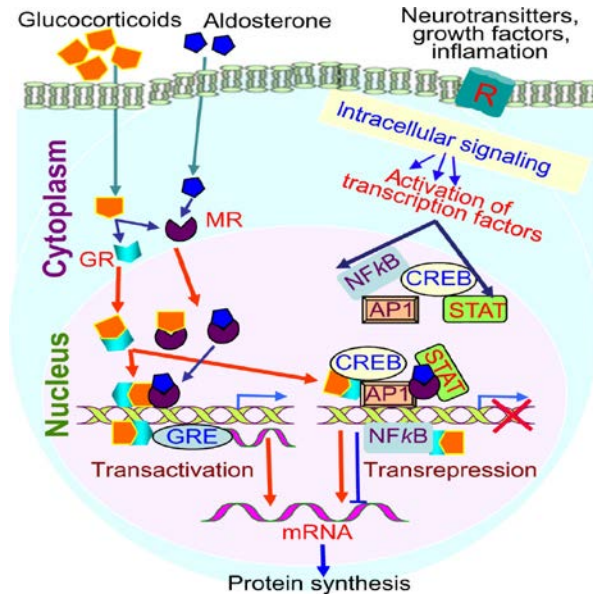


Figura 6. Esquema de los mecanismos de acción genómicos de las hormonas esteroideas mediados por GR y MR. A la izquierda se representa la transactivación, mecanismo donde los receptores, en forma de dímeros, se unen de forma directa al DNA, concretamente a la secuencia consenso denominada *Glucocorticoid response elements* o GRE en las regiones reguladoras de sus genes diana. A la derecha se representa la transrepresión, donde MR y GR, en forma de monómeros, interfieren con la actividad transcripcional de otros factores de transcripción unidos al DNA como CREB, NF- κ B, AP-1 o STAT. Tomada de Slominski *et al.*, 2014.

El ligando induce además modificaciones post-traduccionales en los receptores, incluyendo su fosforilación, y posteriormente su rápida translocación al núcleo.

Durante el proceso de TA, el DBD expone los sitios de dimerización, permitiendo la formación de homo- y heterodímeros (MR-MR, GR-GR, MR-GR). Los dímeros se unirán a las secuencias reguladoras en los promotores de sus genes diana, GREs, a través de la caja P del DBD. Estas secuencias se caracterizan por ser un palíndromo invertido separado por tres nucleótidos (5'-AGA ACA nnn TGT TCT-3'). Los dímeros reclutan factores que estabilizan su unión a los GREs y también reguladores transcripcionales, co-activadores o co-represores, por tanto, la proporción de homo- vs heterodímeros y la unión de los distintos ligandos condicionará

la respuesta transcripcional final (Weikum *et al.*, 2017, Sacta *et al.*, 2016, Gómez-Sánchez y Gómez-Sánchez, 2014, Pérez, 2011).

En el mecanismo de TR, los receptores no se unen directamente al DNA en los sitios GRE sino a otros factores de transcripción como son AP-1, NF- κ B, STATs o IRF3, de forma que inhiben su actividad. Este mecanismo es independiente de la dimerización de los receptores (Weikum *et al.*, 2017, Schäcke *et al.*, 2007).

Una vez el receptor se disocia del ligando, vuelve al citoplasma ya que deja de ser transcripcionalmente activo. Una señal de exportación nuclear, que se encuentra entre el NSL1 de la región bisagra y el DBD, regula el movimiento de MR fuera del núcleo hacia el citoplasma (Gómez-Sánchez y Gómez-Sánchez, 2014).

Muchas de las acciones anti-inflamatorias de los GCs están mediadas por la TR de monómeros de GR con las vías de señalización AP-1 o NF- κ B. En los estudios clásicos sobre los mecanismos de acción de los GCs, la TR se asociaba a su acción anti-inflamatoria y la TA se asociaba a los efectos adversos de los GCs, como la atrofia cutánea. Actualmente se sabe que la inducción transcripcional mediante TA clásica de dímeros GR de genes anti-inflamatorios como *Gilz* es también un mecanismo terapéutico relevante (Slominski *et al.*, 2014, Schäcke *et al.*, 2007).

3.2. Acciones no genómicas

Las acciones no genómicas son acciones hormonales muy rápidas, que no requieren la síntesis de proteína, y están mediadas a través de interacciones físico-químicas de MR o GR (citósolicos o unidos a la membrana) con otras vías de señalización. Estas acciones añaden complejidad y diversidad a las acciones biológicas dependientes de GCs y son específicas de tejido (Ramamoorthy y Cidlowski, 2016, Martinerie *et al.*, 2012).

Existen indicativos que apoyan la activación de MR en respuesta a Aldo fuera del núcleo. Estos mecanismos implican la interacción de MR con distintas proteínas de señalización como receptores de membrana tirosina quinasa (EGFR, VEGFR, IGF1R y otros) y el receptor de angiotensina 1. Además, MR puede interactuar con especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que pueden contribuir a su activación fisiopatológica (Meinel *et al.*, 2014). En trabajos más recientes, se ha demostrado que algunas de las acciones de Aldo son independientes de MR y son importantes en la homeostasis de la piel, como por ejemplo la inducción del gen de la elastina en fibroblastos dérmicos. El mecanismo propuesto postula que Aldo estimula c-Src, dando lugar a la fosforilación de IGF-IR, que a su vez promueve activación de PI3K/AKT, induciendo la expresión de tropoelastina (Mitts *et al.*, 2012).

Las acciones no genómicas de GR ocurren en segundos o minutos tras su activación por ligando, modulando la actividad de varias quinasas como AKT y MAPK (Ramamoorthy y Cidlowski, 2016). El grupo de Stojadinovic y colaboradores, demostró que aproximadamente un 2% de GR se localizaba en la membrana plasmática de queratinocitos asociado a la β -catenina de las uniones adherentes (Stojadinovic *et al.*, 2013).

4. La piel como sistema modelo

En mamíferos, la piel es el órgano más externo y extenso del cuerpo. Está formada principalmente por dos capas: la capa más externa, la epidermis, es un epitelio pluriestratificado compuesto mayoritariamente por queratinocitos, y la capa más interna, la dermis, formada por tejido conectivo, principalmente fibras de colágeno, y sus células mayoritarias son los fibroblastos (Figura 7). Bajo la dermis se encuentra la hipodermis formada principalmente por adipocitos (Watt, 2014, Schoepe *et al.*, 2006).

La epidermis está compartimentalizada en distintos estratos e incluye estructuras anejas: folículos pilosos, glándulas sebáceas y glándulas sudoríparas. Actúa como barrera entre el medio externo y el organismo protegiéndolo de infecciones de patógenos, la deshidratación, y diversas agresiones químicas y mecánicas (Fuchs y Horsley, 2008, Eckert, 1989). Además, los lípidos más externos se encargan de la lubricación de la piel y los pelos y el sudor participan en la termorregulación (Figura 7) (Watt, 2014).

Además de los queratinocitos y los fibroblastos, existen otros tipos celulares en la piel cuya función es importante para este órgano, y que incluyen células del sistema nervioso periférico, vasos sanguíneos, melanocitos y células del sistema inmune innato y adaptativo (Watt, 2014, Schneider, 2012).

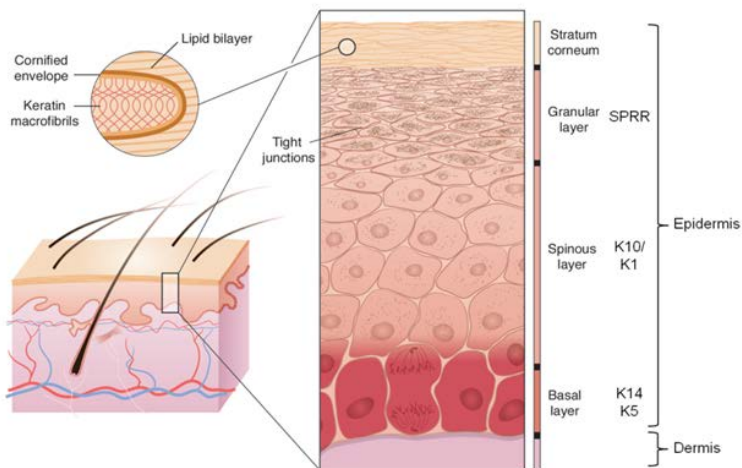


Figura 7. Representación esquemática de estructura de la piel (epidermis y dermis) y sus apéndices cutáneos. En la ampliación se representan las diferentes capas de la epidermis. Los queratinocitos, las células mayoritarias de la epidermis, forman distintas capas denominadas basal, la única con capacidad proliferativa (expresan los marcadores de proliferación K5 y K14) y suprabasales, que incluye los estratos espinoso, granular y córneo y corresponden a distintos estados de diferenciación de los queratinocitos (expresan los marcadores de diferenciación K1 y K10). El estrato córneo es el más diferenciado e importante en la competencia funcional de la barrera epidérmica gracias a su composición en queratinas, lípidos y otras proteínas. Modificada de Segre, 2006.

La epidermis se renueva de forma continua y dinámica. Los queratinocitos que se encuentran en la capa basal, la capa más interna de la epidermis, están en un estado proliferativo permanente. Estos queratinocitos están anclados a la membrana basal, la capa que separa la epidermis de la dermis, que genera distintos estímulos para que los queratinocitos de esta capa proliferen. Estos queratinocitos expresan las queratinas (K)5 y K14, que son marcadores de proliferación (Watt, 2014, Fuchs y Horsley, 2008).

Durante la diferenciación, los queratinocitos de la capa basal dejan de proliferar, pierden las uniones a la membrana basal y migran a las capas más externas llamadas capa espinosa, granular y estrato córneo (Figura 7). Durante este proceso, la expresión de las queratinas proliferativas cambia por otras queratinas y proteínas como son K1 y K10, loricrina (LOR), filagrina (FIL), involucrina (INV) y otros péptidos que son marcadores de diferenciación (Pastar *et al.*, 2014, Pérez, 2011). Además, los queratinocitos sufren cambios morfológicos, se aplanan, establecen un mayor número de contactos celulares y se estratifican (Hennings *et al.*, 1980). El estadio último de diferenciación es la diferenciación terminal, donde los queratinocitos pierden su núcleo y, finalmente, sufren un proceso especializado de muerte celular programada que da lugar a la descamación. En esta última fase, los queratinocitos sufren más cambios morfológicos adquiriendo las características de un corneocito y formando envueltas córneas; estructuras típicas del estrato córneo, que es rico en queratinas, lípidos y otras proteínas como la corneodesmosina (Schoepe *et al.*, 2006, Candi *et al.*, 2005, Eckert, 1989). El proceso de diferenciación está regulado por varias vías de señalización que se activan por diversos estímulos como el gradiente de calcio que existe en la epidermis. Este gradiente es indispensable para la diferenciación ya que muchas de las proteínas que median este proceso son proteasas y anti-proteasas dependientes de calcio (Eckert, 1989, Hennings *et al.*, 1980).

4.1. Patologías inflamatorias

Una de las características principales de las enfermedades inflamatorias de piel más comunes, psoriasis y dermatitis atópica, es una barrera epidérmica defectiva. Los daños en la barrera estimulan la producción de citoquinas incluyendo TNF- α , IFN- γ e IL-1, entre otras. Esta producción de citoquinas actúa de forma autocrina induciendo la proliferación y diferenciación de queratinocitos y también de forma paracrina y endocrina estimulando la respuesta inmune e inflamatoria local y sistémica. Estos estudios, por tanto, demuestran que la inducción de citoquinas y la hiperplasia epidérmica son respuestas intrínsecas a la disrupción de la barrera epidérmica (Segre, 2006).

La psoriasis es una enfermedad inflamatoria crónica con afecciones cutáneas caracterizadas por la formación de escamas preferentemente en zonas de flexión de las extremidades y el tronco. Afecta al 2-3% de la población y aparece en torno a la tercera década de edad (Segre, 2006).

La dermatitis atópica es una enfermedad inflamatoria crónica común caracterizada por el prurito, eczema y una hiper-reactividad a agentes ambientales. Aparece a partir de los 6 meses de vida y afecta al 15-30% de niños y 2-10% de adultos en países desarrollados, porcentaje que está en aumento (Nicolakis *et al.*, 2016, Segre, 2006).

Ambas enfermedades se deben a componentes genéticos y ambientales que contribuyen a su patogénesis. En experimentos de secuenciación de todo el genoma se ha comprobado que muchos de los genes que forman el complejo de diferenciación epidérmica (EDC) están asociados de forma común a psoriasis y dermatitis atópica (Segre, 2006). Este complejo está formado por al menos 30 genes que codifican para proteínas que constituyen y regulan la formación de la barrera epidérmica, lo cual sugiere que la función de barrera está estrechamente relacionada con las enfermedades cutáneas inflamatorias. Entre las proteínas del EDC fuertemente inducidas en las lesiones psoriáticas humanas cabe destacar

dos proteínas reguladas por calcio denominadas S100A8 y S100A9. Asimismo, la familia de *Small Prolin-Rich proteins* (SPRRs), del complejo EDC, también están frecuentemente expresadas en piel humana psoriática. Es importante señalar que se ha descrito la sobreexpresión tanto de S100A8/9 como de SPRRs en diversos modelos de ratón transgénicos con una barrera epidérmica deficiente, considerándose como una respuesta a estrés en muchos casos (Sevilla *et al.*, 2013, Segre, 2006).

4.2. Efectos adversos de los tratamientos con GCs en piel

Los tratamientos con GCs se han usado para tratar enfermedades inflamatorias durante décadas por sus efectos anti-inflamatorios y anti-proliferativos, sin embargo, el uso de los GCs de alta potencia o los tratamientos durante períodos largos de tiempo dan lugar a efectos secundarios no deseados. Algunos de estos efectos, como la osteoporosis, la diabetes, el glaucoma y la atrofia muscular son severos y a veces irreversibles. La incidencia de los efectos secundarios depende de la potencia de los GCs usados, la duración del tratamiento, la pauta de administración, las indicaciones y el individuo (Schäcke *et al.*, 2007, Schoepe *et al.*, 2006). El síndrome de Cushing, donde los niveles de GCs circulantes son elevados, recapitula los efectos de los tratamientos sistémicos con GCs (Davidovici *et al.*, 2008).

En el caso de las enfermedades cutáneas, los tratamientos con GCs pueden administrarse tópicamente, lo cual tiene la ventaja de que los efectos sistémicos se ven disminuidos, sin embargo, siguen existiendo efectos adversos locales tras tratamientos tópicos prolongados (Figura 8), siendo la atrofia cutánea uno de los más comunes (Schäcke *et al.*, 2007, Hengge *et al.*, 2006). Otros efectos secundarios son la aparición de estrías, acné, rosácea, disrupción de la barrera epidérmica, dermatitis perioral, hipopigmentación y otros (Figura 8). Además, la desensibilización que tiene lugar con tratamientos prolongados con GCs (taquifilaxis), requiere el uso

de GCs de mayor potencia y, por tanto, da lugar a efectos secundarios más severos (Hengge *et al.*, 2006).

Skin atrophy
Telangiectasia
Striae
Purpura
Stellate pseudoscars
Ulceration
Easy bruising
Masked microbial infections (tinea incognito)
Aggravation of cutaneous candidiasis, herpes, or demodex
Reactivation of Kaposi sarcoma
Granuloma gluteale infantum
Ocular hypertension
Glaucoma, cataract
Steroid rebound, steroid addiction, tachyphylaxis
Steroid acne
Perioral dermatitis
Steroid rosacea
Hirsutism
Hyperpigmentation
Hypopigmentation
Photosensitization
Rebound flare (psoriasis)

Figura 8. Tabla de los efectos secundarios producidos por tratamientos tópicos con GCs. Modificada de Hengge *et al.*, 2006.

Por estas razones, se necesitan compuestos que posean los efectos beneficiosos anti-inflamatorios e inmunomoduladores de los GCs con un menor riesgo de efectos secundarios, es decir, con un mayor índice terapéutico (IT). Un IT de 1-2 se define como una relación igual de efectos beneficiosos y adversos. Optimizar el ratio beneficio/riesgo es uno de los retos para el desarrollo de nuevos compuestos análogos de los GCs (Schoepe *et al.*, 2011, Schäcke *et al.*, 2007, Schoepe *et al.*, 2006).

4.2.1. Atrofia cutánea

La atrofia cutánea es uno de los efectos secundarios de los GCs más estudiados debido a su alta frecuencia y a su irreversibilidad. Se caracteriza por una pérdida del grosor de la piel, tanto epidérmico como dérmico, y de la elasticidad y tensión dando lugar a una piel más frágil, más permeable y más susceptible a la deshidratación consecuencia de una función de barrera alterada (Figura 9). La reducción en el grosor epidérmico está causada por una disminución en la tasa de proliferación de queratinocitos epidérmicos y queratinocitos de menor tamaño, además de la inhibición de la diferenciación terminal que da lugar a una epidermis aplanada con un estrato córneo reducido. La reducción en el grosor dérmico es consecuencia de la inhibición en la proliferación de fibroblastos dérmicos, que son los que sintetizan las proteínas de la matriz extracelular (colágeno, proteoglicanos y elastina), las cuales disminuyen su expresión y se degradan. El colágeno es el componente mayoritario de la matriz extracelular (70% del peso seco de la piel) que provee a la piel de fuerza tensora. El colágeno tipo I es la forma de colágeno principal (80%) y está codificado por los genes *COL1A1* y *COL1A2* en humanos. La elastina es la principal proteína de las fibras elásticas que, como su nombre indica, da elasticidad a la piel (Figura 9, Schoepe *et al.*, 2011, Schoepe *et al.*, 2006, Hengge *et al.*, 2006).

Por tanto, las características básicas que se estudian para determinar la atrofia cutánea son la proliferación de los queratinocitos y los fibroblastos y la inhibición de colágeno tipo I. Estos parámetros pueden estudiarse *in vitro* en modelos de piel en tres dimensiones o en queratinocitos y fibroblastos en cultivo, tanto humanos como de ratón.

Las características de la atrofia cutánea inducida por GCs se recapitulan en la piel envejecida debido a que los niveles de GCs aumentan con la edad (Schoepe *et al.*, 2006).

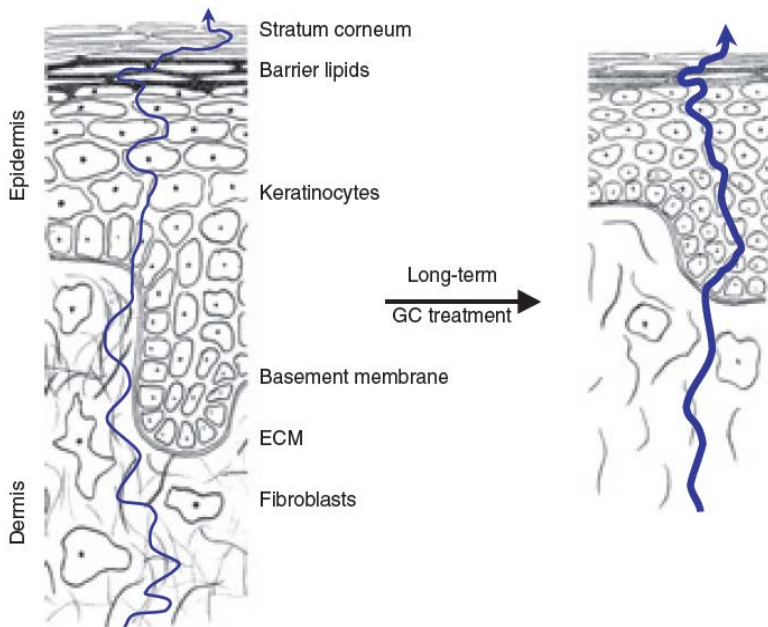


Figura 9. Efectos del tratamiento tópico con GCs. La proliferación de queratinocitos y fibroblastos y la síntesis de proteínas de la matriz extracelular (*extracellular matrix*, ECM) está inhibida por el tratamiento continuado con GCs, lo que resulta en la pérdida de la resistencia y elasticidad de la piel. Los GCs también reducen el grosor del estrato córneo y la barrera de lípidos intercelulares dando lugar a la pérdida de la función de barrera epidérmica ejemplificada por la pérdida de agua transepidérmica (flecha azul). Tomada de Schöepe *et al.*, 2006.

4.2.2. Retraso en el cierre de heridas

Otro de los efectos secundarios de los tratamientos continuados con GCs es el retraso en el cierre de heridas (Figura 10). Este problema puede ocurrir en otras situaciones como en la vejez o en situaciones patológicas relacionadas con exceso de GCs como en pacientes diabéticos o con síndrome de Cushing. Mejorar la cicatrización cutánea en estos pacientes y, por tanto, su calidad de vida, es de gran interés ya que limitaría el riesgo de infección asociado a lesiones ulcerosas crónicas (Gurtner *et al.*, 2008).

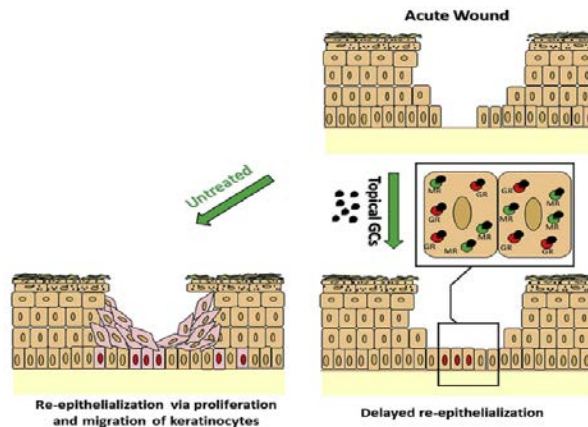


Figura 10. Tras una herida aguda, la proliferación y migración de los queratinocitos se encarga de restaurar el tejido mediante un proceso coordinado llamado re-epitelización. El tratamiento con GCs retrasa el cierre de heridas debido a la activación de GR; el papel de MR en este proceso no se conoce en detalle. Modificada de Stojadinovic *et al.*, 2016.

La cicatrización cutánea es un proceso biológico complejo mediado por distintas vías de señalización que coordinan distintos procesos celulares para, en última instancia, restaurar la función de barrera de la piel. Comprende distintos estadios bien regulados espacio-temporalmente: la inflamación inicial y la activación de la cascada de coagulación, la formación de tejido nuevo y la remodelación del mismo. Cualquier cambio en este proceso dará lugar a una cicatrización anómala; por ejemplo, la respuesta inflamatoria es esencial en los primeros estadios del proceso pero si persiste puede ser perjudicial (Vukelic *et al.*, 2011, Gurtner *et al.*, 2008).

Tras un daño agudo en la piel, las células inmunes (neutrófilos, monocitos y macrófagos) son reclutadas al sitio del daño para secretar distintas citoquinas (TNF α , IL-1 y IL-6) y factores de crecimiento (TGF β , KGF, EGF y otros). Las citoquinas estimulan el eje HPA para sintetizar cortisol y disminuir la inflamación de la fase inicial, como mecanismo de regulación negativa (Pastar *et al.*, 2014, Vukelic *et al.*, 2011). La síntesis de cortisol puede ser también local y puede estar modulada por los enzimas 11 β HSD1 y 11 β HSD2 (Tiganescu *et al.*, 2014, Tiganescu *et al.*, 2013).

Además, las citoquinas actúan como señal para los queratinocitos, que no sólo son importantes en mantener la homeostasis de la epidermis, sino también en restaurarla tras un daño, ya que gracias a su migración y proliferación desde los márgenes de la herida formarán la nueva epidermis ocupando el área afectada en un proceso llamado re-epitelización (Figura 11). En el proceso de migración, los queratinocitos en el borde de la herida primero deben perder las uniones célula-célula y célula-lámina basal para migrar en forma de lengua de migración, mientras que los queratinocitos adyacentes a la lengua de migración son los que deben proliferar. Los queratinocitos en migración tienen una mayor expresión de K6, K16 y K17 (Pastar *et al.*, 2014, Tiganescu *et al.*, 2014, Vukelic *et al.*, 2011).

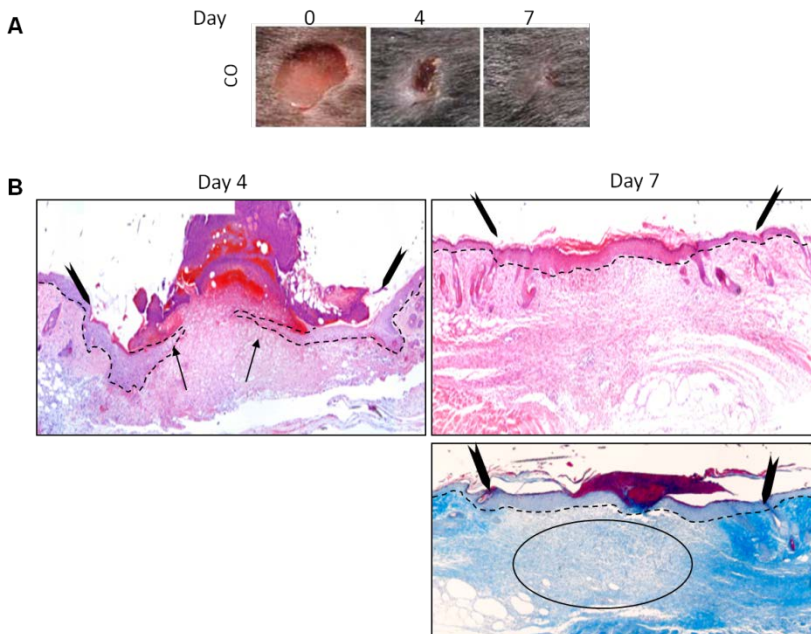


Figura 11. A. Imágenes macroscópicas del cierre de herida de un animal control durante el período indicado. B. Imágenes de H&E representativas de una herida cerrándose a día 4; las flechas gruesas señalan los márgenes de la herida y las flechas de menor grosor señalan las lenguas de re-epitelización; a día 7, la herida está completamente cerrada tras el proceso de re-epitelización y la dermis se ha remodelado, como se indica con la tinción de tricrómico de Masson (abajo, óvalo). Modificada de Sanchis *et al.*, 2012.

El retraso en el cierre de heridas causado por los GCs se debe tanto a sus efectos en queratinocitos, donde inhiben su proliferación y migración resultando en un retraso en la re-epitelización, como en fibroblastos, donde la reducción del colágeno dérmico y la atrofia dérmica son los causantes de una remodelación dérmica defectiva (Figuras 10 y 11) (Hengge *et al.*, 2006). Además, los GCs inhiben la expresión de citoquinas pro-inflamatorias y factores de crecimiento necesarios en la primera fase de la cicatrización (Sanchis *et al.*, 2012, Vukelic *et al.*, 2011, Beer *et al.*, 2000). En conjunto, los GCs dan lugar a una piel más frágil y propensa al daño que tiene como consecuencia un proceso de cicatrización anómalo susceptible de ser infectado o ulcerado (Stojadinovic *et al.*, 2016, Davidovici *et al.*, 2008).

Se ha descrito que la inhibición farmacológica o el bloqueo del enzima 11 β HSD1 en ratón previene estos efectos nocivos de los GCs, acelerando el proceso de cierre de herida (Tiganescu *et al.*, 2014, Tiganescu *et al.*, 2013).

5. Modelos animales transgénicos para estudiar la función de los receptores de GCs en piel

Se ha demostrado que el ratón sirve para modelizar diversas enfermedades cutáneas en humanos, como la dermatitis de contacto, la psoriasis, o la formación de tumores de piel no melanoma (Schneider, 2012). Existe una gran similitud genética entre ambos organismos (comparten más del 80% del genoma). Además, las condiciones controladas de estabulación y mantenimiento, el ciclo reproductivo corto y la disponibilidad de un gran número de herramientas para manipular su genoma, gametos o embriones hacen del ratón un organismo modelo con muchas ventajas; de hecho, las tecnologías para generar ratones transgénicos han permitido estudiar la función de distintas proteínas inactivando los genes que las codifican, sustituyéndolos, modificándolos o sobreexpresándolos (Schneider, 2012).

El papel de GR en piel ha sido ampliamente estudiado por nuestro grupo mediante modelos transgénicos de ratón, tanto de sobreexpresión como de inactivación (Pérez, 2011). Sin embargo, el papel de MR en piel, se había abordado en escasos artículos cuando iniciamos este proyecto. En particular, se generaron ratones con sobreexpresión del receptor MR humano en queratinocitos epidérmicos de ratón utilizando el promotor de K5 en un modelo inducible por doxiciclina (ratones K5-hMR, Sainte Marie *et al.*, 2007). Al inducir la sobreexpresión de hMR durante el desarrollo, los ratones transgénicos morían en la etapa post-natal, fenómeno que podía revertirse al tratar a la madre gestante con el antagonista de MR Canre, indicando que la letalidad era dependiente de MR. Los ratones K5-hMR presentaban una formación de barrera epidérmica prematura a día embrionario (E) 16.5. A día E18.5, los K5-hMR presentaban un fenotipo de atrofia epidérmica con un menor grosor epidérmico y menor densidad de folículos pilosos (Sainte Marie *et al.*, 2007). La proliferación no estaba alterada pero la apoptosis de los queratinocitos estaba aumentada y el ojo estaba abierto de forma prematura, debido a la ausencia de párpado (el promotor K5 también dirige la expresión del transgén al epitelio palpebral; Ramírez *et al.*, 2004).

Al inducir la sobreexpresión de hMR después del nacimiento, los ratones K5-hMR eran viables pero presentaron anomalías en el ciclo de pelo y displasia en los folículos que derivaron en una alopecia progresiva con quistes. La epidermis de estos ratones era indistinguible de los controles y tampoco se detectaron alteraciones en las vibrissas, glándulas sudoríparas y otros epitelios pluriestratificados (Sainte Marie *et al.*, 2007).

MR y GR son dos receptores cercanos evolutivamente y con una homología muy alta en su secuencia (Gómez-Sánchez y Gómez-Sánchez, 2014), por lo que es lógico que exista solapamiento en el fenotipo de sobreexpresión de MR con el de sobreexpresión de GR.

Pérez y colaboradores generaron los ratones transgénicos que sobreexpresan el GR de rata en epidermis y otros epitelios estratificados, utilizando la misma estrategia con el promotor de K5 (K5-GR; Pérez *et al.*, 2001). Estos ratones K5-GR morían pocas horas después de nacer y presentaban ciertas características comunes con los K5-hMR, como son una formación de barrera epidérmica acelerada, un grosor epidérmico menor con folículos pilosos poco desarrollados consecuencia de una menor proliferación de los queratinocitos y un desarrollo de la piel alterado (Pérez, 2011; Farman *et al.*, 2010). El ojo también estaba abierto en el nacimiento de forma prematura. La severidad de las anomalías epiteliales descritas en los ratones K5-GR era dependiente de la dosis génica, de manera que las líneas transgénicas con menores niveles de expresión (o líneas en heterocigosis) sobrevivían, permitiendo estudiar las consecuencias de la sobreexpresión de GR en piel en la edad adulta. Además, se realizaron trasplantes de piel de embriones E18.5 K5-GR con fenotipo severo a ratones inmunodeprimidos, y se observaron alteraciones en la proliferación y diferenciación de los queratinocitos epidérmicos, así como defectos en el folículo piloso que daban un pelaje menos abundante (Pérez *et al.*, 2001).

Por otra parte, el estudio de la cicatrización cutánea en los ratones K5-GR reveló un retraso en este proceso con una menor proliferación y retraso en la migración de los queratinocitos, acompañado de un menor reclutamiento de células inmunes, de forma similar a lo descrito en los tratamientos con GCs (Sanchis *et al.*, 2012, Beer *et al.*, 2000). Los efectos anti-proliferativos de GR en los ratones K5-GR están de acuerdo con los efectos anti-mitóticos de los tratamientos tópicos con GCs (Pérez, 2011).

Por otro lado, se caracterizaron las alteraciones cutáneas de ratones con inactivación generalizada de GR (GR^{-/-}), generado previamente por el grupo del Prof. Schütz, que morían perinatalmente por un fallo respiratorio y presentaban de-regulación del eje HPA, con niveles altos de ACTH y corticosterona (Cole *et al.*, 1995). El análisis de la piel de ratones GR^{-/-}

durante el desarrollo embrionario mostraba una piel frágil e inmadura a día E18.5 con menor grosor epidérmico y expresión virtualmente indetectable de distintos marcadores de diferenciación, consecuencia de una estratificación epidérmica incompleta y una mayor tasa de apoptosis (Bayo *et al.*, 2008). La falta de diferenciación terminal daba lugar a un desarrollo anormal de la piel que carecía de estrato granuloso y estrato córneo, resultando en una función de barrera comprometida. El cultivo de queratinocitos primarios de ratones GR^{-/-} reveló una mayor tasa de crecimiento concluyendo que GR regula la proliferación de queratinocitos (Bayo *et al.*, 2008).

Adicionalmente, se realizó un estudio transcriptómico para entender la regulación génica por parte de GR durante el desarrollo de la piel, comparando muestras de piel de ratones control y GR^{-/-} a día E18.5 mediante el uso de *microarrays* (Sevilla *et al.*, 2010). El análisis de este estudio reveló 442 genes expresados de manera diferencial con una sobre-representación de genes relacionados con el desarrollo de la epidermis que indicaron que GR reprime la diferenciación temprana e induce la diferenciación tardía de queratinocitos, acorde con el fenotipo de los ratones GR^{-/-} (Sevilla *et al.*, 2010).

Debido a que los ratones GR^{-/-} tienen altos niveles de GCs circulantes, es posible especular que, en ausencia de GR, éstos pueden contribuir al fenotipo observado a través de su unión a MR. Recientemente, se generó un modelo con inactivación de GR específico de epidermis (*GR epidermal knock-out*, GR^{EKO}) que ha permitido analizar la función de GR en el compartimento epitelial durante el desarrollo y en la edad adulta, prescindiendo además de las alteraciones hormonales observadas en el modelo GR^{-/-}. En este trabajo hemos usado tanto los ratones como la línea de queratinocitos immortalizada GR^{EKO}, por tanto, a continuación realizaremos una breve descripción de estos modelos.

Los ratones GR^{EKO} presentan durante el desarrollo una formación de barrera epidérmica retrasada y anormal con defectos en la diferenciación, hiperproliferación y fragilidad en el estrato córneo. En el nacimiento, la epidermis de GR^{EKO} presentaba un mayor grosor con defectos en diferenciación y una mayor deposición de queratinas en el estrato córneo que, por otra parte, estaba dañado. Los niveles de algunos marcadores de diferenciación, genes que participan en el mantenimiento del estrato córneo y genes implicados en la respuesta inmune innata estaban alterados (Sevilla *et al.*, 2013). Aproximadamente el 50% de los genes sobreexpresados, incluyendo *S100a9* y *S100a8* o *Thymic Stromal Lymphopoietin (Tslp)*, están también sobreexpresados en enfermedades cutáneas inflamatorias como la psoriasis o la dermatitis atópica (Segre, 2006). Además, la piel de ratones GR^{EKO} presentaba infiltrados de macrófagos y mastocitos, como los pacientes con dermatitis atópica, y una mayor actividad de STAT3, como los pacientes con psoriasis (Segre, 2006).

En la edad adulta, los ratones GR^{EKO} presentaban un fenotipo cutáneo leve con mayor grosor epidérmico y un porcentaje de proliferación ligeramente mayor que los controles. Sin embargo, la perturbación de la homeostasis de la piel con el tratamiento tópico con el detergente SDS o el éster de forbol PMA dio lugar a un fenotipo más exagerado comparado con los controles, con más proliferación y deposición de queratinas en el estrato córneo. El tratamiento de ratones GR^{EKO} con el GC sintético dexametasona (Dex) produjo un efecto residual en la inhibición de la proliferación o de atrofia epidérmica demostrando que los efectos anti-proliferativos de los GCs requieren GR en queratinocitos (Sevilla *et al.*, 2013). La línea de queratinocitos GR^{EKO} generada a partir de la epidermis de los ratones transgénicos adultos presentó un fenotipo de huso característico de una transición epitelio-mesénquima (*epithelial-mesenchymal transition*, EMT) parcial, con una diferenciación terminal incompleta apoyada por la falta de expresión del marcador epitelial E-cadherina, y la presencia del marcador mesenquimal vimentina (Latorre *et al.*, 2013, Moreno-Bueno *et al.*, 2009).

Estos trabajos demuestran que GR es un factor de transcripción importante en piel, tanto para el desarrollo del tejido y de una función de barrera epidérmica competente como para el mantenimiento de su homeostasis. En su ausencia, los ratones desarrollan un fenotipo análogo al descrito en enfermedades cutáneas inflamatorias. Dado que el papel de MR en piel ha sido mucho menos estudiado, y que las acciones de los GCs se ejercen a través de ambos receptores, MR y GR, hemos planteado estudios funcionales en modelos animales y celulares que nos ayuden a entender la función de MR en la fisiopatología de este tejido, así como su contribución a las acciones terapéuticas y adversas de los GCs.

Objetivos

El objetivo principal de esta tesis es entender el papel de MR en la fisiopatología de la piel. Los objetivos concretos son:

1. Análisis de la expresión de MR en piel de ratón durante el desarrollo y en la edad adulta.

2. Generación y caracterización del fenotipo en piel de los ratones con inactivación total del receptor de mineralocorticoides (*MR knock-out* o $MR^{-/-}$).

3. Generación y caracterización del fenotipo en piel de los ratones con inactivación del receptor de mineralocorticoides específica de epidermis (*MR epidermal knock-out* o MR^{EKO}).

4. Establecimiento de líneas de queratinocitos MR^{EKO} para estudios *in vitro*.

5. Estudio de la respuesta de los ratones MR^{EKO} y control a diversos protocolos de patología cutánea: dermatitis de contacto inducida por SDS, inflamación aguda inducida por PMA y cicatrización cutánea.

6. Estudio de la respuesta a GCs en ausencia de MR funcional *in vivo* (modelo transgénico), *ex vivo* (explantes de piel humana) e *in vitro* (líneas de queratinocitos MR^{EKO}). Análisis de los mecanismos moleculares en respuesta a GCs.

Materiales y métodos

1. Experimentación animal

La experimentación animal se realizó en el estabulario 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 la obtención de ratones transgénicos con inactivación de MR total (MR^{-/-}) o específica de queratinocitos (MR^{EKO}), utilizamos las líneas transgénicas K5-Cre (Ramírez *et al.*, 2004) y MR^{loxP/loxP} (Berger *et al.*, 2006).

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 de secuencias reguladoras del promotor de la queratina 5 (K5) bovino que dirigen la expresión de genes heterólogos a epitelios estratificados que incluyen epidermis y derivados epidérmicos (folículo piloso, glándulas sudoríparas, y glándulas sebáceas). Esta línea transgénica se ha utilizado con éxito en numerosos estudios para dirigir la expresión de distintos transgenes a queratinocitos (Donet *et al.*, 2008; Sainte Marie *et al.*, 2007, Pérez *et al.*, 2001). Además, las hembras gestantes que portan el alelo K5-Cre darán lugar a una descendencia con el gen de interés inactivado en todas las células, independientemente de la presencia de Cre en su genotipo, ya que la recombinasa Cre se expresa en el oocito y esta línea de transmisión “materna” de Cre equivale a la inactivación generalizada de MR en línea germinal (Ramírez *et al.*, 2004).

Los ratones MR^{loxP/loxP} (Berger *et al.*, 2006) fueron cedidos por el Profesor Günther Schütz del *Centro Alemán de Investigaciones contra el Cáncer (Deutsches Krebsforschungszentrum, DKFZ, Heidelberg, Alemania)*. En estos ratones, el exón 3 del gen *Nr3c2*, que codifica para MR, está flanqueado por secuencias loxP (Figura 12. A). La recombinasa Cre

reconoce las secuencias *loxP*, dando lugar a la delección de la secuencia que flanquean en el exón 3, originando el corrimiento en la pauta de lectura y un codón de parada prematuro que tiene como consecuencia la ausencia de función de MR.

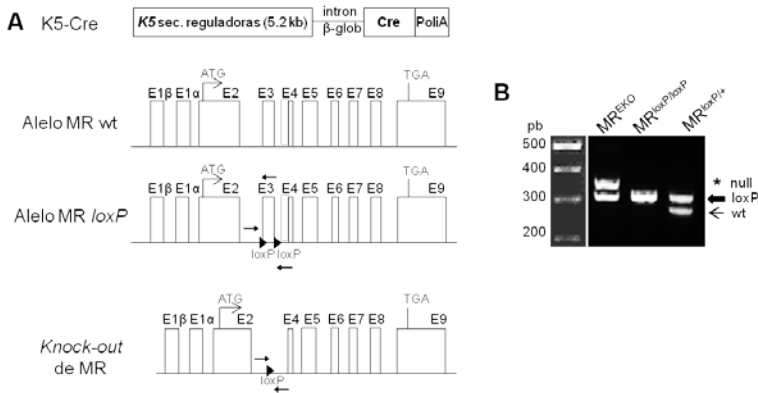


Figura 12. Esquema representativo de la inactivación de MR mediante la acción de la recombinasa Cre. A. La recombinasa Cre se encuentra bajo el control de las secuencias reguladoras de la K5 bovina. El alelo MR *loxP* contiene dos secuencias loxP flanqueando el exón 3 que son reconocidas por la recombinasa. En los ratones con inactivación epidérmica de MR, MR^{EKO}, la recombinasa Cre deletiona el fragmento de DNA contenido entre las secuencias loxP inactivando el gen. B. Genotipado representativo de la colonia de ratones mediante PCR con cebadores específicos para MR. Se muestran las tres bandas (wt, loxP y null) correspondientes a los genotipos MR^{loxP/+}, MR^{loxP/loxP} y MR^{EKO}.

Los ratones MR^{-/-} se obtuvieron mediante cruces de machos 0-Cre//MR^{loxP/+} y hembras K5-Cre^{+/-}//MR^{loxP/+} que dieron lugar a una descendencia MR^{+/+}, MR^{+/-} y MR^{-/-} debido a la expresión de la recombinasa Cre en el oocito de la madre. Por la programación de cruces planteada, obtuvimos pocos animales MR^{-/-} (25%) de forma que, tras comprobar que los ratones MR^{+/+} y MR^{+/-} tenían un fenotipo indistinguible (no mostrado) programamos cruces entre machos 0-Cre//MR^{loxP/+} y hembras K5-Cre^{+/-}//MR^{loxP/loxP} para obtener los genotipos MR^{+/-} (50%) y MR^{-/-} (50%). Los ratones MR^{+/-} se utilizaron como controles hermanos de camada para el análisis de los ratones MR^{-/-}.

Para generar los ratones MR^{EKO} (K5-Cre^{+/-}//MR^{loxP/loxP}) realizamos sucesivos cruces entre las dos líneas transgénicas. A partir de este

momento se cruzaron ratones macho K5-Cre^{+/+}//MR^{loxP/loxP} y hembras 0-Cre//MR^{loxP/loxP}, que se utilizaron de forma rutinaria para el mantenimiento de la línea. Esta programación da lugar a ratones K5-Cre^{+/+}//MR^{loxP/loxP} o MR^{EKO} y ratones 0-Cre//MR^{loxP/loxP} que se utilizaron como control.

Para obtener ratones del estadio embrionario 17.5 (E17.5) o recién nacidos (P0) se controló el día en que el macho fecundaba a la hembra mediante observación del tapón vaginal. Los ratones MR^{-/-} mueren entre los días postnatales 7 y 10 (P7-P10), lo que impide el establecimiento de la colonia (Berger *et al.*, 1998). En todos los casos, los ratones se genotiparon tomando una biopsia de cola de la que se extrajo el DNA genómico. Tras tres semanas, los ratones se destetaron separando machos y hembras en jaulas distintas. Una vez los animales cumplían 6 semanas ya eran fértiles y podían programarse cruces. El fondo genético de las líneas 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 un proveedor autorizado (Janvier Labs, Francia). En todos los experimentos utilizamos ratones hermanos de camada de ambos genotipos para minimizar diferencias debidas a la variabilidad del fondo genético.

Para la recogida de muestras de embriones y animales adultos, los animales se sacrificaron previamente mediante los métodos indicados en la legislación vigente, con la aprobación del Comité de Ética de Experimentación Animal del CSIC (proyecto SAF 2011-28115 y SAF2014-59474-R).

1.1. Obtención del DNA genómico

A partir de la biopsia de cola recogida se extrajo DNA genómico para determinar el genotipo de cada ratón mediante una PCR convencional. El tejido se digirió en una solución compuesta por Tris-HCl 1 M pH 8.0, NaCl 5 M, SDS 10%, proteinasa K 10 mg/ml y agua miliQ estéril durante 3 h a 300

rpm y 55°C en un termo-bloque Eppendorf. Pasado este tiempo se diluyó en agua miliQ estéril y se inactivó la proteinasa K durante 10 min a 95°C.

Previamente a la PCR se midió la concentración de DNA en el Nanodrop (Thermo Scientific) así como su pureza con el valor del ratio 260/280. Todas las muestras se diluyeron a una concentración entre 10 y 25 ng/μl para llevar a cabo la PCR.

1.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Una vez se diluyeron las muestras de DNA de cada ratón procedimos a realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se amplificaron secuencias concretas del gen *Nr3c2* mediante el uso de tres cebadores específicos distintos (Figura 12. A, sitios de unión indicados por flechas). La mezcla de reacción contenía: 2 μl de DNA (10-25 ng/μl), tampón de reacción sin MgCl₂ 1x (Biotools), 2 mM MgCl₂ (Biotools), 0.25 mM de dNTPs (Thermo Scientific), 0.25 mM de cada uno de los cebadores (Roche) y 0.5 unidades de polimerasa (Biotools) en un volumen final de 20 μl. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler (Eppendorf). La secuencia de los cebadores y las condiciones de PCR se detallan en la tabla 1 (Berger *et al.*, 2006).

Tabla 1. Secuencias de los cebadores y condiciones de la PCR utilizados para el genotipado de los ratones.

Gen	Cebadores	Secuencia oligonucleótidos	Condiciones	Fragmentos
MR	MR_F	CTGGAGATCTGAACTCCAGGCT	94°C 1'	285 pb
	MR_RA	CCTAGAGTTCCTGAGCTGCTGA	94°C 30"	
	MR_RB	TAGAAACACTTCGTAAAGTAGAGCT	63°C 1' 72°C 1' 72°C 5'	390 pb

Los productos obtenidos se resolvieron en un gel de agarosa al 2% que contenía 3 μl de GelRed™ 10000x (Biotium), en tampón TAE (40 mM Tris-acetato pH 8.3, 1 mM EDTA) durante 1 h a 80 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). La combinación de los tres cebadores daba lugar a tres bandas: la banda *wild type* de 290 pb, la banda *MR/loxP* de 335 pb y la banda *null* de 390 pb donde el exón 3 estaba eliminado. En un genotipado de biopsia de cola rutinario, los animales *wild type* presentaban una única banda de 290 pb, los controles (0-cre $MR^{loxP/loxP}$) la banda de 335 pb y los animales MR^{EKO} (K5-cre $MR^{loxP/loxP}$) presentaban tanto la banda de 390 pb correspondiente al exón 3 eliminado en epidermis como la banda de 335 pb, correspondiente al alelo *MR/loxP* no deleccionado en la dermis (Figura 12. A, B).

1.3. Test de funcionalidad de glándulas sudoríparas

En la introducción se ha descrito que MR tiene un papel importante en el intercambio iónico (Jaisser y Farman, 2016, Martinerie *et al.*, 2012); por tanto, quisimos testar si la inactivación de MR tenía un efecto en la funcionalidad de las glándulas sudoríparas. Mientras que en humanos las glándulas sudoríparas están presentes en toda la piel, en ratón solo se encuentran en regiones palmo-palmares (Lu y Fuchs, 2014). Realizamos un test que consiste en aplicar una solución de yodo y alcohol (2 g de yodo disuelto en 100 ml de alcohol absoluto) a los palmares de las patas traseras de ratones control y MR^{EKO} , seguida de otra solución de almidón y aceite (100 g de almidón en 100 ml de aceite de castor). En condiciones normales, el yodo y el almidón reaccionan en las glándulas sudoríparas y aparecen puntos morados en los puntos de sudoración indicando que las glándulas son funcionales (Cui *et al.*, 2012).

1.4. Seguimiento del ciclo de pelo

El seguimiento del ciclo de pelo de los ratones control y MR^{EKO} se realizó desde las 3 semanas de edad (día P21) hasta las 8 semanas (día P56). Durante las primeras semanas de edad, los ciclos del pelo están sincronizados, es decir, todos los folículos de cada ratón se comportan igual y cambian de estadio a la vez (Stenn y Paus, 2001). Para inferir el estadio

del ciclo de pelo en el que se encontraban los ratones se observó el color de la piel diariamente tras afeitar el lomo de los animales a P21. La cepa de ratón C57BL/6J/DBA/2J sólo produce pigmentación en la fase de crecimiento del pelo (Stenn y Paus, 2001), por tanto, se consideró que los ratones estaban en telogen cuando la piel era de color rosa, en anagen cuando la piel era gris-negra y en catagen cuando la piel empezaba a aclararse tras pasar por anagen.

1.5. Tratamientos tópicos

Los tratamientos tópicos se realizaron en animales adultos de entre 8 y 12 semanas comprobando siempre que estaban en la fase de descanso del pelo o telogen. 48 h antes de realizar cada uno de los tratamientos, se afeitó el lomo de los animales con una afeitadora. Excepto en los tratamientos indicados, todos los animales se afeitaron delimitando dos zonas de lomo, parte izquierda y parte derecha, separadas por una línea de pelo. En todos los casos, 1 h antes del sacrificio, los ratones fueron inyectados intraperitonealmente con una solución de 10 mg/ml de BrdU en suero salino estéril al 0.7% (10 mg de BrdU por Kg de peso del ratón) para posteriormente analizar la proliferación mediante inmunohistoquímica.

Se realizaron distintos experimentos mediante aplicaciones tópicas en el lomo de los ratones control y MR^{EKO} de 100 µl de vehículo (agua) o SDS 10% durante 5 días consecutivos; vehículo (acetona) o dexametasona (Dex, 8 µg) durante 48h (una única dosis) o una semana (3 dosis administradas en días alternos). Por último, las orejas de los ratones (lado interno y externo) se trataron con vehículo (acetona) o el éster de forbol PMA (16 µg) durante 48 h para evaluar el edema. Tras los tratamientos, los animales se sacrificaron y se recogieron las muestras para su posterior análisis.

1.6. Ensayo de cierre de herida *in vivo*

Para los ensayos de cicatrización *in vivo* utilizamos hembras control y MR^{EKO} de 10 a 12 semanas de edad (al menos 10 por cada genotipo). En

estos experimentos, se administró analgesia (Buprecare 0.1 mg/kg) y anestesia (isoflurano inhalatorio al 4%, IsoVet, B.Braun Vet Care) a los animales antes de realizar las heridas. Se realizaron 4 heridas de 6 mm de diámetro en la región dorsal de cada animal utilizando un bisturí circular o *punch*. Tras realizar las heridas se volvió a administrar analgesia. El área de las heridas se midió a diario (Image J) utilizando un plástico transparente en el que se calcó su perímetro (Sanchis *et al.*, 2012) para realizar un seguimiento del cierre hasta el día 7 post-herida, cuando los animales fueron sacrificados. A día 7, las heridas se recogieron para su análisis histopatológico.

Para calcular el porcentaje de re-epitelización se utilizó la inmunohistoquímica con K6 que tiñe la epidermis *de novo*; las heridas cerradas eran aquellas donde toda la epidermis era positiva para K6 y los bordes de la herida se delimitaron con la presencia de folículos pilosos maduros. Por tanto, el porcentaje de re-epitelización es el porcentaje de epidermis *de novo* formada con respecto a la herida inicial; dicho porcentaje se considera del 100% en las heridas totalmente cerradas.

1.7. Recogida de las muestras

Tanto la piel como las orejas se recogieron con ayuda de tijeras, pinzas y bisturí. Las muestras se fijaron en etanol 70% para su posterior análisis histopatológico o se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C para la futura extracción de RNA o proteínas.

2. Explantes de piel humana

2.1. Cultivo y tratamiento de explantes de piel humana

Mediante el cultivo de tejidos *ex vivo* se pretende mantener la integridad del mismo a partir de biopsias de piel procedentes de donaciones de individuos sanos. Esta piel se preservó en PBS con antibiótico para su

transporte al laboratorio. A partir de este momento se trabajó en una cabina de flujo laminar y las muestras se lavaron varias veces en PBS con penicilina-estreptomicina al 2% para evitar posibles contaminaciones. El tejido adiposo se eliminó diseccionándolo con ayuda de unas tijeras y unas pinzas con cuidado de no eliminar la dermis. Además, las muestras o explantes se incubaron 30 min en biseptina al 10% (Bayern) y, posteriormente, se dividieron en piezas de 6 mm de diámetro utilizando un punch. Estas piezas/ unidades se cultivaron en placas de 6 pocillos con medio DMEM 1x + GlutaMAX (Gibco, Life Technologies) conteniendo FBS Charcoal al 10% y penicilina-estreptomicina al 1%. Los explantes se cultivaron flotando en el medio con la epidermis hacia arriba a 37°C y 5% de CO₂. El medio se cambió cada dos días hasta el final del experimento.

Para inducir un daño en los explantes de piel humana, pusimos a punto un tratamiento con SDS (basándonos en el trabajo de Chung *et al.*, 2001), que imita una dermatitis de contacto incubando las muestras con SDS (15 µg/ml) durante 3 días (d).

Los explantes tratados con vehículo (agua) o SDS, se trataron adicionalmente con vehículo (etanol 0.01%), clobetasol (100 nM, durante 4 d), canrenoato (10 µM, 4 d) o un tratamiento combinado (clobetasol 100 nM y canrenoato 10 µM, 4 d) (Maubec *et al.*, 2015).

Tras los tratamientos mencionados, las muestras se recogieron para su posterior análisis por RT-qPCR en nitrógeno líquido o se fijaron en etanol 70% para su análisis histopatológico.

3. Análisis histológico

Para el análisis histológico de las muestras, la piel se fijó en etanol al 70% (Panreac) durante 48 h. Posteriormente, las muestras se procesaron en un procesador de tejidos STP 120; Myr, (Micron) donde se deshidrataron pasando por baños de etanol de concentraciones crecientes y, finalmente,

por dos baños de xileno. A continuación, se incluyeron en parafina en una estación de inclusión (EC-350; Myr, Micron). Finalmente, las muestras se seccionaron de forma seriada en un micrótopo de rotación (HM-340E; Micron) con cortes de 4 μm de grosor que fueron adheridos a portaobjetos tratados con poli-lisina (Thermo Scientific).

En todos los casos, como paso previo a la tinción o inmunohistoquímica las muestras se desparafinaron a 65°C durante 30 min seguido de dos pases de 10 min por xileno y, a continuación, se hidrataron en distintos pases de 10 min pasando por concentraciones de etanol decrecientes (100%, 90%, 70%, 50%) hasta finalizar en agua.

3.1. Tinción con Hematoxilina-Eosina

Para realizar esta tinción las muestras se desparafinaron e hidrataron y, posteriormente, se tiñeron sumergiéndolas en hematoxilina de Harris (Panreac) fijada con Bluing Reagent (Thermo Scientific) y en eosina amarilla (Panreac). Tras la tinción las muestras se deshidrataron en distintos pases por concentraciones crecientes de etanol (50%, 70%, 90% y 100%) y xileno y se montaron con la resina sintética DPX (Merck).

3.2. Análisis inmunohistoquímico

Las muestras desparafinadas se pasaron por dos baños de 10 min en etanol 100% y, posteriormente, en una solución de metanol y H_2O_2 (29:1) durante 20 min para bloquear la actividad peroxidasa endógena. A continuación, las preparaciones se incubaron en 5% suero bovino fetal (Lonza) en PBS (FBS/PBS) durante 30 min para bloquear las uniones inespecíficas del anticuerpo primario. Seguidamente, se incubó durante toda la noche (4°C) con el anticuerpo primario de interés diluido a la concentración indicada en la tabla 2. Al día siguiente se lavaron las muestras con PBS para eliminar el exceso de anticuerpo primario y se incubó con anticuerpo secundario conjugado con biotina durante 45 min a RT (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Ambos anticuerpos se

diluyeron en una solución al 1% de seroalbúmina bovina en PBS (BSA/PBS). El exceso de anticuerpo secundario se eliminó con PBS seguido de una incubación con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC, Vectastain; Vector Laboratories) durante 30 min a RT y en oscuridad. Para revelar la señal se utilizó un kit de diaminobencidina (DAB; Vector Laboratories) que actúa como sustrato para la peroxidasa. La reacción química se paró sumergiendo las muestras en agua tras determinar el tiempo de revelado visualizando las muestras en un microscopio óptico. Para contrateñir la señal, se hizo una tinción con hematoxilina y, finalmente, las muestras se deshidrataron y montaron.

La inmunohistoquímica anti-BrdU se realiza con un paso previo, en el que las muestras se incuban con HCl 1N (Merck) 40 min a 37°C tras el bloqueo con metanol y H₂O₂. Esta incubación permite la desnaturalización del DNA para la detección del BrdU. El análisis de la proliferación *in vivo* se realizó contando el número de queratinocitos basales epidérmicos interfoliculares positivos para BrdU en relación al número total de queratinocitos basales interfoliculares, y se representa en forma de porcentaje.

Tabla 2. Anticuerpos y diluciones utilizadas para inmunohistoquímica

Anticuerpo primario	Dilución primario	Compañía	Especie	Fijación del tejido	Dilución secundario
BrdU (1170376)	1/100	Roche	Ratón	EtOH 70%	1/1000
K10 (PRB-159P)	1/3000	Covance	Conejo	EtOH 70%	1/5000
K5 (PRB-160P)	1/3000	Covance	Conejo	EtOH 70%	1/5000
K6 (PRB-169P)	1/2000	Covance	Conejo	EtOH 70%	1/2000
LOR (PRB-145P)	1/1000	Covance	Conejo	EtOH 70%	1/2000
11βHSD2 (sc-20176)	1/500	Santa Cruz	Conejo	EtOH 70%	1/1000

3.3. Tinción de lípidos mediante Rojo Nilo

Para determinar la composición lipídica de la epidermis se tiñeron las muestras de piel de ratones recién nacidos con el colorante Rojo Nilo

(Sigma). Los lípidos polares se tiñen de color rojo mientras que los no polares se tiñen de verde (Fowler y Greenspan, 1985).

Las muestras fijadas en etanol 70%, se desparafinaron y rehidrataron para, posteriormente, incubarse con una solución de Rojo Nilo 1 µg/ml y DAPI (ThermoScientific) en PBS durante 5 min a RT. El exceso de reactivo se eliminó con un lavado de PBS y, finalmente, las muestras se montaron en Mowiol (Calbiochem).

Las muestras se visualizaron y fotografiaron con un microscopio vertical de fluorescencia Leica DM RXA2 acoplado a una cámara Leica DFC350 FX monocroma de alta sensibilidad.

3.4. Tinción con tricrómico de Masson

Para evaluar la cantidad de colágeno dérmico en las muestras de piel usamos esta técnica de tinción de tricrómico de Masson donde las fibras de colágeno se tiñen de azul, las queratinas y el músculo se tiñen de rosa y los núcleos se tiñen de morado.

Una vez desparafinadas las muestras se incubaron en una solución de hematoxilina férrica de Weighert (Sigma) durante 10 min. Posteriormente, se eliminó el exceso de hematoxilina con agua del grifo corriente durante 10 min y se tiñó con una solución de escarlata de Biebrich y fucsina ácida (Sigma) durante 15 min. El exceso se eliminó esta vez con agua destilada y se tiñó de nuevo con una solución de ácido fosfomolibdico y ácido fosfotúngstico (Sigma) en agua destilada (1:1:2) durante 15 min. Seguidamente se incubó con una solución de azul de anilina (Sigma) durante 15 min y ésta se lavó con agua destilada para eliminar el exceso. La tinción se fijó con ácido acético al 1% durante 1 min y las muestras se deshidrataron de nuevo para proceder a su montaje.

3.5. Visualización, documentación, cuantificación y análisis de imagen de muestras histopatológicas

Las preparaciones se visualizaron en un microscopio de campo claro Leica DM 1000 a 4x, 10x, 20x o 40x. Para la toma de imágenes se utilizó una cámara Leica EC3 acoplada al microscopio mencionado y utilizando el software LAS EZ (Leica Microsystems). El análisis de imagen se realizó usando el programa Image J.

Para cuantificar el grosor epidérmico y del edema de oreja se utilizaron fotos a 20x y a 4x respectivamente a partir de H&E. Con el programa de análisis de imagen Image J, se realizaron 10 medidas por foto de un mínimo de 5 fotos. Posteriormente, se calculó la media del grosor por cada animal y se realizaron los análisis estadísticos indicados.

Para cuantificar el porcentaje de colágeno depositado en la dermis tomamos como medida la densidad integrada de fibras de colágeno, que es el producto del área ocupada por colágeno por la intensidad media del colágeno. Estas medidas se tomaron a partir de fotografías de secciones teñidas con tricrómico de Masson (TCM). Al menos se tomaron 5 fotos por muestra siguiendo un método semi-aleatorio que excluye zonas alteradas y se midió la densidad integrada de fibras de colágeno de cada foto usando el programa Image J. En las muestras de las heridas, las imágenes fueron tomadas de la zona bajo de la herida que corresponde a la dermis recién formada.

4. Ensayo de permeabilidad de barrera con azul de toluidina

El ensayo de permeabilidad de barrera permite evaluar la madurez y por tanto, la funcionalidad de la barrera epidérmica. Durante el desarrollo embrionario, la maduración de la epidermis sigue un patrón dorso-ventral y antero-posterior (Hardman *et al.*, 1998). Si la epidermis es madura, será

impermeable al colorante azul de toluidina, quedando sin teñir. Si, por el contrario, la epidermis es inmadura el colorante penetrará en la piel tiñéndose ésta de color azul.

Este ensayo lo realizamos en embriones E17.5 que se fijan mediante inmersión en baños de metanol de concentración creciente (25%, 50%, 75% y 100%) y decreciente (75%, 50% y 25%) hasta llegar a PBS para hidratarlos de nuevo, durante 30 segundos en cada baño. Posteriormente, los embriones se tiñeron en una solución de azul de toluidina al 1% en agua durante 1 min y se pasaron a PBS pH 7.4 para eliminar el exceso de colorante. Los embriones se fotografiaron en una lupa Leica MZ 1125 para poder analizar posibles diferencias en el patrón de maduración epidérmica entre los ratones control y transgénicos.

5. Generación y caracterización de líneas de queratinocitos inmortales

5.1. Generación de las líneas de queratinocitos

Una muy buena herramienta utilizada *in vitro* son las líneas celulares de queratinocitos inmortales generadas a partir de la epidermis dorsal de ratones control y líneas transgénicas. La línea GR^{EKO} se describió previamente (Sevilla *et al.*, 2013) y la línea MR^{EKO} se describe en este trabajo. Para generar estas líneas, se utilizaron en todos los casos ratones hembra de 8 semanas de edad del genotipo deseado. Tras su sacrificio y afeitado post-mortem, se recogió la piel dorsal, que se desinfectó sumergiéndola en betadine. Posteriormente, con ayuda de un bisturí se eliminó la grasa y la piel se estiró en una placa Petri con la dermis hacia abajo para tratarla con 1 ml de tripsina 0.25% (Sigma) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, la epidermis se separó de la dermis con ayuda de material quirúrgico y se troceó en medio de cultivo de queratinocitos (ver tabla 3) para intentar disgregar los mismos. Posteriormente, los

queratinocitos se filtraron en un filtro de 100 mm de diámetro para eliminar trozos grandes de tejido y se centrifugaron durante 5 min a 1400 rpm. Los queratinocitos ya disgregados se sembraron en frascos T75 previamente tratados con colágeno I que contenían fibroblastos 3T3 J2 (*feeders*) tratados con mitomicina C (Sigma) para parar su proliferación. Los queratinocitos se cultivaron a 32°C y un 5% de CO₂ cambiando el medio cada 48h (Latorre *et al.*, 20013). En los primeros pases, los queratinocitos se cultivaron hasta alcanzar subconfluencia y se dividieron 1:1, posteriormente, algunos de ellos adquieren mutaciones de forma espontánea que hace que se inmortalicen. Para realizar el pase de queratinocitos, primero se eliminaron los fibroblastos utilizando Versene (EDTA 0,02%, Biowest) durante 5 min a 37°C, y después, se despegaron los queratinocitos usando tripsina-EDTA 1x (Biowest) durante 5 min a 37°C, se resuspendieron en medio de queratinocitos, se contaron usando un hemocitómetro y se sembraron en un frasco con colágeno y fibroblastos tratados con mitomicina C. Los cultivos se documentaron fotográficamente utilizando un microscopio invertido de contraste de fases Zeiss Axiovert 25 (objetivo 10x) y una cámara Canon.

Tabla 3. Composición del medio de cultivo para las líneas de queratinocitos de ratón.

Medio DMEM-Ham's 7.5% FBSi con bajo calcio	
3:1 DMEM (sin calcio)-Ham's F12	Thermo Fisher Scientific/Biowest
7,5% Suero Bovino Fetal inactivado	Biowest
0.35 mM CaCl ₂	
0.18 mM Adenina	Sigma
2 mM glutamina	Biowest
5 µg/ml Insulina	Sigma
10 ⁻¹⁰ M Toxina colérica	Sigma
10 ng/ml EGF	Perprotech
100 u/ml Penicilina	Biowest
100 µg/ml estreptomina	Biowest
0.25 µg/ml anfotericina B	Biowest

Para el mantenimiento de los fibroblastos se utilizó un medio convencional de fibroblastos (ver tabla 4). Para realizar los distintos pases

una vez alcanzada la confluencia se utilizó tripsina-EDTA 1x para despegar las células del frasco T75.

Tabla 4. Composición del medio de cultivo para la línea de fibroblastos 3T3 J2.

Medio DMEM	
DMEM con calcio	Biowest
10% Suero Bovino	Biowest
100 u/ml Penicilina	Biowest
100 µg/ml estreptomicina	Biowest
0.25 µg/ml anfotericina B	Biowest

5.2. Ensayo de proliferación

Para medir la proliferación de las líneas celulares de queratinocitos establecidas utilizamos el kit *CellTiter 96 @ Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay Reagent* (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, el reactivo MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium inner salt) se añadió al medio de cultivo de las células y, tras una incubación de 3 h a 37°C, dio lugar a un producto con color, formazan, que se midió a una absorbancia de 490 nm en el espectrofotómetro Victor² (Perkin Elmer Wallac). La cantidad del producto medida por la A_{490nm} fue directamente proporcional al número de células vivas en cultivo.

Para realizar el ensayo sembramos las células en placas de 96 pocillos (cuatro pocillos por cada línea y condición) y realizamos el seguimiento de su crecimiento durante 7 días midiendo la A_{490nm} a día 0, 3, 5 y 7.

5.3. Análisis de diferenciación

Para inducir la diferenciación de los queratinocitos de ratón en cultivo, incubamos las células con 1.2 mM de $CaCl_2$ (en lugar de 0.35 mM) durante 72h simulando el gradiente de calcio de la epidermis para poder detectar los cambios morfológicos (Hennings *et al.*, 1980). Posteriormente, se

recogieron las células en TRIzol para la extracción de RNA y análisis de la expresión génica. Como controles, utilizamos las células no diferenciadas cultivadas en medio normal (CaCl_2 0.35 mM) recogidas a tiempo 0 h. Los cambios morfológicos se documentaron fotográficamente.

5.4. Ensayo de cierre de herida *in vitro*

Una vez alcanzada la confluencia, los queratinocitos control y MR^{EKO} se trataron con mitomicina C (10 $\mu\text{g/ml}$, Sigma) durante 1 h para parar la proliferación celular. A continuación, se realizaron las “heridas” o “*scratch*” con una punta blanca estéril y los cultivos se fotografiaron a distintos tiempos (0, 4, 8, 24, 30, 36 y 48 h) para cuantificar el área de la placa no cubierta por células y evaluar así la cinética de migración de los queratinocitos. Para calcular el porcentaje de cierre de herida *in vitro*, se dividió el área no ocupada por queratinocitos con respecto al área a tiempo 0 h, obteniendo el porcentaje de herida abierta. Este resultado se restó al 100% y obtuvimos el porcentaje de cierre de herida. El porcentaje del 100% representa heridas totalmente cerradas.

5.5. Transfección con lipofectamina

Para introducir DNA exógeno a las líneas de queratinocitos en cultivo se llevó a cabo una transfección usando lipofectamina 2000 (Invitrogen) utilizando células con una confluencia de alrededor del 70-90%. Las construcciones utilizadas incluyen los plásmidos HA-MR (pCDNA4-HA-MR, Aguilar-Sánchez *et al.*, 2012), pcDNA4-GFP-MR (cedido por el grupo de Diego Álvarez), pcDNA3.1-HA-GR (generado en el laboratorio) o pCDNA4 (Thermo Fisher) y/o los distintos *reporter* luciferasa (GRE-luc (pGRE2EIB-Luciferase), Necela y Cidlowski, 2004; NF- κ B-luc (pGL3-NF- κ B-5x-Luciferase), Torres y Watt, 2008) junto con el control interno *renilla* (pRL-SV40, Promega).

Para las transfecciones, se siguieron las instrucciones del proveedor: brevemente, una vez formados los complejos DNA-lipofectamina, se

añadieron al medio de cultivo gota a gota. Las células se incubaron durante 5 h a 37°C para permitir la entrada del DNA al interior de la célula, y se cambió el medio a medio normal de queratinocitos o medio sin hormonas esteroideas según los requerimientos del experimento.

5.6. Inmunofluorescencia

Para analizar la expresión y localización celular de los marcadores indicados mediante inmunofluorescencia, los queratinocitos crecieron en cubreobjetos de cristal incubados previamente con colágeno para facilitar la adhesión de las células. Una vez realizados los tratamientos indicados, las células se fijaron con PFA 4% durante 10 min a RT y, posteriormente, se lavaron con PBS 1x varias veces. Para permeabilizar las células, éstas se trataron con Tritón X-100 0.2% en PBS durante 5 min y se lavaron de nuevo con PBS 1x. Seguidamente se incubaron con una solución de bloqueo (suero de burro 5% y BSA 0.5% en PBS) durante 1 h a RT y, transcurrido ese tiempo, se incubaron con el anticuerpo primario (ver tabla 5) diluido en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C.

Al día siguiente se eliminó el exceso de anticuerpo primario lavando con PBS varias veces y se incubó con el anticuerpo secundario (ver tabla 5) y DAPI 1x durante 1 h a RT. De nuevo, el exceso de anticuerpo secundario se eliminó lavando varias veces con PBS y una vez con agua. Para su visualización, los cubres se montaron en portas utilizando el medio de montaje mowiol (Calbiochem). Las muestras se visualizaron y fotografiaron en un microscopio confocal Espectral Leica TCS SP8 utilizando el objetivo de 40x. Las imágenes son las proyecciones máximas de varias capas en el plano Z.

Tabla 5. Anticuerpos utilizados en inmunofluorescencia.

Anticuerpo primario	Dilución	Compañía	Especie
HA.11	1/1000	Covance	Ratón
GR-1004	1/200	Santa Cruz	Conejo

GFP ab290	1/2000	Abcam	Conejo
-----------	--------	-------	--------

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

5.7. Proximity Ligation Assay (PLA)

El protocolo de Proximity Ligation Assay (PLA, Sigma) se utiliza para detectar la interacción entre proteínas, además de su localización subcelular y se ha demostrado que detecta de forma eficiente la formación de dímeros como los que forma EGFR (Greenwood *et al.*, 2015, Gajadhar y Guha, 2010). Hemos adaptado el protocolo de la casa comercial con objeto de detectar las proteínas de interés utilizando anticuerpos primarios, cada uno de ellos generado en una especie distinta, basándonos en experimento previos (Jiménez-Canino *et al.*, 2016). Estos anticuerpos primarios, a su vez, se detectaron con anticuerpos secundarios específicos para cada especie, conjugados con colas de oligonucleótidos complementarias de tal modo que, si ambas proteínas están interaccionando, estarán tan cerca que permitirán la unión de las colas de oligonucleótidos. Tras esta unión, se realiza una reacción de ligación y amplificación. Al DNA se le une un fluoróforo que será el que se visualice en un microscopio de fluorescencia indicando la interacción (Figura 13).

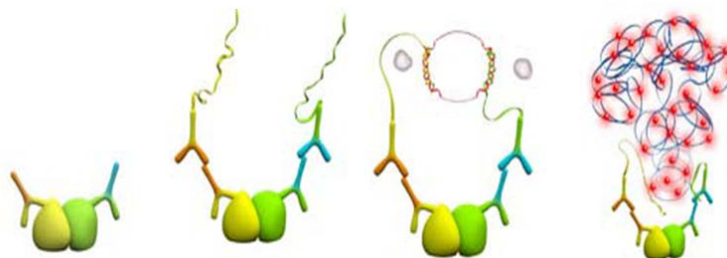


Figura 13. Esquema explicativo del protocolo *Proximity ligation assay* (PLA). Para detectar la interacción entre dos proteínas se usan anticuerpos primarios específicos de cada una de ellas. Éstos se detectan con anticuerpos secundarios conjugados con una cola de oligonucleótidos complementaria. Las colas se unen y se realiza una ligación

seguida de una amplificación; tras el proceso, al DNA amplificado se le une un fluoróforo para poder detectar la interacción mediante microscopía. Modificada del manual del kit PLA Sigma.

En este caso, para detectar la interacción de MR y GR en queratinocitos utilizamos una línea de queratinocitos generada en el laboratorio deficiente para ambos receptores (datos sin publicar). Crecimos estas células en cubreobjetos de vidrio y las transfectamos con las construcciones GFP-MR y HA-GR a una ratio 1:1. Los anticuerpos primarios utilizados deben ser específicos de cada proteína y detectarse por inmunofluorescencia. Para poner a punto la técnica, por tanto, realizamos una inmunofluorescencia con los anticuerpos primarios anti-HA y anti-GFP.

Como control positivo utilizamos la detección de dímeros MR (construcciones HA-MR y GFP-MR) anteriormente descrita, tras un tratamiento de 16 h con aldosterona 10 nM (Jiménez-Canino *et al.*, 2016). La detección de la interacción de MR y GR se probó en respuesta a un tratamiento con Dex 16 h. Pasado el tiempo de tratamiento, fijamos las células en PFA 4% durante 30 min y eliminamos el exceso lavando con PBS 1x varias veces con agitación. Posteriormente, permeabilizamos los queratinocitos tratando con tritón X-100 al 0.2% durante 5 min y lavamos con PBS 1x de nuevo. Para el bloqueo utilizamos la misma solución de bloqueo utilizada en la inmunofluorescencia (ver apartado 5.6) incubando las muestras durante 1 h a 37°C en una cámara húmeda y, seguidamente, incubamos los cubres con los anticuerpos primarios (ver tabla 6) diluidos en la solución *Antibody Diluent* del kit durante toda la noche a 4°C.

Tabla 6. Anticuerpos primarios utilizados en PLA.

Anticuerpo primario	Dilución	Compañía	Especie
HA.11	1/500	Covance	Ratón
GFP ab290	1/2000	Abcam	Conejo

Al día siguiente, se lavó el exceso de anticuerpo primario con el tampón de lavado A y se incubó con los anticuerpos secundarios contra

conejo y ratón a la concentración indicada por el kit. A la solución se le añadió el DAPI a 1x y se incubaron las muestras 1 h a 37°C en una cámara húmeda. El exceso de solución se eliminó lavando con tampón de lavado A y se procedió a la reacción de ligación como se indica en el protocolo incubando la solución de ligación con ligasa durante 1 h a 37°C. Tras este paso, se lavaron las muestras de nuevo con tampón de lavado A y se incubaron con una solución de amplificación con la polimerasa durante 100 min a 37°C. Las muestras se lavaron con tampón de lavado B como indica el protocolo del kit y se procedió al montaje de las mismas en medio Mowiol, como en la inmunofluorescencia. Las muestras se visualizaron y fotografiaron en un microscopio vertical Leica DM RXA2 acoplado a una cámara Leica DFC350 FX monocroma de alta sensibilidad utilizando el objetivo de 40x.

Como controles negativos se tomaron las células transfectadas con sólo una de las construcciones y se realizó el mismo protocolo, donde no debíamos ver señal de interacción.

5.8. Tratamientos de queratinocitos en cultivo

Las líneas celulares indicadas se trataron con PMA 100 nM, Dex 100 nM durante 3 h para el aislamiento de RNA. En todos los casos en los que se trató con Dex, los queratinocitos se incubaron al menos 16h antes del tratamiento con medio de queratinocitos convencional (ver tabla 3) tratado con charcoal para eliminar los esteroides.

Para los ensayos de luciferasa, las células se trataron con PMA 100 nM durante 6 h para detectar la señal NF- κ B-luc y con Dex 100 nM durante 5 h para detectar la señal GRE-luc. En los experimentos de tratamiento con eplerenona (Eple) 10 mM, las células se pre-incubaron 16h con este compuesto, y después se trataron con V, Dex, Eple o Dex+Eple durante 5 h adicionales.

Para los experimentos de ChIP-qPCR, los queratinocitos se trataron con Dex 100 nM o Aldo 3 nM durante 2 h.

Para visualizar la translocación nuclear tanto de MR como de GR en presencia de Dex mediante inmunofluorescencia, las células se trataron con Dex 100 nM durante 1h.

Por último, para detectar interacción entre ambos receptores con la técnica de PLA, los queratinocitos se trataron con Dex 100 nM o Aldo 10 nM durante 16h (ver apartado 5.7).

5.9. Análisis de activación transcripcional mediante ensayo de luciferasa

Para los ensayos utilizando *reporters* luciferasa sembramos las células control, MR^{EKO} y GR^{EKO} en placas de 24 pocillos. Una vez alcanzada una confluencia del 70-90% realizamos una transfección con lipofectamina (ver apartado 5.5) de los plásmidos del *reporter* de estudio *FireFly* luciferasa, el control basal pRL-SV40 *Renilla* (Promega) y las construcciones de interés en los casos indicados. La señal detectada correspondiente a la *FireFly* luciferasa, en nuestro caso, está asociada a la activación transcripcional a través de secuencias GRE o NF-κB; la señal detectada correspondiente a *Renilla* sirve como control de transfección ya que está asociada a la cantidad de plásmido transfectado en las células.

Al día siguiente se trataron las células con PMA, Dex o Eplerenona+Dex (como se indica en el apartado 5.8) y se procedió a la detección y análisis de la señal del *reporter* utilizando el kit *Dual-Luciferase® Reporter Assay System* (Promega) según el protocolo del fabricante. Muy brevemente, se lisaron las células, los lisados se transfirieron a placas blancas opacas de 96 pocillos y a cada pocillo se le añadió el reactivo del kit *LAR* que sirve como sustrato de la *FireFly* Luciferasa. La señal lumínica generada se registró en el luminómetro Victor² (Perkin Elmer Wallac). Seguidamente, a cada muestra se le añadió el reactivo del kit *Stop&Glo* que paró la reacción de luminiscencia llevada a cabo por la luciferasa y sirvió a su vez como sustrato de la *Renilla*. De nuevo la señal lumínica se registró en el luminómetro Victor².

Para calcular la actividad de cada reporter luciferasa analizamos los datos de la siguiente forma: a cada valor de luminiscencia correspondiente a luciferasa o renilla se le restó el valor correspondiente a un control negativo no transfectado que indica el valor de fondo. Los valores corregidos obtenidos de luciferasa se referenciaron a los de renilla (luciferasa/renilla) y se normalizaron a los controles sin tratar en cada caso.

6. Análisis de la expresión de proteínas y *western blot*

Para el análisis de la expresión de proteínas procedimos a la extracción de las mismas, cuantificación y posterior separación por peso molecular por SDS-PAGE.

6.1. Extracción de proteínas a partir de tejido

El primer paso en la extracción de proteínas a partir de tejido es la homogeneización del mismo. En el caso de la piel, el método más sencillo y efectivo es el uso de un mortero con el que pulverizamos las muestras utilizando siempre nitrógeno líquido para mantenerlas en frío. Una vez homogeneizado el tejido, lo resuspendimos en buffer C (HEPES 20 mM pH 7.9, NaCl 0.4 M, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM y 25% de glicerol) al que añadimos DTT 0.1 M e inhibidores de proteasas y fosfatasa 1x (complete Mini EDTA-free y PhosStop, Roche). Para lisar las células realizamos tres ciclos de congelación-descongelación en nitrógeno líquido y a 37°C respectivamente. Seguidamente, añadimos el detergente IGEPAL al 1% e incubamos las muestras en hielo durante 15 min, tras los que las centrifugamos durante 20 min a 10000 rpm y 4°C. Tras recoger el sobrenadante donde estaban las proteínas medimos la concentración de las muestras usando el reactivo Bradford (BioRad) y una recta patrón de seroalbúmina bovina (BSA) de concentraciones conocidas. La reacción colorimétrica la cuantificamos en el espectrofotómetro Victor² (Perkin Elmer Wallac) midiendo la absorbancia a 590 nm.

6.2. Extracción de proteínas a partir de células

Para la extracción de proteínas a partir de células, éstas se lavaron con PBS, se rasparon y resuspendieron en tampón RIPA (radioimmunoprecipitation assay o ensayo de radioinmunoprecipitación) que contenía NaCl 150 mM, IGEPAL 1%, desoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1% y Tris-HCl 50 mM pH 8.0, además de inhibidores de proteasas y fosfatasas 1x (complete Mini EDTA-free y PhosStop, Roche). Posteriormente, se incubaron en hielo durante 15 min y se centrifugaron a máxima velocidad durante otros 15 min a 4°C. El sobrenadante se recogió y se cuantificó en el espectrofotómetro Victor² (Perkin Elmer Wallac) utilizando, de nuevo, una recta patrón de BSA. En este caso, como el tampón de lisis contiene SDS utilizamos el kit BCA (ThermoScientific) que se mide a una absorbancia de 562 nm.

6.3. Western Blot

Las proteínas (30 µg) en tampón de carga Laemmli (SDS 8%, 2-β mercaptoetanol 5%, Tris-HCl 200 mM pH 6.8, azul de bromofenol 0.04% y glicerol 40%) se desnaturalizaron (5 min a 95°C) y se migraron en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, ver composición en la tabla 7) al 8%. Se utilizó un marcador de peso molecular (*Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder*, Thermo Scientific, 10 µl por minigel) para estimar el peso molecular relativo de las proteínas.

Tabla 7. Composición de los geles de poliacrilamida

Gel de concentración (5%)		Gel de separación (8%)	
H ₂ O	1.46 ml	H ₂ O	2.65 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 ml
SDS 10%	20 µl	SDS 10%	50 µl
APS 10%	20 µl	APS 10%	50 µl
TEMED	2 µl	TEMED	5 µl

Las muestras se corrieron durante 2-3 h con un voltaje constante de 80 V en una fuente Power Pac 3000 (BioRad).

Posteriormente, las muestras se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Amershan Protan Premium 0.45 μm , GE Healthcare) usando el tampón de transferencia (Tris 50 mM, Glicina 40 mM, SDS 0.04% y metanol 20%) y el equipo de transferencia semi-seco *Trans Blot SD Semi-dry Transfer Cell* (BioRad) a 80 mA por minigel durante 1 h 15 min. Para comprobar que la transferencia se había realizado correctamente y que la carga era similar en todas las muestras, teñimos las membranas con rojo Ponceau-S 0.1% (Sigma) y ácido acético glacial 5%.

Para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos a las membranas, éstas se bloquearon con leche desnatada en polvo al 5% en PBS 1x y Tween-20 0.1% (Sigma) a RT en agitación. Una vez realizado el bloqueo, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente a la concentración indicada (ver tabla 8), diluido en la misma solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Para eliminar el exceso de anticuerpo primario y evitar señal inespecífica se realizaron 3 lavados de 10 min con PBS-Tween-20 0.1 % siempre en agitación y, posteriormente, se incubó con el anticuerpo secundario necesario diluido en la misma solución de bloqueo (ver tabla 8) durante 1 h a RT. Tras esta incubación, se realizaron otros 3 lavados de 10 min con PBS-Tween-20 0.1 %. En este caso, el anticuerpo secundario utilizado está conjugado con la peroxidasa para, posteriormente, detectar la señal específica en el revelado. Para el revelado, las membranas se incubaron con una solución *Enhanced Chimioluminescence* (ECL 2 de Pierce, ThermoScientific) y la señal se detectó con el equipo ImageQuant™ LAS 4000 mini (GE Healthcare).

La cuantificación de la señal correspondiente a la expresión de cada una de las proteínas se realizó utilizando el programa Image J. Los resultados se relativizaron a los controles de carga actina o tubulina o, en el caso de las proteínas fosforiladas, a las proteínas totales.

Tabla 8. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en Western Blot

Anticuerpo primario	Dilución	Compañía	Especie
MR (ab64457)	1/1000	Sigma	Conejo
GR (sc. 1004)	1/1000	Santa Cruz	Conejo
pGR (Ser211) (#4161)	1/1000	Cell Signaling	Conejo
HA.11(# MMS-101P)	1/1000	Covance	Ratón
S100A9	1/500	R&D Systems	Conejo
p-STAT3 (Tyr705) (#9145)	1/1000	Cell Signaling	Conejo
STAT3 (#9132)	1/1000	Cell Signaling	Conejo
Actina (A-2066)	1/1000	Sigma	Conejo
Tubulina (clon DM1A)	1/4000	Sigma	Ratón

Anticuerpo secundario	Dilución	Compañía
anti-conejo HRP	1/1000	GE Healthcare
anti-ratón HRP	1/1000	GE Healthcare

Para poder reutilizar la membrana, eliminamos los anticuerpos utilizando una solución de *stripping* (SDS 2%, Tris-HCl 62.5 mM y 2- β mercaptoetanol 0.7%) incubando las membranas con esta solución durante 20 min a 55°C.

7. Análisis de expresión génica

7.1. Extracción de RNA

El RNA, tanto de muestras de tejido como de células, se extrajo utilizando *TRIzol Reagent* (Invitrogen). Las muestras de piel u otros tejidos se homogeneizaron en *TRIzol* de forma previa a su extracción usando un Polytron durante 1 min a máxima potencia. Posteriormente, y para eliminar los restos de tejido, las muestras se centrifugaron durante 10 min a 10000 rpm y 4°C y se recogió el sobrenadante en un nuevo tubo. En la extracción a partir de células, éstas se rasparon y recogieron en 1 mL de *TRIzol* y se pasaron a un tubo. A partir de este punto ambos protocolos son idénticos.

Las muestras se incubaron 5 min a RT y, seguidamente se les añadieron 100 μ l de BCP (1-Bromo-3-chloropropane, Sigma). La mezcla se agitó vigorosamente durante 15 segundos y se incubó durante 10 min a RT, posteriormente, se centrifugaron durante 15 min a 11400 rpm y 4°C. Tras esta centrifugación la mezcla queda dividida en dos fases. La fase acuosa o transparente (superior), donde está el RNA, se recogió en un tubo nuevo con cuidado de no coger la interfase de proteínas y se mezcló con 500 μ l de isopropanol por inversión. Esta mezcla se incubó 10 min a RT y se centrifugó durante 10 min a 11400 rpm y 4°C. Tras observar el pellet y descartar el sobrenadante, el RNA se lavó dos veces con 1 ml de etanol 75% diluido en agua libre de nucleasas. Tras el último lavado se eliminó el etanol y se dejó secar el pellet en una campana de extracción a RT durante 10 min para diluirlo en agua libre de nucleasas y resuspenderlo bien en un termobloque a 55°C durante 10 min y 300 rpm. La concentración de RNA y la ratio A260/A280 se determinaron usando NanoDrop.

7.2. Síntesis de DNA complementario (cDNA)

Para la síntesis de DNA de la cadena complementaria del RNA aislado (cDNA) realizamos una reacción de transcripción reversa a partir de 1 μ g de mRNA. Como cebador se utilizó 1 μ l de oligo dT (Thermo Scientific) que se incubó durante 5 min a 65°C. En hielo se añadieron 7.5 μ l de una mezcla con tampón 5x, dNTPs 10 mM, inhibidor de RNasa y transcriptasa reversa (Thermo Scientific). Ésta se incubó durante 1 h a 42°C y, seguidamente, 10 min a 70°C. El cDNA se diluyó 1/10 en agua libre de nucleasas para obtener la concentración de uso.

7.3. PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)

La reacción de PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) se llevó a cabo en un termociclador 7500 Fast (Applied Biosystems) en placas de 96 pocillos. Cada mezcla de reacción contenía 8 μ l de cDNA 1/10, 10 μ l de *FastStart Universal SYBR Green Master* (Roche) con ROX, 0.6 μ l de cada

uno de los cebadores, tanto 5' como 3', y 0.8 µl de agua libre de nucleasas para completar un volumen final de 20 µl. La secuencia de los cebadores utilizados se detalla en las tablas 9a y 9b. Como gen referencia se utilizó *Hprt1* en ratón y *RPLP0* en humano. Previo a los 40 ciclos de reacción (desnaturalización durante 15 segundos a 95°C, extensión de 1 min a 60°C) la polimerasa se activó con 20 segundos a 50°C y 10 min a 95°C.

Tabla 9a. Secuencia de los cebadores utilizados para ratón en qRT-PCR.

Gen		Secuencia oligonucleótidos
<i>Nr3c2/MR</i>	5'	GTGGACAGTCCTTTCCTACTACCG
	3'	TGACACCCAGAAGCCTCATCTC
<i>Nr3c1/GR</i>	5'	TGCTATGCTTTGCTCCTGATCTG
	3'	TGTCAGTTGATAAAACCGCTGCC
<i>Spr2d</i>	5'	TGGTACTCAAGGCCGAGA
	3'	TTTGTCCCTGATGACTGCTGAAGAC
<i>Defb1</i>	5'	CCTCATCTGTCAGCCCAACT
	3'	GTGAGAATGCCAACACCTGG
<i>Tnf-α</i>	5'	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT
	3'	GCTACGACGTGGGCTACAG
<i>Il-6</i>	5'	GATGCTACCAAAGTGGATATAATC
	3'	GGTCCTTAGCCACTCCTTCTGTG
<i>Slpi</i>	5'	TGGCACCTGGACTGTGGAAGG
	3'	CCCGTCCCTCTGGCAGACAT
<i>Ccnd1</i>	5'	CATCAAGTGTGACCCGGACTG
	3'	CCTCCTCCTCAGTGGCCTTG
<i>Col1a1</i>	5'	CTAAGGGTACCGCTGGAGAAC
	3'	GGGACCTTGTTACCTCTCTC
<i>Gilz</i>	5'	CTGTTGGCCTCGACTGCTG
	3'	GCCGAAAGTTGCTCACGAAG
<i>Hprt1</i>	5'	TCAGTCAACGGGGACATAAA
	3'	GGGGCTGTACTGCTTAACCAG

Tabla 9b. Secuencia de los cebadores utilizados para humano en qRT-PCR.

Gen		Secuencia oligonucleótidos
<i>IL-6</i>	5'	GGTACATCCTCGACGGCATCT
	3'	GTGCCTCTTTGCTGCTTTTAC
<i>COL1A1</i>	5'	GAGGGCCAAGACGAAGACATC
	3'	CAGATCACGTCATCGCACAAC
<i>RPLP0</i>	5'	AGATGCAGCAGATCCGCAT
	3'	GTTCTTGCCCATCAGCACC

El análisis de los resultados se realizó en una hoja de cálculo Excel donde se restó el valor Ct del gen de referencia del valor del gen de estudio para cada una de las muestras y así obtener el valor dCt. Se tomó el valor dCt de una muestra control como referencia, y éste se restó al resto de muestras para obtener el ddCt. A partir del valor obtenido se calculó el coeficiente RQ siguiendo la fórmula $2^{(-ddCt)}$.

7.4. Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

Los experimentos de inmunoprecipitación de cromatina se llevaron a cabo en las líneas celulares de queratinocitos control y MR^{EKO}. Éstas se sembraron en placas p100 y se crecieron hasta confluencia. Entonces, se cambió el medio a DMEM-Ham's 7.5% (ver tabla 3) conteniendo suero charcoal y se incubó durante toda la noche para, al día siguiente tratar las células con Dex o Aldo. El tratamiento se paró fijando las células y las uniones proteína-DNA con formaldehído 18.5% (concentración final 1%) durante 8 min a RT. Para neutralizar el formaldehído las células se incubaron con glicina 1 M durante 5 min a RT y se lavaron en hielo con PBS 1x frío. Posteriormente, se rasparon, resuspendieron y recogieron en PBS 1x con inhibidores de proteasas y fosfatasa 1x (complete Mini EDTA-free y PhosStop, Roche) y se centrifugaron durante 5 min a 2000 rpm y 4°C.

El pellet de células se resuspendió en tampón de lisis (ver tabla 10) con inhibidores de proteasas y fosfatasa y se incubó sobre hielo durante 10 min. Posteriormente, las muestras se sonicaron en el sonicador Bioruptor

(Diagenode) donde se sumergieron en un baño con agua a 4°C y se sonicaron a máxima potencia durante 30 min en ciclos de encendido y apagado de 30 segundos cada uno. Los 30 min se dividieron en tres rondas de 10 min separadas por un vórtex para mezclar y una centrifugación rápida. Tras sonicar, las muestras se centrifugaron durante 10 min a 13000 rpm y 6°C para eliminar el material insoluble y el sobrenadante se pasó a un tubo nuevo.

Para la inmunoprecipitación cogimos 200 µl del sobrenadante y los resuspendimos en 1.8 ml de tampón de dilución (ver tabla 10) con inhibidores de proteasas y fosfatasa. A esta mezcla se le añadieron 15 µl de bolas magnéticas conjugadas con proteína A (Dynabeads® Protein A, Invitrogen) para eliminar proteínas o DNA que se unen de forma inespecífica a la proteína A y asegurarnos de que la inmunoprecipitación será específica. Incubamos las muestras durante 2 h a 4°C en rotación y, transcurrido este tiempo, pusimos los tubos en un imán (DynaMag™-2, Invitrogen) al que se pegaron las bolas magnéticas junto con las uniones inespecíficas. El sobrenadante lo pasamos a un tubo nuevo del que, por una parte separamos el *input* (40 µl) y, por otra, separamos la muestra para realizar la inmunoprecipitación añadiendo el anticuerpo anti-GR (sc-1004, Santa Cruz) o anti-MR (sc-11412, Santa Cruz) según se indique. Cada inmunoprecipitación se incubó con 2 µg de anticuerpo durante toda la noche a 4°C y en rotación. Los *input* se guardaron a -20°C.

Tabla 10. Composición de los tampones usados en el ChIP.

Tampón de lisis	Tampón de dilución	Tampón de elución
1% SDS	0.01% SDS	1% SDS
10 mM EDTA	1.1% Triton X-100	0.1 M NaHCO ₃
50 mM Tris-HCl pH 8.1	1.2 mM EDTA	
	16.7 mM Tris-HCl pH 8.1	
	167 mM NaCl	

Tras dejar que el anticuerpo se pegase a los complejos GR- o MR-cromatina, se añadieron 25 µl de las bolas magnéticas y se incubaron durante 2 h a 4°C y en rotación para permitir la unión al anticuerpo a la proteína A y seleccionar así los complejos. Tras la incubación, los complejos unidos a las bolas se lavó con distintas soluciones de lavado: baja concentración de sales, alta concentración de sales, cloruro de litio (LiCl) y TE (ver tabla 11) con ayuda del imán.

Tabla 11. Composición de los tampones de lavado de las bolas magnéticas.

Baja concentración de sales	Alta concentración de sales	LiCl	TE
0.1% SDS	0.1% SDS	0.25 M LiCl	1 mM EDTA
1% Triton X-100	1% Triton X-100	1% IGEPAL-CA630	10 mM Tris-HCl pH 8
2 mM EDTA	2 mM EDTA	1% ácido deoxicolato	
20 mM Tris-HCl pH 8.1	20 mM Tris-HCl pH 8.1	1 mM EDTA	
150 mM NaCl	500 mM NaCl	10 mM Tris-HCl pH 8.1	

Para eluir los complejos proteína-DNA de las bolas magnéticas incubamos los inmunoprecipitados con el tampón de elución (ver tabla 10) durante 15 min a 300 rpm y 25°C y recogimos el sobrenadante en un tubo nuevo con ayuda del imán. A los *input* también se les añadió el mismo tampón de elución. A partir de este paso se trataron por igual tanto los *input* como los inmunoprecipitados.

Para revertir las uniones proteína-DNA y liberar el DNA se incubaron todos los tubos con 20 µl de NaCl 5M durante toda a la noche a 65°C. A continuación, las muestras se trataron con 30 µg de RNasa A (Sigma) durante 30 min a 37°C para eliminar el RNA, y para eliminar las proteínas, las muestras se incubaron con una mezcla de EDTA 0.5 M, Tris-HCl 1 M pH 6.5 y proteinasa K 10 mg/ml durante 2 h a 55°C.

Una vez aislado el DNA, se purificó con una solución de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) saturado con Tris 10 mM pH 8 EDTA 1mM, que se añadió y mezcló con las muestras para luego centrifugarlas durante 15 min a 1300 rpm y 4°C. La fase superior acuosa se

recogió en un tubo nuevo y se le añadió cloroformo. Tras agitar la mezcla, las muestras se volvieron a centrifugar 15 min a 1300 rpm y 4°C. La fase superior acuosa se transfirió a un tubo nuevo al que se añadieron 2 µl de glucógeno, 18.8 µl de NaCl 5M y 1 ml de etanol absoluto y se incubó durante toda la noche a -20°C.

Por último, las muestras se centrifugaron durante 30 min a 13000 rpm y 4°C para visualizar el pellet de DNA, que se lavó con etanol 70%. Tras este paso, se eliminó el sobrenadante dejando secar el pellet que se resuspendió en 100 µl de agua libre de nucleasas. Tanto los input como los ChIP se diluyeron 1/4 para usar como DNA de partida en una qPCR.

Para comprobar si GR se había unido a las secuencias reguladoras del gen *Gilz* realizamos una qPCR utilizando los cebadores específicos de la secuencia identificada por ChIP-seq (5': GGAGGGAATGCAACTGGGAG y 3': CCCCTCCCTTGAATGCTGAA; Sevilla *et al.*, 2015) siguiendo el protocolo de qPCR descrito en el apartado 6.3.

8. Análisis estadístico

Los datos experimentales se analizaron utilizando los programas Microsoft Excel e IBM SPSS Statistics 23. En las gráficas se muestran los valores de las medias \pm la desviación estándar.

Las posibles diferencias estadísticas entre dos grupos se analizaron mediante el estadístico t de Student.

Las comparativas entre más de dos grupos experimentales se analizaron mediante ANOVA de un factor. Antes de aplicar la prueba paramétrica ANOVA, los datos se normalizaron aplicando una transformación logarítmica para asegurar que las varianzas entre grupos eran iguales con la prueba de Levene. Cuando la prueba ANOVA fue significativa, se aplicó la prueba *post hoc* de Tukey para comparaciones múltiples.

Se consideraron estadísticamente significativos los valores con un p-valor menor que 0.05.

Resultados y discusión

1. Análisis de la expresión de MR, GR, 11 β HSD1 y 11 β HSD2 en desarrollo cutáneo

El desarrollo epidérmico tienen lugar durante la embriogénesis donde, a través de un proceso complejo pero bien coordinado, se obtiene un epitelio estratificado y diferenciado a partir de una monocapa de epitelio derivado del ectodermo (Liu *et al.*, 2013, Slominski *et al.*, 2012, Segre, 2006). Los GCs se sintetizan alrededor de día embrionario (E)15 de forma que participan en la maduración epidérmica y, por tanto, en la funcionalidad de la barrera epidérmica a través de GR (Sevilla *et al.*, 2013, Bayo *et al.*, 2008, Hanley *et al.*, 1998).

Los GCs pueden unirse tanto a GR como a MR (Jaisser y Farman, 2016, Gómez-Sánchez y Gómez-Sánchez, 2014) por lo que hemos querido analizar la expresión relativa de los genes *Nr3c2* (MR), *Nr3c1* (GR), así como de los enzimas que interconvierten las formas activas e inactivas de los GCs, 11 β HSD1 y 11 β HSD2 en piel. Para ello, hemos recogido muestras de piel dorsal de ratones control (0 Cre MR^{loxP/loxP}) en distintos estadios del desarrollo: estadios embrionarios (E) 15.5, 16.5, 18.5 y post-natal (P) 0, y en distintos tiempos de la edad adulta, correspondientes a la fase de crecimiento del pelo o anagen (5 semanas) y fase de descanso del pelo o telogen (8 semanas).

Nuestros datos muestran que *Nr3c2*/MR tiene un pico de expresión en piel a día E16.5, tanto a nivel de mRNA (RT-qPCR) como a nivel de proteína, que disminuye posteriormente siendo prácticamente indetectable en la edad adulta en estudios de *western blot* (Figura 14. A, B). Este patrón de expresión se diferencia del patrón en otros tejidos como son riñón, corazón y cerebro, donde MR se expresa en las últimas etapas embrionarias si bien su expresión decrece en la infancia y aumenta posteriormente en la edad adulta; en pulmón, la expresión de MR es constante a lo largo de las distintas etapas (Martinerie *et al.*, 2012). Se ha descrito que este patrón de expresión subraya la importancia de la vía de señalización de MCs en el periodo perinatal para la adaptación del individuo

desde el medio acuoso intra-uterino al medio externo (Martinerie *et al.*, 2012).

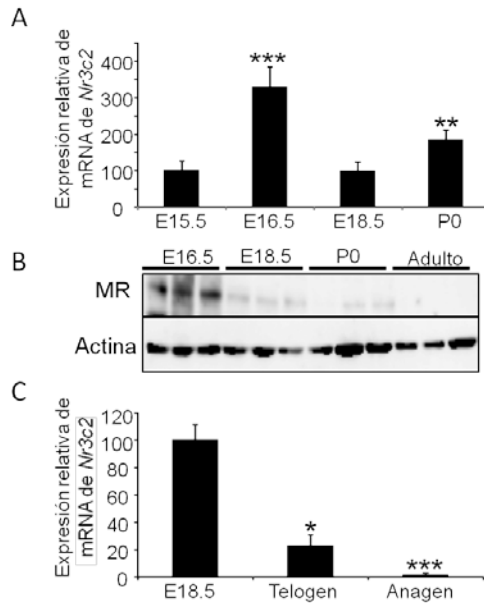


Figura 14. Expresión de MR durante el desarrollo y en la edad adulta en la piel de ratones control. A. Análisis de la expresión relativa de mRNA de *Nr3c2* en piel durante el desarrollo (E15.5 a E18.5) y en el nacimiento (P0) mediante RT-qPCR. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas con respecto a E15.5 (n=4 de cada edad). B. Análisis de la expresión relativa de MR en piel durante el desarrollo (E16.5, E18.5), P0 y adulto, mediante *Western Blot* referenciado a la actina como control de carga. C. Análisis de la expresión relativa de mRNA de *Nr3c2* en piel de ratones control E18.5 comparado con piel de ratón adulta en telogen (8 semanas) y anagen (5 semanas) mediante RT-qPCR. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas con respecto a E18.5 (n=3 de cada edad; *, p-valor< 0.05; **, p-valor<0.01; ***, p-valor < 0.001).

Un análisis más detallado de la expresión relativa de *Nr3c2* en la edad adulta indicó que durante el ciclo de pelo, los niveles de mRNA de *Nr3c2* son aproximadamente 17 veces más elevados en el estadio de descanso que en la fase de crecimiento (telogen y anagen, respectivamente; Figura 14. C). Estos datos sugieren que MR desempeña un papel en la regulación del ciclo de pelo y, más concretamente, un papel anti-proliferativo ya que existe una correlación entre niveles de expresión bajos de *Nr3c2* y el

crecimiento de los folículos pilosos. La expresión de *Nr3c2* en telogen es 5 veces menor que a día E18.5, indicando de nuevo que la expresión relativa en adulto es significativamente más baja que durante el desarrollo. Estos resultados sugieren que MR desempeña una función fisiológica en la etapa embrionaria/perinatal.

Nuestros estudios previos han mostrado que la expresión de *Nr3c1*/GR en piel aumenta alrededor de día E16.5, manteniéndose elevada en la etapa perinatal (Sevilla *et al.* 2010). Si bien los niveles de *Nr3c2* también aumentan a día E16.5, su expresión decae en la última etapa de desarrollo embrionario, en contraste con GR (Figura 15). En estudios anteriores del grupo, demostramos que existe una correlación entre la expresión de GR (*Nr3c1*) y la expresión de marcadores de diferenciación epidérmicos en etapas tempranas y tardías del desarrollo cutáneo, ejemplificadas por la disminución de *Keratin 77* (*Krt77*) y la inducción de *Small proline rich protein 2D* (*Sprr2d*) (Figura 15; Sevilla *et al.* 2010). En conjunto, el patrón de expresión de *Nr3c1* y *Nr3c2* durante el desarrollo epidérmico sugiere que ambos receptores son necesarios para la regulación de marcadores tempranos de la diferenciación mientras que ejercen funciones opuestas en la regulación de marcadores tardíos.

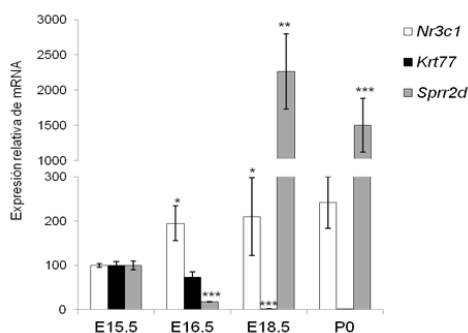


Figura 15. Análisis de la expresión relativa de mRNA de *Nr3c1*, *Krt77* y *Sprr2d* durante el desarrollo (E15.5 a E18.5) y en el nacimiento (P0) en la piel de ratones control mediante RT-qPCR. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas con respecto a E15.5 (n=4 de cada edad; *, p-valor < 0.05; **, p-valor < 0.01; ***, p-valor < 0.001).

Como se ha comentado, la activación de MR por uno u otro ligando viene determinada por la co-expresión de los enzimas 11 β HSD1 y 11 β HSD2 (Jaisser y Farman, 2016). Por tanto, resulta relevante estudiar la expresión de ambos enzimas en piel a lo largo del desarrollo. Nuestros datos de RT-qPCR muestran que ambos enzimas tienen un pico de expresión a día E18.5 en piel, que disminuye en P0 y adulto (Figura 16. A), sugiriendo que el balance de GCs activos e inactivos (y por tanto, su acceso a MR y GR) es muy importante en este estadio para el normal desarrollo de este tejido. En conjunto, estos datos apoyarían la idea de que MR tiene un papel importante a día E16.5, posiblemente en la maduración de la piel, ya que su expresión está aumentada y la disponibilidad de los ligandos está bien regulada en los estadios posteriores.

El principal enzima en este tipo de regulación pre-receptor es 11 β HSD2, que se expresa en los tejidos donde es importante que MR se active por MCs y no por GCs, inactivando los GCs e impidiendo por tanto la formación de los complejos MR-GCs (Jaisser y Farman, 2016). Hemos examinado la expresión de 11 β HSD2 en distintas etapas del desarrollo en piel de ratón mediante inmunohistoquímica y detectamos expresión diferencial de este enzima en las capas suprabasales de la epidermis (Figura 16. B). Además, al cuantificar la intensidad de la expresión de 11 β HSD2 vimos que ésta aumentó a P0 en comparación con E16.5 y E18.5 (Figura 16. C). Nuestros datos son coincidentes con trabajos previos que describen la expresión de 11 β HSD2 en epidermis humana (Skobowiat *et al.*, 2013).

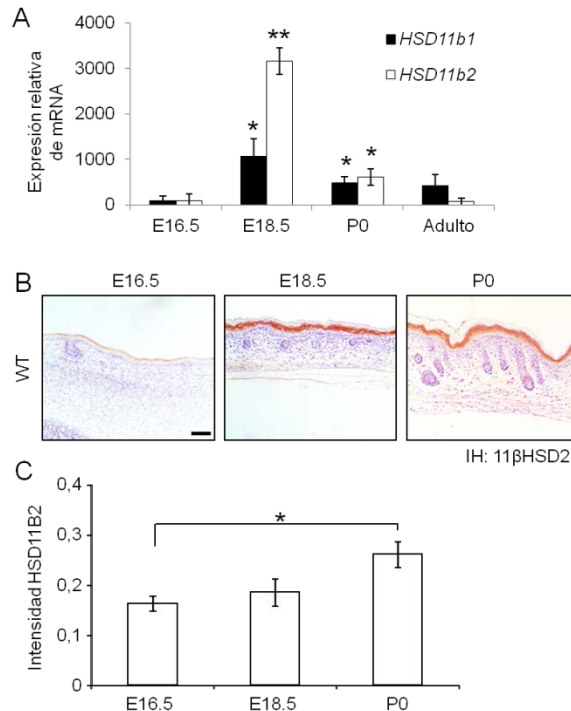


Figura 16. Expresión de 11βHSD1 y 11βHSD2 durante el desarrollo y en el nacimiento en piel de ratones control. A. Análisis de la expresión relativa de mRNA de *Hsd11b1* y *Hsd11b2* durante el desarrollo (E16.5, E18.5), en el nacimiento (P0) y en la edad adulta (8 semanas) en la piel de ratones control mediante RT-qPCR (n=3 de cada edad). B. Imágenes representativas de una inmunohistoquímica anti-11βHSD2 en muestras de piel de ratones control E16.5, E18.5 y P0. Barra: 100 μm. C. Cuantificación de la intensidad de la señal de 11βHSD2 en las muestras en B (n=4 de cada edad). Los datos se expresan como unidades relativas de intensidad. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas con respecto a E16.5 (*, p-valor < 0.05; **, p-valor < 0.01).

2. Generación y análisis del fenotipo de los ratones con inactivación total de MR (ratones MR^{-/-}) durante la etapa perinatal

2.1. Generación de los ratones MR^{-/-}

Se ha descrito que la función principal de MR es la de regular la reabsorción de sodio en el riñón (Martineri *et al.*, 2012). El grupo de

Berger y colaboradores generó los ratones $MR^{-/-}$ mediante recombinación homóloga para estudiar las consecuencias de la inactivación total de MR en el riñón y el colon, sin embargo, estos autores no caracterizaron las posibles alteraciones en piel (Berger *et al.*, 1998).

En este trabajo, generamos ratones con inactivación total de MR ($MR^{-/-}$) utilizando una estrategia basada en la recombinación generalizada mediante el uso de la recombinasa Cre en la línea materna a partir de la línea de ratones transgénica K5-Cre (Ramírez *et al.*, 2004). Como se describe en la metodología, cruzamos la línea K5-Cre con la línea MR^{flox} (Berger *et al.*, 2006) hasta obtener hembras $K5-Cre^{+/-} MR^{loxP/loxP}$ y machos $0-Cre MR^{+loxP}$ que cruzamos de nuevo para obtener ratones de dos genotipos: $MR^{+/-}$ que usamos como controles y $MR^{-/-}$ donde MR era afuncional en todos los tejidos (Figura 12. A).

Al igual que en el trabajo de Berger y colaboradores, los ratones $MR^{-/-}$ morían entre P7-P10 debido a deshidratación (Berger *et al.*, 1998), por lo que el análisis del fenotipo de estos ratones se realizó en el período perinatal (embriones E16.5-E18.5, nacimiento y día postnatal (P)4).

En primer lugar, recogimos piel dorsal de los distintos genotipos en el nacimiento y analizamos la expresión de MR mediante RT-qPCR. La figura 17. A demuestra que la expresión de MR era un 50% más baja en los animales heterocigotos con respecto a los *wild type* mientras que era prácticamente indetectable en los $MR^{-/-}$.

2.2. Análisis de la función de barrera epidérmica en ratones $MR^{-/-}$

Puesto que MR tiene un pico de expresión a día E16.5 que coincide con la maduración epidérmica, quisimos evaluar si la falta de MR tenía consecuencias en la función de barrera epidérmica en los animales $MR^{-/-}$ a día E17.5, estadio en el que se distingue bien el patrón de maduración dorso-ventral de la piel. Para ello, realizamos un protocolo de tinción de azul de toluidina donde una piel madura no permitirá que penetre el colorante

quedando blanca, mientras que una piel inmadura dejará que el colorante penetre quedando azul (Byrne *et al.*, 2010).

En la figura 17. B se muestran dos embriones E17.5 representativos, control y $MR^{-/-}$, teñidos con azul de toluidina, que ilustran que no hay diferencias en cuanto al patrón de desarrollo de la barrera epidérmica entre genotipos. Sin embargo, estudios previos demostraron que la sobreexpresión del MR humano (K5-hMR) en epidermis de ratón acelera la maduración epidérmica en embriones E16.5 (Sainte Marie *et al.*, 2007). Esta aparente contradicción podría deberse a diferencias entre especies y/o a una posible compensación funcional por otro(s) factores en ausencia de MR.

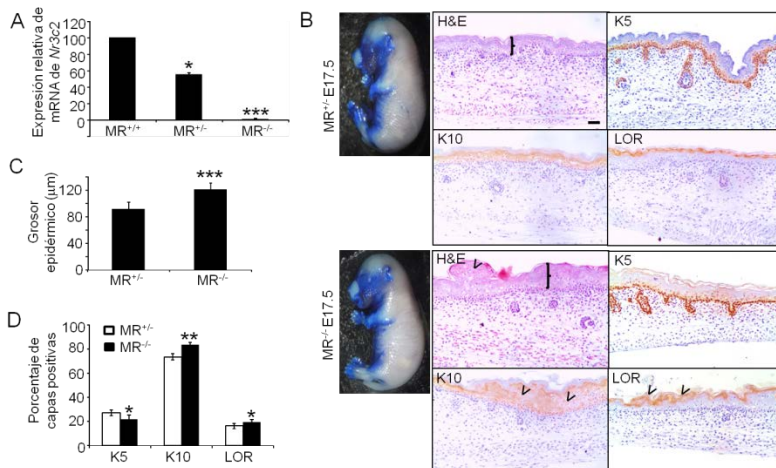


Figura 17. Generación de ratones $MR^{-/-}$ y caracterización del fenotipo en piel en embriones E17.5. A. Expresión relativa de *Nr3c2* en piel de $MR^{+/+}$, $MR^{+/-}$ y $MR^{-/-}$. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas con respecto a $MR^{+/+}$ ($n \geq 3$ por genotipo). B. Izquierda: ensayo de permeabilidad de barrera con azul de toluidina realizado en ratones $MR^{+/-}$ y $MR^{-/-}$ a día E17.5 ($n=11$ por genotipo). El color azul indica una epidermis inmadura mientras que el blanco indica una epidermis madura. Derecha: análisis histológico por hematoxilina-eosina (H&E) e imágenes representativas de inmunohistoquímicas con K5, K10 y loricina (LOR); corchetes: grosor epidérmico, flechas: alteraciones en la diferenciación. Barra: 100 µm. C. Cuantificación del grosor epidérmico. D. Cuantificación de los datos inmunohistoquímicos expresados como porcentaje de capas de la epidermis positivas para cada marcador en ratones $MR^{+/-}$ y $MR^{-/-}$ a día E17.5. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas relativas a $MR^{+/-}$ ($n=7$ por genotipo; *, p -valor < 0.05; **, p -valor < 0.01).

2.3. Análisis histopatológico perinatal de la piel de ratones MR^{-/-}

Para evaluar el fenotipo en piel de los ratones MR^{-/-} realizamos un análisis histopatológico mediante tinción con hematoxilina-eosina (H&E) y técnicas inmunohistoquímicas para detectar posibles anomalías en la expresión de marcadores de proliferación y/o diferenciación.

El análisis más detallado del fenotipo en piel de los ratones MR^{-/-} E17.5 (Figura 17) reveló diferencias sutiles en comparación con los controles que incluyen un ligero pero significativo aumento en el grosor epidérmico (Figura 17. B, corchetes, C), un menor número de capas positivas para el marcador de proliferación queratina (K) 5 y una diferenciación alterada indicada por el mayor número de capas positivas para los marcadores de diferenciación K10 y loricrina (LOR) (Figura 17. B, flechas, D).

Dichos defectos se resolvieron posteriormente, siendo indetectables en MR^{-/-} P0-P4, donde tanto la arquitectura de la piel (H&E), como el grosor epidérmico, y la expresión de LOR, fueron indistinguibles respecto a los controles (Figura 18. A, C, D). La composición de lípidos evaluada con la tinción de rojo nilo tampoco presentó cambios entre genotipos (Figura 18. A). En cuanto al porcentaje de proliferación de queratinocitos basales epidérmicos, medido mediante incorporación de BrdU *in vivo*, no mostró diferencias entre ambos genotipos a P0. Sin embargo, la tasa de proliferación aumentó significativamente alrededor de 2 veces en la piel de ratones MR^{-/-} P4 respecto a los controles (Figura 18. B). Estos cambios en proliferación podrían atribuirse a cambios secundarios por la deshidratación ya descrita por Berger y colaboradores en los MR^{-/-} (Berger *et al.*, 1998).

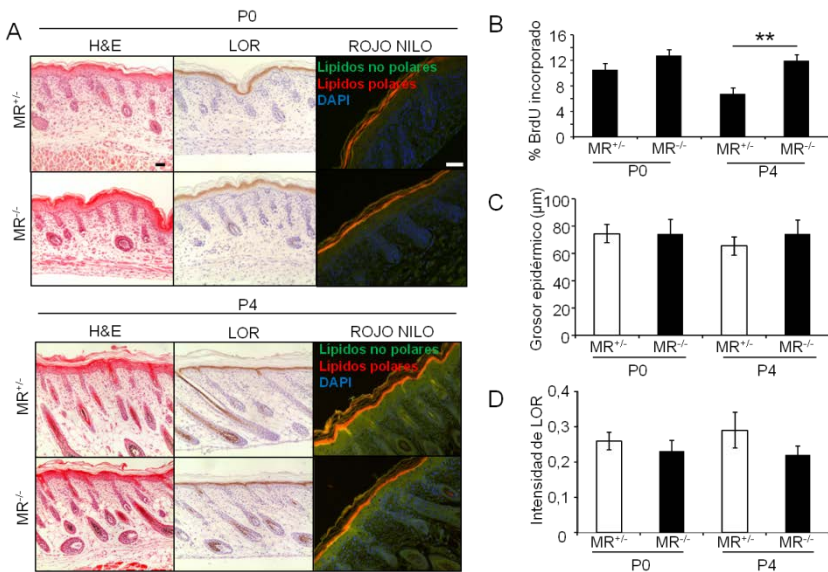


Figura 18. Caracterización del fenotipo en piel de los ratones MR^{-/-} a P0 y P4. A. Tinción con hematoxilina-eosina (H&E), inmunohistoquímica para loricrina (LOR) y tinción de lípidos con rojo nilo en muestras de piel de ratones MR^{+/-} y MR^{-/-} a P0 y P4. B. Cuantificación del porcentaje de BrdU incorporado en queratinocitos epidérmicos basales en ratones MR^{+/-} y MR^{-/-} a P0 y P4. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas relativas a MR^{+/-} (n=6 por genotipo y edad; **, p-valor<0.01). C. Cuantificación del grosor epidérmico y de la intensidad de loricrina (D) en las muestras de piel MR^{+/-} y MR^{-/-} a P0 y P4 (n=6 por genotipo y edad). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas. D. Los datos se expresan como unidades relativas de intensidad.

2.4. Análisis de la expresión génica en piel de ratones MR^{-/-} recién nacidos

En varios trabajos se ha descrito que la expresión de ENaC (*Scnn1*) está regulada por MR y GR (Schulz-Baldes *et al.*, 2001), por lo que quisimos comprobar si la ausencia total de MR correlacionaba con cambios en su expresión en piel. Para ello, analizamos mediante RT-qPCR la expresión de la subunidad alfa (*Scnn1a*) en la piel de ratones MR^{-/-} y control recién nacidos, sin encontrar diferencias entre genotipos (Figura 19. A). La expresión de *Scnn1a* tampoco cambia entre controles y MR^{-/-} en colon y riñón (Schulz-Baldes *et al.*, 2001). En embriones E18.5 K5-hMR no se han

descrito cambios en la expresión de ninguna de las subunidades de ENaC (*Scnn1a*, *Scnn1b* y *Scnn1g*) (Sainte Marie *et al.*, 2007); sin embargo, el mismo grupo describió recientemente que a P0 los ratones K5-hMR presentaban una mayor expresión de las tres subunidades de *Scnn1* (Maubec *et al.*, 2015). Además, la progenie de hembras gestantes K5-hMR inyectadas con el antagonista farmacológico de MR, canrenoato (Canre), normalizó las diferencias en la expresión de *Scnn1* en piel en el nacimiento (Maubec *et al.*, 2015).

Nuestros datos muestran que la pérdida funcional total de MR se traduce en alteraciones fenotípicas cutáneas leves, que se resuelven de forma espontánea y que, además, no da lugar a diferencias en la expresión de *Scnn1a*. Ello podría deberse a que en ausencia de MR, GR ejerce compensación funcional, por tanto, analizamos la expresión de GR en la piel de los ratones MR^{-/-} y control recién nacidos. De nuevo, no encontramos cambios en la expresión de GR entre ambos genotipos (Figura 19. A), lo que no descarta un posible incremento en la actividad funcional de GR. Alternativamente, estos datos pueden indicar que MR no desempeña un papel importante en piel durante la etapa perinatal.

Como se ha indicado previamente, 11 β HSD2 se expresa en las capas suprabasales de la epidermis de ratones control recién nacidos (Figura 16. B). La expresión de 11 β HSD2 en los ratones MR^{-/-} no presentó diferencias con respecto a los controles MR^{+/+}. En cambio, los animales GR^{-/-} presentaron una expresión muy disminuida, incluso indetectable de 11 β HSD2 (Figura 19. B, C). Estos resultados sugieren que GR regula directa o indirectamente la expresión 11 β HSD2 controlando de esta forma la disponibilidad de ligando. De hecho, se ha descrito anteriormente que el ortólogo humano de 11 β HSD2 (*HSD2b11*) es una diana transcripcional de GCs (Stojadinovic *et al.*, 2007, Surjit *et al.*, 2011). Otra posible explicación para la expresión defectiva de 11 β HSD2 en los animales GR^{-/-} es que este enzima se expresa en capas diferenciadas de la epidermis, prácticamente ausentes en estos ratones (Bayo *et al.*, 2008).

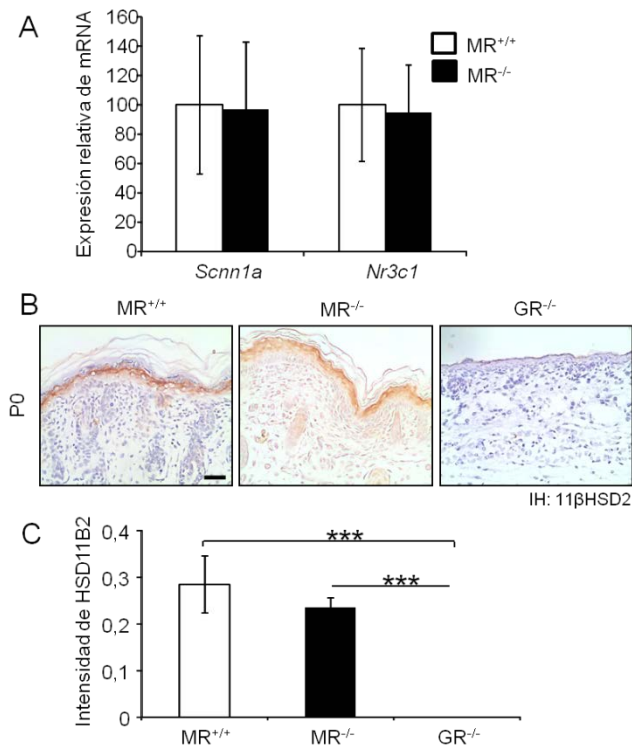


Figura 19. A. Expresión relativa de ENaCα (*Scnn1a*) y *Nr3c1* en piel de los ratones MR^{+/+} y MR^{-/-} a P0 (n=5 por genotipo). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas. B. Imágenes representativas de una inmunohistoquímica de 11βHSD2 en piel P0 de ratones MR^{+/+}, MR^{-/-} y GR^{-/-}. Barra: 100 μm. C. Cuantificación de la intensidad de la señal en epidermis. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre los genotipos indicados (n=4 por genotipo; ***, p-valor<0.001). Los datos se expresan como unidades relativas de intensidad.

3. Generación y caracterización de los ratones con inactivación de MR específica de la epidermis (MR^{EKO}) en la edad adulta

3.1. Generación de los ratones MR^{EKO}

Para obtener los ratones con inactivación de MR específica de la epidermis (*MR epidermal knock-out*) o ratones MR^{EKO} utilizamos una

estrategia basada en la expresión de la recombinasa Cre específica de queratinocitos epidérmicos y otros epitelios estratificados bajo el control de secuencias reguladoras de la queratina K5. Cruzamos la línea transgénica K5-Cre (Ramírez *et al.*, 2004) con la línea *MRflox* (Berger *et al.*, 2006) para obtener, tras varios cruces, ratones K5-Cre $MR^{loxP/loxP}$ o MR^{EKO} , y ratones 0-Cre $MR^{loxP/loxP}$ o controles. Los ratones MR^{EKO} eran viables y fértiles.

A partir de queratinocitos aislados de la epidermis dorsal de ratones control y MR^{EKO} realizamos una RT-qPCR para analizar la expresión de *Nr3c2*, verificando que su expresión era prácticamente indetectable en los animales MR^{EKO} (Figura 20. A).

3.2. Análisis del fenotipo de los ratones MR^{EKO} en la edad adulta

El estudio preliminar del fenotipo cutáneo de los ratones MR^{EKO} durante el desarrollo y en el nacimiento no apunta diferencias entre genotipos (no mostrado). Nuestra caracterización fenotípica se ha centrado en ratones machos y hembras MR^{EKO} de 8 semanas utilizando técnicas histológicas.

Las tinciones H&E y las inmunohistoquímicas utilizando anticuerpos específicos frente a queratina 6 (K6), LOR y BrdU de los ratones MR^{EKO} adultos revelaron cambios menores pero significativos en la piel consistentes en un incremento en el grosor epidérmico, que correlaciona con una expresión anómala de K6 y una mayor proliferación de los queratinocitos basales (Figura 20. B-D). La expresión de K6 se restringe normalmente al folículo piloso, sin embargo, se induce en la epidermis interfolicular en situaciones de patología, siendo común en casos de hiperproliferación. Además, la expresión del marcador de diferenciación epidérmico LOR presenta incrementos focales (Figura 20. B). Estos cambios indican defectos en proliferación y diferenciación epidérmica donde MR tendría un papel anti-proliferativo de acuerdo con los datos de expresión de MR en las distintas fases del ciclo de pelo. En otros tejidos, a MR se le atribuye un papel pro-proliferativo, como en células endoteliales o células

del músculo liso (Jaisser y Farman, 2016). En trabajos anteriores del grupo se ha descrito que GR ejerce un papel anti-proliferativo en epidermis (revisado en Pérez, 2011). Podría ser que en epidermis ambos receptores actuaran conjuntamente para ejercer las acciones anti-proliferativas de los GCs.

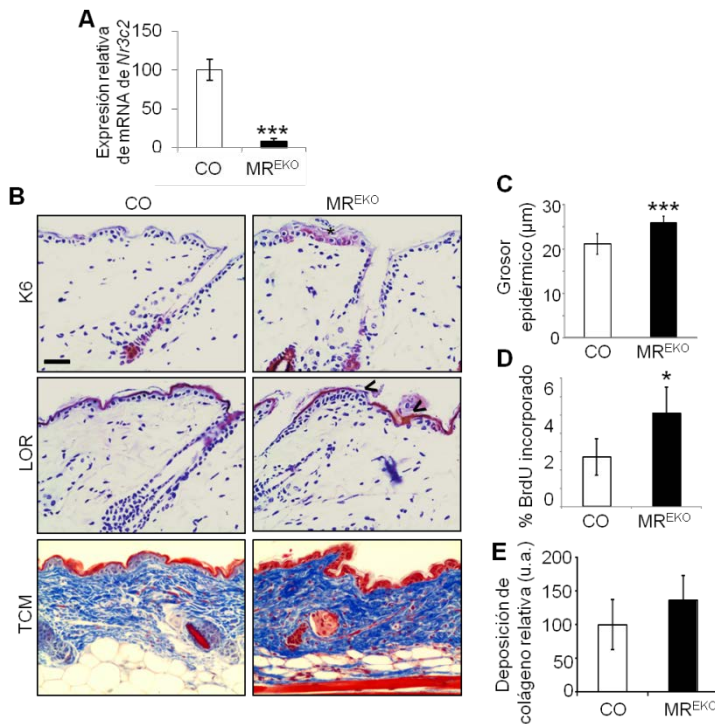


Figura 20. Caracterización del fenotipo de los ratones MR^{EKO} adultos. A. Análisis de la expresión relativa de mRNA de *Nr3c2* en queratinocitos epidérmicos de ratones control (CO) y MR^{EKO} adultos mediante RT-qPCR. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($n \geq 4$ por genotipo; ***, p -valor < 0.001). B. Análisis histopatológico de la piel de ratones CO y MR^{EKO} adultos con anticuerpos específicos frente a K6, loricrina (LOR) y una tinción con tricrómico de Masson (TCM). Los asteriscos indican una tinción anormal de K6, las flechas indican incrementos focales de loricrina. Barra: 100 μ m. C. Cuantificación del grosor epidérmico en ratones CO y MR^{EKO} adultos (8 semanas). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($n \geq 11$ por genotipo; ***, p -valor < 0.001). D. Cuantificación del porcentaje de BrdU incorporado en queratinocitos epidérmicos en ratones CO y MR^{EKO} adultos. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($n=5$ por genotipo; *, p -valor < 0.05). E. Cuantificación de la deposición de colágeno relativa representada como la

densidad integrada medida a partir del TCM. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas (n=4 por genotipo).

Por otra parte, ya que a MR se le atribuye un papel profibrótico en otros tejidos (Jaisser y Farman, 2016), estudiamos mediante una tinción con Tricrómico de Masson (TCM) si la deposición de colágeno en la dermis estaba afectada en los ratones MR^{EKO}. La cuantificación de estos datos mediante análisis de imagen no reveló diferencias estadísticamente significativas entre genotipos (Figura 20. B, E), indicando que la ausencia de MR en la epidermis no afecta a la deposición de colágeno basal en la dermis. Estos datos son compatibles con estudios que describen que la expresión de *Col1a1* está inducida por Aldo en fibroblastos dérmicos pero no en queratinocitos (Mitts *et al.*, 2010).

Se ha demostrado que MR también se expresa en apéndices cutáneos que, al igual que la epidermis, son derivados ectodérmicos, como las glándulas sudoríparas, las glándulas sebáceas y los folículos pilosos (Liu *et al.*, 2013, Kenouch *et al.*, 1994). Por ello, quisimos evaluar posibles alteraciones de estos apéndices cutáneos en los animales MR^{EKO}. Para evaluar la funcionalidad de las glándulas sudoríparas realizamos el test de almidón y yodo, donde ambos compuestos reaccionan con las secreciones de dichas glándulas, que quedan marcadas en azul oscuro. Realizamos este test en los plantares de ratones control y MR^{EKO} (ya que las glándulas sudoríparas de ratón están exclusivamente en esta localización) sin encontrar diferencias cualitativas, como se muestra en las fotos representativas de la figura 21. A. Además, realizamos una inmunohistoquímica de K5 en los plantares de ambos genotipos, que tiñó estas glándulas mioepiteliales, sin embargo, no encontramos diferencias en su morfología o número (Figura 21. B, flechas).

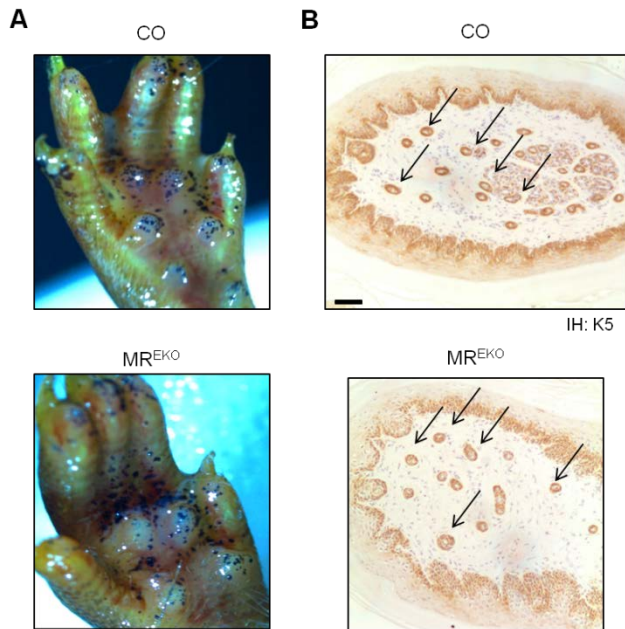


Figura 21. Funcionalidad de las glándulas sudoríparas. A. Test de yodo y almidón para analizar la funcionalidad de las glándulas sudoríparas en los plantares de ratones control (CO) y MR^{EKO} adultos. Los puntos azules indican glándulas sudoríparas funcionales. B. Imágenes representativas de una inmunohistoquímica de K5 en las glándulas sudoríparas de ratones CO y MR^{EKO} adultos. Barra: 50 μ m.

En otros tejidos como el riñón, MR tiene la función de regular la absorción de sales para mantener la homeostasis de los fluidos extracelulares y la presión sanguínea (Farman y Rafestin-Oblin, 2001). Por ello, cabría esperar que en piel MR fuese el responsable de regular la sudoración, sin embargo, nuestros datos funcionales no apoyan esta idea. Estos datos podrían sugerir que la regulación de la sudoración es independiente de MR, ya que los animales que sobreexpresan MR en la epidermis o K5-hMR, tampoco tienen defectos en las glándulas sudoríparas (Sainte-Marie *et al.*, 2007). Otra posibilidad es que en ambos casos ocurra un mecanismo compensatorio para asegurar que el proceso de sudoración se mantenga en correcto funcionamiento. En esta dirección podemos sugerir que el canal de sodio diana de MR, ENaC/*Scnn1*, es el mediador en la regulación de electrolitos mientras que MR es prescindible. Esta hipótesis

está en consonancia con los pacientes de pseudohipoaldosteronismo primario tipo I: los que padecen la forma autosómica dominante, con mutaciones en *NR3C2*, no tienen defectos en piel, sin embargo, los pacientes con la forma autosómica recesiva, con mutaciones en *SCNN1A*, *SCNN1B* o *SCNN1G*, presentan defectos en la sudoración (Korkut *et al.*, 2015). Podría ser que en ausencia de MR, ENaC estuviera regulado por otra vía para evitar defectos en la sudoración. En anteriores trabajos se ha descrito que ENaC es también una diana transcripcional de GR (Zhao *et al.*, 2010) por lo que en ausencia de MR, GR podría ejercer compensación funcional.

Por otra parte, se estudió el ciclo de pelo de los ratones control y MR^{EKO} en la edad adulta. Una vez afeitamos los animales, se realizó una inspección visual diaria de la piel y el pelo para inferir la fase del ciclo (anagen, catagen o telogen) en la que se encontraban (Stenn y Paus, 2001). Sin embargo, no se detectaron cambios sustanciales entre ambos genotipos (Figura 22). Estos resultados sugieren que MR no participa en la regulación de la duración de las distintas fases del ciclo de pelo, a pesar de que se ha descrito que los ratones K5-hMR adultos presentaban una degeneración del folículo piloso que daba lugar a alopecia acompañada de la formación de quistes. Además, los ratones K5-hMR presentaron anomalías en el ciclo de pelo, como un retraso en la entrada de anagen (Sainte Marie *et al.*, 2007). Es posible que el folículo piloso en la edad adulta esté afectado por la sobreexpresión de MR pero no por su ausencia y que los defectos en el ciclo de pelo aparezcan al superar cierta dosis umbral de MR.

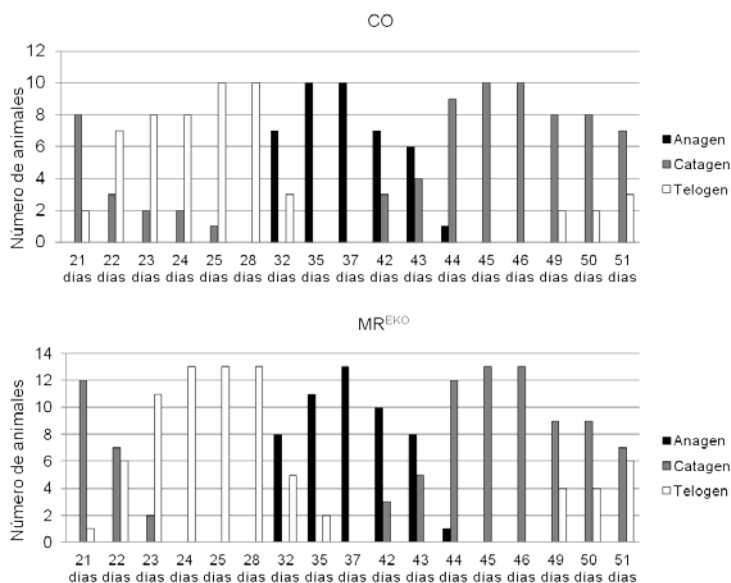


Figura 22. Análisis macroscópico del ciclo de pelo en ratones control (CO, n=10) y MR^{EKO} (n=13) a los tiempos indicados. Se muestra una comparativa del número de ratones de cada genotipo en cada estadio del ciclo de pelo (anagen, catagen, telogen).

3.3. Generación y caracterización del fenotipo de queratinocitos MR^{EKO}

Para estudiar más en profundidad las consecuencias de la falta de MR en queratinocitos epidérmicos, aislamos y cultivamos queratinocitos a partir de la piel dorsal de ratones control y MR^{EKO} y generamos líneas de queratinocitos inmortales (Figura 23. B, panel superior).

Los queratinocitos MR^{EKO} presentaron una morfología relativamente normal, sin embargo, los ensayos de proliferación mostraron un crecimiento más acelerado respecto a los queratinocitos control (Figura 23. A), de acuerdo con la mayor tasa de proliferación encontrada en la epidermis de los ratones MR^{EKO} (Figura 20. C). En conjunto, estos datos sugieren un papel anti-proliferativo para MR. específico de queratinocitos.

A continuación evaluamos posibles alteraciones en la diferenciación de queratinocitos MR^{EKO} *in vitro*; para ello, incubamos las células con altas concentraciones de calcio (1.2 mM CaCl₂) simulando la situación fisiológica, con un gradiente ascendente de calcio en las capas suprabasales diferenciadas de la epidermis. Tras 72 h del tratamiento con alto calcio, los queratinocitos control adquirieron la morfología característica de un queratinocito diferenciado que incluye el aplanamiento de la célula, la formación de contactos intercelulares, la estratificación de las capas de queratinocitos y la aparición de corneocitos (Figura 23. B, flechas, Hennings *et al.*, 1980); los corneocitos representan la morfología de diferenciación terminal que adquiere el queratinocito en el estrato córneo cuando ha perdido su núcleo y contiene muchas queratinas y lípidos.

Los queratinocitos MR^{EKO} fueron capaces de diferenciar y, además, presentaban un mayor número de corneocitos que los queratinocitos control (Figura 23. B, flechas). De forma complementaria, analizamos mediante RT-qPCR la expresión de dos marcadores de diferenciación epidérmicos, *Spr2d* y *Defensina beta 1 (Defb1)*, en queratinocitos control y MR^{EKO} sin diferenciar y diferenciados. Nuestros datos muestran un aumento en los niveles de mRNA correspondientes a *Spr2d* y *Defb1* de alrededor de 100 y 50 veces respectivamente en los queratinocitos control, acorde con nuestros datos previos (Figura 23. C, Sevilla *et al.*, 2010). Sin embargo, y consistente con su morfología, los queratinocitos MR^{EKO} tanto indiferenciados como diferenciados presentaron una mayor expresión de ambos marcadores (Figura 23. C). Estos datos sugieren que los niveles fisiológicos de MR modulan el proceso de diferenciación de queratinocitos actuando como freno del mismo.

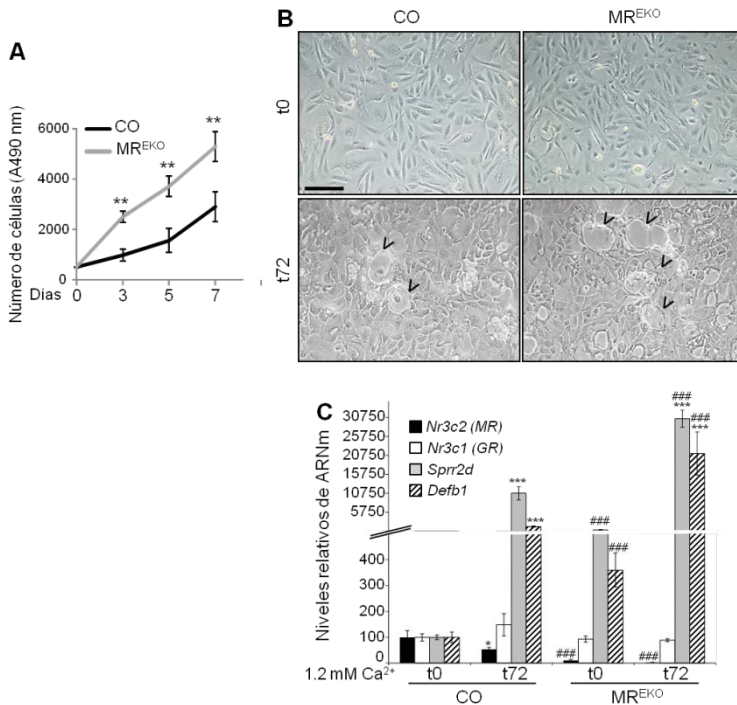


Figura 23. Caracterización del fenotipo de las líneas de queratinocitos inmortalizadas control (CO) y MR^{EKO}. A. Curvas de crecimiento (número de células/días) de la línea CO vs MR^{EKO}. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre genotipos dentro del mismo tiempo, las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas entre genotipos dentro del mismo tratamiento (n=4 por genotipo y tiempo; **, p-valor<0.01). B. Imágenes representativas de microscopía de contraste de fases de queratinocitos CO y MR^{EKO} en condiciones de calcio normal (0.35 mM, t0 h) o alto calcio (1.2 mM, t72 h) para inducir diferenciación. Las flechas indican las envueltas córneas. Barra: 50 μ m. C. Análisis de la expresión de *Nr3c2* (MR), *Nr3c1* (GR), *Sprr2d* y *Defb1* mediante RT-qPCR en queratinocitos CO y MR^{EKO} en condiciones de calcio normal y alto (como se indica en B). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro del mismo genotipo, las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas entre genotipos dentro del mismo tratamiento (n=3-5 por genotipo y tratamiento; *, p-valor<0.05; ***, ###, p-valor < 0.001).

Para apoyar esta hipótesis estudiamos la expresión de *Nr3c2* y *Nr3c1* durante el proceso de diferenciación de queratinocitos *in vitro* en respuesta a alto calcio. En un trabajo anterior del grupo (Sevilla *et al.*, 2015) se demostró que GR aumenta su expresión a nivel de proteína cuando los queratinocitos están diferenciados. Además, los queratinocitos deficientes

para GR (GR^{EKO}) presentaban una diferenciación terminal anormal o defectiva con ausencia de envueltas córneas y falta de inducción del marcador *Spr2d* en respuesta a alto calcio. Todo ello sugiere que GR desempeña un papel promotor de la diferenciación terminal de queratinocitos. Consistentemente, detectamos una tendencia al alza en la expresión de *Nr3c1* en células control diferenciadas respecto a las no diferenciadas (Figura 23. C) mediante RT-qPCR. La expresión de *Nr3c2*, sin embargo, disminuyó en un 40% de forma estadísticamente significativa en queratinocitos control diferenciados con respecto a los no diferenciados. Con estos resultados, podríamos hipotetizar un papel opuesto de ambos receptores en el proceso de diferenciación, donde la expresión de GR debe aumentar para inducir el proceso mientras que la de MR debe disminuir para permitir que ocurra. En los ratones adultos K5-hMR no se ha abordado el estudio de posibles alteraciones en marcadores de diferenciación o proliferación epidérmicas (Saint Marie *et al.*, 2007). Sin embargo, se han descrito defectos de diferenciación durante el desarrollo, con una formación de barrera epidérmica prematura y un menor grosor del estrato granuloso (Saint Marie *et al.*, 2007). Sería necesario el análisis de expresión de marcadores de diferenciación epidérmica para determinar las coincidencias/discrepancias entre ambos modelos transgénicos con ganancia y pérdida de función de MR específica de queratinocitos (K5-hMR y MR^{EKO} , respectivamente).

4. Análisis de la respuesta de los ratones MR^{EKO} adultos a distintos protocolos de patología cutánea

4.1. Respuesta de ratones MR^{EKO} a un tratamiento tópico con SDS

Para evaluar si la integridad de la piel y la función de la barrera estaban comprometidas en ausencia del MR epidérmico realizamos un protocolo de

daño epitelial tratando tópicamente a los ratones con SDS 10% durante 5 días consecutivos, simulando una dermatitis de contacto (Sevilla *et al.*, 2013, Le *et al.*, 1997).

En los animales control, el SDS indujo un engrosamiento en la epidermis o hiperplasia (Figura 24. A, corchete, B) de aproximadamente 4 veces, acompañado de un incremento en la proliferación de los queratinocitos (Figura 24. C, 30%). Estos datos correlacionan con una expresión ectópica de K6 en la epidermis que indica una hiperproliferación anómala (Figura 24. A, panel derecha). Además, este tratamiento induce hiperqueratosis o una mayor acumulación de queratinas en el estrato córneo de la epidermis (Figura 24. A, flechas).

Los animales MR^{EKO} presentaron todas estas características de daño epitelial mucho más exageradas que los animales control, con una mayor hiperplasia o grosor epidérmico (5 veces) y una mayor proliferación de los queratinocitos (50%) tras el tratamiento con SDS. Además, la hiperqueratosis era mayor en los animales MR^{EKO} (Figura 24. A-C).

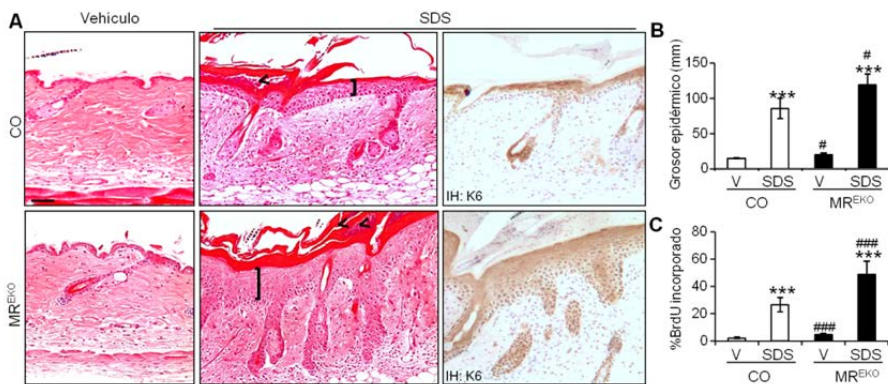


Figura 24. La pérdida de MR epidérmico da lugar a un mayor daño epitelial en respuesta al detergente SDS. A. Imágenes representativas de una tinción con hematoxilina-eosina (H&E) de la piel dorsal de ratones control (CO) y MR^{EKO} tratados con vehículo (V) o SDS 10% durante 5 días. Los corchetes indican el grosor epidérmico y las flechas indican la deposición de queratinas en el estrato córneo o hiperqueratosis. La inmunohistoquímica con K6 (derecha) indica un daño epitelial. Barra: 100 μ m. B. Cuantificación del grosor epidérmico y el porcentaje de BrdU incorporado en los queratinocitos epidérmicos (C) de ratones CO y MR^{EKO} tratados con V o SDS. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro del mismo genotipo, las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas entre genotipos dentro del

mismo tratamiento (n≥4 por genotipo y tratamiento; #, p-valor<0.05; ***, ###, p-valor < 0.001).

Una de las proteínas que se induce en procesos inflamatorios de daño epitelial es S100A9, una proteína dependiente de calcio que se expresa de forma constitutiva en células mieloides pero se induce en queratinocitos. La familia de los S100 se encuentra formando un *cluster* en el complejo de diferenciación epidérmica junto con otros genes de diferenciación. Además, S100A9 se expresa en enfermedades cutáneas inflamatorias crónicas como la psoriasis donde se postula que regula la proliferación y diferenciación de los queratinocitos (Kerkhoff *et al.*, 2012). El estudio de la expresión de esta proteína en respuesta a SDS mediante *western blot* reveló una tendencia al alza en los animales control mientras que su inducción fue significativa y mucho mayor, alrededor de 6 veces, en los animales MR^{EKO} (Figura 25. A).

En distintas patologías inflamatorias que afectan otros tejidos, la expresión de S100A9 está regulada por STAT3 (Kerkhoff *et al.*, 2012, Lee *et al.*, 2012). Por ello, estudiamos por *western blot* tanto la expresión total de STAT3 como su actividad, utilizando anticuerpos contra la proteína total y su forma fosforilada (p-STAT3) en los animales control y MR^{EKO} tratados con vehículo y SDS. El tratamiento con SDS produjo un incremento en la actividad de STAT3, representada como la ratio entre p-STAT3/STAT3, en controles y MR^{EKO}. Éstos últimos, sin embargo, presentaban una actividad constitutiva 4 veces más elevada que los controles así como una mayor actividad inducida por el tratamiento con SDS, de 4-5 veces (Figura 25. B).

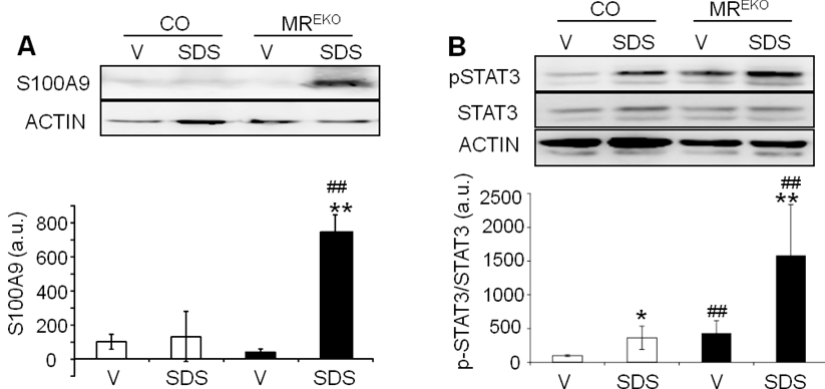


Figura 25. La pérdida de MR epidérmico da lugar a una mayor activación de STAT3/S100A9 en respuesta al detergente SDS. Imágenes representativas de *western blot* para S100A9 (A, arriba), fosfo (p)-STAT3 y STAT3 (B, arriba) con sus correspondientes cuantificaciones (abajo) de muestras de piel control (CO) y MR^{EKO} tratadas con vehículo (V) o SDS. La actina se ha utilizado como control de carga. La cuantificación en B es la ratio de la señal p-STAT3/STAT3 para determinar la actividad de STAT3. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro del mismo genotipo, las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas entre genotipos dentro del mismo tratamiento (n≥4 por genotipo y tratamiento; *, p-valor<0.05; **, ##, p-valor < 0.01).

En los animales control, la expresión de *Nr3c2* y *Nr3c1* en piel se ve disminuida tras el tratamiento con SDS. En los ratones MR^{EKO}, la disminución en los niveles de *Nr3c1* tras el tratamiento con SDS fue idéntica a la de los controles. La expresión de *Nr3c2* en piel tratada con el vehículo (V) fue menor en los MR^{EKO} que en los controles, sin embargo, no presentó variaciones tras el tratamiento con SDS (Figura 26. A, B).

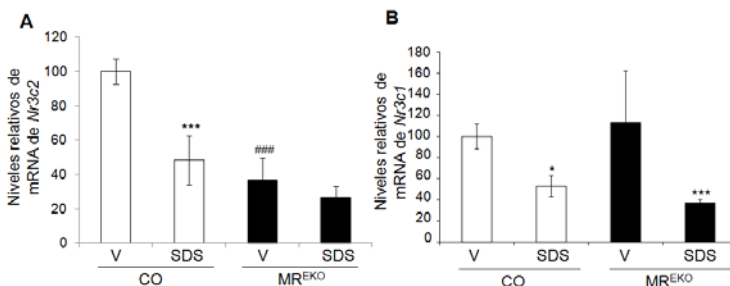


Figura 26. Niveles relativos de MR (*Nr3c2*, A) y GR (*Nr3c1*, B) en piel de ratones control

(CO) y MR^{EKO} tratada con vehículo (V) o SDS. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro del mismo genotipo, las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas entre genotipos dentro del mismo tratamiento (n=3 por genotipo y tratamiento; *, p-valor<0.05; ***, ###, p-valor < 0.001).

En los animales GR^{EKO} observamos también una respuesta más exagerada al SDS, así como una mayor actividad STAT3 constitutiva e inducida respecto a los animales control (Sevilla *et al.*, 2013). En conjunto, estos resultados indicarían que ambos receptores tienen un papel protector frente al daño cutáneo inducido por el agente irritativo SDS en queratinocitos. Además, ambos receptores son necesarios para preservar la integridad de la epidermis ya que en ausencia de uno de ellos, el otro no es capaz de compensar su falta. La bajada en la expresión de ambos receptores producida por el tratamiento con SDS en los controles podría contribuir, en parte, al fenotipo observado.

4.2. Respuesta de ratones MR^{EKO} a un tratamiento tópico con PMA

Para entender el papel de MR en la respuesta inflamatoria realizamos un protocolo de edema de oreja en ratones control y MR^{EKO}, donde se tratan ambos lados de la oreja con el éster de forbol PMA o vehículo (acetona), imitando un contexto inflamatorio que ocurre en muchas de las enfermedades de la piel (Hua *et al.*, 2016).

Las orejas de los ratones control tratados con PMA presentaron un engrosamiento global o edema, así como un aumento en el número de capas de la epidermis (Figura 27). Los ratones MR^{EKO} presentaron un mayor edema de la oreja así como engrosamiento de la epidermis, además de abscesos inflamatorios locales (Figura 27. A, flecha). Cuantificamos el grosor de las orejas tratadas con vehículo y PMA en los ratones de ambos genotipos y observamos que el PMA induce mayor edema de oreja en los

ratones MR^{EKO} que en los controles (Figura 27. B; aproximadamente 75% vs 30%, respectivamente). Estos datos correlacionan con una mayor inducción en la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias *Interleukin 6 (Il6)* y *Secretory leukocyte peptidase inhibitor (Slpi)* en los ratones MR^{EKO} respecto a los controles tras el tratamiento con PMA. La inducción de *Tumor necrosis factor alpha (Tnfa)* no presenta diferencias significativas entre genotipos (Figura 27. C).

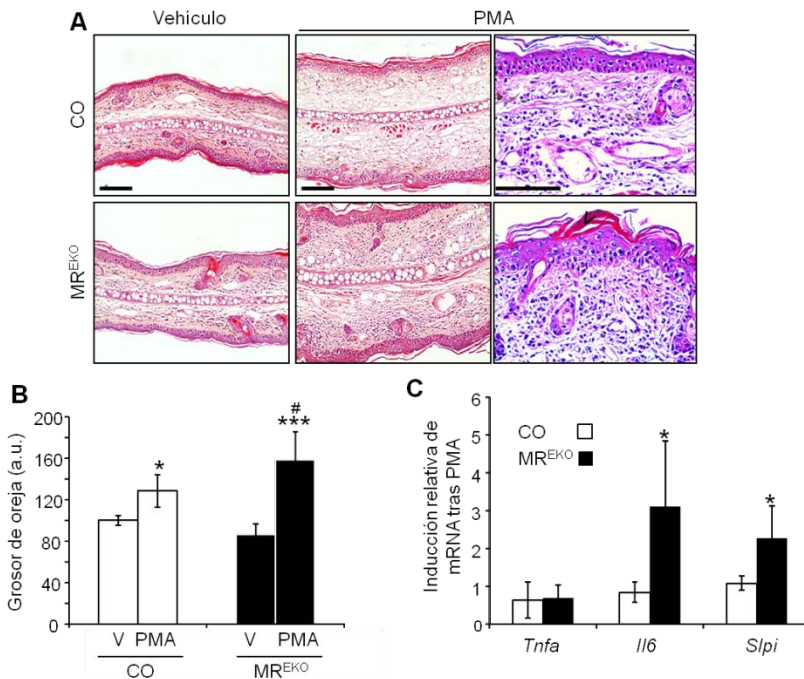


Figura 27. Respuesta cutánea inflamatoria incrementada en ratones MR^{EKO} tratados con PMA. La oreja de ratones control (CO) y MR^{EKO} se trató tópicamente con PMA (16 μ g) o vehículo (V) durante 48h. A. Imágenes representativas de las secciones de oreja teñidas con hematoxilina-eosina (H&E). Las imágenes de la izquierda y centro están tomadas a 10x. Las imágenes de la derecha están tomadas a 20x. La flecha indica un absceso inflamatorio. Barras: 100 μ m. B. Cuantificación del grosor de las orejas de ratones CO y MR^{EKO} tratadas con V (n=4 por genotipo) y PMA (n=8 por genotipo). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro del mismo genotipo, las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas entre genotipos dentro del mismo tratamiento (*, #, p-valor<0.05; ###, p-valor < 0.001). C. Inducción relativa de las citoquinas *Tnfa*, *Il6* y *Slpi* medidas por RT-qPCR en las orejas de ratones CO y MR^{EKO} tratadas con V y PMA y representadas como el ratio PMA vs V. Los

Resultados y discusión

asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre genotipos ($n \geq 3$ por genotipo y tratamiento; *, p -valor < 0.05).

Es importante subrayar que el tratamiento con PMA disminuyó la expresión de *Nr3c2* alrededor de un 50% en ratones control (Figura 28. A). Además, la expresión de *Nr3c1* era similar entre ambos genotipos y el PMA no modificó dichos niveles (Figura 28. B). Estos resultados sugieren que GR no participa en el fenotipo observado en ratones MR^{EKO} en respuesta a PMA. Además, al igual que ocurría con el tratamiento con SDS, PMA redujo los niveles de mRNA de *Nr3c2* epidérmico pero no dérmico, ya que su expresión disminuyó en los controles pero no en los MR^{EKO} (Figura 28. A, Figura 26. A, B). Nuestros datos sugieren que la función de MR en epidermis es anti-inflamatoria ya que su ausencia da lugar a un fenotipo más agravado.

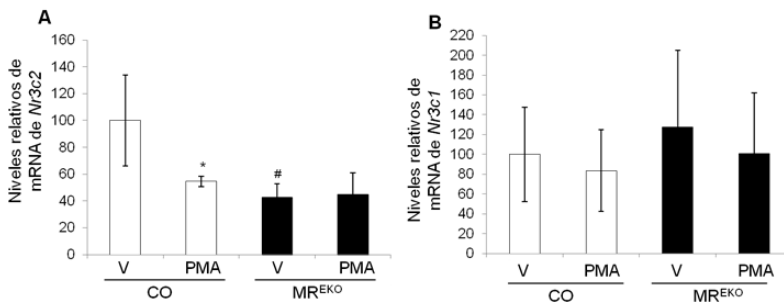


Figura 28. Niveles relativos de MR (*Nr3c2*, A) y GR (*Nr3c1*, B) en piel de ratones control (CO) y MR^{EKO} tratada con vehículo (V) o PMA. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro del mismo genotipo, las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas entre genotipos dentro del mismo tratamiento ($n \geq 4$ por genotipo y tratamiento; *, #, p -valor < 0.05).

Para corroborar el papel de MR en inflamación específicamente en queratinocitos, recurrimos a las líneas celulares inmortalizadas ya descritas (Figura 23). Del mismo modo que en el protocolo realizado *in vivo*, tratamos las células control y MR^{EKO} con vehículo y PMA y analizamos la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias *Tnfa*, *Il6* y *Sipi*. En las células control, observamos una inducción de *Tnfa* tras el tratamiento con PMA

estadísticamente significativa mientras que en *Il6* y *Slpi* observamos una tendencia al alza (Figura 29. A). Además, los niveles relativos de mRNA de estas citoquinas pro-inflamatorias, tanto basales como tras el tratamiento con PMA, fueron mayores en las células MR^{EKO} respecto a las control (Figura 29. A). Estos datos *in vitro* apoyan los datos *in vivo*, y demuestran que la ausencia de MR en queratinocitos epidérmicos da lugar a una mayor inducción de citoquinas en respuesta a estímulos pro-inflamatorios.

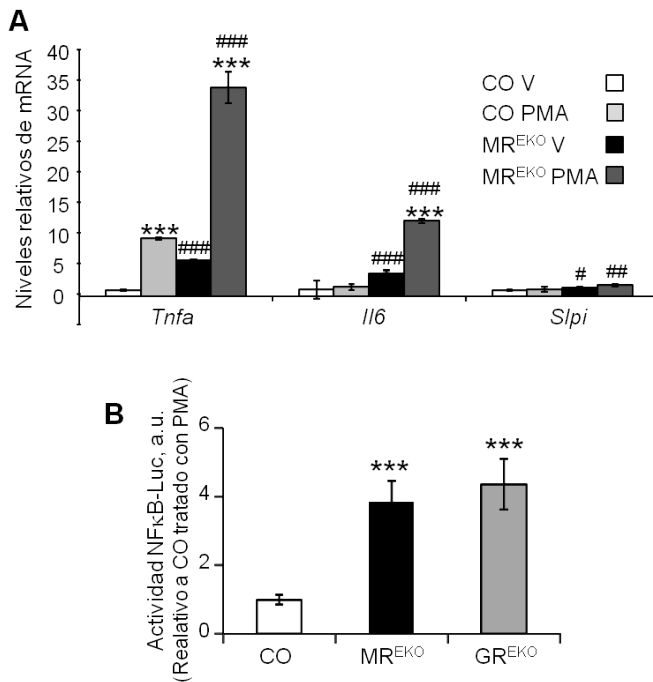


Figura 29. A. Niveles de expresión relativos de las citoquinas *Tnfa*, *Il6* y *Slpi* medidos por RT-qPCR en queratinocitos control (CO) y MR^{EKO} tratados con V y PMA (3h). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro del mismo genotipo, las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas entre genotipos dentro del mismo tratamiento ($n \geq 3$ por genotipo y tratamiento; #, p -valor < 0.05 ; ##, p -valor < 0.01 ; ***, ###, p -valor < 0.001). B. Actividad del *reporter* NF-κB-luciferasa en queratinocitos CO, MR^{EKO} y GR^{EKO} tratados con PMA (6h). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas relativas al CO ($n \geq 4$ por genotipo; ***, p -valor < 0.001).

Intentando elucidar los mecanismos por los cuales la ausencia de MR da lugar a una mayor inflamación en queratinocitos, transfectamos las células control y MR^{EKO} con un *reporter* NF-κB-luciferasa (NF-κB-luc) (Torres y Watt, 2008) y evaluamos su actividad en respuesta a PMA. En las células MR^{EKO}, PMA indujo un aumento en la actividad NF-κB-luc de entre 4 y 5 veces con respecto a la línea control (Figura 29. B), demostrando que la ausencia de MR activa esta vía pro-inflamatoria. Como control adicional, realizamos estos experimentos en paralelo utilizando queratinocitos GR^{EKO}, que también presentaron un aumento en la actividad NF-κB-luc (4-5 veces respecto a los controles) equivalente al de la línea celular MR^{EKO}. Estos datos sugieren que tanto MR como GR ejercen un papel anti-inflamatorio en queratinocitos en cultivo inhibiendo la vía NF-κB y que ninguno de los dos receptores es capaz de compensar la falta del otro.

En numerosas patologías inflamatorias, sobre todo en estudios de enfermedades cardíacas y renales, MR ejerce un papel pro-inflamatorio, y el uso de antagonistas de MR disminuye la inflamación (Jaisser y Farman, 2016). Por el contrario, nuestros datos indican que, en condiciones fisiológicas, la expresión de MR en queratinocitos epidérmicos ejerce un papel anti-inflamatorio en la piel. En un contexto de inflamación cutánea, la expresión de MR en queratinocitos es capaz de inhibir la vía NF-κB, como pone de manifiesto la sobreactivación de dicha vía en ausencia de esta proteína. Estas acciones anti-inflamatorias de MR también se han descrito en otros tipos celulares, por ejemplo en células HEK293, donde la sobreexpresión de MR inhibe la actividad de un *reporter* NF-κB-luc en respuesta a TNFα (Dougherty *et al.*, 2016).

4.3. El proceso de cicatrización cutánea en ratones MR^{EKO}

El cierre de herida cutáneo es un proceso complejo en el cual ocurren una serie de eventos biológicos que deben orquestarse en el tiempo de

forma muy coordinada en respuesta a la lesión para, al final, reparar el daño del tejido y restaurar la homeostasis de la piel. Ya hemos comentado que el proceso consta de tres fases bien diferenciadas: la fase inflamatoria, la fase proliferativa y la fase de remodelación donde participan distintos tipos celulares, entre ellos, células residentes como los queratinocitos y los fibroblastos, e infiltrados celulares como son las células inmunes. Los queratinocitos en concreto, proliferan y migran hacia la herida para cubrir la zona dañada y restaurar la epidermis, un fenómeno denominado reepitelización (Pastar *et al.*, 2014, Kerkhoff *et al.*, 2012).

Es sobradamente conocido que los tratamientos crónicos con GCs retrasan el cierre de la herida (Stojadinovic *et al.*, 2005, Beer *et al.*, 2000), en gran parte debido a la regulación negativa de mediadores inflamatorios y factores de crecimiento, que son necesarios para una correcta cicatrización cutánea. Los mecanismos responsables de este retraso en cicatrización implican tanto una inhibición de las vías de señalización NF- κ B y AP-1, como un retraso en la migración de los queratinocitos causado por la represión de K6/K16 (Pastar *et al.*, 2014). Además, la producción local de GCs en queratinocitos aumenta como respuesta a la inducción de IL-1 β , que actúa como señal de daño en el tejido, formando parte de una respuesta normalizada a la herida (Vukelic *et al.*, 2011). De acuerdo con estos datos, el bloqueo de la producción de GCs endógenos mediante el uso de inhibidores farmacológicos del enzima 11 β HSD1 da lugar a un cierre de herida más acelerado (Tiganescu *et al.*, 2013, Youm *et al.*, 2013, Vukelic *et al.*, 2011). Todo ello apoya la importancia de la producción local de los GCs en piel, de la expresión de los receptores GR y MR, así como de los mecanismos que regulan el acceso de los GCs a dichos receptores (Stojadinovic *et al.*, 2016).

Para evaluar el papel de MR en la cicatrización cutánea, realizamos heridas en la piel dorsal de los ratones control y MR^{EKO} y evaluamos su

cierre durante 7 días. La cinética de cierre de herida, donde medimos el área de las heridas de cada ratón entre día 0 y día 7, fue muy similar entre ambos genotipos (Figura 30. A). Además, el porcentaje de re-epitelización, en el que medimos el porcentaje de área de herida inicial ocupada por nueva epidermis, es prácticamente el 100% en ambos casos (Figura 30. B, D), a pesar de que los animales MR^{EKO} presentan una mayor proliferación de queratinocitos epidérmicos que los controles (Figura 30. C). Sin embargo, la organización de los queratinocitos en la epidermis *de novo* de ratones MR^{EKO} era anómala, como indica la tinción con K6, que sugiere defectos en la migración de los mismos (Figura 30. D).

Por otra parte, la remodelación dérmica también está alterada en los animales MR^{EKO}, que presentan una menor deposición de colágeno en la herida, como muestra la tinción con tricrómico de Masson (TCM) y su posterior cuantificación (Figura 30. D, E). Estos datos indicarían que MR epidérmico participa en la remodelación cutánea tras la cicatrización, al menos en parte, favoreciendo la deposición de las nuevas fibras de colágeno, aunque no hayamos detectado cambios en ratones MR^{EKO} de manera basal (Figura 20. B, E).

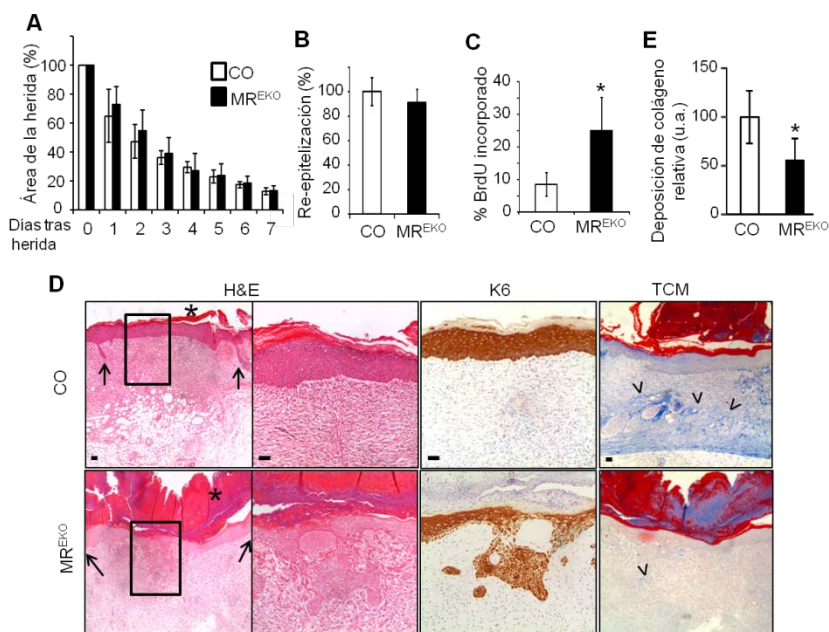


Figura 30. Consecuencias de la inactivación epidérmica de MR en la cicatrización cutánea de ratones MR^{EKO}. La ausencia de MR en epidermis no afecta a la cinética de cierre de herida pero sí a la proliferación de los queratinocitos y a la deposición de colágeno en la dermis. A. Cinética de cierre de herida medida como el porcentaje de área de la herida abierta con respecto al tiempo (7 días) en control (CO) y MR^{EKO}. B. Porcentaje de re-epitelización de heridas en ratones CO y MR^{EKO} a día 7 tras la herida. No existen diferencias estadísticamente significativas entre genotipos. C. Porcentaje de BrdU incorporado en queratinocitos epidérmicos CO (n=7) y MR^{EKO} (n=9). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre genotipos (*, p-valor<0.05). D. Imágenes representativas de una tinción hematoxilina-eosina (H&E), una inmunohistoquímica para K6 y una tinción de tricrómico de Masson (TCM) de heridas CO y MR^{EKO} a día 7. Las flechas en la H&E indican los bordes de la herida inicial, los asteriscos indican la costra de la herida, la imagen de la derecha es una ampliación del recuadro de la izquierda. Las flechas en el TCM indican el nuevo colágeno depositado (en azul). Barra: 100 μ m. E. Cuantificación de la deposición de colágeno relativa en heridas de ratones CO (n=7) y MR^{EKO} (n=9) a día 7. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre genotipos (*, p-valor<0.05).

Para estudiar el papel específico de MR en queratinocitos durante el cierre de herida y, atendiendo a la organización anómala de los queratinocitos en la epidermis *de novo*, realizamos un protocolo de cierre de herida *in vitro* (Pastar *et al.*, 2014). En estos ensayos, realizamos una incisión o “herida” con una punta de pipeta en queratinocitos control y

MR^{EKO} crecidos en monocapa y documentamos su migración fotográficamente a distintos tiempos hasta que los queratinocitos ocuparon toda el área y la herida estaba cerrada al 100% (Figura 31. A). El área no ocupada por queratinocitos de cada una de las fotos a distintos tiempos se cuantificó y se refirió al área inicial. Estos resultados revelaron un retraso en la migración de los queratinocitos MR^{EKO} frente a los controles en todos los tiempos estudiados (8, 24, 36 y 48 h, Figura 31. B).

Para corroborar que los defectos en la migración observados en queratinocitos MR^{EKO} se deben a la inactivación funcional de MR y no a alteraciones debidas al establecimiento de la línea celular, utilizamos una aproximación complementaria. Tratamos los queratinocitos control con el inhibidor farmacológico de MR, Eple, 24 h antes de realizar la herida y seguimos la migración de los queratinocitos tratados y sin tratar. Nuestros datos muestran resultados similares en queratinocitos MR^{EKO} y queratinocitos control tratados con Eple, indicando que la falta de función de MR en queratinocitos se traduce en un retraso en su migración (Figura 31. C). Además, nuestros datos muestran que la ausencia de MR se traduce en la desorganización de la arquitectura epidérmica durante el proceso de re-epitelialización en ensayos de cicatrización *in vivo* pero no en un retraso en la cinética de cierre de herida.

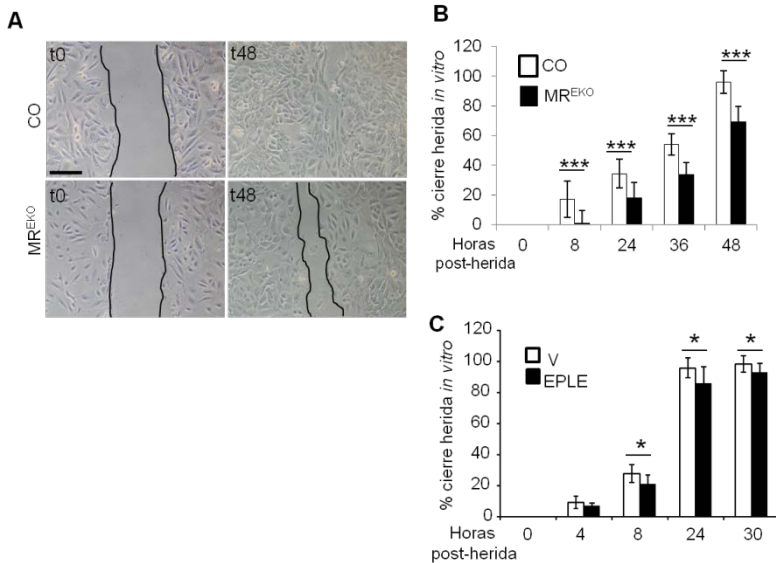


Figura 31. La inactivación de MR en queratinocitos epidérmicos tienen como consecuencia un retraso en la migración *in vitro*. A. Los queratinocitos control (CO) y MR^{EKO} se sembraron en monocapas para realizar el experimento de cierre de herida *in vitro* y evaluar la migración de los mismos hasta el cierre de herida (48h). Barra: 50 μ m. B. Cuantificación del porcentaje de cierre de herida en queratinocitos CO y MR^{EKO} a distintos tiempos. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre genotipos a distintos tiempos (n=8 por genotipo y tiempo; ***, p-valor<0.001). C. Cuantificación del porcentaje de cierre de herida a distintos tiempos en queratinocitos CO tratados con vehículo (V) o eplerenona (Eple) 24 horas antes de la herida y durante el cierre de herida. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos a distintos tiempos (n=8 por genotipo y tiempo; *, p-valor<0.05).

Estos datos están de acuerdo con los resultados descritos por Nguyen y colaboradores, donde el bloqueo de MR de forma farmacológica en ratones control sin tratar no da lugar a un retraso en el cierre de heridas *in vivo* (Nguyen *et al.*, 2016). Adicionalmente, estos autores han descrito que un tratamiento continuado con el GC Clobetasol (Clobe) en ratones induce un aumento en la expresión de *Nr3c2*/MR en piel, y postulan que dicho aumento correlaciona con el retraso en el cierre de heridas. De acuerdo con su hipótesis, este grupo demostró que el bloqueo farmacológico de MR mejora la cinética de cierre de heridas en ratones tratados con GCs (Nguyen *et al.*, 2016). Estos resultados abren la posibilidad de que el retraso

en el cierre de heridas en presencia de altas dosis de GCs se deba al papel anti-inflamatorio tanto de GR (Youm *et al.*, 2013) como de MR.

5. Análisis de la respuesta a GCs en condiciones de inactivación de MR en piel

5.1. Respuesta de los ratones MR^{EKO} a un tratamiento tópico crónico con Dexametasona

La atrofia cutánea es otro de los efectos secundarios producidos por los tratamientos continuados con GCs. Para evaluar el papel de MR en respuesta a un tratamiento prolongado con GCs, tratamos a los ratones control y MR^{EKO} con el GC sintético dexametasona (Dex) durante 7 días.

Los ratones control tratados con Dex presentaron adelgazamiento epidérmico, reducción en la expresión de K5 (Figura 32. A), y una disminución en el porcentaje de queratinocitos proliferativos de más del 80% en relación con los controles tratados con vehículo (Figura 32. B; Schoepe *et al.*, 2006). Se ha descrito que la disminución en la proliferación, la expresión reducida de K5 y la represión del gen de la ciclina D1, *Ccnd1*, también observado en los controles (Figura 32. C, reducción del 80%) están mediadas, al menos parcialmente por GR (Surjit *et al.*, 2011). Además, el tratamiento con Dex en los animales control redujo el grosor dérmico así como la deposición de colágeno (Cutroneo *et al.*, 2004) como se indica en la tinción TCM (Figura 33. A).

A nivel de mRNA, la expresión del *Col1a1*, componente mayoritario de las fibras de colágeno, sufrió una reducción del 80% tras el tratamiento con Dex (Figura 33. B). Todas estas características recapitulan los efectos adversos asociados a los tratamientos crónicos con GCs en humanos.

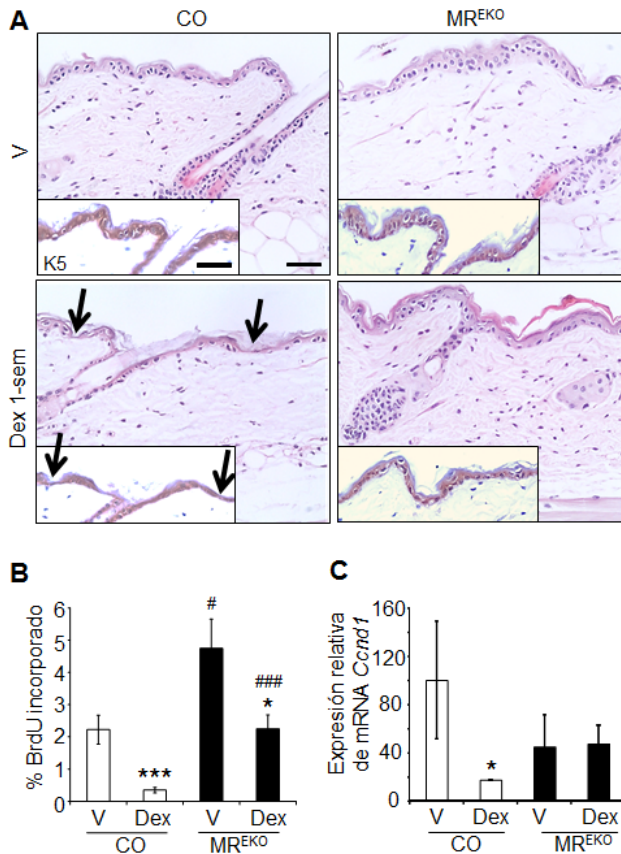


Figura 32. La inactivación epidérmica de MR protege parcialmente de la atrofia epidérmica inducida por Dex. A. Imágenes representativas de una hematoxilina-eosina (H&E) y una inmunohistoquímica para K5 en la piel de los ratones control (CO) y MR^{EKO} tratados con vehículo (V) y Dex durante 1 semana. Las flechas indican el adelgazamiento epidérmico. Barra: 50 μ m. B. Porcentaje de BrdU incorporado en queratinocitos epidérmicos CO y MR^{EKO} tratados con V y Dex 48h. C. Expresión relativa de mRNA de Ciclina D1 (*Ccnd1*) en piel de ratones CO y MR^{EKO} tratados con V y Dex durante 48h. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro del mismo genotipo, las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas entre genotipos dentro del mismo tratamiento (n=3 por genotipo y tratamiento; *, #, p-valor<0.05; ***, ###, p-valor<0.001).

Sin embargo, la aplicación continuada de Dex en los ratones MR^{EKO} causó efectos adversos atenuados, con una menor reducción del grosor epidérmico y dérmico (Figura 32. A, Figura 33. A), menor reducción de la

expresión de K5 respecto a los ratones control y con una inhibición significativamente menor de la proliferación (Figura 32. A, B, reducción del 80% en controles frente a 50% en MR^{EKO}). En los animales MR^{EKO} la falta de represión de la *Ccnd1* en respuesta a Dex (Figura 32. C) sugiere que este gen pueda ser una diana de MR (además de GR). De hecho, en experimentos de ChIP-seq se ha demostrado que la ciclina D3, *Ccnd3*, implicada junto con *Ccnd1* en la transición entre las fases G1 y S del ciclo celular, es una diana transcripcional directa de MR en células de riñón en respuesta a Aldo (Le Billan *et al.*, 2015, Ueda *et al.*, 2014). Estos datos indican que MR epidérmico tiene un papel anti-proliferativo en respuesta a GCs y son coincidentes con dos artículos recientes que demuestran que el bloqueo farmacológico de MR en piel de ratón tratada con GCs da lugar a una mayor proliferación de los queratinocitos (Nguyen *et al.*, 2016, Maubec *et al.*, 2015). Distintos trabajos han descrito que GR media los efectos anti-proliferativos de los GCs (Sevilla *et al.*, 2013, Pérez, 2011, Schäcke *et al.*, 2002), por tanto, podemos sugerir que las acciones anti-proliferativas de los GCs están mediadas por ambos receptores MR y GR.

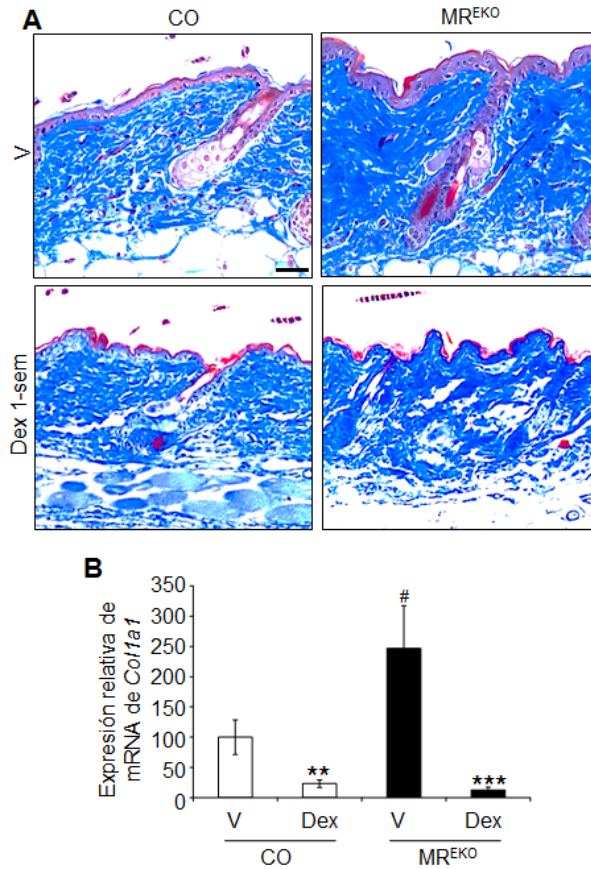


Figura 33. La inactivación epidérmica de MR protege parcialmente de la atrofia dérmica inducida por Dex. A. Imágenes representativas de una tinción con tricrómico de Masson en la piel de los ratones control (CO) y MR^{EKO} tratados con vehículo (V) y Dex durante 1 semana. Las fibras de colágeno dérmico están teñidas de azul. Barra: 100 μ m. B. Expresión relativa de mRNA de Colágeno 1a1 (*Col1a1*) en piel de ratones CO y MR^{EKO} tratados con V y Dex durante 1 semana. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro del mismo genotipo, las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas entre genotipos dentro del mismo tratamiento (n=3 por genotipo y tratamiento; #, p-valor<0.05; **, p-valor<0.01; ***, p-valor<0.001).

En cuanto a la regulación por GCs del contenido de colágeno en ratones MR^{EKO}, nuestros datos muestran una mayor expresión de *Col1a1* respecto a los controles (Figura 33. B). Sin embargo, el tratamiento con Dex redujo la expresión de *Col1a1* en ratones MR^{EKO} hasta niveles similares a

los del control, indicando que la represión de este gen por Dex es independiente de MR epidérmico. De hecho, el grupo de Cutroneo y colaboradores han demostrado que los GCs inhiben, en parte, la síntesis de colágeno tipo I a través de GR con el uso de inhibidores farmacológicos específicos de este receptor (Cutroneo *et al.*, 2004).

Por otra parte, y ya que *Col1a1* se expresa en fibroblastos dérmicos, su mayor expresión en los animales MR^{EKO} en ausencia de tratamiento podría deberse a un efecto compensatorio por la falta de MR epidérmico. Aun así, los niveles de colágeno basal que muestra la tinción TCM no revelaron grandes diferencias entre ambos genotipos (Figura 20. B, E y Figura 33. A, B). Para explicar esta aparente contradicción podemos recurrir al trabajo de Mitts y colaboradores que describieron que la síntesis de *Col1a1* por fibroblastos tratados con Aldo depende de MR. Además, los fibroblastos tratados con Aldo y antagonistas farmacológicos de MR experimentaron una reducción en el número de fibras de colágeno debido a la inhibición en la síntesis de colágeno y a una mayor degradación de las fibras pre-existentes (Mitts *et al.*, 2010). Con todo, podríamos sugerir que la falta de MR epidérmico da lugar a un aumento en la expresión de *Col1a1* que no se traduce en un mayor número de fibras posiblemente por un aumento en la degradación de las mismas.

El tratamiento con Dex da lugar a una disminución en los niveles de *Nr3c1* (Figura 34. B, CO). Sin embargo, los GCs también redujeron la expresión de *Nr3c2* (Figura 34. A, CO), indicando que el mismo ligando modula los niveles de expresión de los receptores GR y MR. En los animales MR^{EKO} se pierde la disminución de *Nr3c1* tras el tratamiento con Dex, sugiriendo que MR está implicado en la regulación negativa de GR por GCs (Figura 34. B, MR^{EKO}). Los niveles de *Nr3c2* no cambiaron en los MR^{EKO} tras el tratamiento con Dex indicando que este ligando no afecta a la expresión de MR dérmico (Figura 34. A, MR^{EKO}).

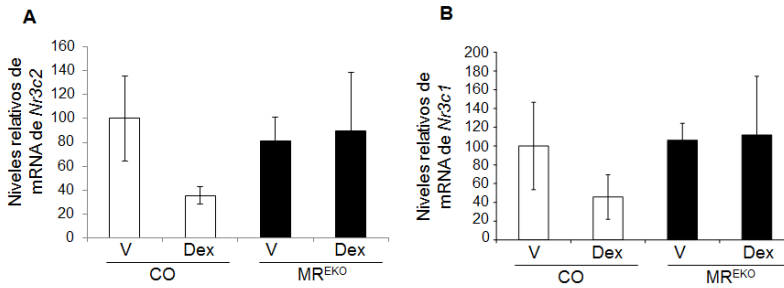


Figura 34. Niveles relativos de MR (*Nr3c2*, A) y GR (*Nr3c1*, B) en piel de ratones control (CO) y MR^{EKO} tratada con vehículo (V) o Dex durante 1 semana (cada 48h). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro del mismo genotipo, las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas entre genotipos dentro del mismo tratamiento (n=3 por genotipo y tratamiento; *, #, p-valor<0.05).

Nuestros resultados son consistentes con el trabajo de Maubec y colaboradores, donde observaron, mediante inmunohistoquímica, que la expresión de MR y GR disminuye tras un tratamiento con Clobex en explantes de piel humana. El tratamiento combinado del antagonista de MR, Espiro, con Clobex mantuvo intactos los niveles de MR mientras que disminuyó los niveles de GR (Maubec *et al.*, 2015). Estos datos sugieren que MR no participa en la regulación negativa de GR por GCs en explantes de piel humana de forma contraria a lo que habíamos descrito en ratón (Figura 34). Esta diferencia podría ser debida al tiempo de tratamiento (29 días vs 7 días).

En conjunto, nuestros datos demuestran que la inactivación de MR en epidermis protege parcialmente de la atrofia epidérmica y dérmica causada por Dex, por tanto, el tratamiento combinado de GCs con antagonistas de MR aparece como una posibilidad para mejorar los tratamientos prolongados con estos compuestos. Antes de plantear el uso combinado de GCs y antagonistas de MR con fines terapéuticos, sin embargo, es crucial valorar si bloquear MR preserva las acciones anti-inflamatorias de los GCs, ya que hemos demostrado que MR epidérmico es anti-inflamatorio.

Además, debemos considerar la participación de MR en la regulación negativa de GR por GCs para evitar que el tratamiento con antagonistas de MR tenga otros efectos secundarios.

5.2. Respuesta en explantes de piel humana a un tratamiento conjunto de GCs y antagonistas de MR

Para valorar una posible extrapolación de estos resultados a la clínica, hemos realizado experimentos en explantes de piel humana mediante tratamientos combinados utilizando Clobe y el antagonista de MR canrenoato (Canre); hay que tener en cuenta que la aplicación tópica del Canre bloquea MR en toda la piel y no sólo en la epidermis, como ocurre en el modelo de ratón MR^{EKO}.

Los explantes de piel humana se han obtenido a partir de biopsias de piel de sujetos sanos cedidas por el Hôpital Européen Georges-Pompidou, que se dividen en distintos grupos experimentales para su cultivo y posterior tratamiento con vehículo, Clobe, Canre, y el tratamiento combinado Clobe+Canre.

En estos experimentos, Clobe indujo adelgazamiento epidérmico y menor deposición de colágeno, como refleja el análisis histopatológico de las muestras (Figura 35). El antagonista de MR no produjo grandes cambios con respecto al control mientras que el tratamiento combinado Clobe+Canre revirtió parcialmente la atrofia cutánea inducida por Clobe en términos de grosor epidérmico y deposición de colágeno (Figura 35. A, B). Este experimento reproduce los resultados del trabajo de Maubec y colaboradores realizado en explantes de piel humana (Maubec *et al.*, 2015). Sin embargo, dado que estos experimentos se han realizado en muestras de piel sana, resulta incierto predecir si el tratamiento combinado Clobe+Canre sigue siendo efectivo en situaciones de patología.

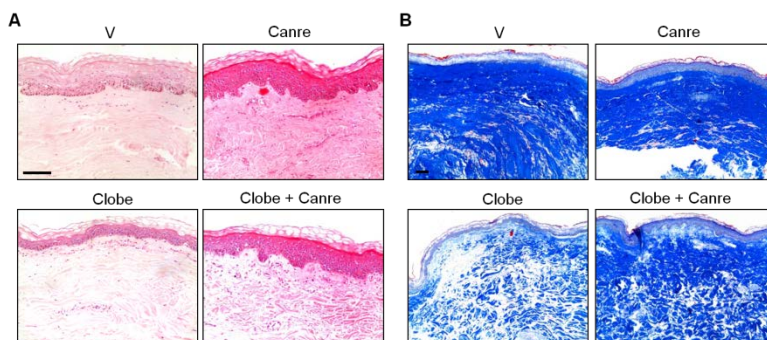


Figura 35. La inactivación farmacológica de MR en piel protege parcialmente de la atrofia cutánea inducida por el GC clobetasol (Clobe). A. Imágenes representativas de una hematoxilina-eosina en explantes de piel humana tratados con vehículo (V), canrenoato (Canre), Clobe y ambos (Clobe+Canre) durante 4 días. Barra: 50 μ m. B. Imágenes representativas de una tinción con tricrómico de Masson en explantes de piel humana tratados con los mismos compuestos que en A. Las fibras de colágeno dérmico están teñidas de azul intenso. Barra: 100 μ m.

Para abordar esta cuestión, elegimos simular de nuevo una patología irritativa, como es la dermatitis de contacto, tratando los explantes de piel humana con el detergente SDS durante tres días. El SDS causó un engrosamiento en la epidermis y un fenotipo globoso en los queratinocitos como signos de daño (Figura 36. A, flechas). Este fenotipo encaja con datos previos en cultivos primarios de queratinocitos humanos y piel humana (Chung *et al.*, 2001). El tratamiento con Clobe revirtió estos efectos causando un adelgazamiento en la epidermis y reducción en la deposición de colágeno (Figura 36. A y figura 37. A). El tratamiento con Canre mejoró parcialmente el fenotipo globoso de los queratinocitos. Sin embargo, el tratamiento combinado revirtió parcialmente el aumento del grosor epidérmico causado por SDS, así como el fenotipo globoso de los queratinocitos sin producir los efectos secundarios del Clobe, adelgazamiento epidérmico y menor deposición de colágeno en la dermis (Figura 36. A y figura 37. A). En cuanto a los niveles de expresión de *COL1A1*, cada uno de los compuestos por separado disminuyó los niveles de este mRNA, sin embargo, el tratamiento combinado restauró los niveles iniciales (Figura 37. B). Estos resultados podrían indicar que Clobe sólo

inhibe los niveles de *COL1A1* cuando MR está activo, apoyando el uso terapéutico del tratamiento combinado.

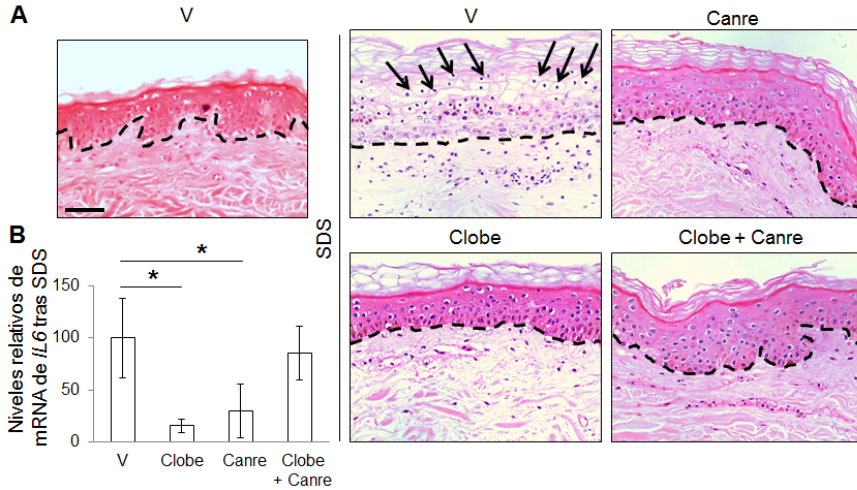


Figura 36. El tratamiento combinado de GCs (clobetasol, Clobe) y antagonistas de MR, canrenoato (Canre) en explantes de piel humana tratados con SDS mejora el daño cutáneo y aminora los efectos adversos de los GCs. A. Imágenes representativas de una hematoxilina-eosina en explantes de piel humana tratados con vehículo (V) o SDS durante 3 días seguidos se un tratamiento con V, Canre, Clobe y ambos (Clobe+Canre) durante 4 días. La línea discontinua separa la epidermis de la dermis. Las flechas indican el fenotipo globoso de los queratinocitos epidérmicos. Barra: 50 μ m. B. Niveles relativos de expresión de la citoquina pro-inflamatoria interleuquina 6 (*IL6*) en los explantes de piel humana tratados con SDS 3 días seguidos de los tratamientos en A 4 días. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos indicados (n=4 por tratamiento; *, p-valor<0.05).

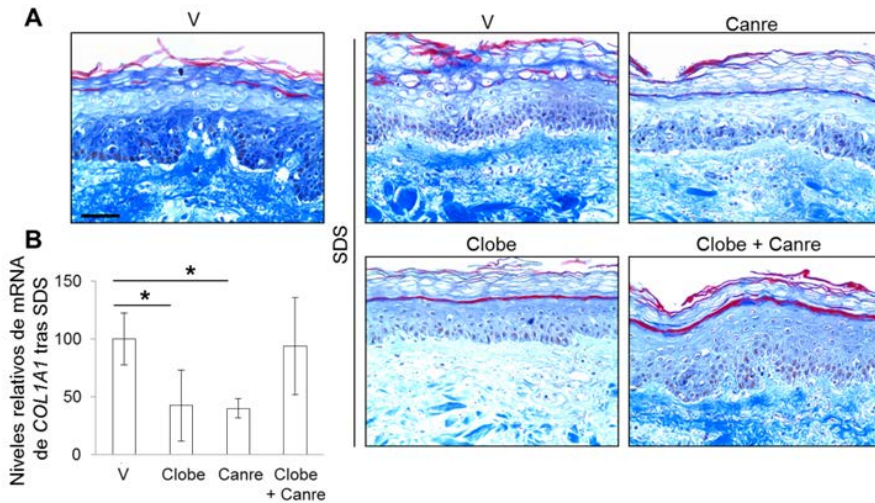


Figura 37. El tratamiento combinado de GCs (clobetasol, Clobe) y antagonistas de MR (canrenoato, Canre) en explantes de piel humana tratados con SDS mejora el daño cutáneo y aminora los efectos adversos de los GCs. A. Imágenes representativas de una tinción con tricrómico de Masson en explantes de piel humana tratados con vehículo (V) o SDS durante 3 días seguidos se un tratamiento con V, canrenoato (Canre), clobetasol (Clobe) y ambos (Clobe+Canre) durante 4 días. Barra: 50 µm. B. Niveles relativos de expresión de colágeno 1A1 (COL1A1) en los explantes de piel humana tratados con SDS 3 días seguidos de los tratamientos en A durante 4 días. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos indicados (n=4 por tratamiento; *, p-valor<0.05).

Tras comprobar que el tratamiento combinado mejora los efectos de atrofia cutánea de los GCs en condiciones de patología, es importante analizar si el bloqueo de MR preserva las acciones anti-inflamatorias de este tratamiento. Para ello, utilizamos como marcador la citoquina pro-inflamatoria *IL6* que se reprime tras un tratamiento con GCs (Schoepe *et al.*, 2011, Hengge *et al.*, 2006). Hemos analizado la expresión de *IL6* en los explantes de piel humana tratados con SDS, SDS+Clobe, SDS+Canre, y SDS+Clobe+Canre. El tratamiento con Clobe redujo los niveles de expresión de *IL6* en un 80% respecto al control, como se ha descrito en trabajos anteriores (Hua *et al.*, 2016). El tratamiento con Canre también redujo significativamente los niveles de esta citoquina, alrededor de un 70%, de forma contraria a nuestros experimentos previos, lo que podría

explicarse por la inactivación de MR en el resto de tipos celulares distintos a los queratinocitos. Por último, el tratamiento combinado no redujo los niveles de *IL6* inducidos por el SDS (Figura 36. B), sugiriendo que el bloqueo farmacológico de MR interfiere con las acciones anti-inflamatorias de los GCs.

A partir de estos experimentos, resulta difícil concluir si el bloqueo total de MR en piel tiene efectos pro-inflamatorios o anti-inflamatorios; si bien es importante recordar que algunos de los efectos observados pueden deberse a los efectos inespecíficos del Canre. Sin embargo, dado que los niveles de *IL6* no disminuyeron tras el tratamiento conjunto con GCs y el antagonista de MR, nuestros datos subrayan la necesidad de analizar la expresión de otros marcadores de inflamación antes de trasladar este tratamiento combinado a la clínica.

Otro de los puntos importantes a valorar es si el tratamiento Clobe+Canre es capaz de revertir las características hiperproliferativas causadas por el SDS y si afecta o no la diferenciación de los queratinocitos necesaria para una correcta función de barrera epidérmica. Para ello, analizamos mediante técnicas inmunohistoquímicas la expresión de K6 y LOR en los explantes de piel humana. Como ya se ha comentado en este trabajo, la expresión ectópica de K6 se asocia en muchos casos a patologías hiperproliferativas, como ocurre tras el tratamiento con SDS (Figura 38. A, V). El tratamiento con Clobe redujo los niveles de K6 y confinó su expresión a capas suprabasales. El tratamiento con Canre no produjo cambios respecto al control, sin embargo, el tratamiento combinado mejoró parcialmente los efectos del SDS restringiendo parcialmente la expresión de K6 a las capas suprabasales, sugiriendo que MR media, en parte, el efecto observado (Figura 38. A).

El marcador de diferenciación LOR presenta una expresión discontinua tras el tratamiento con SDS, sin embargo, el Clobe recupera su continuidad. Ni el tratamiento con Canre ni el tratamiento combinado son capaces de

revertir los efectos de SDS quedando la expresión de LOR en parches (Figura 38. B). Estos resultados sugieren que MR es necesario para mediar los efectos de los GCs, tanto para disminuir la hiperproliferación (K6) causada por el SDS como para restaurar la barrera epidérmica (LOR) alterada.

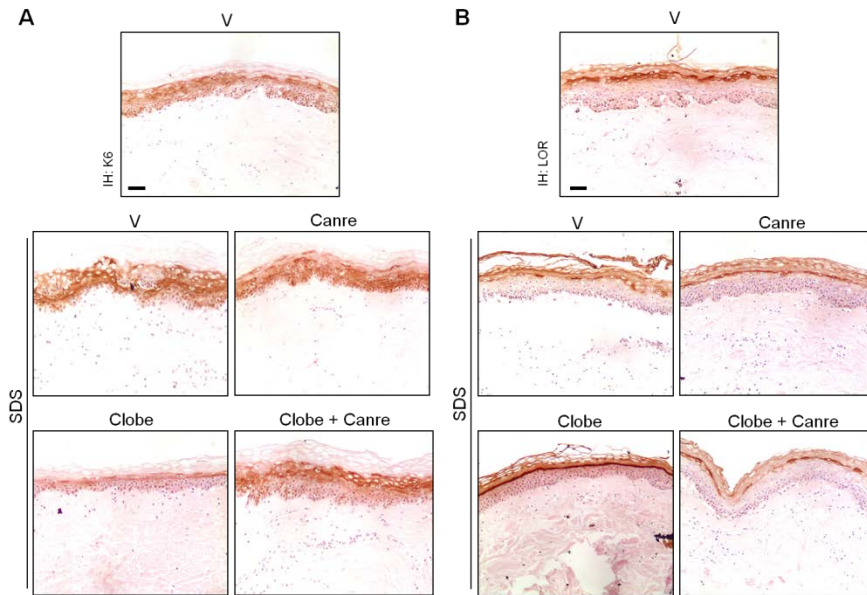


Figura 38. El tratamiento conjunto con antagonistas de MR (canrenoato, Canre) y clobetasol (Clobe) en explantes de piel humana tratada con SDS reduce los efectos beneficiosos del Clobe en proliferación (disminución de K6) y diferenciación (loricrina, LOR). A y B. Imágenes representativas de una inmunohistoquímica utilizando anticuerpos específicos frente a K6 (A) y LOR (B) en explantes de piel humana tratados con vehículo (V) o SDS durante 3 d seguidos de un tratamiento con V, Canre, Clobe o ambos (Clobe+Canre) durante 4 d. Barra: 50 μ m.

Es importante comentar que los resultados del tratamiento con SDS en ratones MR^{EKO} y en explantes de piel humana tratados con Canre presentan algunas diferencias. En primer lugar, en los ratones MR^{EKO}, MR está inactivado específicamente en la epidermis, sin embargo, en los explantes de piel humana el tratamiento con Canre bloquea funcionalmente MR en todos los tipos celulares de este tejido. El papel de MR en otros tipos celulares distintos de queratinocitos puede ser diferente, en este caso pro-

inflamatorio, y contribuir al fenotipo menos grave en explantes de piel humana. Es posible, además, que algunas diferencias se deban a que el Canre no es un antagonista farmacológico específico de MR sino que además tenga efectos adicionales sobre otros receptores, como el de andrógenos y progesterona, que pueden contribuir al fenotipo observado. Por último, y aunque menos probable, las diferencias podrían deberse a que los experimentos están realizados en especies distintas.

Para concluir esta parte, podemos decir que el uso del tratamiento combinado de GCs con antagonistas de MR necesita estudios adicionales antes de llevarse a la clínica. A pesar de que el tratamiento combinado revierte parcialmente algunos de los efectos de atrofia cutánea, como el grosor epidérmico y la deposición de colágeno dérmica, la inactivación de MR podría tener otros efectos secundarios si consideramos el papel anti-inflamatorio de MR en queratinocitos, el posible papel de MR en la regulación negativa de GR por GCs o la participación de MR en la reversión de la hiperproliferación y la recuperación de la expresión de LOR. Además, se necesitan experimentos adicionales para concluir si la inactivación de MR en pacientes preserva los efectos anti-inflamatorios de los tratamientos con GCs.

5.3. Análisis comparativo de la respuesta a GCs en ratones control, MR^{EKO}, y GR^{EKO}

En un trabajo anterior del grupo se generó y caracterizó el modelo de ratón GR^{EKO} (Sevilla *et al.*, 2013). El fenotipo cutáneo de los ratones GR^{EKO} en la edad adulta presenta analogías con los animales MR^{EKO}, como un mayor grosor epidérmico y una mayor proliferación de los queratinocitos epidérmicos basales (Sevilla *et al.*, 2013) apuntando, de nuevo, a acciones anti-proliferativas de ambos receptores. En el mismo trabajo se describe que el tratamiento con Dex durante 48h en ratones adultos control produjo signos de atrofia cutánea con una epidermis muy aplanada y la inhibición de

la proliferación de los queratinocitos, mientras que apenas tuvo efectos en los ratones GR^{EKO}

Si comparamos los efectos del tratamiento con Dex 48h en los ratones control, MR^{EKO} y GR^{EKO} en términos de proliferación, observamos resultados similares, que sugieren que los efectos anti-proliferativos de Dex están mediados tanto por MR como por GR (Figura 32. B; Sevilla *et al.*, 2013).

Adicionalmente, y para entender el papel de cada uno de los receptores como mediadores de la respuesta a GCs crónicos, evaluamos el fenotipo cutáneo de ratones control, GR^{EKO} y MR^{EKO} en respuesta a la aplicación de Dex durante 1 semana (Figura 39). El análisis comparativo de las tinciones H&E de secciones de piel de adulto de ratones control, GR^{EKO} y MR^{EKO} nos ha permitido concluir que mientras Dex causó una reducción evidente en el grosor epidérmico de los animales control, dicha reducción fue comparativamente menor en los animales GR^{EKO} y MR^{EKO}. Estos datos indican que ambos receptores median la atrofia epidérmica causada por los GCs y que la falta de cada uno de ellos revertiría parcialmente el adelgazamiento epidérmico observado.

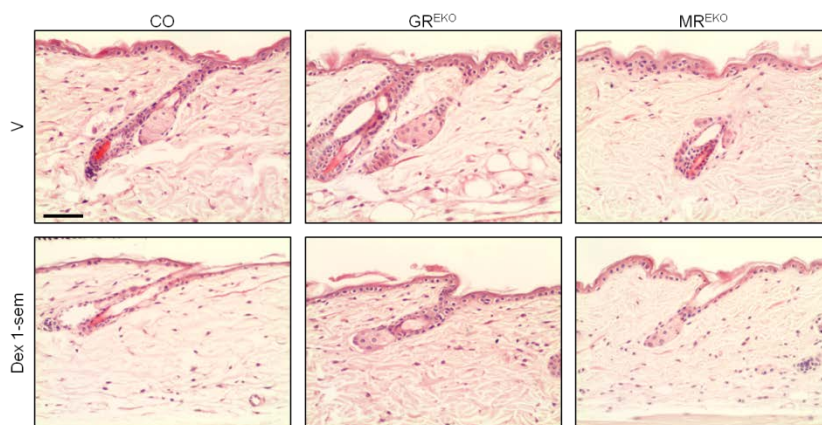


Figura 39. La inactivación epidérmica de tanto de MR como de GR protege parcialmente de la atrofia epidérmica inducida por Dex. Comparativa de imágenes representativas de una hematoxilina-eosina en la piel de los ratones control (CO), GR^{EKO} y MR^{EKO} tratados con vehículo (V) y Dex durante 1 semana. Barra: 50 μ m.

5.4. Respuesta transcripcional de queratinocitos control, MR^{EKO} y GR^{EKO} a un tratamiento con Dexametasona

Es bien conocido que los GCs inducen la activación de GR dando lugar a diversas modificaciones post-traduccionales que incluyen su fosforilación en distintos residuos de serina, entre ellas la Ser(211); GR fosforilado se transloca al núcleo y regula la transcripción génica (Gallier-Beckley *et al.*, 2011, Wang *et al.*, 2002). Para comprobar si la ausencia de MR afectaba de algún modo la expresión o fosforilación de GR y, por tanto, su actividad, realizamos *western blot* utilizando anticuerpos específicos para GR total y GR fosforilado en la Ser(211), calculando la ratio p-GR/GR total como indicativo de la actividad de GR. Este análisis nos permitió concluir que ni la expresión ni la actividad de GR estaban afectadas en ausencia de MR, en la línea MR^{EKO}, en respuesta a Dex (Figura 40. A).

En trabajos previos hemos demostrado que en queratinocitos control, un tratamiento con Dex induce la translocación nuclear de GR (Sevilla *et al.*, 2015); sin embargo, no se había demostrado hasta el momento qué ocurría con MR. En células control transfectadas con hemaglutinina-MR (HA-MR) hemos comprobado que el tratamiento con Dex también induce la translocación nuclear de MR; de hecho, MR y GR co-localizan en el núcleo de estas células transfectadas (Figura 40. B).

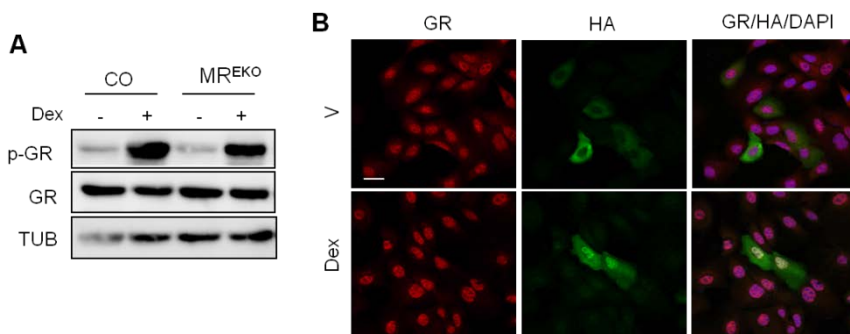


Figura 40. En queratinocitos en cultivo, en presencia de Dex, MR y GR se translocan al núcleo donde co-localizan. A. Western blot de extractos celulares de queratinocitos

control (CO) y MR^{EKO} tratados con vehículo (-) y Dex (+) durante 1 h. Se ha detectado la expresión de fosfo (p)-GR, GR y tubulina (TUB) utilizando anticuerpos específicos para cada caso. B. Imágenes representativas de una inmunofluorescencia anti-GR y anti-hemaglutinina (HA) en queratinocitos CO transfectado con HA-MR y tratados con vehículo (V) y Dex durante 1 h. En el panel de la derecha se muestra la señal combinada de GR (rojo), HA (verde) y DAPI (azul). Barra: 20 μ m.

Para comprobar si ambos receptores simplemente co-localizaban o, además, interaccionaban en el núcleo en presencia de Dex utilizamos la técnica de *proximity ligation assay* (PLA, Greenwood *et al.*, 2015, Gajadhar y Guha, 2010). Para estos experimentos utilizamos una línea inmortalizada de queratinocitos en cultivo deficientes en MR y GR (datos sin publicar), que transfectamos con cantidades equivalentes de ambos receptores (HA-GR y GFP-MR, Figura 41). En primer lugar, comprobamos mediante experimentos de inmunofluorescencia que ambos receptores (HA-GR y GFP-MR) se encontraban en el citoplasma en ausencia de ligando y translocaban al núcleo en presencia de Dex en los queratinocitos deficientes en MR y GR transfectados con una u otra construcción (Figura 41. B). Para investigar la posible formación de heterodímeros en presencia de Dex, transfectamos esta línea de queratinocitos con HA-GR y GFP-MR observando mediante PLA que ambos receptores heterodimerizaban en el citoplasma en ausencia de ligando y se translocaban al núcleo en presencia de Dex (Figura 41. B, izquierda). Adicionalmente, quisimos estudiar el comportamiento de los homodímeros MR en respuesta a Dex, por lo que transfectamos la misma línea de queratinocitos con las construcciones HA-MR y GFP-MR. Los homodímeros MR se encontraban en el citoplasma en ausencia de ligando y translocaban al núcleo en presencia de Dex (Figura 41. B, centro). Como control positivo, analizamos la formación de homodímeros MR en el núcleo en presencia de Aldo descrita anteriormente (Jiménez-Canino *et al.*, 2016). La falta de señal en los controles negativos apoya la especificidad de la técnica (Figura 41. B, derecha).

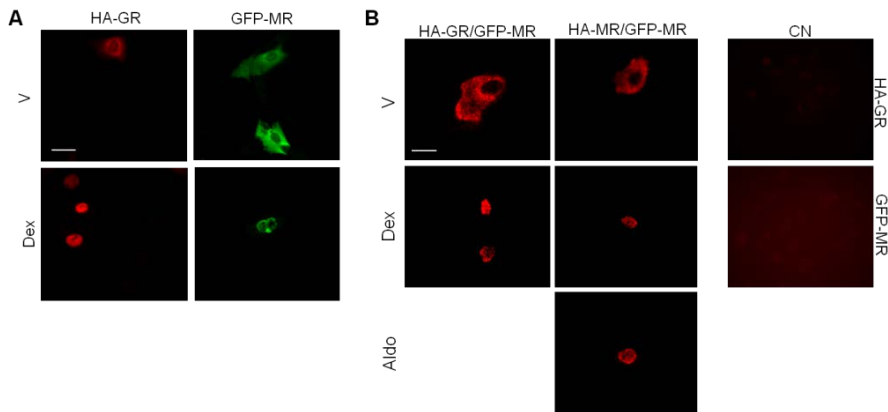


Figura 41. MR y GR heterodimerizan en el citoplasma en ausencia de ligando y en el núcleo en presencia de Dex en queratinocitos en cultivo. A. Imágenes representativas de una inmunofluorescencia anti-hemaglutinina (HA, rojo) y anti-GFP (verde) en queratinocitos deficientes para MR y GR transfectados con HA-GR o GFP-MR y tratados con V y Dex durante 1 h. Barra: 20 μ m. B. Imágenes representativas de fluorescencia para la técnica de *proximity ligation assay* en queratinocitos deficientes para MR y GR transfectados con HA-GR y GFP-MR (izquierda) o HA-MR y GFP-MR (centro) y tratados con vehículo (V), Dex o Aldo durante 16 h. Los controles negativos (CN, derecha) muestran la especificidad de la técnica Barra: 20 μ m.

Estos datos apoyan la interacción de ambos receptores cuando están a una ratio 1:1. Dex induce la translocación nuclear tanto de los homodímeros MR como de los heterodímeros MR-GR. La formación de un complejo u otro puede estar relacionada con la expresión de cada uno de los receptores dependiendo de si la célula se encuentra en una situación fisiológica o patológica.

A continuación realizamos experimentos de transfección con un *reporter* GRE-luciferasa (GRE-luc; Necela y Cidlowski, 2004), que contiene los sitios canónicos GRE, en queratinocitos control y MR^{EKO} y evaluamos la respuesta a Dex. En la línea de queratinocitos control detectamos un incremento en la actividad del *reporter* de 8 veces tras el tratamiento con Dex, mientras que en MR^{EKO} la actividad era un 40% menor. Reinsertando distintas dosis de MR mediante transfección en las células MR^{EKO} recuperamos esa actividad GRE-luc hasta alcanzar niveles equivalentes a

los de las células control (Figura 42. A, B), indicando que MR es necesario para una respuesta transcripcional óptima a Dex. Utilizando una aproximación complementaria, inhibimos farmacológicamente MR en los queratinocitos control tratándolos con el antagonista de MR Eple, los transfectamos con el *reporter* GRE-luc y los tratamos con Dex, Eple o el tratamiento combinado Dex+Eple. El tratamiento con Dex aumentó la actividad GRE-luc entre 8-9 veces con respecto al vehículo, como en el experimento anterior. Eple no produjo diferencias en la actividad GRE-luc con respecto al vehículo, sin embargo, el tratamiento combinado con Dex+Eple disminuyó la actividad del *reporter* un 50% respecto al tratamiento con Dex (Figura 42. C). Estos resultados apoyan los datos anteriores y demuestran que MR regula la respuesta transcripcional a GCs a través de sitios GRE.

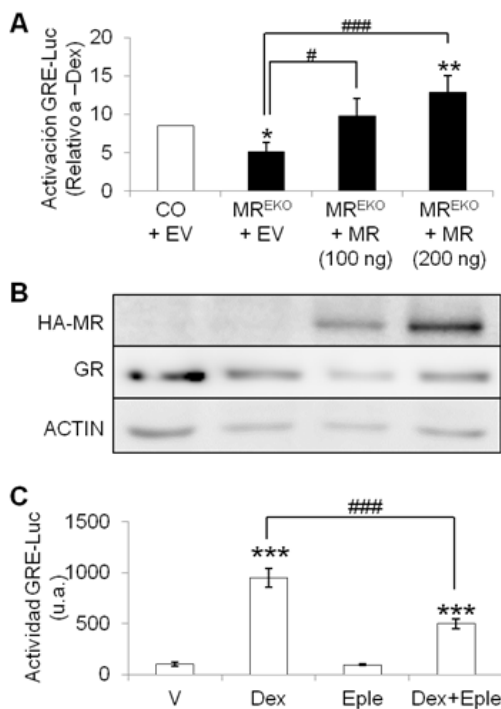


Figura 42. MR en queratinocitos es necesario para mediar la respuesta transcripcional a GCs. A. Activación GRE-Luciferasa (GRE-luc) en queratinocitos control (CO) y MR^{EKO} transfectados con vector vacío (EV) o HA-MR y tratados con vehículo (-Dex) o Dex. Los

resultados se muestran como la ratio actividad GRE-luc en queratinocitos tratados con Dex relativo a vehículo. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas frente al CO, las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas entre el resto de grupos (n=9 por genotipo y tratamiento; *, #, p-valor<0.05; **, p-valor<0.01; ###, p-valor<0.001). B. *Western blot* de queratinocitos CO y MR^{EKO} transfectados con vector vacío (EV) o HA-MR y tratados con vehículo; se ha detectado la expresión de HA-MR y GR. Actina es el control de carga. C. Actividad GRE-luc en queratinocitos CO pretratados con eplerenona (Eple) 16h en los casos indicados seguidos del tratamiento con vehículo (V) o Dex durante 5h. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas frente al V, las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas entre el resto de grupos (n=4 por tratamiento; ***, ###, p-valor<0.001).

En un trabajo anterior del grupo se ha demostrado que el gen *Glucocorticoid-induced leucin zipper (Gilz/Tsc22d3)* se expresa constitutivamente en queratinocitos en cultivo y se induce en respuesta a GCs mediante el reclutamiento de GR a las secuencias reguladoras del gen que contienen elementos GRE (Sevilla *et al.*, 2015). Hemos querido analizar si la inducción de *Gilz* por GCs se ve afectada en ausencia de MR. Para ello, cultivamos células control y MR^{EKO} y analizamos los niveles de mRNA de *Gilz* en respuesta a Dex. En queratinocitos control, Dex indujo la expresión de *Gilz* 5 veces mientras que la inducción era prácticamente inexistente en queratinocitos MR^{EKO} (Figura 43. A). A continuación realizamos ensayos de inmunoprecipitación de cromatina con anticuerpos específicos anti-GR, seguidos de qPCR (ChIP-qPCR) en células control y MR^{EKO}. Nuestros datos mostraron un menor reclutamiento de GR a estas secuencias reguladoras en células MR^{EKO} respecto a los controles, tanto en ausencia como en presencia de Dex (Figura 43. B). Por otro lado, en los queratinocitos GR^{EKO}, deficientes en GR pero con expresión normal de MR, no detectamos inducción transcripcional de *Gilz* en respuesta a Dex (Figura 43. A). Estos resultados indican que tanto MR como GR participan en la regulación transcripcional de *Gilz* por GCs, ya que la ausencia de uno u otro impide una inducción óptima de este gen. Es plausible que sea el propio MR, en presencia de Dex, el que se reclute a las mismas secuencias reguladoras de *Gilz* que GR. Para comprobarlo, realizamos ensayos de ChIP-qPCR con anticuerpos específicos anti-MR pero no detectamos

reclutamiento de este receptor a esa secuencia en respuesta a Dex en nuestras condiciones experimentales (Figura 43. C). Una posible explicación sería que MR, en presencia de Dex, se una a otras secuencias adyacentes a la que se une GR pero que no somos capaces de detectar con nuestros cebadores.

Como control positivo realizamos el mismo experimento de CHIP-qPCR con el anticuerpo anti-MR en queratinocitos control tratados con Aldo y, en este caso, sí detectamos reclutamiento de MR a las secuencias reguladoras de *Gilz* (Figura 43. D).

El reclutamiento diferencial de MR a las secuencias reguladoras de *Gilz* en función del ligando indica que cada ligando modula el receptor de manera distinta. Varios trabajos han descrito que Aldo estabiliza MR de forma más eficiente que los GCs (Ong y Young., 2017, Huyet *et al.*, 2012, Farman y Rafestin-Oblin, 2001) y, por tanto, la unión de MR a las secuencias reguladoras de *Gilz* en respuesta a Dex sería transitoria e impediría detectar el reclutamiento de complejos GC-MR en las condiciones de este experimento.

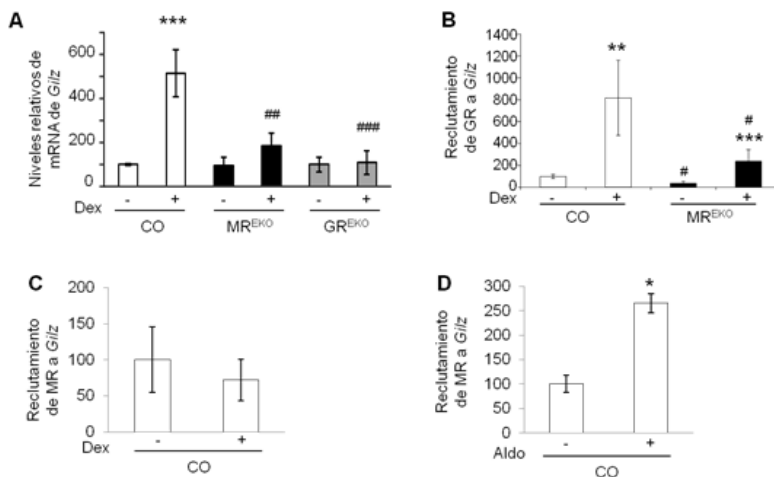


Figura 43. MR y GR median la inducción de *Gilz* por GCs. MR es necesario para el reclutamiento de GR a las secuencias reguladoras de *Gilz*. A. Niveles de expresión relativa de *Gilz* en queratinocitos control (CO), MR^{EKO} y GR^{EKO} tratados con vehículo (-) y Dex (+) durante 3h. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas

entre tratamientos dentro del mismo genotipo, las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas entre genotipos dentro del mismo tratamiento ($n \geq 3$ por genotipo y tratamiento; *, p-valor <0.05 ; ##, p-valor <0.01 ; ###, p-valor <0.001). B-D. Experimentos de ChIP-qPCR en queratinocitos CO y MR^{EKO} (según se indica) tratados con vehículo (-), Dex (+, B, C) o Aldo (+, D) donde se representa el reclutamiento de GR (B) o MR (C, D) a las secuencias reguladoras de *Gilz*. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos dentro del mismo genotipo, las almohadillas indican diferencias estadísticamente significativas genotipos dentro del mismo tratamiento ($n=4$ por genotipo y tratamiento en B, $n=3$ por tratamiento en C, D; *, #, p-valor <0.05 ; **, p-valor <0.01 ; ***, p-valor <0.001).

Cómo se modula la respuesta transcripcional diferencial de MR en función del ligando (MCs ó GCs), es una de las cuestiones abiertas. En esta tesis no hemos abordado el estudio de MR en piel en respuesta a Aldo por cuestiones de tiempo, sin embargo, sí se han publicado trabajos de ChIP-seq que describen genes diana de MR en respuesta a Aldo en células de riñón y cardiomiocitos (Le Billan *et al.*, 2015, Ueda *et al.*, 2014, Messaoudi *et al.*, 2013, Ziera *et al.*, 2009). Hasta el momento no se ha publicado ningún trabajo donde se describan los genes diana de MR en respuesta a GCs mediante experimentos de ChIP-seq en ningún tipo celular.

Uno de los genes diana de MR en respuesta a Aldo descritos en el trabajo de Ueda y colaboradores es *Gilz*, lo que indica que este gen es una diana transcripcional primaria tanto de GR como de MR en distintos tipos celulares, incluyendo queratinocitos (Sevilla *et al.*, 2015, Ueda *et al.*, 2014, Figura 43. D).

Tras el análisis de estos resultados nos preguntamos si MR, en ausencia de GR, era suficiente para mediar la respuesta transcripcional a GCs. Para ello, transfectamos las células GR^{EKO} con HA-MR, GR o ambos y estudiamos la actividad GRE-luc en respuesta a Dex. Al transfectar MR, la actividad GRE-luc aumentó 40 veces con respecto a las células transfectadas con el vector vacío (EV, empty vector), indicando que MR es transcripcionalmente activo incluso en ausencia de GR y está de acuerdo con la formación de homodímeros MR en el núcleo en respuesta a Dex (Figura 41. B). Sin embargo, cuando se restauraron los niveles de GR, la

actividad GRE-luc aumentó un orden de magnitud respecto a la conseguida con MR. Al transfectar ambos receptores no se produjo un efecto aditivo (Figura 44. A, B). Estos resultados sugieren que GR juega un papel central en la respuesta a GCs mientras que MR desempeña un papel modulador. En ausencia de GR, se pierde la regulación de muchos de los genes diana de GCs (Sevilla *et al.*, 2015), sin embargo, en ausencia de MR, GR es capaz de mediar parcialmente la respuesta a GCs (Figura 42). El hecho de que la transfección conjunta de MR y GR no produzca un efecto aditivo en la respuesta a Dex podría deberse a alteraciones en la ratio fisiológica MR:GR o a que los cofactores o el *reporter* GRE-luc estén en cantidades limitantes. Aunque no hemos determinado la ratio fisiológica de MR:GR en piel a nivel de proteína, los valores Ct de nuestros datos de RT-qPCR indican que la expresión de MR es relativamente baja en comparación con la de GR (Figuras 26, 28 y 34). Además, el concepto de ratio MR:GR puede ser decisivo en la respuesta transcripcional a diversos ligandos dependiendo del contexto celular y determinadas situaciones patológicas.

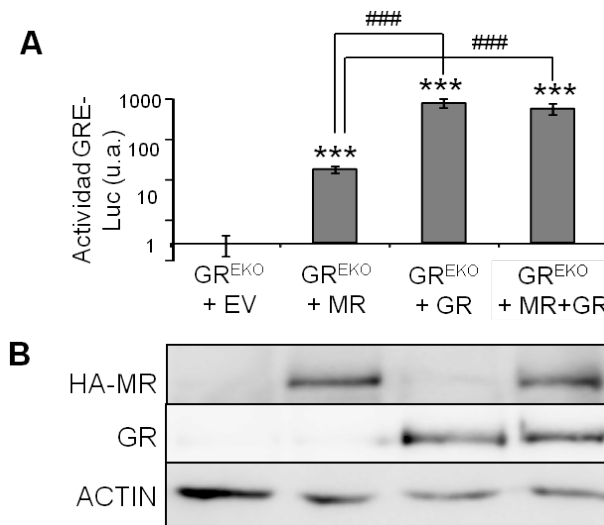


Figura 44. En ausencia de GR, MR es capaz de mediar la activación transcripcional mediante GREs en respuesta a GCs. A. Actividad GRE-Luciferasa (GRE-luc) en queratinocitos GR^{EKO} transfectados con vector vacío (EV), HA-MR, GR o ambos y tratados con Dex durante 5h. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas frente a los queratinocitos transfectados con EV, las almohadillas indican

diferencias estadísticamente significativas entre el resto de grupos indicados (n=4 por tratamiento; ***, ###, p-valor<0.001). B. *Western blot* de queratinocitos GR^{EKO} transfectados con EV, HA-MR, GR o ambos y tratados con vehículo; se ha detectado la expresión de HA-MR y GR. Actina es el control de carga.

En conjunto, nuestros resultados apoyan un papel complejo de MR en queratinocitos epidérmicos tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, como se ha demostrado por los experimentos *in vivo* e *in vitro*. La inactivación de MR epidérmico altera la homeostasis de la piel (mayor proliferación y diferenciación de queratinocitos) aumentando la susceptibilidad a patologías cutáneas tanto de disrupción de la barrera epidérmica como inflamatorias. El aumento de los factores de transcripción pro-inflamatorios STAT3 y NF-κB en ausencia de MR apoya la función anti-inflamatoria de este receptor en queratinocitos. Por otra parte, MR epidérmico media parcialmente los efectos adversos (adelgazamiento epidérmico) inducidos por los tratamientos crónicos con GCs. Nuestros estudios *in vitro* demuestran que la falta de MR en queratinocitos reduce significativamente la respuesta transcripcional inducida por GCs debido a un menor reclutamiento de GR a las secuencias consenso GRE. En conjunto, nuestros datos apoyan papeles comunes y diferenciales de MR y GR en piel, que deben tenerse en cuenta para el diseño de nuevas terapias basadas en el uso de GCs.

Conclusiones

1. El análisis de la expresión de MR durante el periodo embrionario reveló un papel transitorio de este receptor en el desarrollo de la piel de ratón. Los embriones (E17.5) MR^{-/-}, presentaron defectos menores en proliferación y diferenciación epidérmica que se resolvieron posteriormente.
2. La generación y caracterización del fenotipo en piel de ratones con inactivación de MR específica de epidermis (MR^{EKO}) reveló un aumento en la proliferación y diferenciación de queratinocitos adultos *in vivo*. La generación y análisis de líneas inmortalizadas de queratinocitos en cultivo MR^{EKO} es consistente con los resultados obtenidos *in vivo*.
3. En situaciones de patología que imitan la dermatitis de contacto (SDS), MR juega un papel beneficioso, ya que los ratones MR^{EKO} presentaron un mayor daño cutáneo en respuesta al SDS, con un aumento en la expresión de S100A9 y la actividad de STAT3.
4. En patologías de inflamación aguda (PMA), MR epidérmico actúa como anti-inflamatorio ya que los ratones MR^{EKO} mostraron mayor inducción de citoquinas pro-inflamatorias (*Il6* y *Sipi*) en respuesta a PMA. Los resultados *in vivo* correlacionan con los observados en queratinocitos epidérmicos, donde detectamos una mayor respuesta al PMA con mayor inducción de citoquinas pro-inflamatorias (*Tnfa*, *Il6* y *Sipi*) y activación de la vía NF-κB.
5. MR en queratinocitos es necesario para la correcta cicatrización cutánea. Los ratones MR^{EKO} presentaron una menor deposición de colágeno dérmico así como una desorganización de la epidermis *de novo* apuntando defectos en el proceso de re-epitelización consistentes con un retraso en la migración de queratinocitos *in vitro*.
6. La inactivación de MR epidérmico protege parcialmente frente a la atrofia cutánea inducida por un tratamiento continuado con GCs en términos de grosor epidérmico, tanto en modelos animales como en explantes de piel humana; si bien, es dudoso si el bloqueo de MR preserva los efectos anti-inflamatorios.

7. En queratinocitos, MR forma heterodímeros con GR en el citoplasma, que translocan al núcleo en respuesta a Dex. MR es necesario para una respuesta transcripcional óptima a GCs en queratinocitos, y participa en la inducción del gen *Gilz*, modulando positivamente el reclutamiento de GR a secuencias reguladoras GRE en respuesta a Dex.

Bibliografía

Aguilar-Sánchez C, Hernández-Díaz I, Lorenzo-Díaz F, Navarro JF, Hughes TE, Giraldez T, Alvarez de la Rosa D. Identification of permissive insertion sites for generating functional fluorescent mineralocorticoid receptors. *Endocrinology*. 2012;153(7):3517–25.

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

Beer HD, Fässler R, Werner S. Glucocorticoid-regulated gene expression during cutaneous wound repair. *Vitam Horm*. 2000;59:217–39.

Berger S, Bleich M, Schmid W, Cole TJ, Peters J, Watanabe H, Kriz W, Warth R, Greger R, Schütz G. Mineralocorticoid receptor knockout mice: pathophysiology of Na⁺ metabolism. *PNAS*. 1998;95(16):9424–9429.

Berger S, Wolfer DP, Selbach O, Alter H, Erdmann G, Reichardt HM, Chepkova AN, Welzl H, Haas HL, Lipp HP, Schütz G. Loss of the limbic mineralocorticoid receptor impairs behavioral plasticity. *PNAS*. 2006 Jan 3;103(1):195-200.

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

Candi E, Schmidt R, Melino G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nature Rev Mol Cell Biol*. 2005; 6:328-40.

Chung NM, Marshall CM, Leyden JJ, Lavker RM, Jensen PJ, Risse Marsh BC. Sodium dodecyl sulfate induces plasminogen

activator inhibitor type 2 expression in epidermal keratinocytes in vivo and in vitro. *J Invest Dermatol.* 2001 Sep;117(3):647-53.

Cole TJ, Blendy JA, Monaghan AP, Krieglstein K, Schmid W, Aguzzi A, Fantuzzi G, Hummler E, Unsicker K, Schütz G. Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes Dev.* 1995 Jul 1;9(13):1608-21.

Cui CY, Childress V, Piao Y, Michel M, Johnson AA, Kunisada M, Ko MS, Kaestner KH, Marmorstein AD, Schlessinger D. Forkhead transcription factor FoxA1 regulates sweat secretion through Bestrophin 2 anion channel and Na-K-Cl cotransporter 1. *PNAS.* 2012 Jan 24;109(4):1199-203.

Cutroneo KR, Sterling KM Jr. How do glucocorticoids compare to oligo decoys as inhibitors of collagen synthesis and potential toxicity of these therapeutics? *J Cell Biochem.* 2004 May 1;92(1):6-15.

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

Donet E, Bosch P, Sanchis A, Bayo P, Ramírez A, Cascallana JL, Bravo A, Pérez P. Transrepression function of the glucocorticoid receptor regulates eyelid development and keratinocyte proliferation but is not sufficient to prevent skin chronic inflammation. *Mol Endocrinol.* 2008 Apr;22(4):799-812.

Dougherty EJ, Elinoff JM, Ferreyra GA, Hou A, Cai R, Sun J, Blaine KP, Wang S, Danner RL. Mineralocorticoid Receptor (MR) Trans-Activation of Inflammatory AP-1 Signaling: Dependence on

DNA Sequence, MR Conformation, and AP-1 Family Member Expression. *J Biol Chem.* 2016 Sep 20.

Eckert RL: Structure, function, and differentiation of the keratinocyte. *Physiol Rev.* 1989; 69: 1316.

Eliwa MS, El-Emmawie AH, Saeed MA. Ocular and skin manifestations in systemic pseudohypoaldosteronism. *BMJ Case Rep.* 2014 Mar 20;2014.

Faresse N. Post-translational modifications of the mineralocorticoid receptor: How to dress the receptor according to the circumstances? *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014 Sep;143:334-42.

Farman N, Rafestin-Oblin ME. Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2001 Feb;280(2):F181-92.

Farman N, Maubec E, Poeggeler B, Klatte JE, Jaisser F, Paus R. The mineralocorticoid receptor as a novel player in skin biology: beyond the renal horizon? *Exp Dermatol.* 2010;19:100–07.

Fowler SD, Greenspan P. 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.* 1985 Aug;33(8):833-6.

Fuchs E, Horsley V. More than one way to skin...*Genes Dev.* 2008 Apr 15;22(8):976-85.

Gajadhar A and Guha A. A proximity ligation assay using transiently transfected, epitope-tagged proteins: application for in situ detection of dimerized receptor tyrosine kinases. *Biotechniques*. 2010 Feb;48(2):145-52.

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

Greenwood C, Ruff D, Kirvell S, Johnson G, Dhillon HS, Bustin SA. Proximity assays for sensitive quantification of proteins. *Biomol Detect Quantif*. 2015 May 20;4:10-6.

Gomez-Sanchez E, Gomez-Sanchez CE. The multifaceted mineralocorticoid receptor. *Compr Physiol*. 2014;4:965–94.

Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008;453: 314-21.

Hanley K, Feingold KR, Komuves LG, Elias P, Muglia LJ, Majzoub JA, Williams ML. Glucocorticoid deficiency delays stratum corneum maturation in fetal mouse. *J Invest Dermatol*. 1998 Sep;111(3):440-4.

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

Hawkins UA, Gomez-Sanchez EP, Gomez-Sanchez CM, Gomez-Sanchez CE. The ubiquitous mineralocorticoid receptor: clinical implications. *Curr Hypertens Rep.* 2012 Dec;14(6):573-80.

Hengge UR, Ruzicka T, Schwartz RA, Cork MJ. Adverse effects of topical glucocorticosteroids. *J Am Acad Dermatol.* 2006 Jan;54(1):1-15; quiz 16-8.

Hennings H, Michael D, Cheng C, Steinert P, Holbrook K, Yuspa SH. Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell.* 1980 Jan;19(1):245-54.

Hinds TD Jr, Ramakrishnan S, Cash HA, Stechschulte LA, Heinrich G, Najjar SM, Sanchez ER. Discovery of glucocorticoid receptor- β in mice with a role in metabolism. *Mol Endocrinol.* 2010; 24:1715-27.

Hua G, Ganti KP, Chambon P. Glucocorticoid-induced tethered transrepression requires SUMOylation of GR and formation of a SUMO-SMRT/NCoR1-HDAC3 repressing complex. *PNAS.* 2016 Feb 2;113(5):E635-43.

Huyet J, Pinon GM, Fay MR, Rafestin-Oblin ME, Fagart J. Structural determinants of ligand binding to the mineralocorticoid receptor. *Mol Cell Endocrinol.* 2012 Mar 24;350(2):187-95.

Jaisser F, Farman N. Emerging Roles of the Mineralocorticoid Receptor in Pathology: Toward New Paradigms in Clinical Pharmacology. *Pharmacol Rev.* 2016;68:49–75.

Jiménez-Canino R, Fernandes MX, Alvarez de la Rosa D. Phosphorylation of Mineralocorticoid Receptor Ligand Binding Domain Impairs Receptor Activation and Has a Dominant Negative Effect over Non-phosphorylated Receptors. *J Biol Chem.* 2016 Sep 2;291(36):19068-78.

Kenouch S, Lombes M, Delahaye F, Eugene E, Bonvalet JP, Farman N. Human skin as target for aldosterone: coexpression of mineralocorticoid receptors and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994;79:1334–41.

Kerkhoff C, Voss A, Scholzen TE, Averill MM, Zänker KS, Bornfeldt KE. Novel insights into the role of S100A8/A9 in skin biology. *Exp Dermatol.* 2012;21:822–26.

Kolkhof P, Borden SA. Molecular pharmacology of the mineralocorticoid receptor: prospects for novel therapeutics. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;350:310-17.

Korkut S, Gökalp E, Özdemir A, Kurtoğlu S, Demirtaş Ş, Gül Ü, Baştuğ O. Dermal and Ophthalmic Findings in Pseudohypoaldosteronism. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2015 Jun;7(2):155-8.

Latorre V, Sevilla LM, Sanchis A, Pérez P. Selective ablation of glucocorticoid receptor in mouse keratinocytes increases susceptibility to skin tumorigenesis. *J Invest Dermatol.* 2013;133:2771–9.

Le Billan F, Khan JA, Lamribet K, Viengchareun S, Bouligand J, Fagart J, Lombès M. Cistrome of the aldosterone-activated

mineralocorticoid receptor in human renal cells. *FASEB J.* 2015 Sep;29(9):3977-89.

Le TK, De Mon P, Schalkwijk J, van der Valk PG. Effect of a topical corticosteroid, a retinoid and a vitamin D3 derivative on sodium dodecyl sulphate induced skin irritation. *Contact Dermatitis.* 1997;37(1):19-26.

Lee MJ, Lee JK, Choi JW, Lee CS, Sim JH, Cho CH, Lee KH, Cho IH, Chung MH, Kim HR, Ye SK. Interleukin-6 induces S100A9 expression in colonic epithelial cells through STAT3 in experimental ulcerative colitis. *PLoS One.* 2012;7(9):e38801.

Liu S, Zhang H, Duan E. Epidermal development in mammals: key regulators, signals from beneath, and stem cells. *Int J Mol Sci.* 2013 May 24;14(6):10869-95.

Lu C, Fuchs E. Sweat gland progenitors in development, homeostasis, and wound repair. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014 Feb 1;4(2).

Martinerie L, Munier M, Menuet DL, Meduri G, Viengchareun S, Lombès M. The mineralocorticoid signaling pathway throughout development: Expression, regulation and pathophysiological implications. *Biochimie.* 2012;95:148–57.

Maubec E, Laouénan C, Deschamps L, Nguyen VT, Scheer-Senyarich I, Wackenheim-Jacobs AC, Steff M, Duhamel S, Tubiana S, Brahimi N, Leclerc-Mercier S, Crickx B, Perret C, Aractingi S, Escoubet B, Duval X, Arnaud P, Jaisser F, Mentré F, Farman N. Topical Mineralocorticoid Receptor Blockade Limits Glucocorticoid-

Induced Epidermal Atrophy in Human Skin. *J Invest Dermatol.* 2015 Jul;135(7):1781-9.

Meinel S, Gekle M, Grossmann C. Mineralocorticoid receptor signaling: crosstalk with membrane receptors and other modulators. *Steroids.* 2014 Dec;91:3-10.

Messaoudi S, Gravez B, Tarjus A, Pelloux V, Ouvrard-Pascaud A, Delcayre C, Samuel J, Launay JM, Sierra-Ramos C, Alvarez de la Rosa D, Clément K, Farman N, Jaisser F. Aldosterone-specific activation of cardiomyocyte mineralocorticoid receptor in vivo. *Hypertension.* 2013 Feb;61(2):361-7.

Mitts TF, Bunda S, Wang Y, Hinek A. Aldosterone and mineralocorticoid receptor antagonists modulate elastin and collagen deposition in human skin. *J Invest Dermatol.* 2010;130:2396–406.

Moreno-Bueno G, Peinado H, Molina P, Olmeda D, Cubillo E, Santos V, Palacios J, Portillo F, Cano A. The morphological and molecular features of the epithelial-to-mesenchymal transition. *Nat Protoc.* 2009;4(11):1591-613.

Muñoz-Durango N, Vecchiola A, Gonzalez-Gomez LM, Simon F, Riedel CA, Fardella CE, Kalergis AM. Modulation of Immunity and Inflammation by the Mineralocorticoid Receptor and Aldosterone. *Biomed Res Int.* 2015;2015:652738.

Necela BM, Cidlowski JA. A single amino acid change in the first zinc finger of the DNA binding domain of the glucocorticoid receptor regulates differential promoter selectivity. *J Biol Chem.* 2004 Sep 17;279(38):39279-88.

Nguyen VT, Farman N, Maubec E, Nassar D, Desposito D, Waeckel L, Aractingi S, Jaisser F. Re-Epithelialization of Pathological Cutaneous Wounds Is Improved by Local Mineralocorticoid Receptor Antagonism. *J Invest Dermatol*. 2016 Oct;136(10):2080-9.

Nicolaides N, Lamprokostopoulou A, Sertedaki A, Charmandari E. Recent advances in the molecular mechanisms causing primary generalized glucocorticoid resistance. *Hormones (Athens)*. 2016 Jan-Mar;15(1):23-34.

Nikolakis G, Stratakis CA, Kanaki T, Slominski A, Zouboulis CC. Skin steroidogenesis in health and disease. *Rev Endocr Metab Disord*. 2016 Sep;17(3):247-258.

Oakley RH, Cidlowski JA. Glucocorticoid signaling in the heart: A cardiomyocyte perspective. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2015 Sep;153:27-34.

Ong GS, Young MJ. Mineralocorticoid regulation of cell function: the role of rapid signalling and gene transcription pathways. *J Mol Endocrinol*. 2017 Jan;58(1):R33-R57.

Pastar I, Stojadinovic O, Yin NC, Ramirez H, Nusbaum AG, Sawaya A, Patel SB, Khalid L, Isseroff RR, Tomic-Canic M. Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2014 Jul 1;3(7):445-464.

Pérez P, Page A, Bravo A, del Río M, Gimenez-Conti I, Budunova I, Slaga TJ, Jorcano JL. Altered skin development and impaired proliferative and inflammatory responses in transgenic mice

overexpressing the glucocorticoid receptor. *FASEB J.* 2001 Sep;15(11):2030-2.

Pérez P. Glucocorticoid receptors, epidermal homeostasis and hair follicle differentiation *Dermato-Endocrinology.* 2011;3:1–9.

Ramamoorthy S, Cidlowski JA. Exploring the molecular mechanisms of glucocorticoid receptor action from sensitivity to resistance. *Endocr Dev.* 2013;24:41-56.

Ramamoorthy S, Cidlowski JA. Corticosteroids: Mechanisms of Action in Health and Disease. *Rheum Dis Clin North Am.* 2016 Feb;42(1):15-31, vii.

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

Riepe FG. Clinical and molecular features of type 1 pseudohypoaldosteronism. *Horm Res.* 2009;72(1):1-9.

Sacta MA, Chinenov Y, Rogatsky I. Glucocorticoid signaling: an update from a genomic perspective. *Annu Rev Physiol.* 2016;78:155-80.

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. Targeted skin overexpression of the mineralocorticoid receptor in mice causes epidermal atrophy,

premature skin barrier formation, eye abnormalities, and alopecia. *Am J Pathol.* 2007 Sep;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 2012;(1):e29701.

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

Schäcke H, Berger M, Rehwinkel H, Asadullah K. Selective glucocorticoid receptor agonists (SEGRAs): novel ligands with an improved therapeutic index. *Mol Cell Endocrinol.* 2007 Sep 15;275(1-2):109-17.

Schmuth M, Watson RE, Deplewski D, Dubrac S, Zouboulis CC, Griffiths CE. Nuclear hormone receptors in human skin. *Horm Metab Res.* 2007 Feb;39(2):96-105.

Schneider MR. Genetic mouse models for skin research: strategies and resources. *Genesis.* 2012 Sep;50(9):652-64.

Schoepe S, Schäcke H, May E, Asadullah K. Glucocorticoid therapy-induced skin atrophy. *Exp Dermatol.* 2006 Jun;15(6):406-20.

Schoepe S, Schäcke H, Asadullah K. Test systems for the determination of glucocorticoid receptor ligand induced skin atrophy. *Dermatoendocrinol.* 2011 Jul;3(3):175-9.

Schulz-Baldes A, Berger S, Grahammer F, Warth R, Goldschmidt I, Peters J, Schütz G, Greger R & Bleich M 2001 Induction of the

epithelial Na⁺ channel via glucocorticoids in mineralocorticoid receptor knockout mice. *Pflügers Arch - Eur J Physiol.* 443:297–305.

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

Sevilla LM, Bayo P, Latorre V, Sanchis A, Perez P. Glucocorticoid receptor regulates overlapping and differential gene subsets in developing and adult skin. *Mol Endocrinol.* 2010; 24, 2166–2178.

Sevilla LM, Latorre V, Sanchis A, Pérez P. Epidermal inactivation of the glucocorticoid receptor triggers skin barrier defects and cutaneous inflammation. *J Invest Dermatol.* 2013;33:361–70.

Sevilla LM, Latorre V, Carceller E, Boix J, Vodak D, Mills IG, Pérez P. Glucocorticoid receptor and Klf4 co-regulate anti-inflammatory genes in keratinocytes. *Mol Cell Endocrinol.* 2015 Sep 5;412:281-9.

Skobowiat C, Sayre RM, Dowdy JC, Slominski AT. Ultraviolet radiation regulates cortisol activity in a waveband-dependent manner in human skin ex vivo. *Br J Dermatol.* 2013 Mar;168(3):595-601.

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

Slominski AT, Manna PR, Tuckey RC. Cutaneous glucocorticosteroidogenesis: securing local homeostasis and the skin integrity. *Exp Dermatol*. 2014;23:369–74.

Stenn KS, Paus R: Controls of hair follicle cycling. *Physiol Rev*. 2001, 81:449–494.

Stojadinovic O, Brem H, Vouthounis C, Lee B, Fallon J, Stallcup M, Merchant A, Galiano RD, Tomic-Canic M. Molecular pathogenesis of chronic wounds: the role of beta-catenin and c-myc in the inhibition of epithelialization and wound healing. *Am J Pathol*. 2005; 167:59–69.

Stojadinovic O, Lee B, Vouthounis C, Vukelic S, Pastar I, Blumenberg M, Brem H, Tomic-Canic M. 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*. 2007 Feb 9;282(6):4021-34.

Stojadinovic O, Sawaya A, Pastar I, Tomic-Canic M. Glucocorticoid receptor localizes to adherens junctions at the plasma membrane of keratinocytes. *PLoS One*. 2013 Apr 30;8(4):e63453.

Stojadinovic O, Lindley LE, Jozic I, Tomic-Canic M. Mineralocorticoid Receptor Antagonists-A New Sprinkle of Salt and Youth. *J Invest Dermatol*. 2016 Oct;136(10):1938-41.

Surjit M, Ganti KP, Mukherji A, Ye T, Hua G, Metzger D, Li M, Chambon P. Widespread negative response elements mediate direct repression by agonist-liganded glucocorticoid receptor. *Cell*. 2011 Apr 15;145(2):224-41.

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

Terao M, Katayama I. Local cortisol/corticosterone activation in skin physiology and pathology. *J Dermatol Sci.* 2016 Oct;84(1):11-16.

Tiganescu A, Tahrani AA, Morgan SA, Otranto M, Desmoulière A, Abrahams L, Hassan-Smith Z, Walker EA, Rabbitt EH, Cooper MS, Amrein K, Lavery GG, Stewart PM. 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase blockade prevents age-induced skin structure and function defects. *J Clin Invest.* 2013 Jul;123(7):3051-60.

Tiganescu A, Hupe M, Uchida Y, Mauro T, Elias PM, Holleran WM. Increased glucocorticoid activation during mouse skin wound healing. *J Endocrinol.* 2014 Mar 7;221(1):51-61.

Torres J, Watt FM. Nanog maintains pluripotency of mouse embryonic stem cells by inhibiting NF κ B and cooperating with Stat3. *Nat Cell Biol.* 2008;10:194–201.

Ueda K, Fujiki K, Shirahige K, Gomez-Sanchez CE, Fujita T, Nangaku M, Nagase M. Genome-wide analysis of murine renal distal convoluted tubular cells for the target genes of mineralocorticoid receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 Feb 28;445(1):132-7.

Viangchareun S, Le Menuet D, Martinerie L, Munier M, Pascual-Le Tallec L, Lombès M. The mineralocorticoid receptor: insights into its molecular and (patho)physiological biology. *Nucl Recept Signal.* 2007 Nov 30;5:e012.

Vukelic S, Stojadinovic O, Pastar I, Rabach M, Krzyzanowska A, Lebrun E, Davis SC, Resnik S, Brem H, Tomic-Canic M. Cortisol synthesis in epidermis is induced by IL-1 and tissue injury. *J Biol Chem*. 2011 Mar 25;286(12):10265-75.

Wang Z, Frederick J, Garabedian MJ. Deciphering the phosphorylation "code" of the glucocorticoid receptor in vivo. *J Biol Chem*. 2002 Jul 19;277(29):26573-80.

Watt FM. Mammalian skin cell biology: at the interface between laboratory and clinic. *Science*. 2014 Nov 21;346(6212):937-40.

Weikum ER, Knuesel MT, Ortlund EA, Yamamoto KR. Glucocorticoid receptor control of transcription: precision and plasticity via allostery. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017 Mar;18(3):159-174.

Youm JK, Park K, Uchida Y, Chan A, Mauro TM, Holleran WM, Elias PM. Local blockade of glucocorticoid activation reverses stress- and glucocorticoid-induced delays in cutaneous wound healing. *Wound Repair Regen*. 2013 Sep-Oct;21(5):715-22.

Zhao M, Valamanesh F, Celerier I, Savoldelli M, Jonet L, Jeanny JC, Jaisser F, Farman N, Behar-Cohen F. The neuroretina is a novel mineralocorticoid target: aldosterone up-regulates ion and water channels in Müller glial cells. *FASEB J*. 2010 Sep;24(9):3405-15.

Ziera T, Irlbacher H, Fromm A, Latouche C, Krug SM, Fromm M, Jaisser F, Borden SA. *Cnksr3* is a direct mineralocorticoid receptor target gene and plays a key role in the regulation of the epithelial sodium channel. *FASEB J*. 2009 Nov;23(11):3936-46.

Anexo

Publicaciones científicas derivadas de esta tesis doctoral:

Boix J, Carceller E, Sevilla LM, Marcos-Garcés V, Pérez P. The mineralocorticoid receptor plays a transient role in mouse skin development. *Exp Dermatol*. 2016 Jan;25(1):69-71. doi: 10.1111/exd.12822. Epub 2015 Sep 15.

Boix J, Sevilla LM, Sáez Z, Carceller E, Pérez P. Epidermal Mineralocorticoid Receptor Plays Beneficial and Adverse Effects in Skin and Mediates Glucocorticoid Responses. *J Invest Dermatol*. 2016 Dec;136(12):2417-2426. doi: 10.1016/j.jid.2016.07.018. Epub 2016 Jul 25.

which we previously reported to be a sensitive marker (Figure S3 and Table S1). We also examined the half-life of SNHG5 in the serum (Figure S4).

Conclusions

SNHG5 is a member of the non-coding multiple small nucleolar RNA host gene family. The SNHG5 gene is 524 bp in size and located on chromosome 6q15 at the breakpoint of chromosomal translocation t(3,6)(q27;q15); this site is involved in human B-cell lymphoma (7). The fact that the serum levels of SNHG5 were upregulated in patients with MM suggests that SNHG5 may play some roles in melanomagenesis and/or melanoma metastasis. In this study, the serum levels of SNHG5 did not increase in the patients with SCC. However, the present results are associated with some limitations due to the small number of patients. To answer the question as to whether SNHG5 is specifically involved in the pathogenesis of MM, further studies using more samples from other cancers are needed.

Acknowledgements

This work was supported by JSPS KAKENHI grant numbers 25870545 and 15K09772.

Author contributions

Y. I. performed the experiments, analysed the data and wrote the manuscript. S. F. designed the research and wrote the manuscript. A. T., J. Y., A. M. and S. N. contributed to the sampling. W.Z., J. A., I. K. and S. M.

performed the experiments. M. J. and H. I. provided excellent scientific suggestion.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interests.

Supporting Information

Additional supporting data may be found in the supplementary information of this article.

Data S1. The detailed methodologies of the experiments.

Figure S1. The relative expression of serum SNHG5 levels in 5 MM patients before operation (pre-operation), after operation (post-operation), and at recurrence (recurrent). *P* values were determined by a Mann–Whitney test.

Figure S2. The relative concentration of tissue SNHG5 in patients with melanoma and those of nevus SNHG5. SNHG5 levels were measured with real-time PCR. The ordinate shows SNHG5 relative concentration. Bars describe median. *P* values were determined by a Mann–Whitney test. N.S. means not significant.

Figure S3. The relative serum mir-221 levels in five MM patients before the operation (preoperation), after the operation (post-operation) and at recurrence (recurrent). *P* values were determined according to the Mann–Whitney test.

Figure S4. The half-life analysis of lncRNA in the serum. The SNHG5 levels in three MM serum samples were measured at three points: just after thawing (0 h), after one day at room temperature (24 h) and after three days at room temperature (72 h). The dotted line shows the half-life of SNHG5.

Table S1. The list of patients with melanoma showing the pathological stage, age, sex, type of melanoma, relative serum levels of SNHG5 and mir-221 and therapy before sampling. M means male and F means female. The shaded area means their relative expressions are over the cut-off value (the mean + 2SD of normal subjects).

Table S2. The list of five patients who experienced recurrence after surgery showing the pathological stage, age, sex, time before operation, time after operation, and time after recurrence. M means male and F means female.

Table S3. The list of five patients with SCC showing the pathological stage, age, sex and relative serum level of SNHG5. M means male and F means female.

References

- Kohls K, Schmidt D, Holdenrieder S *et al.* *Urologe A* 2015; **54**: 819–825.
- Kanemaru H, Fukushima S, Yamashita J *et al.* *J Dermatol Sci* 2011; **61**: 187–193.
- Inada T, Fukushima S, Murai M *et al.* *J Dermatol* 2015; **42**: 198–201.
- Wang Y, Guo Q, Zhao Y *et al.* *Oncol Lett* 2014; **8**: 1947–1952.
- Yu F J, Zheng J J, Dong P H *et al.* *Mol Clin Oncol* 2015; **3**: 13–17.
- Dudziac E, Goepel J R, Catto J W. *Epigenomics* 2011; **3**: 35–45.
- Tanaka R, Satoh H, Moriyama M *et al.* *Genes Cells* 2000; **5**: 277–287.

DOI: 10.1111/exd.12822

www.wileyonlinelibrary.com/journal/EXD

Letter to the Editor

The mineralocorticoid receptor plays a transient role in mouse skin development

Julia Boix, Elena Carceller, Lisa M. Sevilla, Víctor Marcos-Garcés and Paloma Pérez

Instituto de Biomedicina de Valencia, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IBV-CSIC), Valencia, Spain

Correspondence: Paloma Pérez, IBV-CSIC, Jaime Roig 11, E-46010-Valencia, Spain, Tel.: +34 96 339 1766, Fax: +34 96 369 0800,

e-mail: pperez@ibv.csic.es

Key words: development – epidermis – glucocorticoid receptor – keratinocyte – mineralocorticoid receptor – skin

Accepted for publication 4 August 2015

Background

The importance of hormonal regulation in skin is evidenced by numerous endocrine abnormalities with cutaneous manifestations, including disorders of the epidermal barrier and hair (1,2). Hormone action is mediated by nuclear receptor superfamily members, ligand-activated transcription factors that integrate multiple cellular processes, including the glucocorticoid (GC) receptor (GR

or *Nr3c1*) and the mineralocorticoid receptor (MR or *Nr3c2*) (2). Both proteins are structurally and functionally related, and upon GC binding, recognize the same hormone responsive elements to transcriptionally regulate target genes (3–5). GC access to GR and MR is modulated by two enzymes, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases type I and II (HSD11B1/HSD11B2), which mediate interconversion between inactive and active GCs. Human and mouse

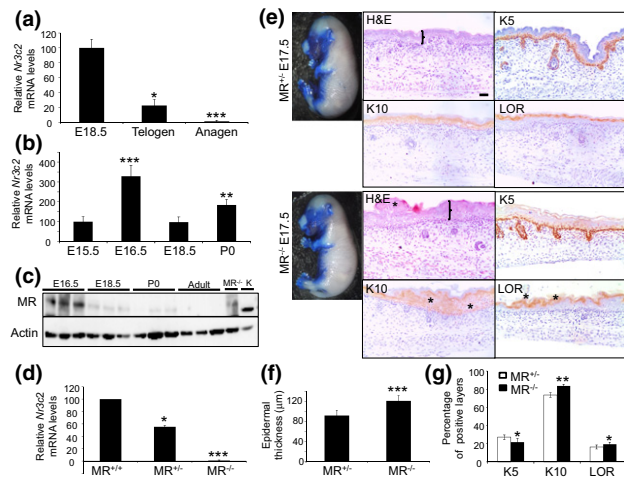


Figure 1. mineralocorticoid receptor (MR) expression in WT developing and adult mouse skin (a–c), and epidermal barrier formation and skin architecture in $MR^{-/-}$ mice (d–g). (a) RT-QPCR data showing relative *Nr3c2* mRNA levels in WT developing (embryonic E18.5) and telogen and anagen adult mouse skin. Asterisks indicate statistically significant differences relative to E18.5 ($n = 3$ per age; * P -value < 0.05 ; *** P -value < 0.001). (b) Relative *Nr3c2* mRNA levels in embryonic (E15.5–E18.5) and newborn (P0) mouse skin. Asterisks indicate statistically significant differences relative to E15.5 ($n = 4$ per age; *** P -value < 0.001). (c) Western blot showing MR protein in developing (E16.5, E18.5, P0) and adult mouse skin (8 weeks old). Kidney whole-cell extracts from $MR^{-/-}$ P0 or WT adult (K) demonstrate the specificity of the MR antibody. Actin is used as a loading control. (d) *Nr3c2* transcript levels were assessed in $MR^{+/+}$, $MR^{+/-}$ and $MR^{-/-}$ P0 skin. Asterisks indicate statistically significant differences relative to $MR^{+/+}$ ($n = 4$ at least three per genotype; ** P -value < 0.01 ; *** P -value < 0.001). (e) Left panels: Epidermal permeability was assessed in E17.5 $MR^{+/+}$ and $MR^{-/-}$ mice ($n = 22$) by toluidine blue staining. Blue denotes immature epidermis and white indicates mature epidermis. Right panels: Histological analysis. H&E indicates haematoxylin/eosin staining. Brackets illustrate differences in epidermal thickness, which were quantitated in panel (f); asterisks indicate altered epidermal differentiation. Bar: 100 μ m. (f–g) Morphometric quantitation of epidermal thickness (f) and immunohistochemistry (g). Percentage of K5-, K10- and loricrin (LOR)-positive layers is shown in (g). Asterisks indicate statistically significant differences relative to $MR^{+/+}$ ($n = 7$ per genotype; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

skin can synthesize GCs and key enzymes of steroid synthesis, acting as a functional hypothalamo–pituitary–adrenal axis to secure epidermal homeostasis (6,8,9). While our previous work demonstrated that GR is required for epidermal development and homeostasis (7,8,9), much less is known regarding MR in this tissue (9). Remarkably, transgenic mice with keratinocyte-specific over-expression of either MR or GR (s5,s6) showed strong phenotypical similarities at birth including atrophic skin, reduced hair follicle number and impaired epidermal maturation.

Questions addressed

We have analysed the following: (i) MR expression during mouse skin development; (ii) the consequences of MR inactivation in developing mouse skin; and (iii) the relative expression of HSD11B1/HSD11B2 during this process.

Experimental design

Animal experimentation

$MR^{-/-}$ mice were generated using generalized CRE-mediated recombination by intercrossing K5-cre mice (s7) and $MR^{loxP/loxP}$ mice (s8).

Sample processing

Skin samples were collected from at least three individuals of each genotype and age and analysed as reported (8). Mean value \pm SD was calculated and statistical significance assessed using the Student's t -test (8).

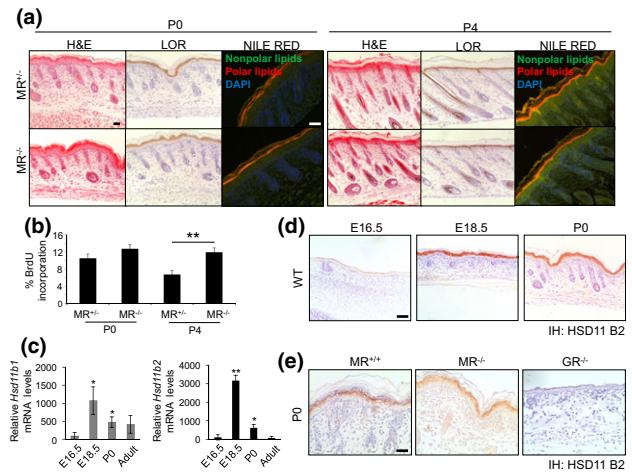


Figure 2. Skin architecture of postnatal $MR^{-/-}$ mice and HSD11B2 expression during skin development. (a) Haematoxylin/eosin (H&E) staining, immunolocalization of loricrin (LOR) and lipid distribution (Nile red staining) were examined in skin sections collected from $MR^{+/+}$ and $MR^{-/-}$ mice at P0 and P4. (b) Epidermal proliferation was assessed in $MR^{+/+}$ and $MR^{-/-}$ P0 skin by *in vivo* BrdU incorporation. Statistically significant changes among genotypes were detected only at P4 ($n = 6$ per genotype; ** P -value < 0.01). (c) *Hsd11b1* and *Hsd11b2* mRNA levels were assessed in developing (E16.5, E18.5, P0) and adult mouse skin by RT-QPCR. Asterisks indicate statistically significant differences relative to E16.5 ($n = 3$ per age; * P -value < 0.05 ; ** P -value < 0.01). (d, e) Immunohistochemistry for HSD11B2 in skin sections from E16.5, E18.5 and P0 WT mice ($n = 12$), as well as in P0 $MR^{+/+}$, $MR^{-/-}$ and $GR^{-/-}$ skin ($n = 12$). Bars: 100 μ m.

Results

We analysed the relative expression of *Nr3c2* by RT-QPCR in WT embryonic (E) 18.5 and adult mouse skin in the telogen (8 weeks old) and anagen (5 weeks old) phases of the hair cycle. *Nr3c2* levels were 17-fold higher in telogen relative to anagen skin, suggesting a role for MR in the resting phase of the hair cycle; however, *Nr3c2* was most abundant in E18.5 skin, fivefold higher than in telogen adult skin (Fig. 1a). Assessment of *Nr3c2* during skin development revealed a peak in expression at E16.5 which decreased thereafter (E18.5 and postnatal day 0 (P0); Fig. 1b). These findings were paralleled by changes in MR protein expression in developing and adult skin (Fig. 1c). *Nr3c1* levels also peaked in E16.5 skin, but unlike *Nr3c2* did not decrease at later time points (Figure S1). *Krt77* and *Spr2d* are controls known to be expressed differentially during epidermal development (Figure S1).

To evaluate the consequences of MR loss-of-function in developing skin, we generated $MR^{-/-}$ mice (Fig. 1d) using generalized CRE-mediated recombination in $MR^{loxP/loxP}$ mice (Appendix S1, s7,s8). $MR^{-/-}$ mice died perinatally around P10 similar to $MR^{null/null}$ mice (s9), presumably due to renal loss of sodium and water (not shown). Epidermal permeability assays in $MR^{+/+}$ and $MR^{-/-}$ E17.5 embryos showed no major changes in the pattern of barrier formation among genotypes (Fig. 1e). However, analysis of haematoxylin/eosin-stained skin sections showed statistically significant increases of epidermal thickness in $MR^{-/-}$ relative to $MR^{+/+}$ embryos (Fig. 1e,f). Altered differentiation, with a more restricted expression of keratin (K5) and abnormal expression patterns of K10 and loricrin (LOR), was also detected in $MR^{-/-}$ embryos and quantitated as minor but statistically significant changes of per cent positive layers (Fig. 1e,g). These alterations resolved spontaneously with age as $MR^{-/-}$ skin had a similar appearance as $MR^{+/+}$ or WT littermates at P0 and P4 (Fig. 2 and

data not shown). We assessed stratum corneum lipids by Nile red staining and quantitated epidermal thickness and loricrin staining in postnatal skin samples but found no changes among genotypes (Fig. 2a and Figure S2). $MR^{-/-}$ epidermal proliferation was unchanged at P0, but statistically significant increases were detected at P4 (Fig. 2b), relative to controls; however, we cannot exclude the possibility that the $MR^{-/-}$ postnatal renal defects indirectly affect proliferation in this tissue.

To understand whether the transient role of MR in epidermal development is due to alterations in GC availability, we assessed *Hsd11b1* and *Hsd11b2* in skin at distinct stages and observed pronounced peaks in expression for both genes at E18.5 (Fig. 2c). In adult skin, the expression of *Hsd11b1* decreased twofold and that of *Hsd11b2* more than 30-fold relative to E18.5. Immunostaining confirmed the restricted expression of HSD11B2 to the upper epidermal layers with statistically significant increases at P0 (Fig. 2d and Figure S3a). Importantly, HSD11B2 epidermal expression was similar in $MR^{+/+}$ versus $MR^{-/-}$ mice but decreased significantly in $GR^{-/-}$ skin (Fig. 2e and Figure S3b).

The α -subunit of the amiloride-sensitive epithelial Na channel (*ENaC α /Scnn1a*), necessary for epidermal homeostasis, is a transcriptional target of both MR and GR (s10). We assessed whether the absence of MR affected *ENaC α* but found no differences in P0 skin (Figure S4), similar to that reported in colon and kidney of $MR^{-/-}$ newborn mice (s11). The fact that *Nr3c1* levels are unchanged in $MR^{-/-}$ skin suggests that GR expression is not negatively affected by loss of MR (Figure S4).

Conclusions

Our findings indicate that MR plays a role in regulating epidermal differentiation at late embryonic stages. The transient expression peak of MR at E16.5, coinciding with low levels of HSD11B2, argues for a role of GC-MR complexes in epidermal maturation. The fact that HSD11B2 was virtually absent in $GR^{-/-}$ skin but normally expressed in $MR^{-/-}$ skin, together with its reported induction by dexamethasone in human keratinocytes (s12), sug-

gests that this enzyme is regulated by GR but not MR and may represent a mechanism to modulate GC-dependent actions locally. The hypothalamo-pituitary-adrenal axis becomes active around E15.5 ensuring proper control of circulating GC and aldosterone levels, which are normally high perinatally (s13). MR and GR expression peaks shortly afterwards, at E16.5. MR expression decreases at later developmental time points while that for GR remains constant. This observation together with our phenotypic data supports the hypothesis that MR plays a transient role in skin development. While $GR^{-/-}$ late embryos featured defective epidermal differentiation with virtually absent stratum corneum and impaired barrier function (s4), the skin phenotype of $MR^{-/-}$ embryos was relatively milder suggesting functional compensation by GR in the perinatal period.

Acknowledgements

We thank Jose Nieto for expert technical help. JB, EC and VMG are recipients of FPI, FPU (MINECO) and JAE-INTRO (CSIC) fellowships. We thank COST ADMIRE BM-1301 for support for dissemination. JB generated the mouse model; JB, EC, LMS and VMG analysed skin samples. PP designed the experiments and wrote the study. All authors read and approved the manuscript.

Funding

This work was supported by the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (grants SAF2011-28115 and SAF2014-59474-R).

Conflict of interest

The authors have declared no conflict of interests.

Supporting Information

Additional supporting data may be found in the supplementary information of this article.

Appendix S1. Materials and methods.

Figure S1. Relative mRNA levels of *Nr3c1*, *Krt77*, and *Spr2d* in embryonic (E15.5–E18.5) and newborn (P0) mouse skin.

Figure S2. Quantitation of epidermal thickness (a) and loricrin immunostaining (b) in $MR^{+/+}$ and $MR^{-/-}$ P0 and P4 mice ($n = 6$ per genotype).

Figure S3. Quantitation of epidermal HSD11B2 immunostaining A.

Figure S4. Relative mRNA levels of the α -subunit of the amiloride-sensitive epithelial Na channel (*ENaC α /Scnn1a*) and *Nr3c1* in $MR^{-/-}$ versus $MR^{+/+}$ P0 skin ($n = 5$ per genotype).

References

- Slominski A T, Zmijewski M A, Skobowiat C *et al.* *Adv Anat Embryol Cell Biol* 2012; **212**: 1–115.
- Evans R M, Mangelsdorf D J. *Cell* 2014; **157**: 255–266.
- Oakley R H, Cidlowski J A. *J Allergy Clin Immunol* 2013; **132**: 1033–1044.
- Funder J W. *Endocrinology* 2010; **151**: 5098–5102.
- Martinerie L, Munier M, Menuet D L *et al.* *Biochimie* 2013; **95**: 148–157.
- Slominski A T, Manna P R, Tuckey R C. *Exp Dermatol* 2014; **23**: 369–374.
- Pérez P 2011. *Dermatoendocrinol* **3**:1–9.
- Sevilla L M, Latorre V, Sanchis A *et al.* *J Invest Dermatol* 2013; **33**: 361–370.
- Farman N, Maubec E, Poeggeler B *et al.* *Exp Dermatol* 2010; **19**: 100–107.

DOI: 10.1111/exd.12833

www.wileyonlinelibrary.com/journal/EXD

Letter to the Editor

ST2 receptor invalidation maintains wound inflammation, delays healing and increases fibrosis

James S. Lee^{1,2}, Elke Seppanen¹, Jatin Patel¹, Mathieu P. Rodero¹ and Kiarash Khosrotehrani^{1,2}

¹The University of Queensland, UQ Centre for Clinical Research, Herson, QLD, 4029, Australia; ²The University of Queensland Diamantina Institute, Translational Research Institute, 37 Kent Street, Woolloongabba, QLD, 4102, Australia

Correspondence: Assoc. Prof. Kiarash Khosrotehrani, MD, PhD, FACD, Royal Brisbane Hospital, University of Queensland Centre for Clinical Research, Building 71/918, Herston, Qld 4029, Australia, Tel.: +61733466077, Fax: +6173346 5598, e-mail: k.khosrotehrani@uq.edu.au

Supplementary Information

Supplementary Materials and Methods

Ethics Statement and Animal Experimentation

All mice were handled in accordance with the current Spanish and European regulations, and approved by our institution's Ethics committee (approval ID for project SAF2011-28115).

For analysis of MR expression during development, mice were subjected to timed matings, and embryo skin samples were obtained by cesarean derivation. At least 3 samples of dorsal WT (B6D2 mice, Janvier Labs) skin for each time-point (E15.5, E16.5, E18.5, P0, 5-wk, and 8-wk) or MR^{+/+}, MR^{+/-} and MR^{-/-} (P0) were analyzed for RNA and protein expression.

MR^{-/-} mice were generated using a strategy based on generalized CRE-mediated recombination of MR^{loxP/loxP} mice. This approach relies on the fact that the keratinocyte-specific promoter keratin (K)5 is transcriptionally active in murine oocytes. This implies that when a female expresses CRE under the control of the K5 promoter, loxP flanked sequences will be deleted in all tissues of the offspring, even in littermates that do not inherit the CRE allele (s7). This strategy has been successfully used to achieve ubiquitous CRE-mediated recombination (s7). Consequently, by intercrosses of K5-Cre^{+/-}/MR^{loxP/+} females and 0Cre//MR^{loxP/+} males, three different genotypes were obtained: MR^{+/+}, MR^{+/-} and MR^{-/-} mice. MR^{+/+} and MR^{+/-} mice were used as controls as the phenotype of their skin was indistinguishable.

Histological and Immunohistochemical analysis

Dorsal skin samples from litters of MR^{+/-} and MR^{-/-} mice at E17.5 (n= 22), P0 (n= 33), or P4 (n= 12) were collected, fixed in 70% ethanol and embedded in paraffin. BrdU incorporation was assessed by immunohistochemistry (anti-BrdU, biotest, Roche, Indianapolis, IN) in paraffin-embedded sections from mice injected with BrdU 1 hr prior to sacrifice (130 µg/g of body weight, Roche). Polyclonal antibodies to K5 (PRB-160P), K10 (PRB-159P), and loricrin (PRB-145P) were from Covance (Babco, Berkeley, CA). HSD11B2 antibody was from Santa Cruz (sc-20176). Secondary biotin-conjugated anti-rabbit or anti-mouse antibodies (Jackson ImmunoResearch) were used. At least 4 skin samples of each genotype and age (E16.5, E18.5, and P0 WT; and P0 MR^{+/+}, MR^{+/-} and MR^{-/-}) were used for histopathological analysis.

For lipid staining, sections (P0 and P4 MR^{+/-} and MR^{-/-} mice, n= 3 per genotype) were incubated with 1mg ml⁻¹ Nile Red (Sigma) in phosphate-buffered saline along with 4'-6-diamidino-2-phenylindole for 5 minutes at room temperature (8).

Epidermal dye permeability assay was performed with 1% toluidine blue dye (Sigma) as described (s14) in at least five individuals of each genotype (MR^{+/+}, MR^{+/-} and MR^{-/-}).

Morphometrical analysis and immunohistochemistry quantitation

Morphometrical analysis and quantitation of immunohistochemical staining was performed using the software IMAGE-PRO PLUS 6.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). For each sample, five microphotographs were taken at 100x magnification following a method of semi-randomization, which excluded altered zones. A Leica DM1000 microscope, a Leica EC3 camera and Leica LAS EZ software (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) were used.

The epidermal thickness was determined in H&E stained skin sections of MR^{+/-} and MR^{-/-} E17.5, P0 and P4 mice (at least n= 6 per genotype). At least 5 images and 10 sections were used per sample. For quantitation of K5, K10, and LOR staining (Fig. 1G), we determined the percentage of epidermal thickness that was positive for each marker by manually measuring the area. For that purpose, 10 semi-randomized measurements of marker-positive epidermis were taken in each image. Additionally, for LOR and HSD11B2 staining (Fig. S2B, S3), the intensity of each marker was quantitated by selecting the corresponding expression in each image, and measuring the mean intensity of pixels within the segmented in the microphotograph. Average intensity of expression of each marker was calculated as mean of all images and expressed as relative intensity units.

RNA isolation and Quantitative RT-PCR

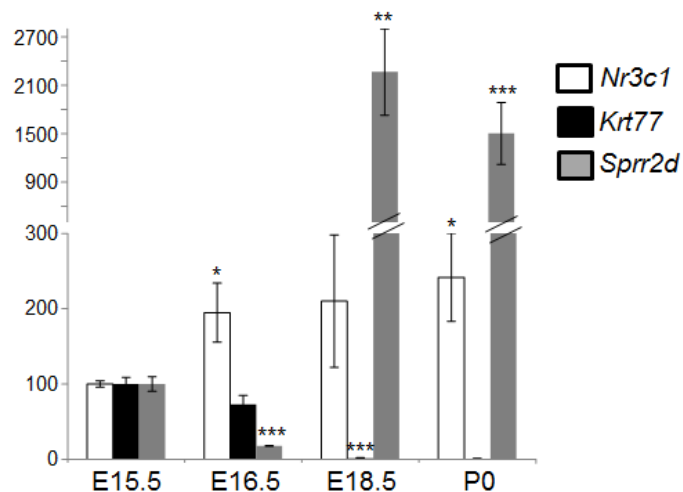
RNA was isolated from mouse dorsal epidermis using Trizol (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, Oregon) and reverse transcribed using oligo-dT and RevertAid H-minus Reverse Transcriptase (Fermentas Inc., Burlington, Canada). Quantitative PCR was conducted using specific oligonucleotides and FastStart Universal SYBR Green Master ROX (Roche) in an Applied Biosystems 7500 Fast real time PCR system. Data were normalized to *Hprt1* expression. Specific primers used were as follows: 5'-TGCTATGCTTTGCTCCTGATCTG-3', 5'-TGTCAGTTGATAAAACCGCTGCC-3' for *Nr3c1*; 5'-GTGGACAGTCCTTTCCTACTACCG-3', 5'-TGACACCCAGAAGCCTCATCTC-3' for *Nr3c2*; 5'-CTAATGATGCTGGACCACACC-3', 5'-AAAGCGTCTGCTCCGTGATGC-3' for *ENac α* ; 5'-GGAGCCGCACTTATCTGAA-3', 5'-GACCTGGCAGTCAATACCA-3' for *Hsd11b1*; 5'-CTGCAGATGGATCTGACCAA-3', 5'-GTCAGCTCAAGTGCACCAA-3' for *Hsd11b2*; 5'-GAGCAAAGATGAGGCTGAGG-3', 5'-CCTCCGCATCAGAAATCAAT-3' for *Krt77*; 5'-TGGTACTCAAGGCCGAGA-3', 5'-TTTGTCTGATGACTGCTGAAGAC-3' for *Sprr2d*; and 5'-TCAGTCAACGGGGGACATAAA-3', 5'-GGGGCTGTACTGCTTAACCAG-3' for *Hprt1*.

Immunoblotting

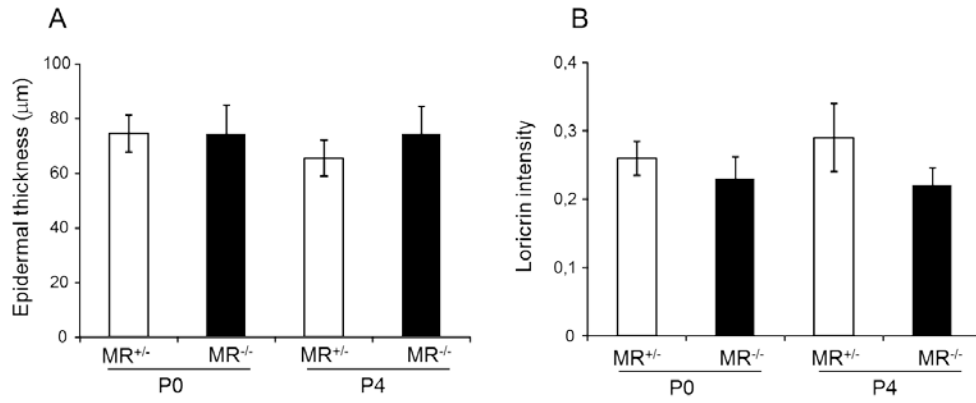
Preparation of whole cell extracts and immunoblotting were performed as described (7). Polyclonal antibody against MR was from Abcam (ab64457; Bristol, UK) and anti-actin was from Sigma (A2066). Secondary peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (Amersham) was used.

Supplementary Figures

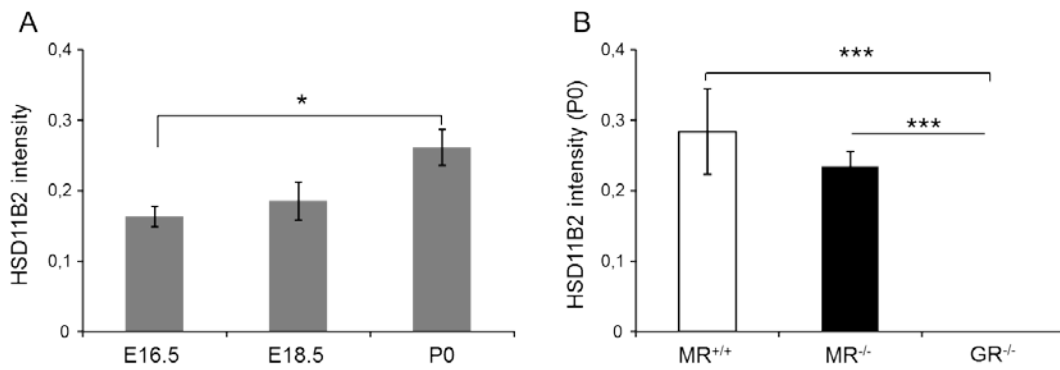
Supplementary Fig. 1. Relative mRNA levels of *Nr3c1*, *Krt77*, and *Sprr2d* in embryonic (E15.5-E18.5) and newborn (P0) mouse skin. Statistically significant differences relative to E15.5 are indicated (n= 4 per age; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).



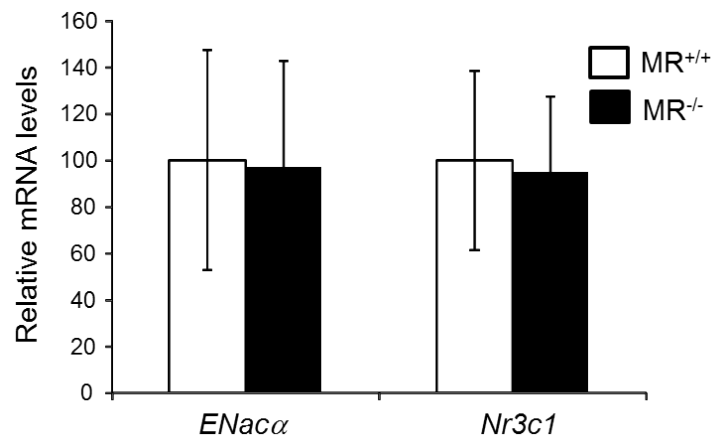
Supplementary Fig. 2. Quantitation of epidermal thickness (A) and loricrin immunostaining (B) in MR^{+/-} and MR^{-/-} P0 and P4 mice (n= 6 per genotype). The intensity of immunostaining for loricrin is expressed as relative intensity units. No statistically significant changes were found.



Supplementary Fig. 3. Quantitation of epidermal HSD11B2 immunostaining A. Comparison between embryonic (E16.5, E18.5) and newborn (P0) epidermis (n= 4 per age; * p<0.05). B. Epidermal staining intensity in P0 MR^{+/+}, MR^{-/-}, and GR^{-/-} mice P0 (n= 4 per genotype; *** p<0.001). Data are expressed as relative intensity units.



Supplementary Fig. 4. Relative mRNA levels of the α -subunit of the amiloride-sensitive epithelial Na channel (*ENaC α /Scnn1 α*) and *Nr3c1* in MR^{-/-} vs MR^{+/+} P0 skin (n= 5 per genotype).



Supplementary References

- s1 Schmutz M, Watson RE, Deplewski D, Dubrac S, Zouboulis CC & Griffiths CE 2007 Nuclear hormone receptors in human skin. *Hormone Metabolism Research* **39**:96–105.
- s2 Slominski A & Wortsman J 2000 Neuroendocrinology of the skin. *Endocrine Rev* **21**:457–487.
- s3 Slominski A, Wortsman J, Tuckey RC & Paus R 2007 Differential expression of HPA axis homolog in the skin. *Mol Cell Endocrinol* **265-266**:143–149.
- s4 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):1377–1388.
- s5 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. *American Journal of Pathology* **171**:846–860.
- s6 Pérez P, Page A, Bravo A, del Río M, Gimenez-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 Journal* **15**:2030–2036.
- s7 Ramirez 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**:52–7
- s8 Berger S, Wolfer DP, Selbach O, Alter H, Erdmann G, Reichardt HM, Chepkova AN, Welzl H, Haas HL, Lipp HP & Schütz G 2006 Loss of the limbic mineralocorticoid receptor impairs behavioral plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**(1):195–200.
- s9 Berger S, Bleich M, Schmid W, Cole TJ, Peters J, Watanabe H, Kriz W, Warth R, Greger R & Schütz G 1998 Mineralocorticoid receptor knockout mice: pathophysiology of Na⁺ metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**(16):9424–9429.
- s10 Charles RP, Guitard M, Leyvraz C, Breiden B, Haftek M, Haftek-Terreau Z, Stehle JC, Sandhoff K & Hummler E 2008 Postnatal requirement of the epithelial sodium channel for maintenance of epidermal barrier function. *J Biol Chem* **283**(5):2622–30.
- s11 Schulz-Baldes A, Berger S, Grahammer F, Warth R, Goldschmidt I, Peters J, Schütz G, Greger R & Bleich M 2001 Induction of the epithelial Na⁺ channel via glucocorticoids in mineralocorticoid receptor knockout mice. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* **443**:297–305.
- s12 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. *J Biol Chem* **282**:4021–4034.
- s13 Reichardt HM & Schutz G 1996 Feedback Control of Glucocorticoid Production is Established during Fetal Development *Mol Medicine* **2**(6):735–744.

s14 Byrne C, Avilion AA, O'Shaughnessy RF, Welte JC & Hardman MJ 2010 Whole-mount assays for gene induction and barrier formation in the developing epidermis. *Methods Mol Biol* **585**:271–86.



Epidermal Mineralocorticoid Receptor Plays Beneficial and Adverse Effects in Skin and Mediates Glucocorticoid Responses

Julia Boix¹, Lisa M. Sevilla¹, Zara Sáez¹, Elena Carceller¹ and Paloma Pérez¹

Glucocorticoids (GCs) regulate skin homeostasis and combat cutaneous inflammatory diseases; however, adverse effects of chronic GC treatments limit their therapeutic use. GCs bind and activate the GC receptor and the mineralocorticoid receptor (MR), transcription factors that recognize identical hormone responsive elements. Whether epidermal MR mediates beneficial or deleterious GC effects is of great interest for improving GC-based skin therapies. MR epidermal knockout mice exhibited increased keratinocyte proliferation and differentiation and showed resistance to GC-induced epidermal thinning. However, crucially, loss of epidermal MR rendered mice more sensitive to inflammatory stimuli and skin damage. MR epidermal knockout mice showed increased susceptibility to phorbol 12-myristate 13-acetate-induced inflammation with higher cytokine induction. Likewise, cultured MR epidermal knockout keratinocytes had increased phorbol 12-myristate 13-acetate-induced NF- κ B activation, highlighting an anti-inflammatory function for MR. GC-induced transcription was reduced in MR epidermal knockout keratinocytes, at least partially due to decreased recruitment of GC receptor to hormone responsive element-containing sequences. Our results support a role for epidermal MR in adult skin homeostasis and demonstrate nonredundant roles for MR and GC receptor in mediating GC actions.

Journal of Investigative Dermatology (2016) **136**, 2417–2426; doi:10.1016/j.jid.2016.07.018

INTRODUCTION

The mineralocorticoid receptor (MR) and glucocorticoid (GC) receptor (GR) are structurally and functionally related proteins that belong to the steroid receptor superfamily and act as ligand-activated transcription factors recognizing the same hormone responsive elements on target genes (Oakley and Cidlowski, 2013; Odermatt and Atanasov, 2009; Vandevyver et al., 2013; Viengchareun et al., 2007). In fact, although many GC target genes are regulated by both MR and GR in different cell types, the exact contribution of each receptor is largely unknown (Oakley and Cidlowski, 2015).

MR can bind its physiological ligand aldosterone but also GCs (cortisol in humans and corticosterone in rodents) with similar affinity. Indeed, MR binds GCs with a 10-fold higher affinity than GR itself. Given that GC plasma concentration exceeds that of aldosterone by approximately 100-fold, all MR should be theoretically occupied by GCs (Funder, 2010; Gomez-Sanchez and Gomez-Sanchez, 2014). However, MR

occupancy by GCs is limited by their interconversion between inactive and active forms, which is modulated by the enzymes 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and 2. Therefore, the formation of different receptor/ligand complexes in a given cell type will be determined by the relative expression and function of MR, GR, aldosterone, and GCs (Oakley and Cidlowski, 2015).

MR and aldosterone play vital roles in renal sodium and water reabsorption, as MR^{-/-} mice die postnatally from severe dehydration (Berger et al., 1998). However, it is currently recognized that MR exerts a broader range of functions in nonclassic target tissues (Jaisser and Farman, 2016; Martinerie et al., 2013). In fact, MR activation is involved in numerous pathophysiological effects including inflammation, hypertrophy, and fibrosis, in tissues including the renal, adipose, and cardiovascular system (Brown, 2013). These findings are consistent with clinical studies demonstrating that besides the classical use of MR antagonists for treating hypertension, pharmacological blockade of MR was also beneficial for patients suffering from other inflammatory and fibrotic diseases (Jaisser and Farman, 2016). The mechanisms mediating pathological MR activation include activation of the NF- κ B pathway and oxidative stress as well as upregulation of MR targets including profibrotic genes (Bauersachs et al., 2015). However, MR activation can be beneficial in certain circumstances by improving capillary density and combating inflammation through inhibition of NF- κ B activity (Bergmann et al., 2010; Messaoudi et al., 2009).

The use of GCs is widely prescribed for treating cutaneous diseases because of their anti-inflammatory and anti-proliferative effects. However, adverse effects caused by chronic GC treatments such as skin atrophy and delayed

¹Instituto de Biomedicina de Valencia-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Valencia, Spain

Correspondence: Paloma Pérez, Instituto de Biomedicina de Valencia-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Jaime Roig 11, E-46010, Valencia, Spain. E-mail: pperez@ibv.csic.es

Abbreviations: CO, control; Dex, dexamethasone; GC, glucocorticoid; GR, GC receptor; GR^{EKO}, GR epidermal knockout; GRE, glucocorticoid response element; HA, hemagglutinin; MR, mineralocorticoid receptor; MR^{EKO}, MR epidermal knockout; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; STAT, signal transducer and activator of transcription

Received 21 March 2016; revised 30 June 2016; accepted 11 July 2016; accepted manuscript published online 25 July 2016; corrected proof published online 8 September 2016

wound healing limit their therapeutic use (Cato et al., 2004; Pérez, 2011; Schäcke et al., 2002). Although the crucial function of GR in skin pathophysiology has been widely characterized, the exact role of MR in this tissue deserves further study (Farman et al., 2010; Farman and Nguyen, 2015; Pérez, 2011).

MR is expressed in epidermal keratinocytes, hair follicles, and sebaceous and sweat glands in humans and mice (Kenouch et al., 1994; Mitts et al., 2010; Sainte-Marie et al., 2007). We previously reported that MR reached a peak of expression at the mRNA and protein level in late developing embryonic skin where stratification occurs (Boix et al., 2015). After birth, MR mRNA expression was drastically reduced (more than 10-fold in adult skin), and MR protein was not detectable using currently available antibodies. MR inactivation caused minor defects in early stages of mouse skin development; however, consequences in the adulthood could not be addressed because of the perinatal death of MR^{-/-} mice (Boix et al., 2015).

In vitro studies with MR antagonists, agonists, and/or its physiological ligand aldosterone have provided important clues about its function in skin. For instance, skin aging was related to upregulation of MR because its pharmacological blockade suppressed inflammation and age-related changes in a mouse model of metabolic syndrome (Nagase et al., 2013). One caveat is that these studies cannot exclude that the compounds used act through other receptors besides MR (Gomez-Sanchez, 2016). For example, the MR antagonist spironolactone can exert certain effects independently of MR likely through retinoid X receptor in colon carcinoma cells (Leung et al., 2013). In addition, the physiological MR ligand aldosterone showed receptor-dependent and -independent actions in the deposition of dermal collagen and elastin, respectively, in human skin explants (Mitts et al., 2010). Overall, these pieces of evidence highlight the necessity for tissue-specific loss-of-function models to elucidate the precise role of MR in skin physiopathology.

Mice with keratinocyte-specific overexpression of either MR or GR exhibited strong similarities in their skin phenotypes, including atrophic skin, reduced hair follicle number, and impaired epidermal maturation (Cascallana et al., 2005; Pérez et al., 2001; Sainte-Marie et al., 2007). This, along with the functional homology between MR and GR, raised the question of whether some of the GC effects might be mediated by MR (Farman et al., 2010; Farman and Nguyen, 2015; Pérez, 2011). Very recently, Farman's group demonstrated that topical application of a pharmacological MR antagonist partially reversed the GC-induced skin atrophy in human healthy skin (Maubec et al., 2015).

Here we report the generation of epidermal-specific MR knockout mice (MR^{EKO}) and address the role of this transcription factor in skin pathophysiology. We demonstrate that keratinocyte MR contributed to GC-induced epidermal thinning but not reduced collagen deposition while it was required for normal keratinocyte migration. Mechanistically, the transcriptional response to GCs through consensus hormone responsive elements involved both MR and GR. In contrast to the MR proinflammatory role in other tissues, epidermal MR exerted anti-inflammatory actions, similar to GR, which were mediated, at least partially, through

repression of NF-κB activity. Altogether, our results demonstrate complex roles for epidermal MR in adult skin homeostasis and disease, with nonredundant roles for MR and GR in mediating GC-dependent transcription.

RESULTS AND DISCUSSION

Epidermal MR plays a role in adult skin homeostasis

We have generated mice with MR inactivation restricted to epidermal keratinocytes (MR^{EKO} mice; Figure 1a–c). Adult MR^{EKO} mice were viable and fertile and showed minor skin defects including statistically significant increases in epidermal thickness as well as abnormal keratin 6 staining, which correlated with increased keratinocyte proliferation (Figure 1d–f). Consistently, we also detected accelerated growth in MR^{EKO} relative to control (CO) cultured keratinocytes (Figure 1g).

The epidermis of MR^{EKO} mice showed focally augmented keratinization (Figure 1d, arrows), and, consistently, MR^{EKO} keratinocytes showed constitutively increased mRNA levels of the differentiation markers *small proline-rich repeat (Sprr) 2d* and *defensin beta1 (Defb1)* relative to CO (Figure 1i). When keratinocytes were induced to differentiate with high-calcium concentrations, there were more corneocytes and upregulation of *Sprr2d* and *Defb1* genes was augmented in MR^{EKO} relative to CO cells (Figure 1h and i; Hennings et al., 1980).

In CO cells, the expression of MR (*Nr3c2*) mRNA decreased around 40% on calcium-induced differentiation, whereas that of GR (*Nr3c1*) showed an increased trend (not statistically significant) indicating that these two receptors play contrasting roles during this process (Figure 1i). This is consistent with the reduced upregulation of *Sprr2d* and *Defb1* detected in calcium-treated GR-deficient cells (Sevilla et al., 2015). The fact that GR expression did not change in undifferentiated MR^{EKO} versus CO cells suggested that the observed morphological and gene expression changes are due to the lack of MR and not to changes in GR expression (Figure 1h and i). These findings were confirmed in vivo, because GR mRNA levels were also unchanged in untreated MR^{EKO} relative to CO mouse skin (Supplementary Figure S1a–c online).

MR protects against skin damage

We evaluated whether epidermal MR inactivation had an impact in local damage caused by repetitive application of the irritant SDS. In CO mice, SDS induced epidermal thickening, keratin 6 expression, and hyperkeratosis after 5 days of treatment (Figure 2a). Importantly, MR^{EKO} mice showed overall augmented epithelial damage on SDS treatment, as shown by histopathological analysis, as well as increased epidermal thickness and keratinocyte proliferation (Figure 2a–c). Our data indicate that epidermal MR inactivation results in increased proliferation both in basal and pathological conditions.

We assessed the expression of the calcium-binding protein S100A9, upregulated in various skin inflammatory conditions including psoriasis (Kerkhoff et al., 2012), and found significant upregulation in SDS-treated MR^{EKO} relative to CO mice (Figure 2d; 6-fold increase). Because signal transducer and activator of transcription (STAT) 3 is involved in controlling

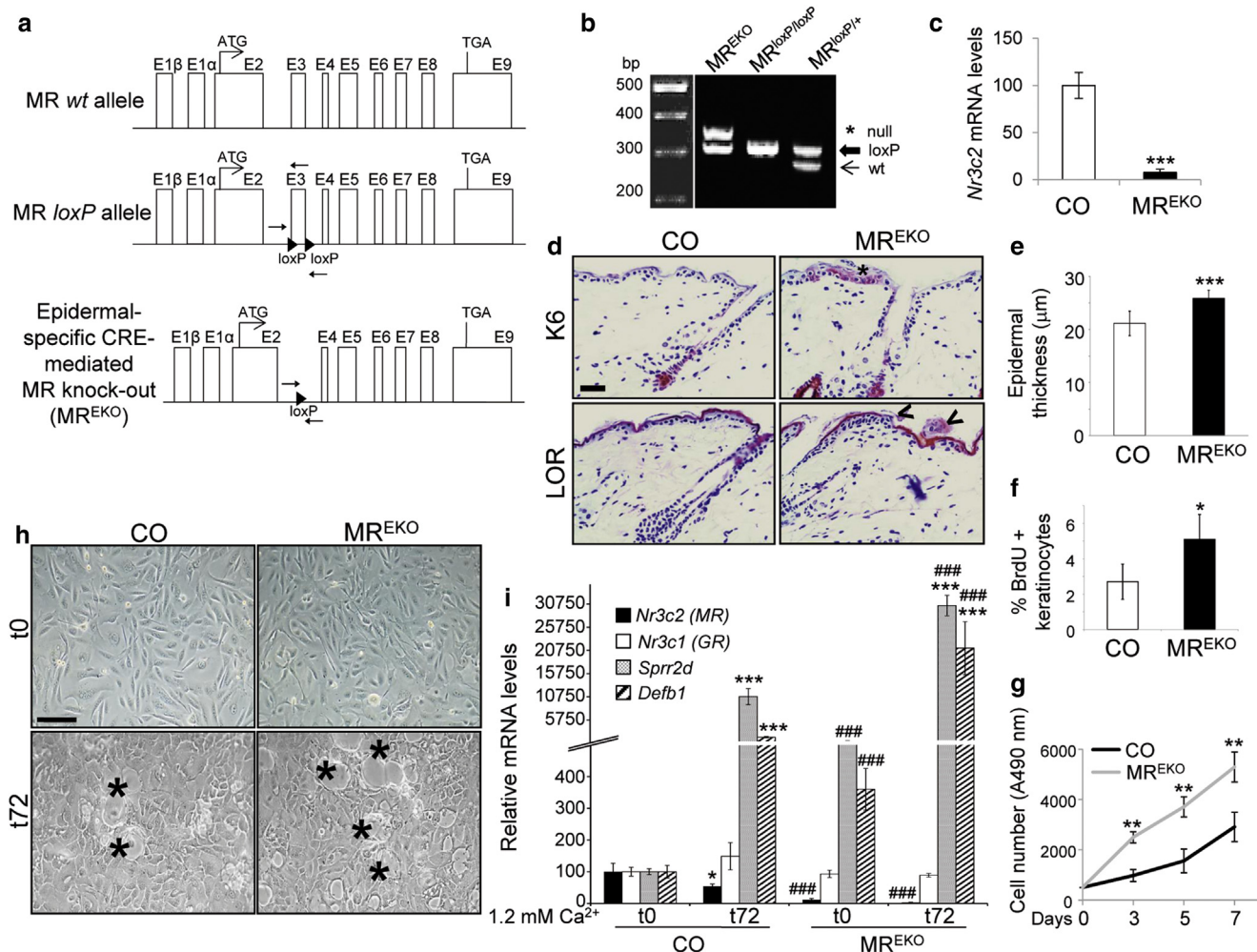


Figure 1. Inactivation of the mineralocorticoid receptor in mouse epidermis (MR^{EKO}) results in increased keratinocyte proliferation and differentiation. (a) Scheme depicting generation of MR^{EKO} (K5-cre//MR^{loxP/loxP}) mice by intercrossing K5-Cre males that express the Cre recombinase under control of the keratin 5 (K5) promoter and MR^{loxP/loxP} females that have the third exon of the MR gene flanked by loxP sequences. (b) Agarose gel showing specific bands from genotyping of MR^{EKO}, MR^{loxP/loxP}, or MR^{loxP/+} mice. (c) qRT-PCR showing *Nr3c2* (MR) mRNA levels in epidermal keratinocytes from MR^{EKO} and MR^{loxP/loxP} (CO) littermates. Student's *t*-test; ***, *P* < 0.001; *n* = at least four mice per genotype. (d) Immunostaining of MR^{EKO} and CO adult skin sections; LOR, loricrin; K6, keratin 6. Bar = 100 μm. *, abnormal K6 staining; <, focal increases of LOR. (e) Quantification of epidermal thickness in MR^{EKO} (*n* = 12) and CO (*n* = 11) mice. Student's *t*-test; ***, *P* < 0.001. (f) Percent BrdU-positive keratinocytes. Student's *t*-test; *, *P* < 0.05, *n* = 5 per genotype. (g) Growth kinetics of MR^{EKO} and CO keratinocytes. Student's *t*-test; **, *P* < 0.01, *n* = 4 per genotype and time point. (h, i) CO and MR^{EKO} keratinocytes treated with 1.2 mM calcium for 0 or 72 hours. Differentiation-associated morphological changes (h); asterisks, cornified envelopes. Bar = 50 μm. Gene expression assessed by qRT-PCR (i). Post hoc Tukey test *, ***, ###, *P* < 0.001, *n* = 3–5 per genotype and time point. Asterisks: significance between time points within each genotype; hashes: significance between genotypes at the same time point. (c, e–g, i): Mean values ± SD are shown. CO, control; GR, GC receptor; MR, mineralocorticoid receptor; SD, standard deviation.

S100A9 expression on diseased conditions, we also assessed the expression of total and phosphorylated (p)-STAT3. Our data demonstrate 4-fold increases in both constitutive and SDS-induced STAT3 activity in MR^{EKO} versus CO mice (Figure 2e). Remarkably, the increased susceptibility to epidermal damage of MR^{EKO} mice highly resembled the response of GR epidermal knockout (GR^{EKO}) mice (Sevilla et al., 2013), indicating that both MR and GR play nonredundant protective roles in skin. Because SDS downregulated GR mRNA levels similarly in CO and MR^{EKO} mice (Supplementary Figure S1a, approximately 50%), our results indicate that the more exaggerated response in SDS-treated MR^{EKO} mice is due to the lack of epidermal MR and not to changes in GR expression.

MR plays an anti-inflammatory role in skin through NF-κB inhibition

The response to phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)-induced ear edema was significantly higher in MR^{EKO} relative to CO mice, correlating with the presence of inflammatory abscesses (Figure 3a, asterisk; Figure 3b). Consistently, after PMA treatment, we detected significant increases in the proinflammatory cytokines Il6 and Slpi in MR^{EKO} relative to CO mice; however, tumor necrosis factor-α expression was unchanged (Figure 3c). Note that PMA treatment did not significantly change GR expression in MR^{EKO} or CO skin (Supplementary Figure S1b), suggesting that its effects are directly related to the epidermal MR absence. We also assessed cytokine expression in cultured keratinocytes and

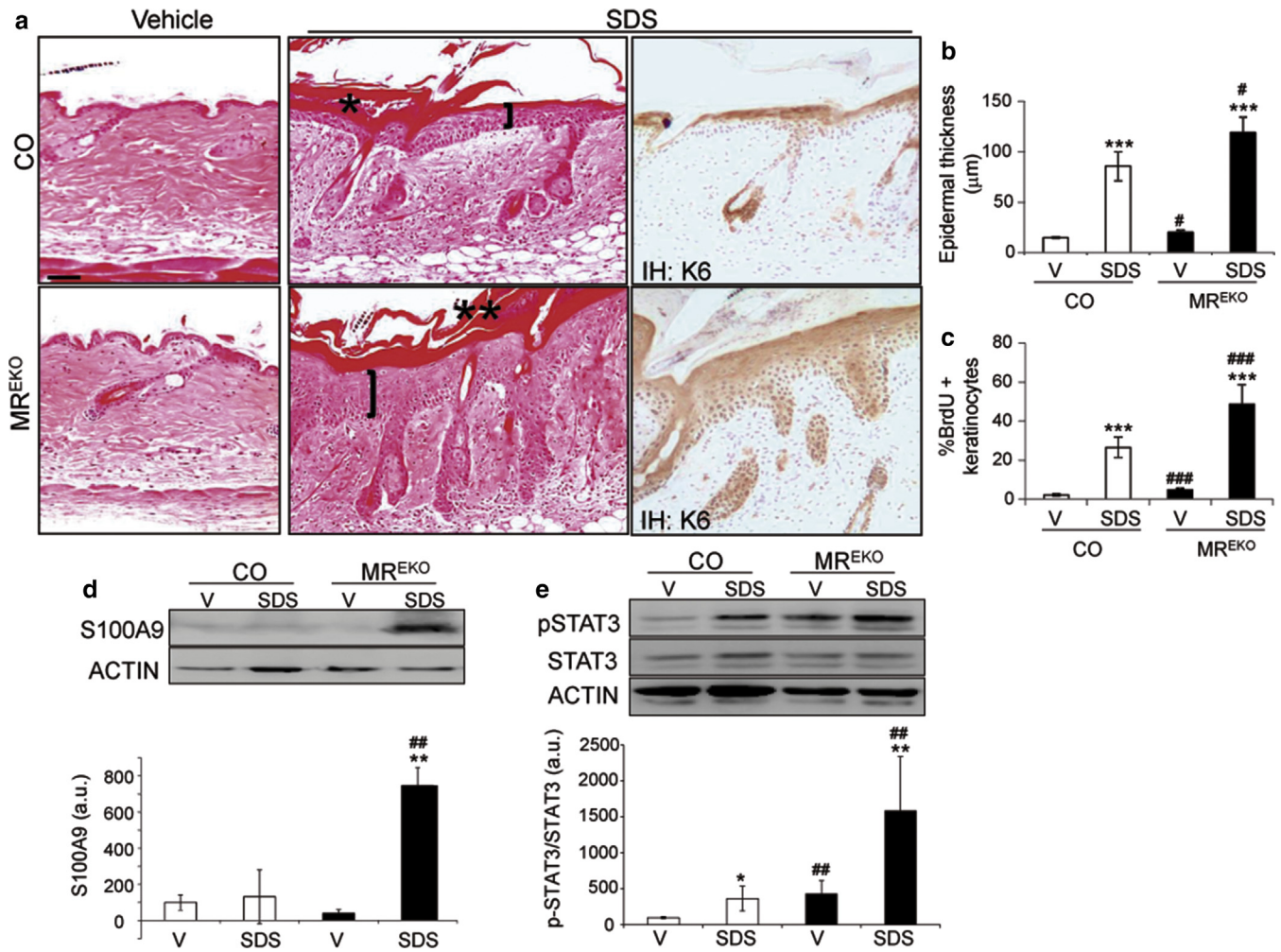


Figure 2. Loss of MR causes increased epithelial damage after SDS treatment. (a) H&E staining and keratin 6 (K6) immunostaining of CO and MR^{EKO} dorsal skin sections treated with vehicle (V) or 10% SDS; brackets, epidermal thickness; asterisks, hyperkeratosis. Bar = 100 µm. Quantification of epidermal thickness (b) and BrdU-positive keratinocytes (c) in V- and SDS-treated mice. Representative immunoblots (upper) and quantitations (lower) for S100A9 (d), phospho(p)-STAT3 and STAT3 (e). Loading control: Actin. (b–e) Mean values ± SD are shown. N = at least four mice per genotype and treatment. Post hoc Tukey test #, *P* < 0.05; **, ##, *P* < 0.01; ***, ###, *P* < 0.001. Asterisks: significance between treatments within each genotype; hashes: significance between genotypes in the same treatment group. CO, control; H&E, hematoxylin and eosin; MR, mineralocorticoid receptor; MR^{EKO}, MR epidermal knockout; SD, standard deviation.

detected significant increases in tumor necrosis factor- α , Il6, and Slpi in vehicle- and PMA-treated MR^{EKO} versus CO cells (Figure 3d). The fact that the PMA-induced cytokine expression observed in MR^{EKO} skin was recapitulated in cultured keratinocytes demonstrates that the anti-inflammatory function of MR is keratinocyte specific.

Given the crucial role of NF- κ B in skin inflammation, we assessed its activation on PMA treatment in CO and MR^{EKO} cultured keratinocytes by measuring the activity of a κ B-luciferase reporter construct (Figure 3e). For comparative purposes, and given the well-known anti-inflammatory function of GR in keratinocytes (Busillo and Cidlowski, 2013; Sevilla et al., 2013), we also used GR^{EKO} cells (Latorre et al., 2013). The κ B-luciferase activity was 4-fold higher in MR-deficient cells relative to CO, and similar to that observed in GR-deficient keratinocytes (Figure 3e). Remarkably, our findings indicate that both nuclear receptors play anti-inflammatory roles in keratinocytes and that one cannot compensate for the other's absence.

Normal cutaneous wound healing requires MR

The importance of correct regulation of GC levels in skin wound repair is well known as chronic GC treatments delay this process (Beer et al., 2000; Pastar et al., 2014; Stojadinovic et al., 2005). It is also widely recognized that epidermal keratinocytes are able to synthesize GCs in response to wounding; consistently, local blockade of GC production using inhibitors of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 accelerated wound healing (Slominski et al., 2014; Tiganescu et al., 2013; Vukelic et al., 2011; Youm et al., 2013).

Keratinocytes play a major role in the healing response by proliferating and migrating into the wound (re-epithelialization), thus restoring the epidermis after injury (Pastar et al., 2014). We examined the healing response in MR^{EKO} and CO mice by performing full-thickness dorsal wounds. Quantitation of wound closure showed no statistically significant variation among genotypes (Figure 4a). The percentage of re-epithelialization at day 7 was also similar in

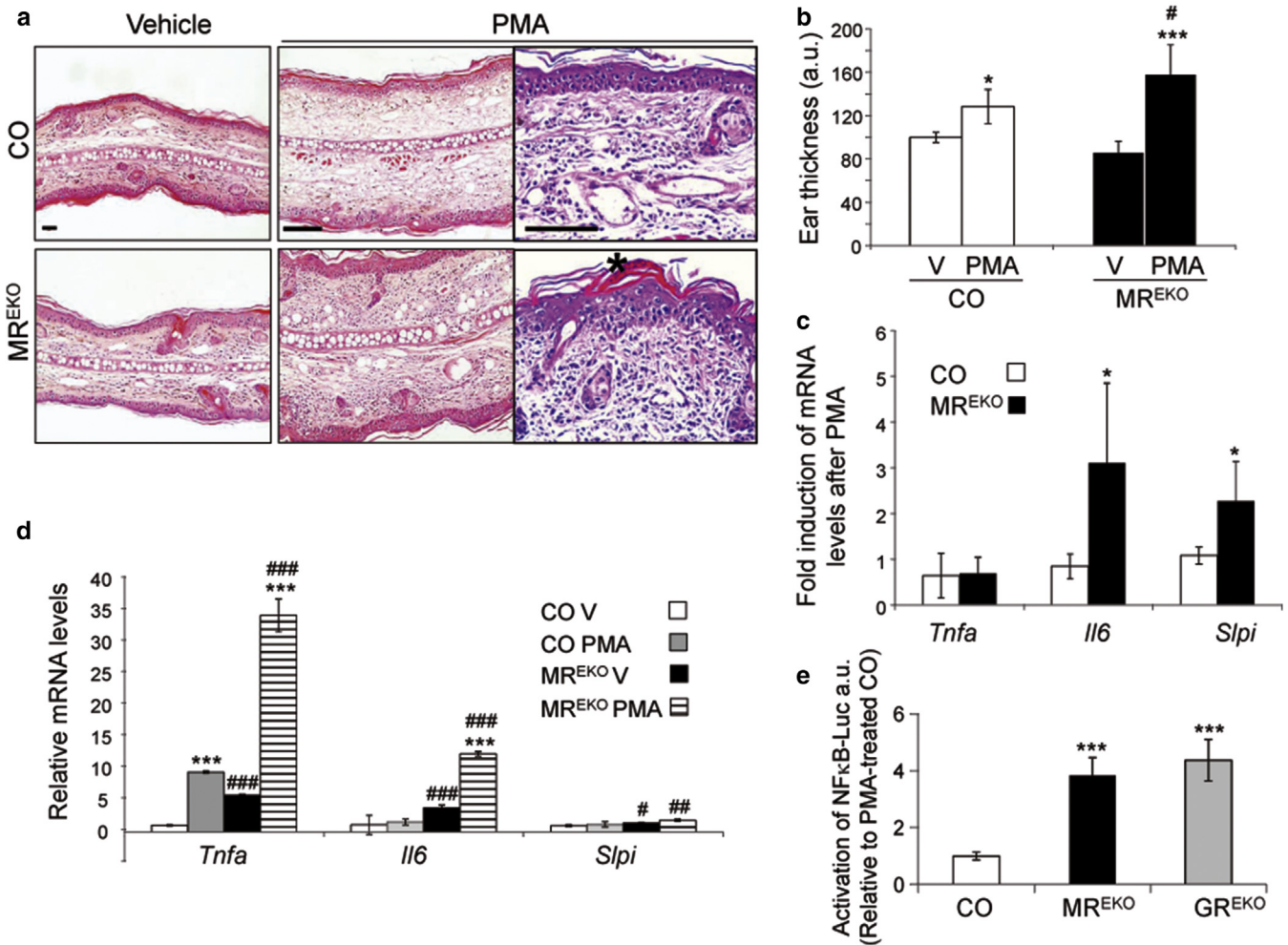


Figure 3. MR^{EKO} mice and cultured keratinocytes show increased PMA-induced inflammation. (a, b) H&E-stained sections and ear thickness quantification of CO and MR^{EKO} mouse ears treated with vehicle (V, n = 4 per genotype) or PMA (n = 8 per genotype) for 48 hours; asterisks, inflammatory abscesses. Bar = 100 μ m. Post hoc Tukey test *, #, $P < 0.05$; ###, $P < 0.001$. (c, d) Gene expression of *Tnfa*, *Il6*, and *Slpi* assessed by qRT-PCR in V- and PMA-treated (n = 3 per genotype and treatment) CO and MR^{EKO} ears (c; Student's *t*-test; *, $P < 0.05$) or keratinocytes (d; post hoc Tukey test #, $P < 0.05$; ##, $P < 0.01$; ***, ###, $P < 0.001$; n = 3 per genotype and treatment). Asterisks: significant differences on treatment within each genotype; hashes: significant differences between genotypes in the same treatment group. (e) Activation of an NF- κ B-luciferase reporter in CO, MR^{EKO}, and GR^{EKO} keratinocytes on PMA treatment. Post hoc Tukey test ***, $P < 0.001$; at least n = 4 per genotype. (b–e) Mean values \pm SD are shown. CO, control; H&E, hematoxylin and eosin; MR^{EKO}, MR epidermal knockout; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; SD, standard deviation.

MR^{EKO} relative to CO despite increased keratinocyte proliferation (Figure 4b and c). This may be due to defective keratinocyte migration in MR^{EKO} wounds, which exhibited unorganized structure and abnormal keratin 6 localization (Figure 4d). In addition, quantitation analysis of 7 days' trichromic-stained wounds demonstrated a statistically significant reduction of collagen deposition (around 45%) in MR^{EKO} versus CO (Figure 4d and e). Note that no statistically significant differences were found in untreated MR^{EKO} relative to CO mice (Supplementary Figure S2 online), suggesting that MR mainly contributes to these differences only in pathological conditions.

Wound scratch experiments demonstrated retarded cell migration of MR^{EKO} keratinocytes at all time points examined (Figure 4f and g). Moreover, treatment of CO keratinocytes with the MR pharmacological antagonist eplerenone also elicited significant delays in keratinocyte migration at 8–30 hours after wounding (Supplementary Figure S3 online), further confirming that these effects are due to MR

inactivation and not related to differences between cell lines. Overall, our results demonstrate that epidermal inactivation of MR does not improve wound healing but rather results in alterations in keratinocyte migration and reduced dermal remodeling.

Epidermal MR inactivation partially protects against GC-induced skin atrophy

We assessed whether skin atrophy caused by continuous GC treatments might be mediated by epidermal MR. CO mice topically treated with the GC analog dexamethasone (Dex) showed epidermal thinning, decreased keratinocyte proliferation, reduced expression of keratin 5, and repression of *cyclin d1* (Figure 5a, c, and d). In contrast, in MR^{EKO} mice, Dex inhibition of keratinocyte proliferation was partially reversed and there was no repression of *cyclin d1*. It has been widely reported that both *Krt5* and *cyclin d1* are target genes negatively regulated by GR, partly accounting for GC antiproliferative actions in several cell types including

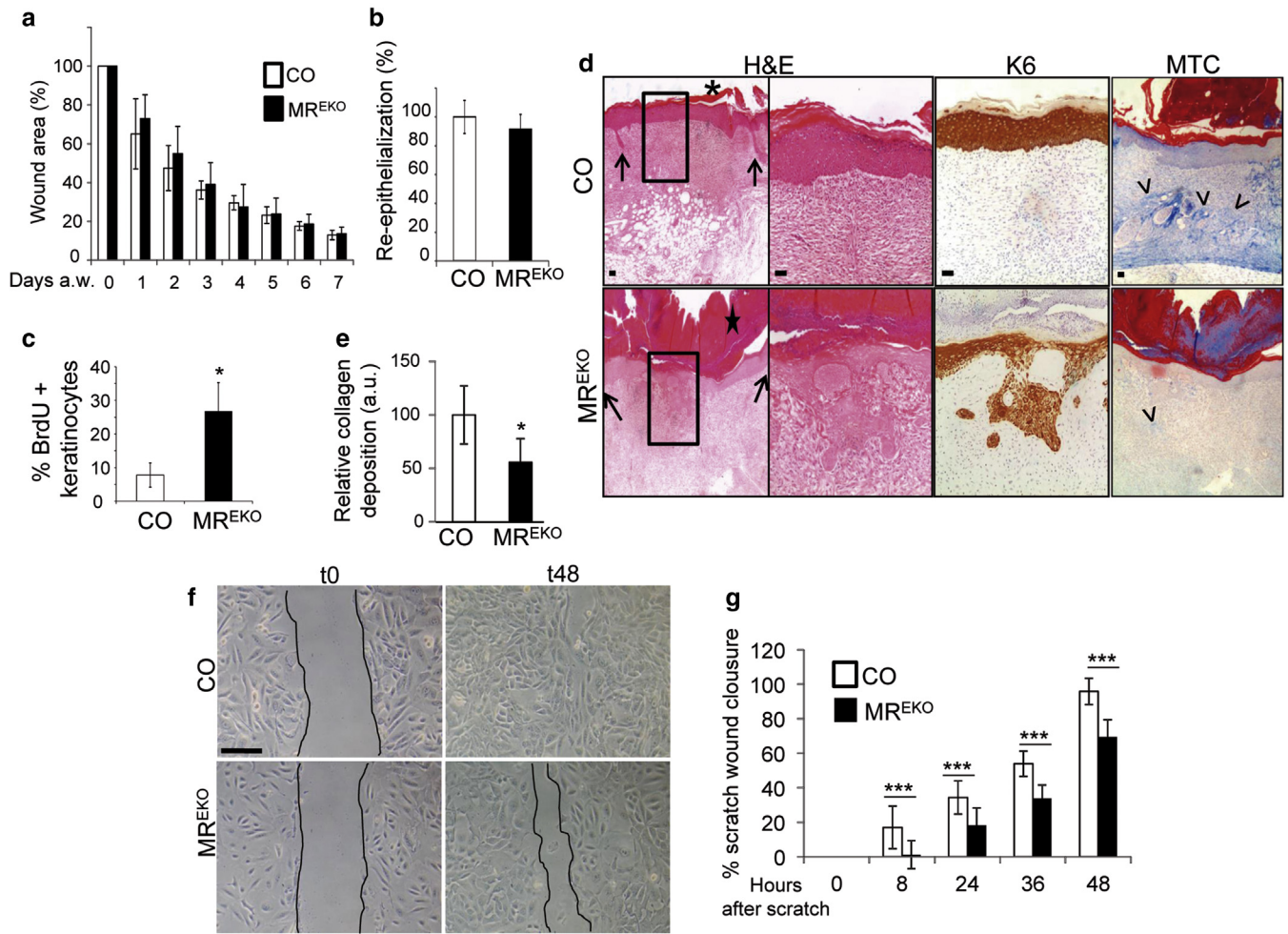


Figure 4. Impaired cutaneous wound healing in MR^{EKO} mice due to defective keratinocyte migration. (a) Healing of full-thickness dorsal wounds was monitored for 7 days and percent area of wound closure quantitated. Percentage of re-epithelialization (b) and percent BrdU-positive keratinocytes (c) at day 7 after wounding. (d) H&E staining, keratin 6 (K6) expression, and collagen deposition (MTC, Masson's trichrome staining) in CO and MR^{EKO} wounds; arrows, original wound edges; *, collagen. Bar = 100 μ m. (e) Quantitation of relative collagen deposition. (a–e) Mean values \pm SD are shown; n = 7 CO and 9 MR^{EKO} mice. Student's t-test; *, $P < 0.05$. (f, g) CO and MR^{EKO} keratinocyte monolayers were evaluated for wound closure at indicated times after scratching. Bar = 50 μ m. Graph (g) shows the average of wound closure \pm SD. Student's t-test; ***, $P < 0.001$, n = 8 per time point and genotype. CO, control; H&E, hematoxylin and eosin; MR^{EKO}, MR epidermal knockout; SD, standard deviation.

keratinocytes (Radoja et al., 2000). Because GR expression did not change in Dex-treated MR^{EKO} or CO mouse skin (Supplementary Figure S1c), our findings indicate that MR also participates in gene repression and that GR is not sufficient to mediate this process. Our data are in agreement with a recent report demonstrating that combined treatments using GCs plus a pharmacological MR antagonist partially reversed the GC-induced epidermal atrophy (Maubec et al., 2015).

We next assessed the expression of *Col1a1* in basal conditions and found significant increases in MR^{EKO} relative to CO skin (Figure 5e). However, Dex treatments reduced *Col1a1* mRNA to similar levels in both genotypes (Figure 5e). Because other reports described that MR contributes to collagen deposition in dermal fibroblasts (Mitts et al., 2010), it is possible that the atrophogenic effects of Dex are also due to MR activation in other cell types besides keratinocytes. Thus, contrary to other tissues in which MR blockade is beneficial to combat fibrosis (e.g., renal and cardiovascular pathologies), epidermal MR inactivation does not have an

impact on cutaneous fibrosis (Supplementary Figure S2, Figure 5e). Although MR inactivation in skin can be beneficial by partially counteracting GC-associated undesired effects, our findings highlight that it can also have adverse consequences in this tissue in response to stressors. Therefore, before the use of MR antagonists, the distinct cell-type-specific functions of this nuclear receptor must be taken into account (Gomez-Sanchez, 2016).

MR is required for transcriptional upregulation of GC-target genes in keratinocytes

We next analyzed whether keratinocyte MR inactivation had an impact on Dex-induced transcriptional responses by measuring the activity of a glucocorticoid response element (GRE)-luciferase reporter in MR^{EKO} and CO keratinocytes. In CO cells, Dex treatment induced an increase in GRE-luciferase activity of approximately 8-fold, which was decreased in MR^{EKO} cells by around 40% (Figure 6a). Further supporting the functional role of MR in mediating GC

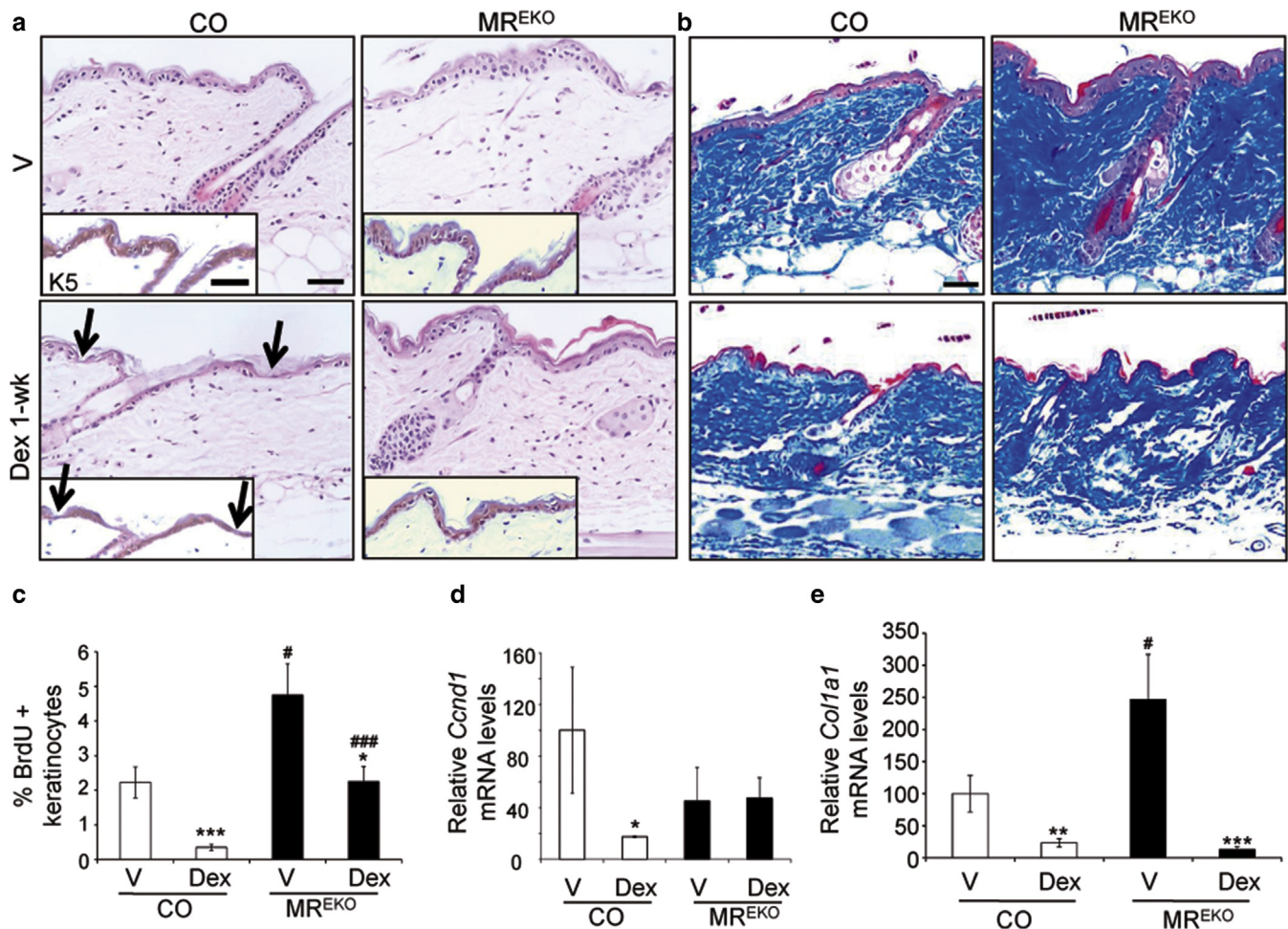


Figure 5. Epidermal MR inactivation partially protects against Dex-induced skin atrophy. (a, b) Dorsal CO and MR^{EKO} skin was treated with vehicle (V) or Dex for 7 days. H&E staining and K5 expression (a) in skin sections; arrows, epidermal thinning. Collagen deposition (b) evaluated by Masson's trichrome staining. Bar = 100 μ m. (c) Percent BrdU-positive keratinocytes after 48 hours of Dex treatment. (d, e) qRT-PCR assessing *Cyclin D1* (*Ccnd1*, d) and *Collagen 1a1* (*Col1a1*, e) expression in CO and MR^{EKO} skin treated with V or Dex (48 hours for *Ccnd1* and 7 days for *Col1a1*). (c–e) Mean values \pm SD are shown; n = 3 per genotype and treatment. Post hoc Tukey test *, #, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, ###, $P < 0.001$. Asterisks: significant differences on treatment within each genotype; hashes: significant differences between genotypes in the same treatment group. CO, control; Dex, dexamethasone; H&E, hematoxylin and eosin; MR, mineralocorticoid receptor; MR^{EKO}, MR epidermal knockout; SD, standard deviation.

transcriptional responses in keratinocytes, Dex induction of GRE-luciferase activity in CO cells was significantly decreased in the presence of eplerenone by approximately 50% (Supplementary Figure S4 online).

Transfection of increasing amounts of hemagglutinin (HA)-MR in MR^{EKO} cells restored the transcriptional response to baseline levels (Figure 6a and b). It must be noted that Dex effectively induced both MR and GR nuclear translocation in HA-MR transfected cells as shown by immunofluorescence (Figure 6c, see "Merge"). Importantly, the total and phosphorylated levels of GR were similar in MR^{EKO} relative to CO cells (Figure 6b and d), indicating that there was no functional compensation by GR.

To understand how MR loss impairs GC-transcriptional responses in keratinocytes, we focused on *Tsc22d3/Gilz*, a classic target gene of both MR and GR that is induced by Dex in many cell types (Ronchetti et al., 2015). In keratinocytes, we previously demonstrated that Dex upregulates *Gilz* by inducing GR recruitment to hormone responsive element-containing regulatory sequences (Sevilla et al., 2015).

Consistent with the reduced transactivation of GRE-luciferase assays, Dex induction of *Gilz* mRNA levels was significantly reduced in MR^{EKO} versus CO keratinocytes (Figure 6e; 1.8-fold vs. 5-fold). Analogous to MR-deficient keratinocytes, GR^{EKO} cells were unable to induce *Gilz* mRNA levels in response to Dex (Figure 6e).

We then assessed GR recruitment to *Gilz* regulatory sequences after Dex treatment in MR^{EKO} and CO cells by chromatin immunoprecipitation-qPCR assays and detected a significant decrease of GR binding in MR^{EKO} keratinocytes (Figure 6f). This together with the fact that MR reinsertion into MR^{EKO} keratinocytes restored GC-mediated transactivation demonstrates that MR is necessary for optimal GC transcriptional regulation. To dissect further the relative contribution of MR and GR in GC transactivation, we used GR^{EKO} keratinocytes. On HA-MR transfection, Dex increased GRE-luciferase activity approximately 40-fold (Figure 6g and h), demonstrating that MR is transcriptionally functional even in the absence of GR. However, GR transfection in GR^{EKO} cells increased GRE-luciferase activity to a much higher extent

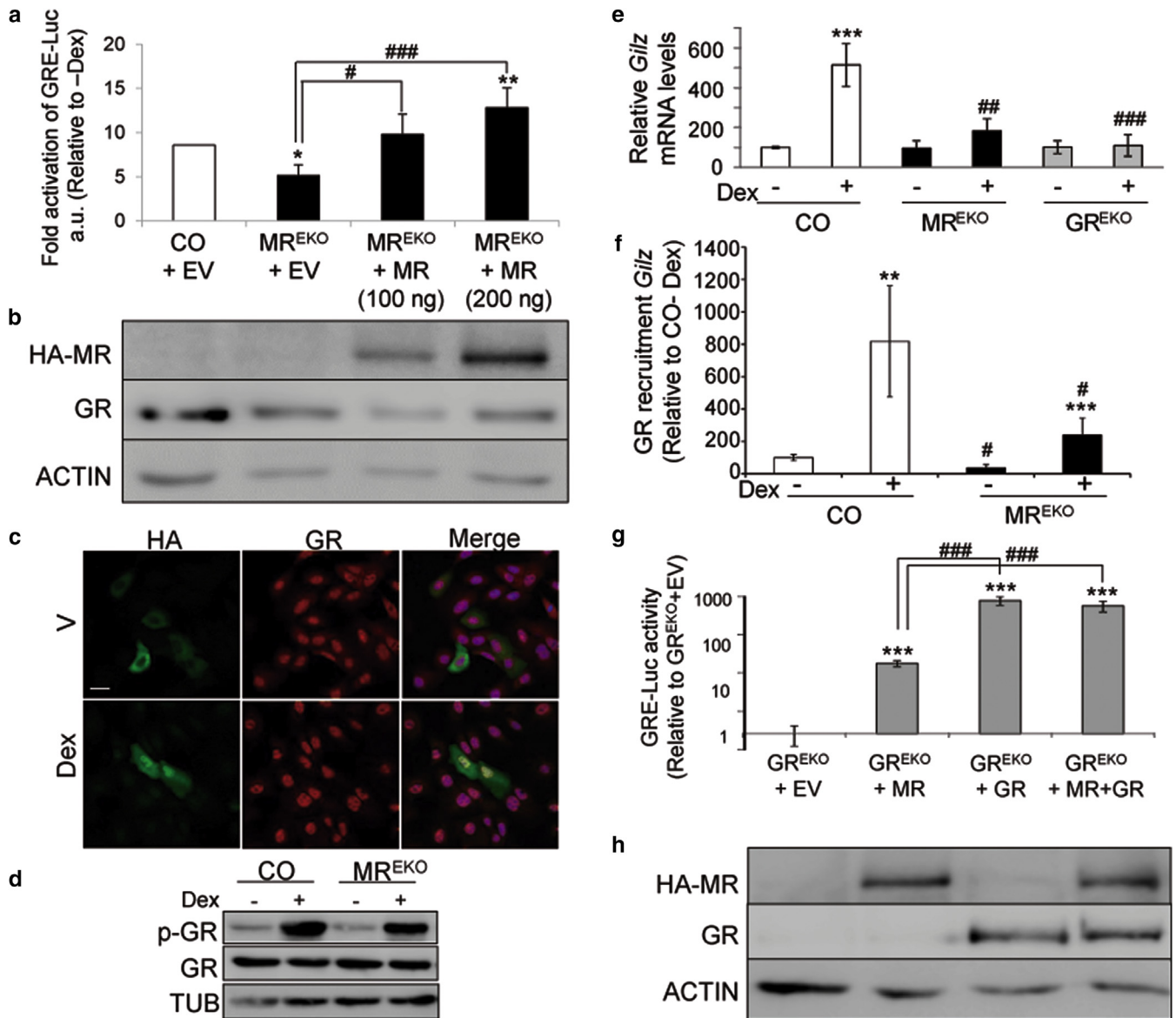


Figure 6. Loss of MR in keratinocytes decreases transcriptional upregulation of GC-target genes. (a) Fold activation of GRE-luciferase (GRE-luc) in Dex relative to vehicle-treated CO and MR^{EKO} keratinocytes after transfection with empty vector (EV) or HA-MR. n = 9 per genotype and treatment. (b) Immunoblotting showing HA-MR and GR in untreated transfected cells; loading control: actin. (c) Immunofluorescence of HA-MR transfected CO keratinocytes. HA, green; GR, red; overlay (DAPI, blue). Bar = 20 μ m. (d) Immunoblot showing GR and p-GR in vehicle- and Dex-treated CO and MR^{EKO} keratinocytes; loading control: tubulin (TUB). (e) qRT-PCR showing *Gilz* expression in CO, MR^{EKO}, and GR^{EKO} keratinocytes treated with vehicle or Dex. n = 3 per genotype and treatment. (f) ChIP qPCR assessing GR recruitment to *Gilz* regulatory sequences in vehicle- or Dex-treated CO and MR^{EKO} keratinocytes. n = 4 per genotype and treatment. (g) Activation of a GRE-luc reporter in GR^{EKO} cells transfected with EV, MR, GR, or both in response to Dex. (h) Immunoblot shows expression of HA-MR and GR in untreated transfected cells; loading control: actin. (a, e–g) Mean values \pm SD are shown. Post hoc Tukey test *, #, $P < 0.05$; **, ##, $P < 0.01$; ***, ###, $P < 0.001$. Asterisks: significant differences on treatment within each genotype; hashes: significant differences between genotypes in the same treatment group. CO, control; ChIP, chromatin immunoprecipitation; Dex, dexamethasone; GC, glucocorticoid; GR, GC receptor; GRE, glucocorticoid response element; HA, hemagglutinin; MR, mineralocorticoid receptor; MR^{EKO}, MR epidermal knockout; SD, standard deviation.

(around one order of magnitude) than MR, and cotransfection of both receptors did not produce an additive effect (Figure 6g and h). Overall, our results indicate that both MR and GR are required to modulate transcriptional regulation in response to GCs.

Altogether, our findings support complex roles for epidermal MR in healthy and diseased skin. Epidermal MR inactivation disturbed skin homeostasis increasing the sensitivity to barrier disruption and inflammation. The observed increased activation of proinflammatory transcription factors

such as STAT3 and NF- κ B highlights an anti-inflammatory function for MR in keratinocytes. In addition to its protective roles, epidermal MR partially mediated GC-induced epidermal thinning. Our in vitro studies also demonstrated that MR inactivation in keratinocytes significantly impaired GC-dependent transactivation at least partly due to reduced GR recruitment to hormone responsive element-containing target genes. Overall, our data support common and distinct roles for MR and GR in skin, which must be taken into account for the design of GC-based skin therapies.

MATERIALS AND METHODS

Animal experimentation and treatments

Animal experimentation was conducted according to current Spanish and European regulations and approved by our institution's ethics committee (SAF2011-28115 and SAF2014-59474-R). MR^{loxP/loxP} and keratin 5-cre mice have been reported (Berger et al., 2006; Ramírez et al., 2004). Intercrosses of these mice led to the double transgenic keratin 5-cre[±]/MR^{loxP/loxP} or MR^{EKO}; 0Cre//MR^{loxP/loxP} mouse littermates were used as controls. Genotyping was performed using primers in Supplementary Table S1 online.

Topical treatments included Dex (8 µg/200 µl; for 48 hours or for 7 days every 48 hours; Sigma, St Louis, MO), and SDS (10%/100 µl daily for 5 days; Merck, Darmstadt, Germany). PMA (8 µg/50 µl; Sigma) was applied to both sides of mouse ears 48 hours before killing. To assess cellular proliferation, mice were injected with BrdU 1 hour before killing (130 µg/g of body weight, Sigma).

For cutaneous wounding assays, full-thickness wounds (n = 4 wound per mouse) were performed (6 mm, Biopsy punch, Stiefel, Brentford, UK) in female MR^{EKO} and CO littermates (n = at least 7 mice per genotype), and wound areas were recorded daily, as described (Sanchis et al., 2012). Mice were killed 7 days after wounding.

Histological analysis

Dorsal skin or ear samples were collected, fixed in 70% ethanol, and paraffin-embedded for histopathological analysis (Sevilla et al., 2013). See Supplementary Methods online for quantitation analyses.

Immunoblotting and antibodies

Immunoblotting was performed as described (Sevilla et al., 2013). Mouse monoclonal antibodies used were specific for hemagglutinin (HA-11, Biolegend, San Diego, CA), and tubulin (T6199, Sigma). Rabbit polyclonal antibodies used were specific for GR (sc-1004, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), actin (A-2066, Sigma), phosphorylated GR (Ser211; #4161), STAT3 (#9132), and phosphorylated STAT3 (Tyr705 D3A7; #9145) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA). Goat anti-S100A9 was from R&D Systems (Minneapolis, MN). Secondary peroxidase-conjugated anti-rabbit (NA934) and anti-mouse (NA931) antibodies were from GE Healthcare (GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA).

Rabbit polyclonal antibodies against keratin 5 (PRB-160P), keratin 6 (PRB-169P), and loricrin (PRB-145P) (Biolegend), and mouse anti-BrdU (Clone BMC 9318, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) were used. Secondary biotin-conjugated anti-rabbit or anti-mouse antibodies (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) and secondary Alexa Fluor anti-rabbit (555, A-31572) or anti-mouse (488, A-21202) antibodies were used (Thermo Fisher, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA).

Cell culture

See Supplementary Methods for details of generation and maintenance of cell lines.

Cultured keratinocytes were grown overnight in medium containing charcoal-stripped serum before Dex treatment, to deplete steroid hormones, and then treated with Dex (100 nM), PMA (100 nM), or eplerenone (Sigma, 10 µM) at the indicated times. To induce terminal differentiation, keratinocytes were incubated with medium containing 1.2 mM CaCl₂ for 72 hours.

RNA isolation, quantitative RT-PCR, and chromatin immunoprecipitation

RNA isolated from mouse dorsal skin, ear, or cultured keratinocytes using Trizol (Thermo Fisher) was used to generate cDNA using

RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (Thermo Fisher) for qPCR that was performed as described using specific oligonucleotides (Sevilla et al. 2015; Supplementary Table S1).

Chromatin immunoprecipitation experiments were performed using adult keratinocyte cell lines as described (Sevilla et al., 2015). The qPCR was performed to determine the relative amplification of specified genomic sites in Dex- versus mock-treated chromatin immunoprecipitations, which were normalized to the amplification values of respective inputs (primers; Supplementary Table S1).

Statistics

Experimental data were analyzed using Microsoft Excel and IBM SPSS Statistics 23 software. In all graphs, unless otherwise mentioned, mean values ± SD are shown. When statistical analysis was performed with relative values, data were first subjected to logarithmic transformation. Before parametric testing, Levene's test was used to determine whether samples within groups had equal variance. For comparisons between two experimental groups, we used Student's unpaired two-tailed *t*-test. For comparisons among more than two experimental groups, we used the one-way analysis of variance that if statistically significant was followed by a post hoc Tukey multiple comparison test. *P* values less than 0.05 were considered statistically significant.

ORCID

Paloma Pérez: <http://orcid.org/0000-0002-7166-2824>

CONFLICT OF INTEREST

The authors state no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants SAF2011-28115 and SAF2014-59474-R (MINECO, Spanish Government). JB and EC are recipients of FPI (BES-2012-0578) and FPU (AP201-06094) fellowships of MINECO, respectively. We thank COST ADMIRE BM-1301 and NURCAMEIN (SAF2015-71878-REDT) for support for dissemination. We are grateful to Prof. J.L. Jorcano and A. Ramírez for providing us with keratin 5-cre mice, Prof. G. Schütz and Jan Tuckermann for providing us with MR^{loxP/loxP} mice, D. Álvarez de la Rosa for pCDNA4-HA-MR, and J.M. Torres for NFκB 5x-Luciferase constructs. We specially thank Jose Nieto for his expert technical help with mice and histological work, and V. Marcos-Garcés for morphometrical analysis of adult mouse skin.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is linked to the online version of the paper at www.jidonline.org, and at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jid.2016.07.018>.

REFERENCES

- Bauersachs J, Jaissner F, Toto R. Mineralocorticoid receptor activation and mineralocorticoid receptor antagonist treatment in cardiac and renal diseases. *Hypertension* 2015;65:257–63.
- Beer HD, Fässler R, Werner S. Glucocorticoid-regulated gene expression during cutaneous wound repair. *Vitam Horm* 2000;59:217–39.
- Berger S, Bleich M, Schmid W, Cole TJ, Peters J, Watanabe H, et al. Mineralocorticoid receptor knockout mice: pathophysiology of Na⁺ metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:9424–9.
- Berger S, Wolfer DP, Selbach O, Alter H, Erdmann G, Reichardt HM, et al. Loss of the limbic mineralocorticoid receptor impairs behavioral plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:195–200.
- Bergmann A, Eulenberger C, Wellner M, Rolle S, Luft F, Kettritz R. Aldosterone abrogates nuclear factor kappaB-mediated tumor necrosis factor alpha production in human neutrophils via the mineralocorticoid receptor. *Hypertension* 2010;55:370–9.
- Boix J, Carceller E, Sevilla LM, Marcos-Garcés V, Pérez P. The mineralocorticoid receptor plays a transient role in mouse skin development. *Exp Dermatol* 2015;25:69–71.
- Brown N. Contribution of aldosterone to cardiovascular and renal inflammation and fibrosis. *Nat Rev Nephrol* 2013;9:459–69.

- Busillo JM, Cidlowski JA. The five Rs of glucocorticoid action during inflammation: ready, reinforce, repress, resolve, and restore. *Trends Endocrinol Metab* 2013;24:109–19.
- Cascallana JL, Bravo A, Donet E, Leis H, Lara MF, Paramio JM, et al. Ectoderm-targeted overexpression of the glucocorticoid receptor induces hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Endocrinology* 2005;146:2629–38.
- Cato AC, Schäcke H, Sterry W, Asadullah K. The glucocorticoid receptor as target for classic and novel anti-inflammatory therapy. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2004;3:347–55.
- Farman N, Maubec E, Poeggeler B, Klatt JE, Jaisser F, Paus R. The mineralocorticoid receptor as a novel player in skin biology: beyond the renal horizon? *Exp Dermatol* 2010;19:100–7.
- Farman N, Nguyen VT. A novel actor in skin biology: the mineralocorticoid receptor. *Exp Dermatol* 2015;25:24–5.
- Funder JW. Minireview: aldosterone and mineralocorticoid receptors: past, present, and future. *Endocrinology* 2010;151:5098–102.
- Gomez-Sanchez E, Gomez-Sanchez CE. The multifaceted mineralocorticoid receptor. *Compr Physiol* 2014;4:965–94.
- Gomez-Sanchez EP. Third-generation mineralocorticoid receptor antagonists: why do we need a fourth? *J Cardiovasc Pharmacol* 2016;67:26–38.
- Hennings H, Michael D, Cheng C, Steinert P, Holbrook K, Yuspa SH. Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell* 1980;19:245–54.
- Jaisser F, Farman N. Emerging roles of the mineralocorticoid receptor in pathology: toward new paradigms in clinical pharmacology. *Pharmacol Rev* 2016;68:49–75.
- Kenouch S, Lombes M, Delahaye F, Eugene E, Bonvalet JP, Farman N. Human skin as target for aldosterone: coexpression of mineralocorticoid receptors and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:1334–41.
- Kerkhoff C, Voss A, Scholzen TE, Averill MM, Zänker KS, Bornfeldt KE. Novel insights into the role of S100A8/A9 in skin biology. *Exp Dermatol* 2012;21:822–6.
- Latorre V, Sevilla LM, Sanchis A, Pérez P. Selective ablation of glucocorticoid receptor in mouse keratinocytes increases susceptibility to skin tumorigenesis. *J Invest Dermatol* 2013;133:2771–9.
- Leung WH, Vong QP, Lin W, Janke L, Chen T, Leung W. Modulation of NKG2D ligand expression and metastasis in tumors by spironolactone via RXR α activation. *J Exp Med* 2013;210:2675–92.
- Martinier L, Munier M, Menuet DL, Meduri G, Viengchareun S, Lombès M. The mineralocorticoid signaling pathway throughout development: expression, regulation and pathophysiological implications. *Biochimie* 2013;95:148–57.
- Maubec E, Laouénan C, Deschamps L, Nguyen VT, Scheer-Senyarich I, Wackenheim-Jacobs AC, et al. Topical mineralocorticoid receptor blockade limits glucocorticoid-induced epidermal atrophy in human skin. *J Invest Dermatol* 2015;135:1781–9.
- Messaoudi S, Milliez P, Samuel JL, Delcayre C. Cardiac aldosterone overexpression prevents harmful effects of diabetes in the mouse heart by preserving capillary density. *FASEB J* 2009;23:2176–85.
- Mitts TF, Bunda S, Wang Y, Hinek A. Aldosterone and mineralocorticoid receptor antagonists modulate elastin and collagen deposition in human skin. *J Invest Dermatol* 2010;130:2396–406.
- Nagase T, Akase T, Sanada H, Minematsu T, Ibuki A, Huang L, et al. Aging-like skin changes in metabolic syndrome model mice are mediated by mineralocorticoid receptor signaling. *Aging Cell* 2013;12:50–7.
- Oakley RH, Cidlowski JA. The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *J Allergy Clin Immunol* 2013;132:1033–44.
- Oakley RH, Cidlowski JA. Glucocorticoid signaling in the heart: a cardiomyocyte perspective. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2015;153:27–34.
- Odermatt A, Atanasov AG. Mineralocorticoid receptors: emerging complexity and functional diversity. *Steroids* 2009;74:163–71.
- Pastar I, Stojadinovic O, Yin NC, Ramirez H, Nusbaum AG, Sawaya A, et al. Epithelialization in wound healing: a comprehensive review. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2014;3:445–64.
- Pérez P, Page A, Bravo A, del Río M, Gimenez-Conti I, Budunova I, et al. Altered skin development and impaired proliferative and inflammatory responses in transgenic mice overexpressing the glucocorticoid receptor. *FASEB J* 2001;15:2030–6.
- Pérez P. Glucocorticoid receptors, epidermal homeostasis and hair follicle differentiation. *Dermatoendocrinology* 2011;3:1–9.
- Radoja N, Komine M, Jho SH, Blumenberg M, Tomic-Canic M. Novel mechanism of steroid action in skin through glucocorticoid receptor monomers. *Mol Cell Biol* 2000;20:4328–39.
- Ramírez A, Page A, Gandarillas A, Zanet J, Pibre S, Vidal M, et al. A keratin K5Cre transgenic line appropriate for tissue-specific or generalized Cre-mediated recombination. *Genesis* 2004;39:52–7.
- Ronchetti S, Migliorati G, Riccardi C. GILZ as a mediator of the anti-inflammatory effects of glucocorticoids. *Front Endocrinol* 2015;6:170.
- Sainte Marie Y, Toulon A, Paus R, Maubec E, Cherfa A, Grossin M, et al. Targeted skin overexpression of the mineralocorticoid receptor in mice causes epidermal atrophy, premature skin barrier formation, eye abnormalities, and alopecia. *Am J Pathol* 2007;171:846–60.
- Sanchis A, Alba L, Latorre V, Sevilla LM, Pérez P. Keratinocyte-targeted overexpression of the glucocorticoid receptor delays cutaneous wound healing. *PLoS One* 2012;7:e29701.
- Schäcke H, Döcke WD, Asadullah K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther* 2002;96:23–43.
- Sevilla LM, Latorre V, Carceller E, Boix J, Vodak D, Mills IG, et al. Glucocorticoid receptor and *klf4* co-regulate anti-inflammatory genes in keratinocytes. *Mol Cell Endocrinol* 2015;412:281–9.
- Sevilla LM, Latorre V, Sanchis A, Pérez P. Epidermal inactivation of the glucocorticoid receptor triggers skin barrier defects and cutaneous inflammation. *J Invest Dermatol* 2013;33:361–70.
- Slominski AT, Manna PR, Tuckey RC. Cutaneous glucocorticosteroidogenesis: securing local homeostasis and the skin integrity. *Exp Dermatol* 2014;23:369–74.
- Stojadinovic O, Brem H, Vouthounis C, Lee B, Fallon J, Stallcup M, et al. Molecular pathogenesis of chronic wounds: the role of beta-catenin and c-myc in the inhibition of epithelialization and wound healing. *Am J Pathol* 2005;167:59–69.
- Tiganescu A, Tahrani AA, Morgan SA, Otranto M, Desmoulière A, Abrahams L, et al. 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase blockade prevents age-induced skin structure and function defects. *J Clin Invest* 2013;123:3051–60.
- Vandevyver S, Dejager L, Tuckermann J, Libert C. New insights into the anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids: an emerging role for glucocorticoid-receptor-mediated transactivation. *Endocrinology* 2013;154:993–1007.
- Viengchareun S, Le Menuet D, Martinier L, Munier M, Pascual-Le Tallec L, Lombès M. The mineralocorticoid receptor: insights into its molecular and (patho)physiological biology. *Nucl Recept Signal* 2007;5:e012.
- Vukelic S, Stojadinovic O, Pastar I, Rabach M, Krzyzanowska A, Lebrun E, et al. Cortisol synthesis in epidermis is induced by IL-1 and tissue injury. *J Biol Chem* 2011;286:10265–75.
- Youn JK, Park K, Uchida Y, Chan A, Mauro TM, Holleran WM, et al. Local blockade of glucocorticoid activation reverses stress- and glucocorticoid-induced delays in cutaneous wound healing. *Wound Repair Regen* 2013;21:715–22.

SUPPLEMENTARY METHODS

Quantitative analyses of histological samples

To assess epidermal thickness, ear edema, and collagen deposition, images of H&E stained skin sections or Masson's Trichrome (Sigma) stained-sections were used (IMAGE J software, Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland). At least five photomicrographs were taken of each section and at least five measurements were taken from each photomicrograph, following a method of semi-randomization, which excluded altered zones. A Leica DM1000 microscope, a Leica EC3 camera and Leica LAS EZ software (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) were used. To quantitate collagen deposition, the integrated density of collagen fibers (product of area occupied by collagen and mean collagen intensity) was determined. In skin wounds, images were taken from the newly formed dermis under the original wound.

Generation of cell lines

CO and GR^{EKO} cell lines were previously described (Sevilla et al., 2013).

Adult MR^{EKO} keratinocyte cell lines were generated from 8-wk-old female mouse dorsal skin, following established protocols (Romero *et al.*, 1999; Reichelt and Haase, 2010). Briefly, keratinocytes were isolated following overnight incubation of skin with 0.25% trypsin-PBS at 4°C and cultured on mitomycin C treated J2-3T3 feeders in type I collagen-coated flasks in DMEM-Ham's F12 (3:1) medium (Thermo Fisher; Biowest, Nuaille, France) supplemented with 1.8×10^{-4} mol/l adenine (Sigma), 0.35 mM calcium, 7.5% FBS Gold (Biowest), 100 U/ml penicillin/100 µg/ml streptomycin (Biowest), 2 mM glutamine (Biowest), 0.25 µg/ml amphotericin B (Biowest), 5 µg/ml insulin (Sigma), 10^{-10} M cholera toxin (Sigma) and 10 ng/ml EGF (Peprotech, Rocky Hill, NJ). Following approximately 7-10 passages, spontaneously immortalized lines arose. Immortal cell lines were maintained using the conditions described above.

Transfection and Luciferase assays

Keratinocytes at 70-90% confluence were transfected with combinations of the following plasmids: pCDNA4 (Thermo Fisher), pCDNA4-HA-MR (Aguilar-Sánchez et al., 2012), pGRE2EIB-Luciferase (Allgood et al. 1993), pGL3-NF-κB-5x-Luciferase (Torres and

Watt, 2008), and the internal control pRL-SV40 Renilla (Promega) using Lipofectamine 2000 Reagent (Thermo Fisher). 24h after transfection, cells were treated with 100 nM Dex for 5 h or 100 nM PMA for 6h. Where indicated, cells were pre-treated 16 h with eplerenone (10 μ M). Luciferase activity was measured using the dual luciferase assay system (Promega) and a Wallac Victor² 1420 multilabel counter. Firefly-luciferase levels were normalized to those of Renilla luciferase.

Immunofluorescence

For immunofluorescence, cells were grown on collagen I-coated coverslips, and analyzed using a confocal microscope (Espectral Leica TCS SP8; Latorre et al., 2013). Images were processed using IMAGE J software and are presented as maximum projections of Z stack series.

Growth curve

500 CO and MR^{EKO} keratinocytes were plated per well of a 96-well plate (n=4 per genotype and time point). On day 0, 3, 5 and 7, 20 μ l per well of CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay Reagent (Promega Corp., Madison, WI) was added and incubated for 3h at 37°C. Absorbance was measured at 490nm using a Wallac Victor² 1420 multilabel counter.

Wound scratch assays

Confluent cells were treated with mitomycin C (Sigma, 4 μ g/ml, 1h) before scratching cell monolayers with sterile white pipette tips. Following wounding, the percentage of cell migration was determined in photomicrographs taken at each time point (Sanchis et al., 2012). Results are average of n=8-9 biological replicates per genotype or treatment. Eight images were taken along each wound scratch per time point for subsequent analysis (Adobe Acrobat 8 Professional).

To evaluate keratinocyte migration in response to eplerenone (10 μ M), cells were preincubated 24 h before scratching; then, additional treatments were performed with vehicle or eplerenone for the duration of the experiment.

Supplementary References

Aguilar-Sánchez C, Hernández-Díaz I, Lorenzo-Díaz F, Navarro JF, Hughes TE, Giraldez T et al. Identification of permissive insertion sites for generating functional fluorescent mineralocorticoid receptors. *Endocrinology* 2012;153:3517–25.

Allgood VE, Oakley RH, Cidlowski JA. Modulation by vitamin B6 of glucocorticoid receptor-mediated gene expression requires transcription factors in addition to the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem* 1993;268:20870–76.

Reichelt J, Haase I. Establishment of Spontaneously Immortalized Keratinocyte Cell Lines from Wild-Type and Mutant Mice. In: Turksen, K, editor. *Epidermal Cells. Methods in Mol Biol*. Totowa, New Jersey, USA: Humana Press; 2010. p. 59–69.

Romero MR, Carroll JM, Watt FM. Analysis of cultured keratinocytes from a transgenic mouse model of psoriasis: effects of suprabasal integrin expression on keratinocyte adhesion, proliferation and terminal differentiation. *Exp Dermatol* 1999;8:53–67.

Torres J, Watt FM. Nanog maintains pluripotency of mouse embryonic stem cells by inhibiting NFkappaB and cooperating with Stat3. *Nat Cell Biol* 2008;10:194–201.

Supplementary Figures

Fig S1. *Nr3c1* expression does not change in MR^{EKO} relative to CO mouse skin under different experimental conditions. Relative *Nr3c1* levels determined by qRT-PCR in CO and MR^{EKO} dorsal skin subjected to different treatments prior to collection. (a) Daily application of vehicle (V) or SDS for 5 d; n=3 per genotype and treatment. A single treatment with V or PMA followed by 48h; n=4 CO, n=5 MR^{EKO} per genotype and treatment. (c) Treatment with V or Dex every 48h for 7 d; n=3 per genotype and treatment. Post hoc Tukey test * p<0.05; ***p<0.001 respective to V treatment of same genotype.

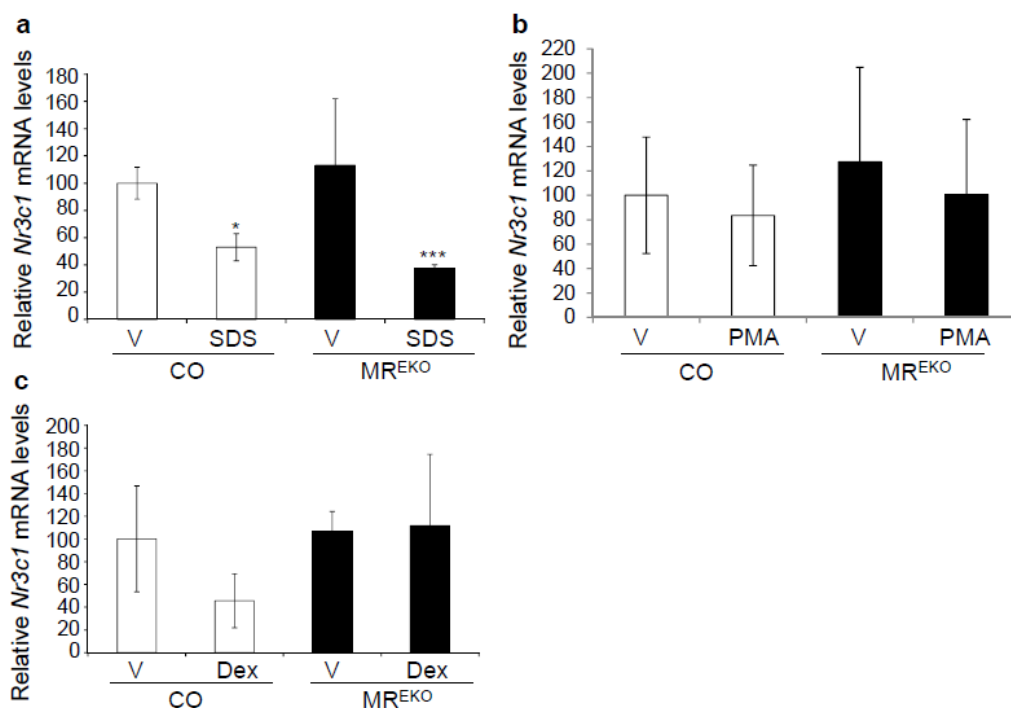


Fig S2. Collagen deposition does not change in MR^{EKO} relative to CO mouse skin. Relative collagen deposition represented as the integrated density was measured in Masson's Trichrome stained sections of CO and MR^{EKO} mice (n=4 per genotype).

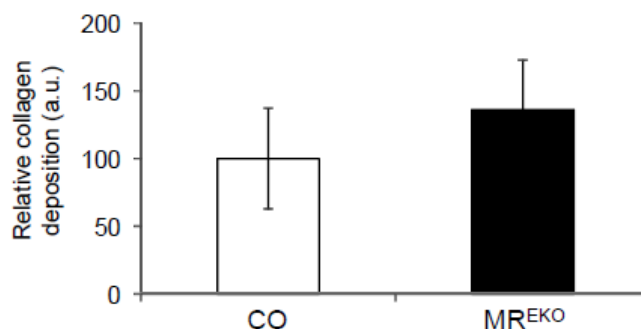


Fig. S3. Treatment of CO keratinocytes with the MR antagonist Eplerenone delays cell migration. CO keratinocyte monolayers were treated with vehicle (V) or eplerenone (E, 10 μ M) 24h before scratching; after wound scratch, additional treatments were performed with V or Eplerenone for the duration of the experiment. Wound closure was evaluated at indicated times. Graph shows the average of wound closure \pm SD. Student's *t* test; *, p<0.05, n=at least 8 per time point and treatment.

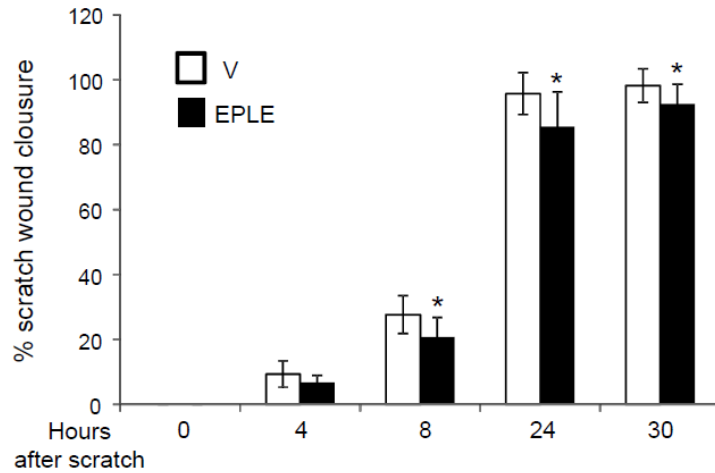
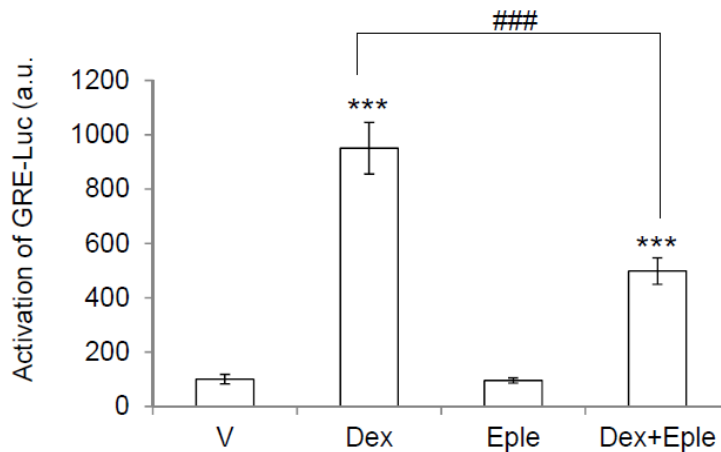


Fig. S4. Treatment of CO keratinocytes with the MR antagonist Eplerone diminishes Dex induction of GRE-luciferase reporter. Activation of GRE-luciferase (GRE-luc) in CO cells treated as indicated. Cells were pre-treated with vehicle or eplerone (Eple, 10 μ M) 16h before further incubation with vehicle (V) or Dex (100 nM) for 5h. Post hoc Tukey test *** $p < 0.001$ relative to V treatment; ### $p < 0.001$ among groups indicated by bracket; $n = 4$ per treatment group.



Genotyping

Gene	Primer name	Sequence	Band size MR ^{wt/wt}	Band size MR ^{Rox/Rox}	Band size MR ^{KO/KO}
<i>Nr3c2</i>	MR_F	CTGGAGATCTGAACTCCAGGCT	285bp (primers F-RA)	335bp (primers F-RA)	390bp (F-RB)
<i>Nr3c2</i>	MR_RA	TAGAAACACTTCGTAAAGTAGAGCT			
<i>Nr3c2</i>	MR_RB	CCTAGAGTTCCTGAGCTGCTGA			

RT qPCR

Gene symbol	Forward sequence	Reverse sequence	product bp
<i>Ccnd1</i>	CATCAAGTGTGACCCGGACTG	CCTCCTCCTCAGTGGCCTTG	116
<i>Col1a1</i>	CTAAGGGTACCGCTGGAGAAC	GGGACCTTGTTACCTCTCTC	155
<i>Defb1</i>	CCTCATCTGTCAGCCCAACT	GTGAGAATGCCAACCTCGG	148
<i>Hprt1</i>	TCAGTCAACGGGGGACATAAA	GGGGCTGTACTGCTTAACCAG	142
<i>Il6</i>	GATGCTACCAAACCTGGATAAATC	GGTCCTTAGCCACTCCTTCTGTG	269
<i>Nr3c1</i>	TGCTATGCTTTGCTCCTGATCTG	TGTCAGTTGATAAAAACCGCTGCC	299
<i>Nr3c2</i>	GTGGACAGTCCTTCACTACCG	TGACACCCAGAAGCCTCATCTC	286
<i>Slpi</i>	TGGCACCTGGACTGTGGAAGG	CCCGTCCCTCTGGCAGACAT	278
<i>Sprr2d</i>	TGGTACTCAAGGCCGAGA	TTTGTCTGATGACTGCTGAAGAC	336
<i>Tnfa</i>	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT	GCTACGACGTGGGCTACAG	61
<i>Tsc22d3/Gilz</i>	CTGTTGGCCTCGACTGCTG	GCCGAAAGTTGCTCACGAAG	111

ChIP qPCR

Gene symbol	Coordinates (Genome build mm9)	Forward sequence	Reverse sequence	product bp
<i>Tsc22d3/Gilz</i>	chrX:137063820-137063910	GGAGGGAATGCAACTGGGAG	CCCCTCCCTTGAATGCTGAA	91

Table S1. Primer sequences for genotyping, RT-QPCR, and ChIP