



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE  
BIOMEDICINA DE  
VALENCIA CSIC

Doctorado en Biotecnología

**Contribuciones relativas de los  
receptores de  
glucocorticoides y mineralocorticoides  
en la biología cutánea**

Tesis doctoral presentada por:  
Judith Bigas Corominas

Directora:  
Paloma Pérez Sánchez

Valencia, Septiembre 2020



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

SAF2014-59474-R

SAF2017-88046-R

Judit Bigas Corominas ha disfrutado de una beca predoctoral FPI (BES2015-072722) otorgada por el Ministerio de Economía y Competitividad, asociada al proyecto SAF2014-59474-R. Agradecemos el apoyo de COST ADMIRE BM-1301 y NuRCaMeIn (SAF2015-71878-REDT y SAF2017-90604-REDT).

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



# **AGRADECIMIENTOS**



Creo que no hay palabras que resuman todos los agradecimientos que me gustaría dar, porque sí, sois muchos los que de forma directa o indirecta habéis aportado un granito de arena a esta tesis doctoral.

Primero de todo, agradecer enormemente al grupo de investigación liderado por la Dra. Paloma Pérez. Paloma, quiero agradecerte cada detalle y momento dedicado en esta tesis, y en definitiva para ayudarme a ser una buena científica, siempre dando lo máximo de mí misma. Lisa, has sido un gran apoyo; tus consejos y las conversaciones de laboratorio nunca se me van a olvidar. Las dos me habéis ayudado mucho, no solo en lo científico, también en lo personal y os lo agradezco de corazón. Tampoco me quiero olvidar de Julia, Elena, Jose, Zara y Víctor que, aunque hemos coincidido poco en el laboratorio, siempre estáis dispuestos a echarme una mano y las risas con las que lo acompañáis todo son insustituibles. Pero del IBV no solo me puedo quedar con la gente del laboratorio, sino que me llevo una mochila llena de nuevas amistades. Gracias Ada, por estar siempre disponible y ofrecerme una mano cuando me veía perdida con todo el papeleo. A vosotras Lidia y Sílvia, gracias por vuestro cariño y confianza, habéis sido unas grandes amigas y espero que siga así. En definitiva, gracias a todo el personal del centro de investigación IBV-CSIC; me he sentido muy apoyada y como en casa.

Per acabar, gràcies a tu Jose per la teva paciència i per suportar-me quan ni jo mateixa ho feia, i agrair a la teva família haver-me acollit tan dolçament. Als meus pares i al meu germà, que sapigueu que tots quatre fem un equip invencible. Gràcies per ser els principals promotors del meus somnis, per confiar i creure en mi. Mama, aquesta tesis te la dedico a tu, per tot el que ha passat, pel que estem vivint i per tot el que vindrà.





# **ABSTRACT**



Our research focuses on understanding the molecular mechanisms that mediate the actions of glucocorticoids (GCs) in skin pathophysiology through functional analysis of the GC receptor (GR) and the mineralocorticoid receptor (MR), two highly related structural and functionally proteins, which act as ligand-dependent transcription factors. Our previous data show that GR plays a central role in skin development; in adulthood, both GR and MR act as anti-inflammatory mediators in skin diseases (Sevilla et al. 2013; Boix et al. 2016). However, we did not know if the receptors exerted cooperative or antagonistic functions in the epidermis.

This doctoral thesis has focused on the generation and characterization of mice with specific inactivation in the epidermis of GR and MR (double knock-out or DKO mice). At birth, DKO show a skin phenotype with defective epidermal differentiation and a unique inflammatory state characterized by epithelial immune infiltrates and alterations in gene expression, similar to psoriatic lesions. This phenotype was much more severe than that of individual KO (GR epidermal KO or GR<sup>EKO</sup> and MR epidermal KO or MR<sup>EKO</sup> mice), but resolved spontaneously from postnatal day 3. In adulthood, DKO skin showed an increase in epidermal thickness, similar to that of individual KO. All KO mice showed greater susceptibility to acute inflammation compared to controls (CO), which was not effectively counteracted by topical treatment with GCs. Furthermore, DKO mice show a greater susceptibility to imiquimod-induced psoriasis relative to individual KO. The increased inflammatory response in DKO was consistent with a significant increase in AP-1 and NF- $\kappa$ B activity in DKO keratinocytes relative to CO or individual KO. Taken together, our data show that epidermal GR and MR act cooperatively to counteract skin inflammation, during development and adulthood, and that both are required for optimal transcriptional response and therapeutic activity of GCs.

Prolonged treatments with pharmacological doses of GCs produce defects such as cutaneous atrophy, similar to that which occurs during chronological

aging, which correlates with an increase in endogenous local levels of GCs. This work has addressed the phenotypic consequences of epidermal loss of MR during chronological aging and the mechanisms involved. The 13-month-old MR<sup>EKO</sup> mice were resistant to epidermal atrophy but displayed reduced dermal thickness and collagen deposition, in part due to a decrease in SMAD2/3 activity relative to the skin of CO mice. In addition, the subcutaneous adipose tissue (dWAT) thickened 2.5 times in MREKO vs CO at 13 months, with hyperplasia and hypertrophy of adipocytes. These changes were triggered, at least in part, through alterations in GC-mediated signaling, and the activation of WNT/ $\beta$ -catenin induced by epidermal paracrine signals that led to increased expression of *Pparg*. These results show a crucial role for epidermal MR in the regulation of the cross-talk between compartments during chronological skin aging.

#### References:

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;136(12):2417-2426

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;133(2):361-370

**RESUM**



La nostra investigació se centra en comprendre els mecanismes moleculars que regulen les accions dels glucocorticoides (GCs) en la fisiopatologia de la pell mitjançant l'anàlisi funcional del receptor de GCs (GR) i el receptor de mineralocorticoides (MR), dues proteïnes altament relacionades estructural i funcionalment, que actuen com a factors de transcripció dependents de lligant. Els nostres resultats previs demostren que GR juga un paper central en el desenvolupament de la pell; en l'edat adulta, tant GR com MR actuen com a mediadors antiinflamatoris en malalties cutànies (Sevilla et al. 2013; Boix et al. 2016). No obstant, desconeixiem si els receptors exercien funcions cooperatives o antagoniques en l'epidermis.

Aquesta tesi doctoral s'ha centrat en la generació i caracterització de ratolins amb inactivació específica en l'epidermis de GR i MR (ratolins *double knock-out* o DKO). En néixer, els DKO van mostrar un fenotip cutani amb diferenciació epidèrmica defectuosa i un estat inflamatori únic caracteritzat per infiltrats immunes epitelials i alteracions en l'expressió gènica, similar a les lesions psoriàtiques. Aquest fenotip va ser molt més sever que el dels KO individuals (ratolins *GR epidermal KO* o  $GR^{EKO}$  i *MR epidermal KO* o  $MR^{EKO}$ ), però es va resoldre espontàniament a partir del dia post-natal 3. En l'edat adulta, la pell DKO va mostrar un augment en el gruix epidèrmic, similar al dels KO individuals. Tots els ratolins KO van mostrar una major susceptibilitat a la inflamació aguda en comparació als controls (CO), que no va ser contrarestada de manera efectiva per un tractament tòpic amb GCs. A més, els ratolins DKO van mostrar una major susceptibilitat a la psoriasis induïda per imiquimod respecte als KO individuals. L'augment de la resposta inflamatòria en els DKO era consistent amb un augment significatiu de l'activitat d'AP-1 i NF- $\kappa$ B en queratinòcits DKO respecte als CO o KO individuals. En conjunt, les nostres dades demostren que GR i MR epidèrmics actuen de manera cooperativa per contrarestar la inflamació de la pell, durant el desenvolupament i l'edat

adulta, i que tots dos són necessaris per a una resposta transcripcional òptima i una activitat terapèutica dels GCs.

Els tractaments prolongats amb dosis farmacològiques de GCs produeixen defectes com l'atròfia cutània, similar a la que té lloc durant l'envelliment cronològic, que correlaciona amb un augment dels nivells locals endògens de GCs. Aquest treball ha abordat les conseqüències fenotípiques de la pèrdua epidèrmica de MR durant l'envelliment cronològic i els mecanismes involucrats. Els ratolins MR<sup>EKO</sup> de 13 mesos d'edat van ser resistents a l'atròfia epidèrmica però van mostrar un menor gruix dèrmic i dipòsit de col·lagen, en part a causa d'una disminució de l'activitat SMAD2/3 respecte a la pell de ratolins CO. A més, el teixit adipós subcutani (dWAT) es va engrossir 2.5 vegades en MR<sup>EKO</sup> vs CO als 13 mesos, amb hiperplàsia i hipertròfia d'adipòcits. Aquests canvis es van desencadenar, almenys en part, a través d'alteracions en la senyalització mediada per GCs, i l'activació de WNT/ $\beta$ -catenina induïda per senyals paracrines epidèrmiques que van conduir a l'augment d'expressió de *Pparg*. Aquests resultats demostren un paper crucial de MR epidèrmic en la regulació del *cross-talk* entre compartiments durant l'envelliment cronològic de la pell.

#### Referències:

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;136(12):2417-2426

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;133(2):361-370



# **RESUMEN**



Nuestra investigación se centra en comprender los mecanismos moleculares que median las acciones de los glucocorticoides (GCs) en la fisiopatología de la piel mediante el análisis funcional del receptor de GCs (GR) y el receptor de mineralocorticoides (MR), dos proteínas altamente relacionadas estructural y funcionalmente, que actúan como factores de transcripción dependientes de ligando. Nuestros datos previos demuestran que GR juega un papel central en el desarrollo de la piel; en la edad adulta, tanto GR como MR actúan como mediadores anti-inflamatorios en enfermedades cutáneas (Sevilla et al. 2013; Boix et al. 2016). No obstante, desconocíamos si los receptores ejercían funciones cooperativas o antagónicas en la epidermis.

Esta tesis doctoral se ha centrado en la generación y caracterización de ratones con inactivación específica en la epidermis de GR y MR (ratones *double knock-out* o DKO). Al nacer, los DKO mostraron un fenotipo cutáneo con diferenciación epidérmica defectuosa y un estado inflamatorio único caracterizado por infiltrados inmunes epiteliales y alteraciones en la expresión génica, similar a las lesiones psoriáticas. Este fenotipo fue mucho más severo que el de los KO individuales (ratones *GR epidermal KO* o  $GR^{EKO}$  y *MR epidermal KO* o  $MR^{EKO}$ ), pero se resolvió espontáneamente a partir del día post-natal 3. En la edad adulta, la piel DKO mostró un aumento en el grosor epidérmico, similar al de los KO individuales. Todos los ratones KO mostraron una mayor susceptibilidad a la inflamación aguda respecto a los controles (CO), que no se contrarrestó de forma efectiva por un tratamiento tópico con GCs. Además, los ratones DKO mostraron una mayor susceptibilidad a la psoriasis inducida por imiquimod respecto a los KO individuales. El aumento de la respuesta inflamatoria en los DKO era consistente con un aumento significativo de la actividad de AP-1 y NF- $\kappa$ B en queratinocitos DKO respecto a los CO o KO individuales. En conjunto, nuestros datos demuestran que GR y MR epidérmicos actúan de manera cooperativa para contrarrestar la inflamación de la piel, durante el desarrollo

y la edad adulta, y que ambos son necesarios para una respuesta transcripcional óptima y una actividad terapéutica de los GCs.

Los tratamientos prolongados con dosis farmacológicas de GCs producen defectos como la atrofia cutánea, similar a la que tiene lugar durante el envejecimiento cronológico, que correlaciona con un aumento de los niveles locales endógenos de GCs. Este trabajo ha abordado las consecuencias fenotípicas de la pérdida epidérmica de MR durante el envejecimiento cronológico y los mecanismos involucrados. Los ratones MR<sup>EKO</sup> de 13 meses de edad fueron resistentes a la atrofia epidérmica pero mostraron un menor grosor dérmico y depósito de colágeno, en parte debido a una disminución de la actividad SMAD2/3 respecto a la piel de ratones CO. Además, el tejido adiposo subcutáneo (dWAT) se engrosó 2.5 veces en MR<sup>EKO</sup> vs CO a los 13 meses, con hiperplasia e hipertrofia de adipocitos. Estos cambios se desencadenaron, al menos en parte, a través de alteraciones en la señalización mediada por GCs, y la activación de WNT/ $\beta$ -catenina inducida por señales paracrinas epidérmicas que condujeron al aumento de expresión de *Pparg*. Estos resultados demuestran un papel crucial de MR epidérmico en la regulación del *cross-talk* entre compartimientos durante el envejecimiento cronológico de la piel.

#### Referencias:

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;136(12):2417-2426

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;133(2):361-370

# **ABREVIATURAS**



<b>AD</b>	<i>Atopic Dermatitis</i>	Dermatitis atópica
<b>AP-1</b>	<i>Activator protein 1</i>	Proteína activadora-1
<b>ARN</b>	<i>Ribonucleic Acid</i>	Ácido ribonucleico
<b>BrdU</b>	<i>5-Bromo-2-deoxyuridine</i>	5-Bromo-2-desoxiuridina
<b>BSA</b>	<i>Bovine Serum Albumin</i>	Seroalbúmina bovina
<b>cADN</b>	<i>Complementary Deoxyribonucleic Acid</i>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>CO</b>	<i>Control</i>	Control
<b>DBD</b>	<i>DNA-Binding Domain</i>	Dominio de unión a ADN
<b>Dex</b>	<i>Dexamethasone</i>	Dexametasona
<b>DKO</b>	<i>Double Knock-Out (GR/MR epidermal knock-out )</i>	Inactivación doble de GR y MR en epidermis
<b>dWAT</b>	<i>dermal White Adipose Tissue</i>	Tejido adiposo blanco dérmico
<b>E</b>	<i>Embryonary</i>	Embrionario
<b>ECM</b>	<i>Extracellular Matrix</i>	Matriz extracelular
<b>FIL</b>	<i>Filaggrin</i>	Filagrina
<b>FT</b>	<i>Transcription factor</i>	Factor de transcripción
<b>GCs</b>	<i>Glucocorticoids</i>	Glucocorticoides
<b>GR</b>	<i>Glucocorticoid receptor</i>	Receptor de glucocorticoides
<b>GR<sup>EKO</sup></b>	<i>GR epidermal knock-out</i>	Inactivación de GR epidérmico
<b>GRE</b>	<i>Glucocorticoid Response Element</i>	Elemento de respuesta a glucocorticoides
<b>h</b>	<i>hour</i>	hora
<b>H&amp;E</b>	<i>Hematoxylin &amp; Eosin</i>	Hematoxilina y eosina
<b>HPA</b>	<i>Hypothalamic-pituitary-adrenal axis</i>	Eje hipotálamo-pituitaria-adrenales
<b>Hsd11β1</b>	<i>11-β Hydroxysteroid dehydrogenase 1</i>	11β-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1
<b>Hsd11β2</b>	<i>11-β Hydroxysteroid dehydrogenase 2</i>	11β-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2
<b>IκBα</b>	<i>NF-Kappa-B Inhibitor α</i>	Inhibidor de kappa-B α
<b>IL</b>	<i>Interleukin</i>	Interleuquina
<b>INV</b>	<i>Involucrin</i>	Involucrina

<b>K</b>	<i>Keratin</i>	Queratina
<b>KO</b>	<i>Knock-Out mouse</i>	Inactivación génica en ratón
<b>LBD</b>	<i>Ligand Binding Domain</i>	Dominio de unión a ligando
<b>LOR</b>	<i>Loricrin</i>	Loricrina
<b>MAPKs</b>	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>	Proteína quinasa activada por mitógenos
<b>mARN</b>	<i>Messenger RNA</i>	ARN mensajero
<b>min</b>	<i>Minutes</i>	Minutos
<b>MKP-1,-2 DUSP-1,2</b>	<i>MAPK phosphatase 1,-2/Dual Specificity Phosphatase 1, -2</i>	MAPK fosfatasa 1, -2/ fosfatasa específica dual 1, -2
<b>MMPs</b>	<i>Matrix metalloproteinases</i>	Metaloproteinasas
<b>MR</b>	<i>Mineralocorticoid receptor</i>	Receptor de mineralocorticoides
<b>MR<sup>EKO</sup></b>	<i>MR epidermal knock-out</i>	Inactivación de MR epidérmico
<b>NF-κB</b>	<i>Nuclear Factor kappa B</i>	Factor nuclear kappa B
<b>NR</b>	<i>Nuclear receptor</i>	Receptor nuclear
<b>NTD</b>	<i>N-Terminal Domain</i>	Dominio N-terminal
<b>P</b>	<i>Postnatal</i>	Post-natal
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffered Saline</i>	Tampón fosfato salino
<b>PFA</b>	<i>Paraformaldehyde</i>	Paraformaldehído
<b>PMA</b>	<i>Phorbol ester 12-Myristate 13-Acetate</i>	Forbol-12-miristato-13-acetato
<b>rpm</b>	revolutions per minute	Revoluciones por minuto
<b>RT</b>	<i>Room Temperature</i>	Temperatura ambiente
<b>RT-qPCR</b>	<i>Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction</i>	Transcriptasa reversa-Reacción en cadena cuantitativa de la polimerasa
<b>SDS</b>	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>	Dodecilsulfato sódico
<b>TBS</b>	<i>Tris-buffered saline</i>	Tampón tris salino
<b>V</b>	<i>Vehicle</i>	Vehículo
<b>WB</b>	<i>Western Blot</i>	Western Blot



# **ÍNDICE GENERAL**



# INTRODUCCIÓN

<b>1. Los glucocorticoides (GCs)</b>	3
1.1 Producción adrenal de los GCs	3
1.2 Producción extra-adrenal de los GCs	4
1.3 Regulación de la biodisponibilidad de los GCs.	6
1.4 Los GCs como agentes terapéuticos	8
<b>2. Los receptores de GCs</b>	8
2.1 El receptor de glucocorticoides (GR)	9
2.2 El receptor de mineralocorticoides (MR)	10
2.3 Estructura modular de GR y MR	11
2.4 Mecanismos de regulación de la expresión génica	13
2.5 Acciones no genómicas de GR y MR	17
2.6 Formación de homodímeros y heterodímeros GR/MR	20
<b>3. La piel: estructura, función, y patologías</b>	21
3.1 El papel de los GCs en la fisiopatología de la piel	23
3.1.1 Los GCs en el desarrollo de la piel	23
3.1.2 Los GCs en el envejecimiento cutáneo cronológico	26
3.1.3 Efectos adversos del uso farmacológico de los GCs en la piel	28
3.2 Patologías inflamatorias	29
3.2.1 La psoriasis	30
3.2.1.1 Modelos murinos para el estudio de la psoriasis	33
3.2.1.2 Los tratamientos para la psoriasis	35
3.2.2 La dermatitis atópica (AD)	35

<b>4. Modelos animales para el estudio funcional de GR y MR en piel</b>	<b>37</b>
4.1. Ratones con sobreexpresión de GR o MR específica de epidermis: K5-GR y K5-MR	37
4.2 Ratones con inactivación de GR específica de epidermis (GR epidermal knock-out, GR <sup>EKO</sup> )	39
4.3 Ratones con inactivación de MR específica de epidermis (MR epidermal knock-out, MR <sup>EKO</sup> )	40
<b>OBJETIVOS</b>	<b>45</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
<b>1. Experimentación animal</b>	<b>49</b>
1.1 Generación de las colonias de ratones transgénicos	49
1.2 Identificación de los ratones transgénicos	51
1.2.1 Obtención del ADN genómico	51
1.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa	52
1.3 Tratamientos tópicos	54
1.4 Recogida de muestras	55
1.4.1 Separación de epidermis, dermis y tejido adiposo	56
1.5. Medición de los niveles de corticosterona endógenos a partir de explantes de piel.	56
<b>2. Análisis histológico y técnicas de inmunodetección</b>	<b>57</b>
2.1 Procesamiento de las muestras	57
2.2 Desparafinación e hidratación/deshidratación de las muestras	57
2.3 Tinción con Hematoxilina-Eosina (H&E)	58
2.4 Tinción con tricrómico de Masson	58
2.5 Tinción azul de toluidina	59
2.6 Análisis inmunohistoquímico	59

2.7 Inmunohistoquímica anti-BrdU	61
2.8 Inmunofluorescencia	61
2.9 Análisis morfométrico	62
<b>3. Generación y caracterización de las líneas de queratinocitos inmortalizados</b>	<b>63</b>
3.1 Generación y mantenimiento de la línea de queratinocitos DKO	63
3.2 Citometría de flujo	66
3.3 Ensayo de proliferación	66
3.4 Tratamientos de los queratinocitos en cultivo	66
3.5 Plásmidos, transfecciones y ensayos luciferasa	67
3.6 Inmunofluorescencia de células en cultivo	68
3.7 <i>Proximity ligation assay</i> (PLA)	69
<b>4. Cultivo de fibroblastos 3T3-L1, ensayo de diferenciación y tinción Oil Red O</b>	<b>71</b>
<b>5. Expresión e inmunodetección de proteínas</b>	<b>72</b>
5.1 Extracción de proteínas a partir de tejido	72
5.2 Extracción de proteínas a partir de células	72
5.3 <i>Western Blot</i> (WB)	73
5.3.1 Electroforesis SDS-PAGE y transferencia a membrana	73
5.3.2 Bloqueo, incubación con los anticuerpos y revelado	74
5.3.3 Cuantificación y normalización de la expresión	75
5.3.4 Reutilización de la membrana	76
<b>6. Análisis de expresión génica</b>	<b>76</b>
6.1 Procesamiento de las muestras y extracción de ARN	76

6.2 Síntesis de ADN complementario (cADN)	77
6.3 PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)	77
6.4 Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)	79
<b>7. Análisis estadístico</b>	<b>81</b>
<b>RESULTADOS</b>	
<b>1. Generación y caracterización de ratones con inactivación combinada de GR y MR específica de la epidermis (GR/MR epidermal knock-out o Double Knock-Out/DKO)</b>	<b>85</b>
1.1. Generación de ratones <i>GR/MR epidermal knock-out</i> o <i>Double Knock-Out/DKO</i>	85
1.2. Análisis histopatológico y molecular de los ratones DKO durante el desarrollo. Estudio comparativo de ratones DKO, GR <sup>EKO</sup> y MR <sup>EKO</sup>	85
1.3. Caracterización fenotípica de los ratones DKO en la edad adulta	90
<b>2. Estudio de susceptibilidad a inflamación cutánea de ratones adultos DKO.</b>	<b>92</b>
2.1 Respuesta de los ratones DKO a un tratamiento tópico con PMA. Estudio comparativo de ratones DKO, GR <sup>EKO</sup> y MR <sup>EKO</sup>	92
2.2 Análisis de los efectos terapéuticos de los GCs en ratones DKO tratados tópicamente con PMA	96
2.3 Susceptibilidad de los ratones DKO a un protocolo de psoriasis inducida por imiquimod (IMQ). Análisis comparativo con los KO individuales	98
<b>3. Generación y caracterización de queratinocitos inmortalizados con inactivación combinada de GR y MR (DKO).</b>	<b>103</b>
3.1. Generación de queratinocitos inmortalizados DKO	103
3.2 Análisis de las vías de señalización MAPK/MKP en las líneas de queratinocitos inmortalizados	106

3.3 Estudio de las rutas pro-inflamatorias NF- $\kappa$ B y AP-1 en las líneas celulares de queratinocitos inmortalizados	110
3.4. Generación y caracterización de las líneas de queratinocitos inmortalizados DKO con re inserción de GR, MR o ambos	112
3.4.1. Evaluación de la respuesta transcripcional a GCs en queratinocitos DKO con re inserción de GR y MR	113
<b>4. Análisis de la contribución relativa de GR y MR al envejecimiento cronológico cutáneo</b>	116
4.1 Estudio histopatológico del envejecimiento cronológico en ratones MR <sup>EKO</sup>	117
4.2 Evaluación de las posibles alteraciones en la señalización por GCs en los ratones MR <sup>EKO</sup> de 13 meses de edad	119
4.2.1 Análisis de los niveles endógenos de corticosterona en explantes de piel de ratón CO y MR <sup>EKO</sup> de 2 y 13 meses de edad	119
4.2.2 Estudio de las alteraciones en la expresión y/o función de GR/MR en los distintos compartimentos de la piel de ratones CO y MR <sup>EKO</sup> de 13 meses de edad	120
4.3 Estudio del estatus inflamatorio en piel de ratones CO y MR <sup>EKO</sup> de 13 meses de edad	123
4.4 Alteraciones en la matriz extracelular en ratones MR <sup>EKO</sup> de 13 meses	126
4.5 Análisis del dWAT en los ratones MR <sup>EKO</sup> de 13 meses	130
4.5.1 Estudio histológico y molecular de los adipocitos	130
4.5.2. Análisis del proceso de adipogénesis en los ratones MR <sup>EKO</sup> de 13 meses	134
<b>DISCUSIÓN</b>	139
<b>1. Contribución relativa de GR y MR durante el desarrollo</b>	140
<b>2. Contribución de GR y MR a la inflamación cutánea (edad adulta)</b>	141

2.1 Susceptibilidad a patologías inflamatorias cutáneas	141
2.2 Acciones conjuntas de GR y MR: posibles implicaciones en los tratamientos con GCs	144
2.3 Especificidad y selectividad de los dímeros GR/MR en la respuesta a GCs en queratinocitos	145
<b>3. El papel de los GCs en el envejecimiento cutáneo cronológico</b>	<b>146</b>
3.1 La ausencia de MR epidérmico altera la homeostasis de la piel en el envejecimiento cronológico	147
3.2 Las alteraciones en la vía de señalización por GCs en ratones MR <sup>EKO</sup> de 13 meses repercuten en el dWAT	149
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>155</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>159</b>
<b>ANEXO</b>	<b>183</b>



# **INTRODUCCIÓN**

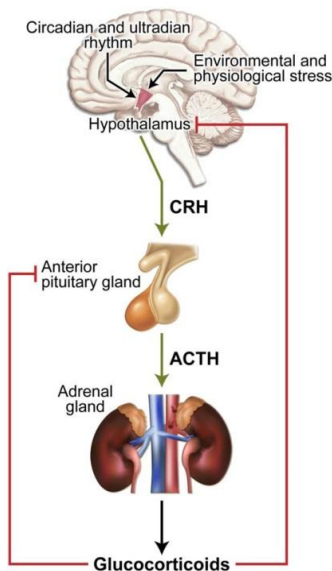


## **1. Los glucocorticoides (GCs)**

Los glucocorticoides (GCs) endógenos, cortisol en humanos y corticosterona en roedores, son hormonas esteroideas imprescindibles para la homeostasis de muchos procesos fisiológicos que incluyen el desarrollo, la homeostasis celular, la regulación de la actividad metabólica, la función inmune, el comportamiento y la respuesta a estrés, entre otros (Granner et al. 2015; Kadmiel y Cidlowski 2013).

### **1.1 Producción adrenal de los GCs**

Los GCs se sintetizan en la zona fasciculada de las glándulas adrenales, y su secreción se modula a través del eje neuroendocrino hipotálamo-pituitaria-adrenales (HPA) (Figura 1; Kadmiel y Cidlowski 2013). En respuesta a señales fisiológicas y de estrés, el hipotálamo secreta la hormona liberadora de corticotropina (CRH). Cuando CRH se une a los receptores correspondientes en la glándula pituitaria, se libera la hormona adrenocorticotropa (ACTH), que a su vez estimula la síntesis de los GCs en el córtex adrenal, y su secreción al torrente sanguíneo (Ramamoorthy and Cidlowski 2016; Taves et al. 2011).



**Figura 1. Representación esquemática de la regulación de la producción de GCs sistémicos por el eje hipotálamo-pituitaria-adrenales (HPA).** CRH: corticotropina; ACTH: adrenocorticotropa (Kadmiel y Cidlowski 2013).

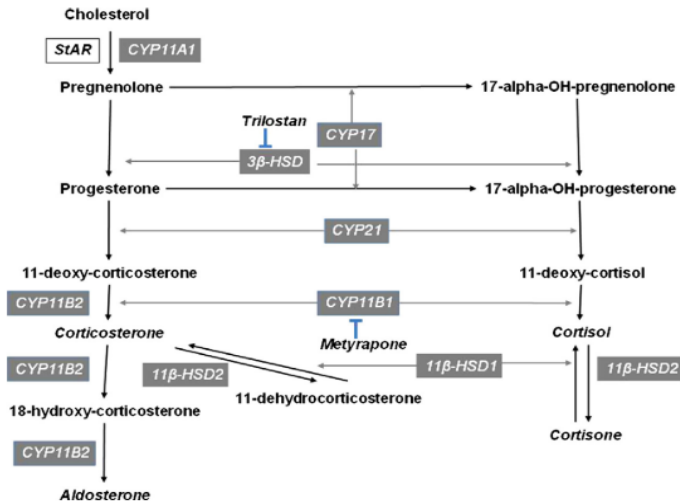
El eje HPA incluye un mecanismo de regulación mediante retroalimentación negativa, que actúa a nivel de la pituitaria anterior y el hipotálamo para inhibir la producción de ACTH y CRH, y por tanto de GCs (Kadmiel y Cidlowski 2013). Es importante mantener niveles correctos de GCs para garantizar que el hipotálamo y las glándulas pituitarias mantengan el nivel apropiado de sensibilidad a la retroalimentación negativa de los GCs. Con el envejecimiento, el hipotálamo y la adenohipófisis son menos sensibles a dicha retroalimentación, y los niveles de ACTH y GCs aumentan (Veldhuis et al. 2013).

En la zona glomerulosa del córtex adrenal se sintetizan otro tipo de hormonas esteroideas, los mineralocorticoides (MCs) (Nakamura et al. 2015). El principal MC endógeno es la aldosterona y su función más importante es el transporte de sodio y potasio a través de las paredes de los túbulos renales, controlando así el volumen de agua extracelular y por tanto, la presión arterial (Jaisser y Farman 2016; Gomez-Sanchez y Gomez-Sanchez 2014; Martinerie et al. 2012; Farman y Rafestin-Oblin 2001). Debido a que los GCs también son capaces de regular la reabsorción de sodio, en algunos tipos celulares es difícil separar los efectos de ambas hormonas ya que actúan de forma complementaria (Farman y Rafestin-Oblin 2001).

### **1.2 Producción extra-adrenal de los GCs**

En algunos tejidos como la piel, los órganos linfoides primarios, el intestino y el cerebro, se ha demostrado la producción local o extra-adrenal de los GCs mediante síntesis de *novo* (Terao y Katayama 2016; Slominski et al. 2014; Taves et al. 2011). En la piel, se ha descrito que la síntesis de GCs ocurre en queratinocitos epidérmicos y del folículo piloso, melanocitos, y en fibroblastos dérmicos (Nikolakis et al. 2016).

Las evidencias de una síntesis local de GCs se basan en la detección de las enzimas esteroidogénicas *Cytochrome P-450* (CYP)(CYP11A1, CYP17, CYP21A2, CYP11B1) y  $3\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase ( $3\beta$ -Hsd), así como en los altos niveles de GCs locales, incluso después de una adrenalectomía (Figura 2; Slominski et al. 2014).



**Figura 2.** Diagrama representativo de la ruta clásica de esteroidogénesis para la producción de corticosterona y aldosterona, indicando los enzimas que participan en dicha ruta (Talabér et al. 2013).

Así pues, mientras que la secreción suprarrenal de GCs en la sangre coordina múltiples órganos, la síntesis extra-adrenal de corticosteroides produce una alta especificidad de acción a nivel local.

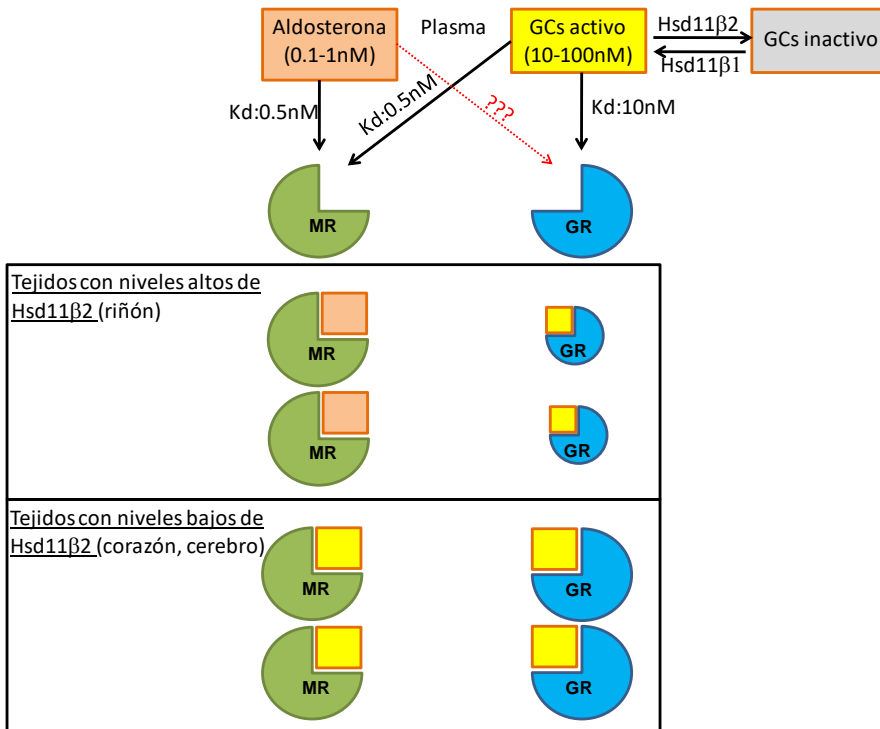
La producción local de GCs, así como su metabolismo, está adquiriendo importancia creciente para entender la fisiopatología de la piel (Slominski et al. 2014). La regulación de los niveles locales de GCs, su actividad y biodisponibilidad son centrales para el balance homeostático y la atenuación de patologías cutáneas (acné, rosácea, tumorogénesis, alopecia, y dermatitis atópica o eczema), e incluso para mejorar las terapias basadas en los GCs (Nikolakis et al. 2016).

### 1.3 Regulación de la biodisponibilidad de los GCs

Los GCs ejercen sus acciones a través de proteínas pertenecientes a la superfamilia de receptores nucleares (NRs) denominadas receptor de glucocorticoides (GR) y receptor de mineralocorticoides (MR), muy relacionadas desde el punto de vista estructural y funcional (ver apartado 2.3).

Los GCs pueden unirse tanto a GR como a MR, aunque con distinto grado de afinidad. Los GCs se unen a MR con una afinidad 10 veces mayor que aquella con la que se unen a GR; de hecho, y a pesar de la nomenclatura, MR actúa como receptor de alta afinidad de GCs, mientras que GR actúa como un receptor de baja afinidad (Gomez-Sanchez y Gomez-Sanchez 2014). Dado que los niveles circulantes de GCs son 2-3 órdenes de magnitud mayores que los de aldosterona, si no existieran mecanismos de regulación adicionales, MR estaría permanentemente ocupado por los GCs (Jaisser y Farman 2016; Martinerie et al. 2012). Por tanto, en aquellos tejidos donde GR y MR se coexpresan, es importante regular la biodisponibilidad de los GCs, para conseguir especificidad de acción hormonal. Esto se consigue mediante un mecanismo a nivel de pre-receptor formado por dos enzimas denominados 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 (Hsd11 $\beta$ 1) y tipo 2 (Hsd11 $\beta$ 2), que regulan la interconversión de GCs activos e inactivos (corticosterona a 11 dehidrocorticosterona en roedores, o cortisol a cortisona en humanos (Figura 2 y 3; Jaisser y Farman 2016).

De hecho, GR y MR, y las hormonas GCs y aldosterona forman un sistema complejo donde, teóricamente, cada uno de los receptores puede activarse por ambos ligandos de forma cruzada (Gomez-Sanchez y Gomez-Sanchez 2014).



**Figura 3. Mecanismos de regulación a nivel de pre-receptor.** Los GCs y la aldosterona se unen a los receptores GR y MR con distinta afinidad relativa (constante de disociación, Kd). MR también se activa por aldosterona en sus tejidos diana gracias a la expresión del enzima Hsd11β2 que metaboliza los GCs activos en las formas inactivas, que poseen una afinidad muy baja por MR.

La actividad de Hsd11β1 y Hsd11β2 mantiene los niveles apropiados de GCs y constituye un mecanismo clave para modular la función de GR a nivel de pre-receptor tanto en plasma como en tejidos periféricos (Chapman et al. 2013). Los dos enzimas, se localizan en la membrana del retículo endoplasmático y se expresan en diversos tejidos (piel, hígado, pulmón, tejido adiposo, ovarios y sistema nervioso central). En concreto, en piel humana y de ratón, Hsd11β1 se expresa en epidermis y dermis, con niveles más altos en los queratinocitos diferenciados (Terao y Katayama 2016; Tiganescu et al. 2011). Por otro lado, Hsd11β2 también se ha detectado en queratinocitos epidérmicos suprabasales y en glándulas sudoríparas en piel

humana, así como en queratinocitos diferenciados de piel de ratón durante el desarrollo (Boix et al. 2017; Boix et al. 2016a; Jaisser y Farman 2016).

### **1.4 Los GCs como agentes terapéuticos**

Los GCs sintéticos, son compuestos análogos a los GCs endógenos que se utilizan con éxito en la clínica desde hace 70 años debido a su potente efecto inmunosupresor, anti-inflamatorio y anti-proliferativo. La eficacia terapéutica de los GCs explica su uso en el tratamiento de numerosas enfermedades autoinmunes e inflamatorias crónicas como la esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, asma, alergia, psoriasis y dermatitis atópica, entre otras (Williams 2018; Ramamoorthy y Cidlowski 2016). Además, los GCs se utilizan rutinariamente como coadyuvantes en terapias contra el cáncer linfóide para reducir los efectos secundarios de los agentes quimioterapéuticos, y su uso como inmunosupresores está estandarizado en la clínica (Vandewalle et al. 2018; De Bosscher y Haegeman 2009). A pesar de su efectividad como agentes anti-inflamatorios (Cruz-Topete y Cidlowski 2014), los tratamientos prolongados o con altas dosis de GCs provocan multitud de efectos secundarios graves y predecibles, que incluyen problemas asociados a la supresión del eje HPA, como osteoporosis, inmunosupresión, desgaste muscular, obesidad, cataratas, diabetes, atrofia cutánea, y retraso en la cicatrización de heridas, entre otros (Schäcke et al. 2002; Schoepe et al 2006). En humanos, los pacientes con niveles elevados de cortisol en sangre (síndrome de Cushing, OMIM # 219090) presentan efectos secundarios similares a los asociados a tratamientos continuados con GCs (Lacroix et al. 2015).

## **2. Los receptores de GCs**

Tanto GR como MR pertenecen a la superfamilia de NRs, que incluye aproximadamente 50 proteínas que actúan como factores de transcripción (FT) inducibles por ligando, y desempeñan un papel regulador clave en el



desarrollo y la homeostasis de los organismos multicelulares (Novac y Heinzl 2004; Aranda y Pascual 2001).

Dentro de la superfamilia de NRs, GR y MR pertenecen a la subfamilia de esteroides, que incluye además el receptor de estrógenos (isoformas ER $\alpha$  y ER $\beta$ ), el receptor de andrógenos (AR), y el receptor de progesterona (PR) (Jiménez-Panizo et al. 2019).

## **2.1 El receptor de glucocorticoides (GR)**

El gen que codifica para GR en ratón es *Nr3c1*, y se localiza en el cromosoma 18; en humanos, el gen ortólogo *NR3C1* se encuentra en el cromosoma 5. *Nr3c1/NR3C1* contiene 9 exones y codifica para una proteína de 777 aminoácidos (Weikum et al. 2017; Kadmiel y Cidlowski 2013). El exón 1 codifica para la región 5'UTR. Existen múltiples isoformas que se originan mediante *splicing* y/o uso alternativo de promotores, a las que se atribuyen funciones específicas de tipo celular (Ramamoorthy y Cidlowski 2016). Las isoformas GR $\beta$  y GR $\alpha$  son las más estudiadas, siendo idénticas hasta el aminoácido 727; a partir de ahí, GR $\alpha$  contiene 50 aminoácidos adicionales, mientras que GR $\beta$  contiene 15 aminoácidos adicionales no homólogos (Vitellius et al. 2018; Oakley et al. 2018; Weikum et al. 2017). Los niveles relativos de GR $\beta$  son menores que los de GR $\alpha$ , y además GR $\beta$  no es capaz de unir ligando (Ramamoorthy y Cidlowski 2013). Se ha propuesto que GR $\beta$  actúa como inhibidor dominante-negativo de la función de GR $\alpha$  en algunas patologías (Kadmiel y Cidlowski 2013), y también que correlaciona con resistencia a GCs en algunos tipos celulares (Hinds et al. 2010; Barnes y Adcock 2009). En este trabajo nos referimos a GR $\alpha$ , la isoforma mayoritaria que une a ligando y media las acciones clásicas del receptor, a la que denominaremos GR.

GR se expresa de forma ubicua y desempeña funciones vitales en todos los tejidos del organismo, que incluyen regulación de la proliferación y

diferenciación celular, metabolismo, sistema inmune y respuesta a estrés (Whirlledge y DeFranco 2018). GR es esencial para la supervivencia en mamíferos; de hecho, los ratones con inactivación completa de GR en el organismo (GR *null*) mueren perinatalmente debido a problemas respiratorios por falta de surfactación alveolar (Cole et al. 1995). Además, los ratones GR *null* presentan numerosas anomalías que incluyen un aumento de tamaño de las glándulas adrenales y niveles elevados de corticosterona, debido a la falta de regulación negativa a través del eje HPA (Cole et al., 1995). La piel de ratones GR *null* mostró defectos severos en la función de barrera epidérmica, con alteraciones en la expresión de genes implicados en diferenciación, metabolismo de lípidos, y defensa epitelial, entre otros (Sevilla et al. 2010).

### 2.2 El receptor de mineralocorticoides (MR)

El gen que codifica para MR se denomina *Nr3c2* en ratón, y se localiza en el cromosoma 8; en humanos, NR3C2 se localiza en el cromosoma 4. *Nr3c2/NR3C2* contiene 10 exones; los dos primeros, 1 $\alpha$  y 1 $\beta$ , codifican para la región 5'UTR. La proteína MR consta de 984 aminoácidos (Martinerie et al. 2012; Farman et al. 2009; Viengchareun et al. 2007). Las isoformas humanas mayoritarias son hMR $\alpha$  y hMR $\beta$ , que se expresan en diversos tejidos incluyendo riñón, corazón, intestino, piel y glándulas sudoríparas (Boix et al. 2016b; Pascual-Le Tallec y Lombès 2005)

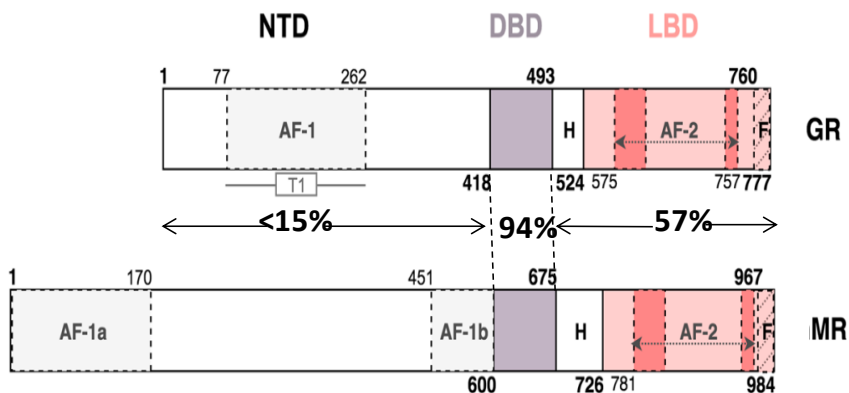
Los niveles más elevados de MR se detectan en riñón, acorde con la función crítica de esta proteína en el control de la presión sanguínea mediante la regulación de la reabsorción de sodio (Martinerie et al. 2012). La importancia de MR en mamíferos queda de manifiesto con la muerte perinatal de los ratones *MR null* por deshidratación debida a una pérdida masiva de sales (Berger et al. 1998). El análisis de la piel de embriones (E) tardíos *MR null* (E15.5-E18.5) mostró un pequeño aumento del grosor

epidérmico y alteraciones en la diferenciación de queratinocitos (Boix et al. 2016a).

### 2.3 Estructura modular de GR y MR

De manera análoga al resto de miembros de la superfamilia de receptores nucleares, GR y MR se estructuran en dominios modulares funcionales denominados dominio de transactivación N-terminal, dominio de unión a ADN (central), y dominio de unión a ligando (C-terminal) (Figura 4; Jiménez-Panizo et al. 2019).

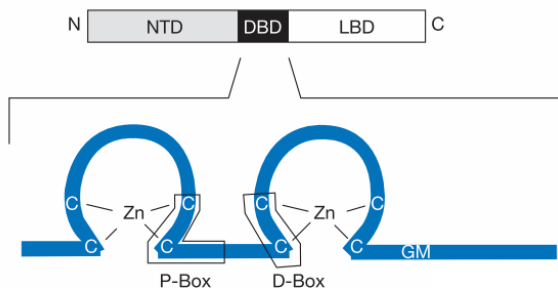
- El dominio de transactivación N-terminal (*N-Terminal Domain*, NTD) contiene una región necesaria para la activación transcripcional (*Activation Function*, AF-1), que interacciona con co-reguladores y la maquinaria basal de transcripción (Fuller et al. 2017; Weikum et al. 2017). La mayoría de las modificaciones post-traduccionales (fosforilación, ubiquitinación y sumoilación) se localizan en el dominio NTD, aportando la especificidad funcional y contextual del receptor (Weikum et al. 2017; Faresse 2014).



**Figura 4. Esquema de la organización de los dominios modulares funcionales en el receptor de glucocorticoides (GR) y de mineralocorticoides (MR).** El dominio N-terminal (NTD), contiene las regiones *Activation Function* (AF)-1, necesarias para la activación transcripcional; el dominio de unión a ADN (DBD) está separado del dominio

de unión a ligando (LBD) mediante una región bisagra o *hinge*. LBD contiene la región AF-2, necesaria para la interacción con co-reguladores de forma dependiente de ligando. Los porcentajes indican el grado de identidad aminoacídica de GR y MR. Modificado de Jiménez-Panizo et al. 2019.

- El dominio de unión a ADN (*DNA-Binding Domain*, DBD), es una zona altamente conservada formada por dos dedos de zinc (Figura 5; Veras Ribeiro Filho et al. 2019). El primer dedo de zinc forma la caja proximal, necesario para la unión a los elementos de respuesta a GCs (*GC Response Elements*, GREs), mientras que el segundo dedo de zinc forma la caja distal importante para la dimerización y translocación de los receptores al núcleo (Claessens y Gewirth 2004).
- La región denominada *Hinge* (H), flexible e hidrofílica, forma una bisagra entre el DBD y el dominio C-terminal. Esta región contiene la señal de localización nuclear 1 (Nuclear Localization Signal 1, NLS1).
- El dominio de unión a ligando (*Ligand Binding Domain*, LBD) se encuentra en el extremo C-terminal. Este dominio contiene la región de activación funcional AF-2, necesaria para la interacción del receptor con co-reguladores de forma ligando-dependiente y la señal NLS2 (Weikum et al. 2017; Gomez-Sanchez y Gomez-Sanchez 2014; Farman y Rafestin-Oblin 2001).



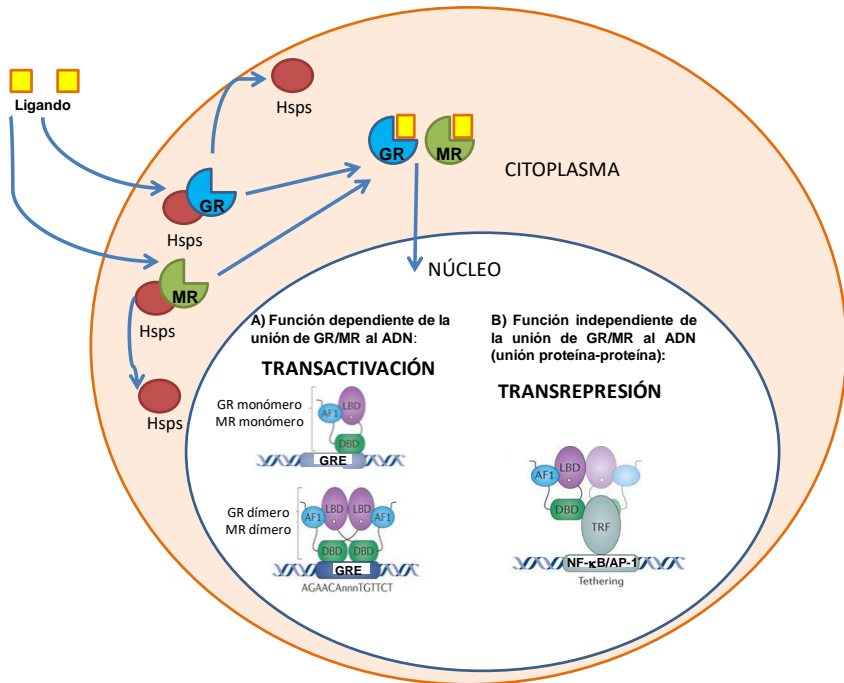
**Figura 5. Esquema de los dedos de Zinc característicos del dominio de unión al ADN (DBD) de GR y MR.** Se indica la caja proximal (P) y la caja distal (D). Modificado de Claessens y Gewirth 2004.

GR y MR presentan una alta homología estructural que conlleva también homología funcional. La homología del LBD entre ambos receptores es de un 57%, lo que implica que pueden unir los mismos ligandos, aunque con distinta afinidad (Farman y Rafestin-Oblin 2001). Sobre todo, el DBD se encuentra altamente conservado en ambos receptores, con una identidad aminoacídica del 94%, que permite la unión de GR y MR a las mismas secuencias GREs y, teóricamente, la regulación de los mismos genes (Gomez-Sanchez y Gomez-Sanchez 2014; Farman y Rafestin-Oblin 2001).

## **2.4 Mecanismos de regulación de la expresión génica**

Los receptores de la subfamilia de esteroides actúan como FT dependientes de ligando, y comparten un mecanismo general que consiste en la translocación al núcleo en respuesta a ligando para unirse con alta afinidad a determinadas secuencias en el ADN, regulando así la expresión génica.

En ausencia de ligando, GR y MR se encuentran inactivos en el citoplasma en complejos multiproteína que incluyen chaperonas (*Heat Shock Protein* (HSP) 90) e inmunofilinas (*FK506 binding protein*; FKBP1 y FKBP52) (Figura 6; Weikum et al. 2017; Sacta et al. 2016; Gomez-Sanchez y Gomez-Sanchez 2014; Vandevyver et al. 2014; Kadmiel y Cidlowski 2013). En respuesta a ligando, ambos receptores sufren modificaciones post-traduccionales que conllevan cambios conformacionales que resultan en su disociación de los complejos citoplásmicos y su translocación al núcleo, donde actúan como FT.



**Figura 6. Esquema del mecanismo de regulación de la transcripción génica mediado por GR y MR.** En ausencia de ligando, GR y MR se encuentran en el citoplasma formando complejos proteicos con *Heat Shock Proteins* (HSPs) y otras proteínas. Tras la unión a un ligando, GR y MR translocan al núcleo para regular la transcripción mediante distintos mecanismos: el mecanismo de transactivación consiste en la unión directa de monómeros o dímeros GR/MR a secuencias específicas en el ADN (*GC Response Elements*, GREs); el mecanismo de transrepresión consiste en interacciones proteína-proteína entre GR/MR y otros FT (que incluyen NF- $\kappa$ B/AP-1) mediante *tethering*, que modifican el resultado transcripcional. Modificado de Weikum et al. 2017.

Una vez en el núcleo, GR y MR regulan la transcripción mediante distintos mecanismos, denominados clásicamente de transactivación y transrepresión (Figura 6; Vandewalle et al. 2018, Ramamoorthy y Cidlowski 2016, Hübner et al. 2015). En líneas generales, los mecanismos son similares para GR y MR, aunque existen particularidades para cada uno de los receptores (Mifsud y Reul 2018).

El mecanismo de transactivación requiere la unión directa del receptor al ADN, en forma de monómeros o dímeros, a una secuencia GRE

canónica que consiste en un palíndromo imperfecto (5'-AGA ACA nnn TGT TCT-3'). Los estudios de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)-Seq para GR y MR han demostrado que las secuencias GRE se encuentran distribuidas a lo largo del genoma, y que no están necesariamente en la vecindad de las regiones proximales de sus genes diana (Van Weert et al. 2017, Sacta et al. 2016, Billan et al. 2015, Ueda et al. 2014, Reddy et al. 2009; Yick-Lun So et al. 2007). La transactivación implica a menudo la unión de los receptores a sitios denominados *composite sites*, que consisten en sitios GRE próximos a secuencias específicas para otros FT. Este es un mecanismo general que permite la inducción diferencial de genes diana de GCs de manera específica de tipo celular (De Bosscher y Haegeman 2009; Yick-Lun So et al. 2007). Tanto GR como MR pueden regular la transcripción uniéndose a un hexámero GRE (o *halfsite*) (Billan et al. 2015; Schiller et al. 2014; Uhlenhaut et al. 2013).

Además, GR puede unirse a otro tipo de secuencias denominadas secuencias invertidas negativas IRnGREs (5'-CTCC(n)0-2 GGAGA-3'), para reprimir la expresión de algunos genes, mayoritariamente anti-inflamatorios (Hua et al. 2016; Surjit et al. 2011). Este mecanismo es específico para GR.

GR y MR también pueden regular la transcripción mediante el mecanismo denominado transrepresión, que implica la interferencia con otros FT vía *tethering*, mediante interacciones proteína-proteína. Este mecanismo no requiere la dimerización del receptor ni su unión a ADN (Figura 6).

El mecanismo de transrepresión de GR ha sido ampliamente caracterizado, sobre todo por su implicación en el uso terapéutico de los GCs. De hecho la interacción de GR con los FT pro-inflamatorios *Nuclear Factor-kappa B* (NF- $\kappa$ B) y *Activator Protein 1* (AP-1), cuya función es mayoritariamente anti-inflamatoria, es responsable de muchas de las

acciones anti-inflamatorias de este receptor (Hübner et al. 2015; Ratman et al. 2013). Durante mucho tiempo se ha considerado que los mecanismos de transactivación y transrepresión podían asignarse a dominios específicos de GR, y por tanto se consideraba posible activar selectivamente las acciones anti-inflamatorias del receptor. Estas evidencias se basan casi en su totalidad en estudios con el mutante de GR A458T, teóricamente incapaz de dimerizar, y por tanto incapaz de unirse a secuencias GRE (Reichardt et al. 1998). Estos estudios condujeron a establecer un dogma que planteaba que la dimerización de GR era imprescindible para su unión a secuencias GRE. Utilizando un modelo de ratón *knock-in* que contenía la mutación A458T, se demostró que los GCs podían ejercer sus efectos anti-inflamatorios exclusivamente mediante el mecanismo de transrepresión. Según este modelo, el mecanismo de transactivación (inhabilitado en los ratones A458T) no participaba en las acciones anti-inflamatorias de los GCs. Sin embargo, este dogma se ha rebatido recientemente al demostrar que el mutante A458T es capaz de formar dímeros, aunque con eficiencia reducida, en ciertos sitios GREs (Presman et al. 2014; De Bosscher y Haegeman 2009). Actualmente está ampliamente demostrado que el mecanismo de transactivación, vía GREs, también juega un papel anti-inflamatorio relevante, induciendo la expresión de genes que actúan como importantes mediadores anti-inflamatorios como *GC-induced leucine zipper* (*Gilz*), *MAPK phosphatase 1* (*Mkp-1*), o *NF-Kappa-B Inhibitor a* (*IkBa*) (Uhlenhaut et al. 2013; Clark 2007; Newton y Holden 2007).

En cuanto a MR, la mayoría de los estudios relativos a su mecanismo de acción se han centrado en la respuesta a aldosterona. MR se une principalmente como dímero a los elementos GRE (idénticos para GR y MR) presentes en los genes diana de este FT (Cole et al. 2015; Kuhn y Lombès 2013). Se demostró que la capacidad de interacción de MR con el ADN disminuía en ratones con una mutación en el primer dedo de zinc del DBD de MR (MRC603S) (Cole et al. 2015; Fuller et al. 2019; Pearce 2001). La



información disponible acerca de la regulación genómica vía MR es muy limitada en comparación con GR. El análisis de unión de MR al ADN en células renales humanas tratadas con aldosterona mediante ChIP-Seq demostró que menos del 10% de los GRE/MRE (*Mineralocorticoid Response Element*) contenían secuencias canónicas y que la mayoría de los GRE/MRE identificados eran *half sites* (Billan et al. 2015). En este estudio se identificó la unión de MR a regiones genómicas enriquecidas en secuencias de unión para los FT *Forkhead box* (FOX) y AP-1, sugiriendo que MR puede interactuar con estas regiones genómicas indirectamente a través de interacciones proteína-proteína o *tethering* (Figura 6; Billan et al. 2015). También se ha descrito que en respuesta a aldosterona, MR también puede unirse directamente a una región del promotor del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) que no contiene un GRE canónico (Van Weert et al. 2017; Grossmann et al. 2007).

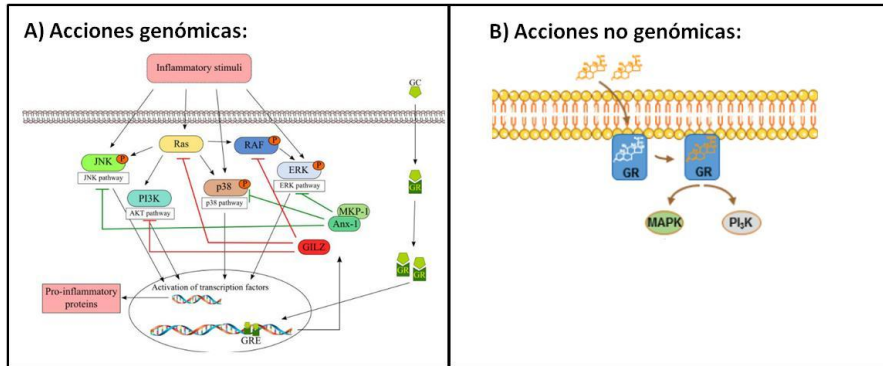
Aunque MR también interactúa físicamente con los FT NF- $\kappa$ B y AP-1 vía proteína-proteína, dicha interacción no da lugar siempre a acciones anti-inflamatorias sino que depende del contexto celular. En muchos tejidos donde la acción de aldosterona/MR es importante (riñón, corazón, y sistema vascular), esta interacción resulta en efectos pro-inflamatorios. De hecho, los antagonistas farmacológicos de MR se usan ampliamente en la clínica para combatir patologías renales y cardiovasculares (Jaisser y Farman 2016).

## **2.5 Acciones no genómicas de los GCs**

En el apartado anterior hemos descrito el mecanismo clásico, o acciones genómicas, de los receptores esteroides, actuando como FT; este proceso ocurre en cuestión de horas o días (Grbesa y Hakim 2017). Sin embargo, las hormonas esteroides, incluyendo los GCs, también ejercen otras acciones rápidas que ocurren en segundos o minutos, que no requieren la síntesis de proteína (Ramamoorthy y Cidlowski 2016).

Dichas acciones rápidas no genómicas de los GCs ocurren independientemente de la transcripción génica e incluyen la interacción de una fracción minoritaria de GR localizado en la membrana (Stojadinovic et al. 2013; Ayroldi et al. 2012) con la subunidad reguladora del complejo PI3K (p85a), que modula la actividad de la quinasa AKT, crítica para la proliferación y supervivencia celular (Figura 7; Desmet y De Bosscher 2017; Ramamoorthy y Cidlowski 2016). Dicha interacción se ha descrito tanto en líneas de queratinocitos como en piel de ratón, habiéndose demostrado que la interferencia negativa GR/PI3K/AKT contribuye a las acciones antitumorales de los GCs en este tejido (Leis et al. 2004). Por tanto, la rápida señalización no genómica agrega mayor complejidad y diversidad a las acciones biológicas de los GCs.

Se ha descrito que muchos de los efectos antiinflamatorios de los GCs implican su interferencia directa o indirecta con la vía de señalización de *Mitogen-Activated Protein Kinases* (MAPKs) (Ramamoorthy y Cidlowski 2016; Ayroldi et al. 2012). En mamíferos, hay tres familias de MAPKs bien caracterizadas: *Extracellular Signal-Regulated Kinase* (ERK), *c-Jun N-terminal kinases* (JNK) y p38 MAPK (Samarasinghe et al. 2012; Clark y Lasa 2003). Las interacciones entre GCs y la vía de las MAPK involucran mecanismos genómicos y no genómicos, y ocurren en muchos puntos de las cascadas de señalización (Figura 7). Las acciones genómicas implican la inducción transcripcional vía GR de genes que regulan negativamente la vía de señalización de las MAPKs como son: *Gilz*, *Mkp-1* y *Annexin-1 (Anx-1)* (Ayroldi et al. 2012). Los efectos no genómicos incluyen la interacción de GR de membrana con miembros de la familia MAPK y modifica su actividad sin necesidad de regulación transcripcional (Nicolaidis y Charmandari 2017; Ayroldi et al. 2012; Groeneweg et al. 2011).



**Figura 7. Vías de señalización genómicas y no genómicas de los GCs para la regulación de quinasas MAPKs y AKT. A Acciones genómicas:** los estímulos inflamatorios inducen la activación de las MAPK, y de las cascadas de señalización que conducen a la producción de mediadores pro-inflamatorios. Los GCs, mediante un mecanismo genómico directo, inducen la expresión de GILZ, MKP-1 y Anx-1, que, a su vez, inhiben la activación de MAPK y AKT, evitando la producción de mediadores inflamatorios. **B Acciones no genómicas:** las acciones no genómicas de los GCs implican la interferencia de GR de membrana con proteínas de las vías de señalización MAPK y PI<sub>3</sub>K /AKT. Modificado de Nicolaides y Charmandari 2017; Ayroldi et al. 2012.

Existen evidencias que demuestran que algunas de las acciones no genómicas de la aldosterona están mediadas por la activación de MR fuera del núcleo (Ruhs et al. 2017; Meinel et al. 2014). La localización de MR en de la membrana plasmática se ha descrito en numeroso estudios (Ashton et al. 2015; Coutinho et al. 2014; Callera et al. 2011; Grossmann et al. 2010). En membrana, MR parece estar asociado a caveolina y estriatina (Ashton et al. 2015; Coutinho et al. 2014), dando lugar a efectos no genómicos mediante la interacción con receptores tirosina-quinasa como EGFR, y receptores acoplados a proteínas G (Ruhs et al. 2017; Grossmann et al. 2010).

## 2.6 Formación de homodímeros y heterodímeros GR/MR

La alta homología entre GR y MR indica que estas proteínas pueden formar distintas combinaciones diméricas, es decir, homodímeros (GR-GR o MR-MR), y heterodímeros GR-MR (Gomez-Sanchez y Gomez-Sanchez 2014; Kadmiel y Cidlowski 2013). Mientras que se ha demostrado la existencia de homodímeros, sin embargo, la presencia de heterodímeros tan solo se ha descrito en estudios puntuales *in vitro* (Annelies et al. 2013; Datson et al. 2011; Nishi et al. 2004; Savory et al. 2001; Liu et al. 1995; Trapp et al. 1994) y recientemente *in vivo* (Figura 6; Pooley et al. 2020; Mifsud y Reul 2016).

Durante mucho tiempo se ha asumido que dado que GR y MR son capaces de unirse a las mismas secuencias GRE, y comparten muchas proteínas co-reguladoras, la actividad transcripcional de los distintos dímeros sería equivalente. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que, tanto los homodímeros como los heterodímeros reconocen distintas secuencias reguladoras de forma selectiva, lo que da lugar a distinto impacto transcripcional dependiendo de los dímeros implicados (Mifsud y Reul 2018; Mifsud y Reul 2016). Utilizando el hipocampo de ratas sometidas a estrés, se demostró que GR y MR pueden interactuar como homo- o hetero-dímeros para regular la expresión de *Fkbp51*; sin embargo, la regulación de otros genes como por ejemplo, *Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1*, *Sgk1* dependía de la formación de homodímeros, indicando que existen mecanismos de regulación diferencial y específicos para cada gen (Mifsud y Reul 2018; Mifsud y Reul 2016). Otro estudio reciente en células de neuroblastoma propone que la interacción MR-GR puede ocurrir por un mecanismo que no implica heterodimerización sino interacción de MR vía *tethering* con GR (Rivers et al. 2019). Dicha interacción, que no necesita la unión de MR al ADN, es capaz de aumentar

la magnitud y la sensibilidad de las respuestas transcripcionales mediadas por GR en el caso de los genes *Dopa decarboxylase (Ddc)* y *Synaptotagmin II (Syt2)*.

Por tanto, en tejidos donde se co-expresan ambos receptores, es importante saber la composición de los distintos dímeros GR/MR y la cinética de activación para entender las acciones conjuntas de de estos FT en respuesta a ligando (Oakley y Cidowski 2015; Gomez-Sanchez y Gomez-Sanchez 2014; Farman y Rafestin-Oblin 2001).

### **3. La piel: estructura, función, y patologías**

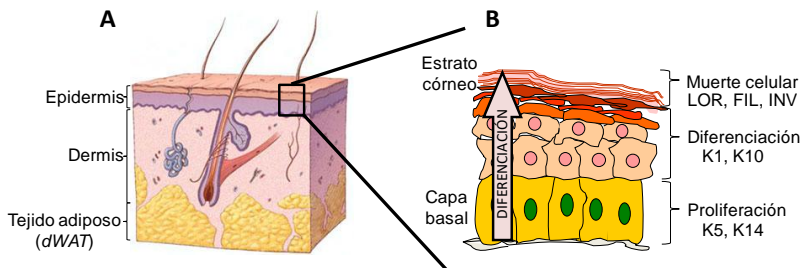
La piel, es el órgano vital más externo y extenso del cuerpo, que actúa como barrera entre el individuo y su entorno, proporcionando percepción sensorial, termorregulación y protección contra la deshidratación, infección y estrés mecánico (Dąbrowska et al. 2018).

La piel está dividida en tres compartimentos, la epidermis, la dermis y el tejido adiposo subcutáneo o *dermal White Adipose Tissue* (dWAT), que contienen principalmente queratinocitos, fibroblastos, y adipocitos, respectivamente (Figura 9). También existen otros tipos celulares cuya función es importante para este órgano, y que incluyen células del sistema nervioso periférico, células endoteliales de los vasos sanguíneos, células del sistema inmune innato y adaptativo, y melanocitos (Schneider 2012; Watt 2014).

Nuestro trabajo se centra en el estudio de la epidermis, que es un epitelio pluriestratificado, diferenciado, y queratinizado (Segre 2006). La epidermis es la capa más superficial y proporciona la barrera física y permeable a la piel, esencial tanto para la supervivencia como para la adaptación al entorno. La epidermis es la capa más superficial de la piel y biológicamente activa, ya que se regenera continuamente mediante la diferenciación terminal de los queratinocitos, que se desprenden y son

sustituídos por queratinocitos basales. El proceso de formación de la epidermis, que ocurre durante la etapa embrionaria, o en respuesta a daño (herida), está altamente organizado, tanto en el espacio como en el tiempo (Proksch et al. 2006).

Los queratinocitos proliferan en la capa basal de la epidermis, migran hacia capas suprabasales a medida que se diferencian, y en las capas más externas pierden su núcleo en un proceso de muerte celular programada para formar el estrato córneo, constituido por células muertas que se descaman continuamente y que depositan queratinas y lípidos que confieren la función de barrera a este tejido (Figura 8). La epidermis también incluye otras estructuras que tienen origen epitelial, como son los folículos pilosos, las glándulas sebáceas, y las glándulas sudoríparas (Wong et al. 2016).



**Figura 8. Esquema de la piel y de la compartimentalización de la epidermis.** **A** La piel está formada por 3 compartimentos: epidermis, dermis y tejido adiposo subcutáneo o dermal White Adipose Tissue (dWAT). **B** En la epidermis, los queratinocitos proliferan en la capa basal de la epidermis (queratina (K)5 y K14), después migran hacia las capas suprabasales y se diferencian de forma progresiva (K1, K10, loricrina (LOR), filagrina (FIL), e involucrina (INV)) hasta llegar al estrato córneo donde pierden su núcleo y producen queratinas y lípidos que confieren a la piel la función de barrera.

La proliferación celular, diferenciación y muerte celular son procesos que ocurren de forma coordinada, y se caracterizan por la expresión de proteínas específicas (Figura 8); la expresión ectópica de estos marcadores indica procesos patológicos (Proksch et al. 2006). En concreto, las queratinas (K)5 y K14 son las proteínas mayoritarias en los queratinocitos

basales proliferativos (Watt 2014; Fuchs y Horsley 2008); K1 y K10 son las primeras proteínas expresadas durante la cornificación (Candi et al. 2005), y en el estrato córneo predominan proteínas estructurales como loricrina (LOR), filagrina (FIL) e involucrina (INV), entre otras (Pastar et al. 2014; Pérez 2011). En la epidermis existe un gradiente de calcio que determina la diferenciación terminal de los queratinocitos; muchas de las proteínas que median este proceso son proteasas y anti-proteasas dependientes de calcio (Elsholz et al. 2014; Cornelissen et al. 2007). Además, la epidermis se rejuvenece constantemente, en un proceso de homeostasis, donde la tasa de proliferación de queratinocitos en la capa basal se equilibra con la descamación de queratinocitos terminales en el estrato córneo (Candi et al. 2005).

### **3.1 El papel de los GCs en la fisiopatología de la piel**

#### **3.1.1 Los GCs en el desarrollo de la piel**

La piel requiere GCs para su desarrollo normal. Se ha demostrado que la administración de GCs a roedores gestantes acelera la formación del estrato córneo en los embriones en desarrollo, con aumento de la deposición de lípidos (Hanley et al. 1998; Aszterbaum et al. 1993). Nuestro grupo y otros han demostrado que la expresión de GR en la piel es crucial para la competencia de la barrera epidérmica y homeostasis de este tejido (Sevilla y Pérez 2018a). Sin embargo, aunque la expresión de MR se describió inicialmente en la epidermis, los folículos pilosos, las glándulas sebáceas, y las glándulas sudoríparas (Jaisser y Farman 2016), su función en la piel se desconocía en gran medida hasta hace poco. La generación de ratones con pérdida completa de función de GR o MR ha contribuido a entender las funciones relativas de GR y MR en la fisiopatología de la piel.

Los ratones con inactivación generalizada de GR (GR<sup>-/-</sup>), generados por el grupo del Prof. Schütz, morían perinatalmente por un fallo respiratorio

causado por una falta de desarrollo terminal de los bronquios y los alveolos pulmonares; además, presentaban alteraciones en el eje HPA, con niveles altos de ACTH y corticosterona (Cole et al. 1995). La caracterización de las alteraciones cutáneas de ratones GR<sup>-/-</sup> a edad embrionaria (E)16.5 y E18.5 demostró una piel frágil e inmadura, con expresión anormal de K5 en las capas suprabasales, estratificación epidérmica incompleta, y una mayor tasa de apoptosis de queratinocitos (Pérez 2011; Bayo et al. 2008). La piel de embriones GR<sup>-/-</sup> presentaba una diferenciación epidérmica defectuosa con niveles casi indetectables de FIL, LOR e INV, resultando en una falta de estrato córneo, y por tanto en una función de barrera comprometida (Sevilla y Pérez 2018a; Pérez 2011). El cultivo de queratinocitos primarios de ratón GR<sup>-/-</sup> mostró un aumento de su tasa de proliferación, acorde con el papel anti-proliferativo de GR en queratinocitos (Bayo et al. 2008).

El estudio transcriptómico comparativo de la piel de embriones GR<sup>-/-</sup> (E18.5) identificó 442 genes expresados de manera diferencial, con una sobrerrepresentación de genes del complejo de diferenciación epidérmica respecto a los controles (Sevilla et al. 2010). La piel de ratones GR<sup>-/-</sup> mostró una reducción en la expresión de genes de diferenciación tardía (*Small proline-rich protein (Sprr)* y *corneodesmosin (Cdsn)*), y aumento de genes de diferenciación temprana (*E74-like factor 5 (Elf5)* y *Krt77*), consistente con el fenotipo de diferenciación epidérmica defectuosa.

Por otro lado, los ratones MR<sup>-/-</sup>, también generados por el grupo del Prof. Schütz, morían a día post-natal (P)7-10 debido a fallos renales, hipertensión y deshidratación (Boix et al. 2016a, Berger et al. 1998). La letalidad perinatal de los ratones MR<sup>-/-</sup> podía rescatarse mediante la administración de NaCl y, además, el tratamiento perinatal con GCs sintéticos prolongaba su supervivencia, indicando que, en ciertas circunstancias, GR puede sustituir parcialmente a MR (Berger et al. 2000; Bleich et al. 1999).



La caracterización de ratones  $MR^{-/-}$  a E17.5 mostró que la pérdida funcional total de MR se traduce en alteraciones cutáneas leves, con hiperplasia y expresión anormal de K5, K10 y LOR; defectos menores que se resolvían a P0-P4 (Boix et al. 2016a). Además, la expresión de MR alcanzaba un pico transitorio a E16.5, disminuyendo posteriormente hasta niveles muy bajos en edad post-natal (Boix et al. 2016a). La expresión de GR era constante durante el desarrollo, lo que sustentaba el papel transitorio de los complejos GC-MR en la maduración epidérmica.

Hasta la fecha no se ha realizado ningún estudio transcriptómico de la piel de los animales  $MR^{-/-}$ . Sin embargo, el análisis de la expresión del gen de la subunidad- $\alpha$  del canal de sodio epitelial sensible a la amilorida, *ENaCa/Scnn1 $\alpha$* , necesario para la correcta homeostasis epidérmica (Boix et al. 2016a) no mostró cambios en su expresión (de forma similar a lo descrito en riñón y colon de ratones  $MR^{-/-}$  recién nacidos; Berger et al. 1998). Aunque la expresión de *Nr3c1* tampoco se vio alterada por la ausencia de MR, el fenotipo cutáneo leve de los ratones  $MR^{-/-}$ , a diferencia del fenotipo severo de los ratones  $GR^{-/-}$ , sugiere que en ausencia de MR, GR podría ejercer compensación funcional en este tejido (Boix et al. 2016a; Pérez 2011).

La comparativa de los ratones  $GR^{-/-}$  y  $MR^{-/-}$  muestra que, ambos receptores desempeñan un papel en el desarrollo cutáneo, aunque GR juega un papel central, mientras que MR tiene una menor contribución en este proceso. Debido a que el fenotipo cutáneo de los ratones  $GR^{-/-}$  y  $MR^{-/-}$  puede reflejar alteraciones sistémicas, es necesario abordar la función específica de GR o MR en piel utilizando modelos knock-out específicos de tejido. Para ello se generaron dos modelos con inactivación de GR específico de epidermis (*GR epidermal knock-out*,  $GR^{EKO}$ ) o de MR (*MR epidermal knock-out*,  $MR^{EKO}$ ) que han permitido analizar la función de cada uno de los receptores en el compartimento epitelial durante el desarrollo y edad adulta (ver apartado 4.2 y 4.3).

### **3.1.2 Los GCs en el envejecimiento cutáneo cronológico**

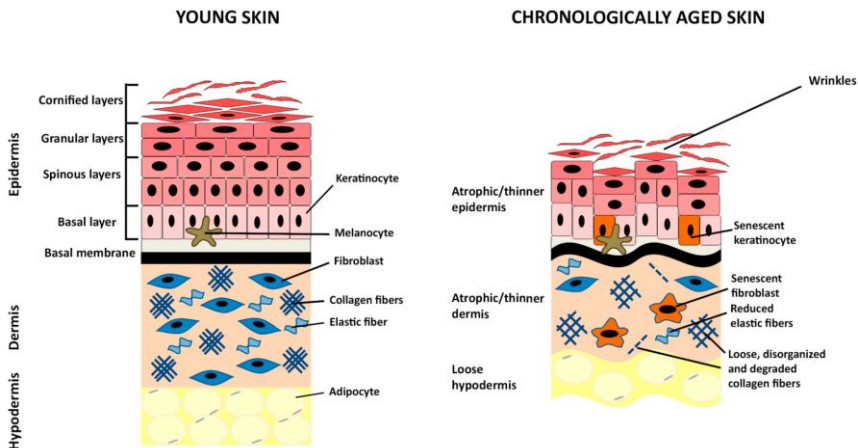
El envejecimiento fisiológico está descrito como un proceso biológico tiempo-dependiente que conlleva cambios en la estructura y función de todos los tejidos que conforman el organismo (Campisi 2013). En la piel, el envejecimiento se ve reflejado por una atrofia cutánea (Figura 9) que afecta a todos los compartimentos.

La epidermis “adelgaza” durante el envejecimiento cronológico, debido a una disminución de la proliferación de los queratinocitos basales (Orioli y Dellambra 2018; Rittié y Fisher 2015). Además, la unión epidermis-dermis se aplana dando lugar a unas papilas dérmicas más cortas (Rittié y Fisher 2015). Otras estructuras epidérmicas, como los folículos pilosos y las glándulas sebáceas, sufren una hinchazón que afecta a su arquitectura normal (Giangreco et al. 2008). Todo ello afecta a la función de barrera epidérmica.

La dermis de individuos de avanzada edad sufre una atrofia marcada por una reducción de su grosor debido un menor número de fibroblastos. Además, hay una pérdida de elasticidad del tejido conectivo dérmico, que correlaciona con una reducción y desorganización de los componentes principales de matriz extracelular (ECM) como el colágeno y otras fibras elásticas, proteoglicanos y glicosaminoglicanos (Naylor et al. 2011; Giangreco et al. 2008; Mine et al. 2008).

El dWAT no solo participa en procesos metabólicos, sino que recientemente, se ha descrito que participa en la regulación del ciclo del pelo, y contribuye a la defensa antimicrobiana, curación de heridas y termogénesis (Chen et al. 2019b). La reducción del tejido adiposo dérmico o dWAT sugiere que las células precursoras de los adipocitos pueden perder

actividad con la edad (Rivera-Gonzalez et al. 2014; Wang et al. 2013; Cartwright et al. 2010; Schipper et al. 2008).



**Figura 9. Esquema del proceso de envejecimiento cutáneo cronológico.** En edades avanzadas, todos los compartimentos de la piel reducen su grosor: la epidermis (con menor contenido en queratinocitos), la dermis (menor cantidad de fibroblastos y de contenido de la ECM), y el dWAT se reducen. Modificado de Orioli y Dellambra 2018.

El envejecimiento intrínseco o cronológico conlleva consecuencias funcionales como pérdida de elasticidad y homeostasis cutánea que incrementan la fragilidad de la piel haciéndola más susceptible a inflamación y a un retraso en el cierre de herida (Mine et al. 2008). Las principales causas del envejecimiento cutáneo son estrés oxidativo, inflamación crónica de bajo grado, y cambios metabólicos que incluyen la desregulación hormonal (Rivera-Gonzalez et al. 2014).

Como hemos comentado en el apartado 1.2, la piel es capaz de controlar la biodisponibilidad de los GCs. De hecho, el aumento de GCs locales durante el envejecimiento en piel humana o de ratón correlaciona con el aumento del enzima Hsd11 $\beta$ 1 (Tiganescu et al. 2018; Tiganescu et al. 2011). En estudios recientes se ha descrito que la inhibición farmacológica de Hsd11 $\beta$ 1 en ratones mejora los signos de envejecimiento

cutáneo y, consistentemente, el ratón Hsd11 $\beta$ 1 KO está parcialmente protegido frente a este proceso (Terao et al. 2014; Tiganeşcu et al. 2013).

### **3.1.3 Efectos adversos del uso farmacológico de los GCs en la piel**

Los GCs sintéticos se usan rutinariamente para el tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel, como la dermatitis atópica o la psoriasis. Sin embargo, los beneficios terapéuticos de los GCs están limitados por los efectos secundarios adversos en tratamientos con altas dosis o aplicación continuada (Kadmiel y Cidłowski 2013; Schoepe et al. 2006; Schäcke et al. 2002). La atrofia de la piel, el retraso en la cicatrización de herida, y la mayor susceptibilidad a infecciones, son los principales efectos adversos asociados al exceso de GCs en la piel (Ramamoorthy y Cidłowski 2016). Estos efectos adversos también suceden en los pacientes con síndrome de Cushing, y asimismo, son muy similares a las alteraciones que ocurren durante el envejecimiento cutáneo cronológico (Ferraù y Korbonits 2015).

La atrofia cutánea provocada por el exceso de GCs conduce a un adelgazamiento dérmico y epidérmico en humanos (Stratakis 2016; Korting et al. 2002) y roedores (Boix et al. 2016b; Faergemann et al. 2002). El contenido de colágeno dérmico en piel humana disminuye después del tratamiento tópico y sistémico con GCs (Henge et al. 2006), y da lugar a un aumento en la transparencia de la piel que adquiere una consistencia similar al papel de seda, aumento de la fragilidad, desgarros y hematomas, aumento de la pérdida de agua transepidérmica, cicatrización deficiente de la herida y un mayor riesgo de infección (Schoepe et al. 2006). En roedores los GCs sistémicos y tópicos provocan atrofia cutánea (Oishi et al. 2002).

Se sabe que los desequilibrios en los niveles de GCs endógenos (sistémicos o locales), alteran la cicatrización de la herida cutánea (Pastar

et al. 2014; Youm et al. 2013; Stojadinovic et al. 2007; Werner y Grose 2003), y en casos más graves, como en los pacientes diabéticos, causan heridas crónicas y úlceras que no curan. Este retraso se debe a las acciones anti-proliferativas y anti-inflamatorias excesivas de los GCs, que reducen la expresión de factores de crecimiento y citoquinas necesarias para la proliferación y migración de los queratinocitos (re-epitelización), necesarias para la reparación de la barrera cutánea (Pastar et al. 2014; Werner y Grose 2003). Nuestro grupo demostró que los ratones transgénicos con sobreexpresión de GR en queratinocitos presentaban un retraso en la cicatrización cutánea similar al inducido por el tratamiento con GCs inyectados, indicando que el exceso de GR específico de epidermis es suficiente para interferir con este proceso (Sanchis et al. 2012).

### **3.2 Patologías inflamatorias**

La psoriasis y la dermatitis atópica (AD) son las dos enfermedades inflamatorias crónicas más comunes de la piel, y afectan entre un 0.1-3% y 2-20% de la población mundial, respectivamente (Furue y Kadono 2017). Ambas enfermedades se caracterizan por la afectación de la función de barrera epidérmica, causando la activación de distintas vías pro-inflamatorias (NF- $\kappa$ B, AP-1, *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* (STAT3), entre otras), y la producción de citoquinas pro-inflamatorias como *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ), e *Interleukin* (IL)-1, que contribuyen a la hiperplasia epidérmica, inflamación sistémica y respuesta autoinmune (Segre 2006). Cabe destacar que las metaloproteinasas (MMPs), enzimas proteolíticas que degradan todos los componentes de ECM, juegan un papel importante en la regulación de las citoquinas y sus receptores específicos (Manicone y McGuire 2008).

### 3.2.1 La psoriasis

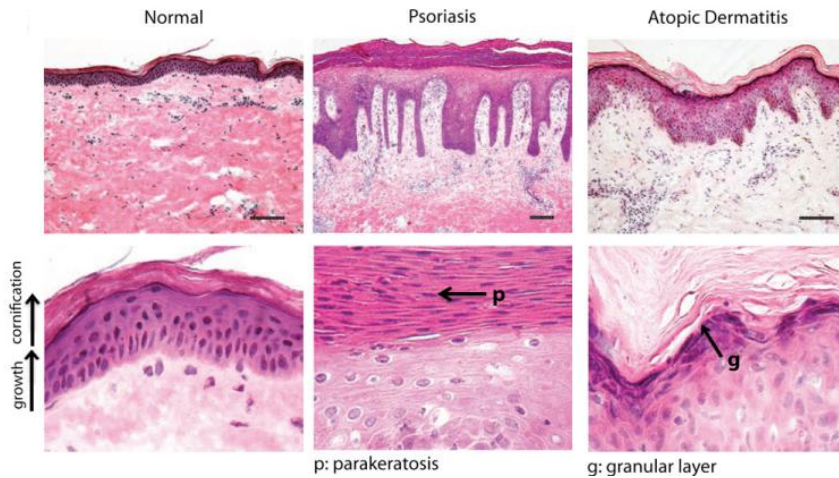
La psoriasis es una enfermedad recurrente que se caracteriza por la aparición de lesiones a cualquier edad, aunque en el 75% de los casos los pacientes tienen más de 40 años. Si bien existen un amplio rango de variantes clínicas, la psoriasis más común es la psoriasis *vulgaris* que se caracteriza por la formación de placas escamosas y eritematosas, de tamaño variable, frecuentemente ubicadas en el cuero cabelludo, la zona inferior de la espalda, la región umbilical, la hendidura intergluteal, las rodillas y los codos (Figura 10; Uva et al. 2012). Muchos de los pacientes padecen además co-morbilidades asociadas a la psoriasis que incluyen, síndrome metabólico, hipertensión, obesidad, depresión, enfermedad inflamatoria intestinal y artritis, empeorando así su calidad de vida (Furue y Kadono 2017; Johnson-huang et al. 2012).



**Figura 10. Fotografías de pacientes con psoriasis o dermatitis atópica (AD).** Se muestran las manifestaciones clínicas más comunes de ambas enfermedades inflamatorias crónicas, eritema y descamación. Modificado de Furue y Kadono 2017.

El análisis histopatológico de las lesiones psoriáticas (Figura 11) muestra hiperplasia epidérmica, engrosamiento del estrato córneo o hiperqueratosis, ausencia de la capa granular epidérmica, elongamiento de las crestas interpapilares, alteraciones en la diferenciación epidérmica y

paraqueratosis; y por último infiltraciones de neutrófilos en la epidermis y la formación de microabscesos de Munro (Guttman-Yassky et al. 2011; Wagner et al. 2010).



**Figura 11. Tinción hematoxilina/eosina de piel humana de sujetos sanos y de pacientes con psoriasis o dermatitis atópica (AD).** La epidermis de pacientes con psoriasis y AD presenta hiperplasia e hiperqueratosis. Los pacientes con AD presentan ortoqueratosis y un estrato granular visible. En cambio, los pacientes con psoriasis presentan paraqueratosis y carecen de estrato granular. Modificado de Guttman-Yassky et al. 2011.

Numerosos estudios demuestran que la etiología de la psoriasis reside tanto en alteraciones en el componente inmune, como en el componente epitelial (queratinocitos) (Albanesi et al. 2018).

Se ha demostrado que la población de células T desempeña un papel principal en la psoriasis, ya que su reducción se asoció con una mejora de los síntomas de la enfermedad (Kim y Krueger 2017). Las células T más relevantes en psoriasis incluyen varios tipos de células *T helper*, que se denominan según las citoquinas que producen: Th1, Th17, Th22, y *regulatory T cells* (Tregs).

Las células Th17 son activadas por IL1 $\beta$ , IL6, *Transforming Growth Factor Beta 1* (TGF- $\beta$ ), e IL23, para dar lugar a la activación del eje IL23/Th17. Este eje está involucrado en la patogénesis de un elevado número de enfermedades inflamatorias que incluye artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal y psoriasis (Cervantes-Durán et al. 2020; Han et al. 2012). Como resultado de la activación del eje IL23/Th17 se producen IL22 e IL17, potentes inductores de activación y reclutamiento de neutrófilos, en respuesta a patógenos bacterianos y fúngicos (Johnson-Huang et al. 2012; Wolk et al. 2006). Asimismo, se ha detectado un aumento en la expresión de genes asociados con la inmunidad adaptativa e innata, como las  $\beta$ -defensinas; la activación de la vía de señalización de TNF- $\alpha$ , STAT3, C-JUN /JUNB y lipocalina (Lnc2) también es característica de las lesiones psoriáticas (Abdel Hay et al. 2019; Johnson-Huang et al. 2012; Wagner et al. 2010).

Las alteraciones de las células Tregs también forman parte del componente inmune de la enfermedad (Soler y McCormick 2011). En condiciones fisiológicas, las Tregs suprimen la inflamación, pero en pacientes con psoriasis, pueden diferenciarse hacia Tregs que expresan IL17, lo que potencialmente perpetúa el proceso inflamatorio que caracteriza la enfermedad (Bettini y Vignali 2009; Sugiyama et al. 2005).

En pacientes con lesiones psoriáticas, las alteraciones epiteliales incluyen la sobreexpresión de proteínas del complejo de diferenciación epidérmico *S100 calcium binding protein* (S100) A8/9, y SPRRs. La sobreexpresión de estas moléculas también se ha descrito en diversos modelos de ratón transgénico con una barrera epidérmica deficiente, y se considera una respuesta a estrés (Sevilla et al. 2013).

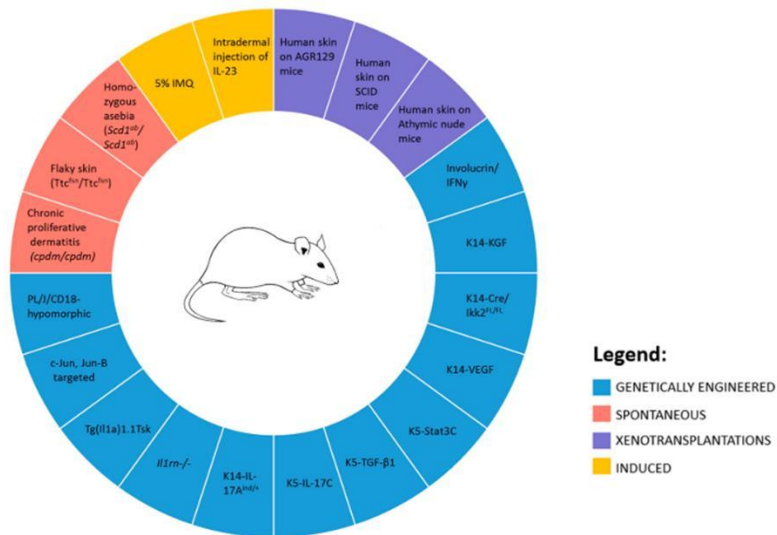
La etiología exacta de la psoriasis todavía no está bien establecida pero se ha demostrado que esta enfermedad puede ser desencadenada o



exacerbada por factores ambientales. Estos factores incluyen el tabaco, el alcohol, la obesidad, infecciones y estrés (Kanemaru et al. 2015).

### 3.2.1.1 Modelos murinos para el estudio de la psoriasis

Los modelos animales de psoriasis incluyen el uso de ratones transgénicos con sobreexpresión o deficiencia de moléculas relevantes en la enfermedad, ratones humanizados, y protocolos experimentales para inducir lesiones psoriáticas en roedores (Figura 12; Nakajima y Sano 2018).



**Figura 12. Clasificación de los modelos de ratones existentes para el estudio de la psoriasis** (Bochénska et al. 2017).

La generación de ratones transgénicos ha hecho posible abordar numerosos modelos *in vivo* para el estudio de la psoriasis. Destacamos los modelos de sobreexpresión en epidermis de STAT3 y TGF- $\beta$ 1, que dan lugar a un fenotipo “psoriático”, ya sea de forma espontáneo o inducida por daño (Sano et al. 2005; Li et al. 2004; Cui et al. 1995; Kane et al. 1990). El modelo KO condicional en epidermis de JunB/c-Jun también recapitulaba

las características de la psoriasis, demostrando el papel de AP-1 en la etiología de la enfermedad (Schonthaler et al. 2009; Zenz et al. 2005; Bartoli et al. 2003).

El uso de ratones humanizados permite injertar la piel de pacientes en ratones inmunodeficientes, y estudiar la contribución de células inmunes al desarrollo y resolución de lesiones psoriáticas (Wrone y Nickoloff 1996). Los ratones xenotransplantados con piel psoriática humana mostraban todas las anomalías histológicas de la enfermedad y permitieron demostrar el papel crucial de las células T, ya que su inyección en la piel no lesionada xenotransplantada del mismo paciente podría inducir psoriasis. Sin embargo, estos modelos tienen desventajas prácticas, ya que el trasplante debe ser rápido para evitar isquemia del injerto, requiere grandes piezas de piel, y en muchos casos es necesario el aislamiento y el trasplante simultáneo de las células T del donante. Además, estos modelos no permiten estudiar los efectos sistémicos de la psoriasis (Gudjonsson et al. 2007; Boyman et al. 2004).

Por último, cabe destacar la importancia del uso de modelos de ratones que se basan en la inducción de lesiones psoriáticas mediante la aplicación tópica o inyección intradérmica de compuestos químicos, o la disrupción de la barrera epidérmica vía daño físico (Sano et al. 2005). Las ventajas de estos modelos inducibles se deben principalmente a su bajo coste, la rápida inducción de la inflamación de la piel y su facilidad de uso en comparación con otros tipos de modelos (Hawkes et al. 2018; Hawkes et al. 2017). El método inducible más utilizado en investigación es la aplicación tópica y repetida de imiquimod (IMQ), un agonista de TLR7 que induce un cuadro inflamatorio similar a la enfermedad humana y es considerado un modelo válido para su estudio (Van der Fits et al. 2009). En este trabajo hemos usado este modelo inducible, cuyo protocolo se especifica en el apartado de Materiales y Métodos.

### **3.2.1.2 Los tratamientos de la psoriasis**

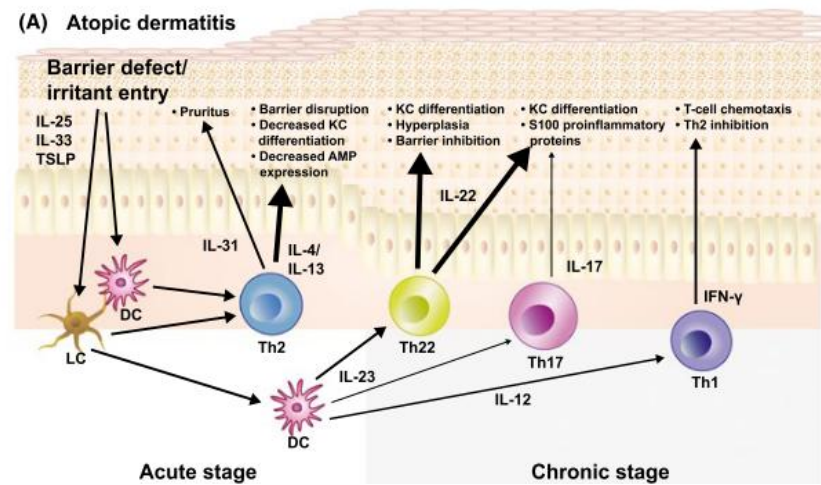
Aunque no existe una cura definitiva para la psoriasis, se utilizan una gran variedad de tratamientos para aliviar los síntomas según su severidad (Boehncke y Schön 2015). Dentro de los tratamientos tópicos, los GCs son los más usados como mono-terapia o en combinación con un tratamiento sistémico (Uva et al. 2012). La respuesta terapéutica a los GCs está mediada por sus efectos vasoconstrictores, anti-inflamatorios, e inmunosupresores (Menter et al. 2009). Los tratamientos sistémicos se administran de forma oral o mediante inyección e incluyen, y consisten en terapias dirigidas a los mediadores inflamatorios mediante anticuerpos frente a receptores solubles de citoquinas y proteínas. Entre ellas, cabe destacar el uso de inhibidores para IL23 e IL17, citoquinas de la vía IL23/Th17 con un papel central en la inmunopatogénesis de la psoriasis (Ogawa et al. 2018; Abuhilal et al. 2016; Han et al. 2012).

### **3.2.2 La dermatitis atópica (AD)**

La AD consiste en erupciones escamosas y pruriginosas con hiperreactividad a agentes ambientales que conforman un cuadro inflamatorio general que se denomina, marcha atópica (Figura 10; Furue y Kadono 2017; Spergel y Paller 2003). Aparece en etapas tempranas del recién nacido y puede resolverse en la edad adulta; sin embargo, los individuos pueden tener recidivas de la enfermedad (Nikolakis et al. 2016; Spergel y Paller 2003). La severidad de la AD se incrementa al asociarse con otras enfermedades atópicas que incluyen alergias en los niños, que luego progresan en asma o rinitis alérgica en la adolescencia o en la edad adulta (Torres et al. 2019; Furue y Kadono 2017). Existen diversas complicaciones que se asocian frecuentemente a la AD, tanto sistémicas (obesidad, enfermedades cardiovasculares y enfermedades cerebrales y autoinmunes), como locales (oftalmológicas; cataratas, queratocono y el desprendimiento de retina) (Silverberg 2019; Furue y Kadono 2017).

Desde el punto de vista histológico la AD se caracteriza por hiperplasia epidérmica, hiperqueratosis, disminución de la capa granular, alteraciones en la diferenciación terminal de los queratinocitos, disminución en los niveles de lípidos y por último infiltrado inmunes de eosinófilos y mastocitos (Figura 11; Guttman-Yassky et al. 2011).

La AD es considerada una enfermedad bifásica, donde se combinan acciones mediadas por las células T; en la fase aguda predominan las células Th2 mientras que la progresión y cronicidad de la enfermedad implican la co-activación de Th1, Th22 y Th17 (Figura 13; Furue y Kadono 2017; Gittler et al. 2012).



**Figura 13. Mecanismos inmunes de inicio y progresión de la AD.** Las células dendríticas activadas estimulan a las células Th2 para que produzcan IL4, IL13 e IL31, induciendo alteraciones en la función de barrera. La transición del estado agudo (días 1 a 3) al estado crónico (día 3 en adelante) está marcada por el reclutamiento células Th1, Th22 y Th17, que reclutan células inmunes circulantes a la epidermis, alterando la diferenciación de queratinocitos e induciendo engrosamiento epidérmico. Modificado de Guttman-Yassky et al. 2018.

La AD también puede tener su origen en defectos epiteliales, como demostró un estudio clásico en el que se describe que la pérdida de función

de FIL era el factor influyente de la enfermedad (Elias y Schmuth 2009; Palmer et al. 2006).

El tratamiento para la AD incluye agentes tópicos como los GCs para mejorar la función de barrera y la inflamación local. Sin embargo, estos tratamientos pueden resultar insuficientes en pacientes con AD moderada o grave, por lo que se están desarrollando tratamientos sistémicos que incluyen inhibidores para las citoquinas IL4/IL13 y IL22, así como también bloqueadores de IL17 y IL22/IL23 (Guttman-Yassky et al. 2018).

#### **4. Modelos animales para el estudio funcional de GR y MR en piel**

Los modelos animales para el estudio funcional de GR y MR en piel se han generado utilizando las secuencias reguladoras de K5, que dirige la expresión del transgén a la capa basal de la epidermis y apéndices epidérmicos (folículos pilosos y las glándulas sebáceas) a partir de E9.5, y durante toda la edad adulta (Ramírez et al. 1994). La línea transgénica que contiene las secuencias reguladoras de K5 se ha utilizado con éxito en numerosos estudios ya que recapitulan el patrón de expresión espacio-temporal del gen endógeno de K5 (Donet et al. 2008; Sainte Marie et al. 2007; Pérez et al. 2001). A continuación describimos modelos transgénicos generados previamente con sobreexpresión o inactivación de GR/MR específica de epidermis.

##### **4.1. Ratones con sobreexpresión de GR o MR específica de epidermis: K5-GR y K5-MR**

Los ratones K5-GR (con sobreexpresión de GR de rata en epidermis y otros epitelios estratificados; Pérez et al. 2001) mostraron alteraciones en el desarrollo de la piel desde E16.5, caracterizada por hipoplasia epidérmica debida a una reducción drástica de queratinocitos proliferativos. Este

fenotipo correlaciona con los efectos anti-proliferativos de los tratamientos farmacológicos con GCs tanto *in vitro* como *in vivo* (Schäcke et al. 2002; Pérez et al. 2001). Además, la epidermis de ratones K5-GR sufría una diferenciación acelerada con una mayor expresión de LOR. Los ratones K5-GR recién nacidos presentaron defectos epiteliales múltiples, incluyendo folículos pilosos anómalos y en menor número, y alteraciones en la cavidad oral y epitelios oculares (fenotipo de ojo abierto al nacer). En la edad adulta, los defectos epiteliales afectaron al folículo piloso, dientes, y glándulas secretoras (de párpado y sudoríparas, entre otras) (Cascallana et al. 2005; Pérez et al. 2001).

La severidad de las anomalías epiteliales era dependiente de la dosis génica, de manera que las líneas transgénicas de heterocigotos presentaban un fenotipo atenuado respecto a las líneas homocigotas, que morían perinatalmente. Además, los ratones K5-GR adultos presentaron un retraso en el cierre de heridas, con una menor proliferación y migración de los queratinocitos (Sanchis et al. 2012).

Los ratones K5-MR (con sobreexpresión de MR humano en epidermis y otros epitelios estratificados) morían en la etapa post-natal por causas desconocidas (Sainte Marie et al. 2007). El análisis de embriones K5-MR (E16.5 y E18.5) mostró un fenotipo de atrofia epidérmica, muy similar a la observada en individuos K5-GR, con un menor grosor epidérmico y menor densidad de folículos pilosos. En este caso, la hipoplasia epidérmica era debida a un aumento de apoptosis de los queratinocitos, y no a una menor tasa de proliferación. Los ratones K5-MR presentaron una diferenciación epidérmica acelerada, que se demostró con una mayor permeabilidad a la tinción con azul de toluidina. Los ratones K5-MR recién nacidos mostraban el fenotipo del ojo abierto al nacer (Sainte Marie et al. 2007). También se generaron ratones con sobreexpresión de MR utilizando una construcción inducible, para evitar la letalidad perinatal; estos ratones eran viables aunque presentaron anomalías en el ciclo de pelo y displasia en los

folículos, que derivaron en una alopecia progresiva con formación de quistes (Sainte Marie et al. 2007).

Estos dos modelos transgénicos K5-GR y K5-MR presentan muchas similitudes, que incluyen atrofia epidérmica, anomalías en los folículos, y fenotipo de ojo abierto al nacer (Sainte Marie et al. 2007; Cascallana et al. 2005); sin embargo, tan solo los ratones K5-GR mostraron alteraciones en otros derivados ectodérmicos, incluyendo los dientes y las glándulas exocrinas. Estas anomalías recapitulan los signos clínicos de la enfermedad humana denominada displasia ectodérmica hipohidrótica (Cascallana et al. 2005).

## **4.2 Ratones con inactivación de GR específica de epidermis (*GR epidermal knock-out*, GR<sup>EKO</sup>)**

Los ratones con inactivación específica de GR en epidermis se generaron cruzando ratones K5-Cre con ratones GR<sup>loxP/loxP</sup> (K5-Cre//GR<sup>loxP/loxP</sup>), y nos referiremos a esta línea como ratones *GR epidermal KO* o GR<sup>EKO</sup> (Sevilla et al. 2013).

La piel de los ratones GR<sup>EKO</sup> presentaba un fenotipo histológico durante el desarrollo y etapa perinatal, con aumento de la proliferación de los queratinocitos, diferenciación anormal de la epidermis, y fragilidad del estrato córneo, que daban lugar a un retraso en la formación de la barrera epidérmica. Estas características correlacionan con una menor expresión de los niveles de LOR, FIL y corneodesmosina en el estrato córneo, así como expresión anormal de K6 interfolicular, y alteraciones en los lípidos epidérmicos (Sevilla et al. 2013). La piel de embriones GR<sup>EKO</sup>, presentaba además infiltrados dérmicos de macrófagos y mastocitos, características propias de la AD, así como también una mayor actividad de STAT3, como en los pacientes con psoriasis (Guttman-Yassky et al. 2018; Sano et al. 2005). También se detectaron alteraciones en genes implicados en la

respuesta inmune innata, en concreto sobreexpresión de *S100a9*, *S100a8*, y *Thymic stromal lymphopoietin (Tslp)*, genes con expresión elevada en lesiones de pacientes con psoriasis o AD (Kerkhoff et al. 2012).

En la edad adulta, los ratones GR<sup>EKO</sup> presentaron un fenotipo cutáneo leve con un ligero aumento de la proliferación respecto a los controles y expresión parcheada de FIL y LOR. Sin embargo, los ratones GR<sup>EKO</sup> presentaban una mayor susceptibilidad al tratamiento tópico con agentes pro-inflamatorios, como el detergente *Sodium Dodecyl Sulfato* (SDS) o el éster de forbol *Phorbol ester 12-Myristate 13-Acetate* (PMA). Estos tratamientos indujeron, en ambos casos, un aumento de la proliferación epidérmica y queratinización la piel de los ratones GR<sup>EKO</sup>, así como un aumento en la expresión de marcadores inflamatorios, y una sobreactivación de las vías de señalización ERK y STAT3 (Sevilla et al. 2013). Mientras que en ratones control, el tratamiento tópico prolongado con el GC sintético dexametasona (Dex) inhibió la proliferación de los queratinocitos, dicho tratamiento produjo tan solo un efecto residual en la epidermis de ratones GR<sup>EKO</sup> demostrando que los efectos anti-proliferativos de los GCs en queratinocitos requieren GR (Sevilla et al. 2013).

### **4.3 Ratones con inactivación de MR específica de epidermis (*MR epidermal knock-out*, MR<sup>EKO</sup>)**

Los ratones con inactivación específica de MR en epidermis se generaron cruzando ratones K5-Cre con ratones MR<sup>loxP/loxP</sup> (K5-Cre//MR<sup>loxP/loxP</sup>); y nos referiremos a ellos como *MR epidermal KO* o MR<sup>EKO</sup> (Boix et al. 2016b).

Los ratones MR<sup>EKO</sup> no presentaron un fenotipo cutáneo evidente durante la etapa embrionaria y perinatal, sugiriendo que MR no desempeña un papel central en el desarrollo cutáneo (Boix et al. 2016b).



En edad adulta, la piel de los ratones MR<sup>EKO</sup> mostró pequeños defectos respecto a los controles, incluyendo un aumento pequeño pero significativo del grosor epidérmico, con expresión anómala de K6, que correlacionaba con una mayor proliferación de los queratinocitos de la epidermis basal (Boix et al. 2016b). Aunque se ha descrito que MR también se expresa en glándulas sudoríparas (Tallec y Lombès 2005), la inactivación de MR epidérmico no alteró su funcionalidad, tal y como demuestra el test con yodo que reveló una correcta funcionalidad de los puntos de sudoración (Boix et al. 2016b). Sin embargo, los ratones MR<sup>EKO</sup> mostraron mayor susceptibilidad a protocolos experimentales de hiperproliferación e inflamación. El tratamiento tópico con SDS o PMA, indujo mayor daño epitelial en MR<sup>EKO</sup> que en los controles, con aumento del grosor epidérmico y de la proliferación de los queratinocitos, así como sobreactivación de STAT3 y niveles elevados de citoquinas reguladas vía NF-κB. Además, el tratamiento tópico prolongado con Dex en ratones MR<sup>EKO</sup> también produjo una menor inhibición de la proliferación epidérmica respecto a los controles. Estos datos indican que MR, de manera análoga a GR, actúa como anti-proliferativo y anti-inflamatorio en la piel en situaciones patológicas (Boix et al. 2016b; Sevilla et al. 2013). Por otro lado, la cicatrización cutánea en ratones MR<sup>EKO</sup> fue anómala, en parte debido a un defecto autónomo en la migración de los queratinocitos deficientes en MR (Boix et al. 2016b).

En resumen, el análisis conjunto de estos modelos transgénicos demuestra que GR tiene un papel crucial en la proliferación y diferenciación epidérmicas durante el desarrollo, mientras que MR tiene una menor contribución en este proceso. Sin embargo, en la edad adulta, ambos receptores juegan un papel en la respuesta a la hiperproliferación e inflamación cutáneas, y son necesarios para la respuesta óptima a GCs.







# **OBJETIVOS**



El objetivo global de esta tesis es esclarecer la contribución relativa de GR y MR en la fisiopatología de la piel. Los objetivos concretos son:

**1.** Generación de ratones con inactivación de GR y MR en la epidermis, que denominamos ratones *GR/MR epidermal knock-out* o *Double Knock-Out/DKO*.

1.1. Caracterización fenotípica de los ratones DKO durante el desarrollo. Comparativa del fenotipo entre CO, GR<sup>EKO</sup>, MR<sup>EKO</sup> y DKO.

1.2. Estudio de la respuesta de los ratones CO, GR<sup>EKO</sup>, MR<sup>EKO</sup> y DKO a diversos protocolos de patología cutánea: inflamación aguda inducida por PMA y psoriasis inducida por imiquimod (IMQ).

1.3. Análisis de los efectos terapéuticos de los GCs en los distintos modelos animales sujetos a protocolos de inflamación.

**2.** Generación de queratinocitos inmortalizados DKO.

2.1. Caracterización fenotípica de los queratinocitos DKO. Comparativa entre CO, GR<sup>EKO</sup>, MR<sup>EKO</sup> y DKO.

2.2. Evaluación de la contribución relativa de GR y MR a la respuesta transcripcional a GCs.

**3.** Estudio de la contribución de MR en el envejecimiento cronológico cutáneo.

3.1. Caracterización del fenotipo y alteraciones moleculares en la piel de ratones MR<sup>EKO</sup> de 13 meses de edad.

3.2. Análisis del *cross-talk* entre compartimentos de la piel.









# **MATERIALES Y MÉTODOS**



## **1. Experimentación animal**

### **1.1 Generación de las colonias de ratones transgénicos**

La experimentación animal, se ha llevado a cabo de acuerdo con la legislación española y europea vigente (Real Decreto 53/2013, BOE 34; y directiva 2010/63/UE), y todos los protocolos de trabajo han sido aprobados por el Comité Ético del Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV-CSIC; proyectos SAF2014-59474-R y SAF2017-88046-R). Los animales fueron estabulados en jaulas convencionales en grupos de 3 a 6, y mantenidos en condiciones de temperatura, humedad y luz controladas (ciclos de 12 horas de luz).

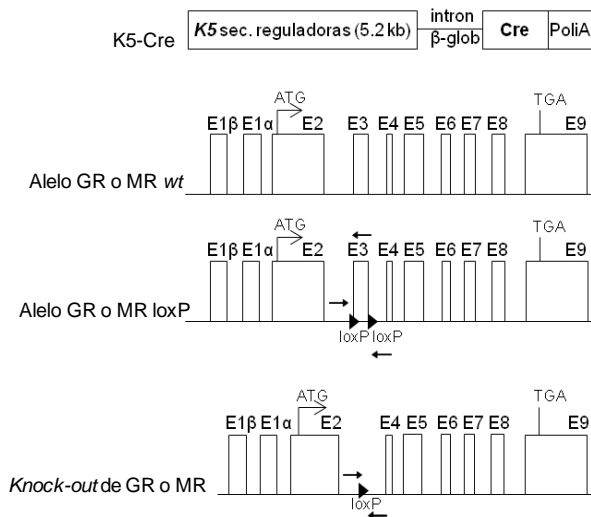
Para la obtención de ratones con inactivación conjunta de GR y MR específica de queratinocitos (K5-Cre//MR<sup>loxP/loxP</sup>//GR<sup>loxP/loxP</sup>, denominados doble KO o DKO), programamos cruces a partir de las líneas transgénicas previamente descritas (Sevilla et al. 2013; Boix et al. 2016b).

La línea K5-Cre cedida por los doctores Ángel Ramírez y José Luis Jorcano, *Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT, Madrid, Ramirez et al. 2004)* contiene la recombinasa CRE bajo el control de las secuencias reguladoras de la K5 bovina, capaces de dirigir su expresión a los queratinocitos de la capa basal de la epidermis y derivados epidérmicos (folículo piloso, glándulas sudoríparas y glándulas sebáceas). Las líneas GR<sup>loxP/loxP</sup> (Tronche et al. 1999) y MR<sup>loxP/loxP</sup> (Berger et al. 2006), ambas cedidas por el Profesor Günther Schütz, *Centro Alemán de Investigaciones contra el Cáncer (Deutsches Krebsforschungszentrum, DKFZ, Heidelberg, Alemania)*, tienen el exón 3 de los genes *Nr3c1* y *Nr3c2*, que codifican para GR y MR respectivamente, flanqueados por secuencias *loxP*. La recombinasa CRE reconoce las secuencias *loxP*, dando lugar a la delección de la secuencia

que flanquea 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 GR y/o MR (Figura 14).

Las líneas KO individuales GR epidermal KO (K5-Cre//GR<sup>loxP/loxP</sup>, GR<sup>EKO</sup>; Sevilla et al. 2013) y MR epidermal KO (K5-Cre//MR<sup>loxP/loxP</sup>, MR<sup>EKO</sup>; Boix et al. 2016b) se generaron previamente en el laboratorio en un fondo híbrido C57BL/6J/DBA/2J (B6D2); su mantenimiento se realiza mediante cruces con ratones B6D2 obtenidos del proveedor autorizado (JanvierLabs, Francia). Todas las colonias transgénicas se mantienen de manera independiente.

La programación rutinaria para la obtención de ratones CO y DKO se realizó mediante cruces de machos K5-Cre<sup>+/-</sup>//MR<sup>loxP/loxP</sup>//GR<sup>loxP/loxP</sup> con hembras 0-Cre//MR<sup>loxP/loxP</sup>//GR<sup>loxP/loxP</sup>. Los ratones DKO eran viables y fértiles y no presentaban ninguna alteración macroscópica ni de comportamiento en comparación con los CO.



**Figura 14. Generación de ratones transgénicos con inactivación conjunta de GR y MR en epidermis (DKO).** Esquema representativo de la generación de ratones GR<sup>EKO</sup> o MR<sup>EKO</sup> mediante la acción de la recombinasa CRE bajo el control de secuencias reguladoras de la queratina (K5). El exón 3 de GR y MR se encuentra flanqueado por

regiones loxP que, en presencia de CRE, es escindido para dar lugar a la inactivación de los genes correspondientes. Modificado de Boix et al. 2016b.

En este trabajo hemos utilizado ratones de edad post-natal (P)0, P1, P3 y adulta (8 semanas; 2-, 6-, 11- y 13-meses de edad) de los genotipos indicados. Los experimentos se realizaron con hembras, excepto si se indica lo contrario, y utilizando en la medida de lo posible hermanas de camada para disminuir las diferencias debidas a la variabilidad del fondo genético.

En algunos casos realizamos control del tapón vaginal para saber el día en el que el macho fecunda a la hembra. Tras 3 semanas después del nacimiento, los ratones se destetaron separando machos y hembras en jaulas distintas. A partir de las 6 semanas de edad, los ratones ya eran fértiles y se podían programar nuevos cruces.

## **1.2 Identificación de los ratones transgénicos**

### **1.2.1 Obtención del ADN genómico**

Para poder identificar los ratones pertenecientes a cada genotipo, se extrajo el ADN genómico de biopsias de cola de ratón para la posterior reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El tejido se digirió en 50  $\mu$ l de una solución compuesta por Tris-HCl 1 M pH 8.0, NaCl 2.7 M, SDS 10%, proteinasa K 10 mg/ml y H<sub>2</sub>O miliQ estéril durante 3 h a 300 rpm y 55°C en un termobloque Eppendorf. Transcurrido este tiempo, se diluyó en H<sub>2</sub>O miliQ estéril (150  $\mu$ l) y se inactivó la proteinasa K durante 10 min a 95°C.

Previamente a la PCR, se midió la concentración de ADN genómico en un equipo Nanodrop (Thermo Scientific), y su pureza con la ratio 260/280. Para que la PCR funcionase correctamente, se diluyeron las muestras a una concentración de 10 ng/ $\mu$ l.

### 1.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa

Una vez obtenido el ADN genómico, se amplificó mediante PCR y de manera independiente, el fragmento específico para *Nr3c1/GR* o para *Nr3c2/MR* mediante PCR utilizando los cebadores específicos.

Para amplificar del gen *Nr3c1/GR*, se diluyeron 2.5  $\mu$ l de ADN (10 ng/ $\mu$ l) en una mezcla que contiene tampón de reacción sin  $MgCl_2$  1x (Biotools), 1.5 mM  $MgCl_2$  (Biotools), 0.25 mM de dNTPs (Thermo Scientific), 0.31 mM de cada uno de los cebadores (Roche) y 0.5 unidades de polimerasa (Biotools) en un volumen final de 20  $\mu$ l.

La mezcla de la reacción para *Nr3c2/MR* contenía 2  $\mu$ l de ADN (10 ng/ $\mu$ l), tampón de reacción sin  $MgCl_2$  1x, 2 mM  $MgCl_2$ , 0.25 mM de dNTPs, 0.25 mM de cada uno de los cebadores y 0.5 unidades de polimerasa en un volumen final de 20  $\mu$ l.

Cuando analizamos ratones antes del destete, realizamos una PCR utilizando cebadores específicos para el gen masculino *Sry* (Gubbay et al. 1992; Koopman et al. 1991). Para la reacción se diluyeron 2.5  $\mu$ l de ADN (10 ng/ $\mu$ l) en una mezcla con tampón de reacción sin  $MgCl_2$  1x, 2 mM de  $MgCl_2$ , 0.2 mM de dNTPs, 0.25 mM de cada uno de los cebadores y 0.5 unidades de polimerasa en un volumen final de 20  $\mu$ l.

Para el genotipado de los ratones K5-Cre se utilizaron 2  $\mu$ l de ADN (25 ng) y se diluyeron en una mezcla que contiene tampón de reacción sin  $MgCl_2$  1x, 2 mM  $MgCl_2$ , 0.25 mM de dNTPs, una mezcla de los cebadores  $\beta$ -*globin*-CRE F+R (10  $\mu$ M) y 0.5 unidades de polimerasa en un volumen final de 20  $\mu$ l.

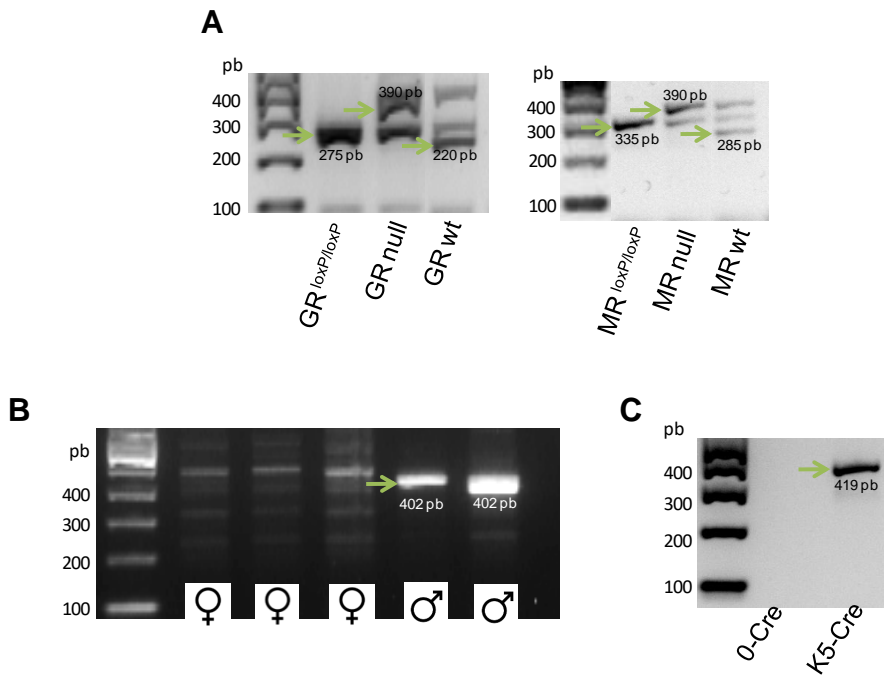
Todas las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Mastercycler (Eppendorf). La secuencia de los cebadores, así como las condiciones de las PCRs se detallan en la Tabla 1.



**Tabla 1. Condiciones del genotipado mediante PCR.** Se especifican las secuencias de los oligonucleótidos utilizados, los tamaños de los fragmentos obtenidos para cada colonia transgénica, y las condiciones de amplificación.

Gen	Cebadores	Secuencia oligonucleótidos	Fragmentos (pb)	Condiciones
<b>MR</b>  Berger et al. 2006	MR_F	CTGGAGATCTGAACTCCAGGCT	285	94°C 1'
	MR_RA	CCTAGAGTTCTGAGCTGCTGA	335	94°C 1'
	MR_RB	TAGAAACACTTCGTAAGTAGAGCT	390	63°C 1'
				72°C 1'
				72°C 5'
<b>GR</b>  Tronche et al. 1999	GR1	GGCATGCACATTACTGGCCTTCT	225	94°C 1'
	GR4	GTGTAGCAGCCAGCTTACAGGA	275	94°C 1'
	GR8	CCTTCTCATTCCATGTCAGCATGT	390	55°C 1'
				72°C 1'
				72°C 5'
<b>Sry</b>  Lambert et al. 2000	Syr_F	TGGGACTGGTGACAATTGTC	402	95°C 4.5'
	Syr_R	GAGTACAGGTGTGCAGCTCT		95°C 35"
				50°C 1'
				72°C 1'
				72°C 5'
<b>K5-Cre</b>  Ramirez et al. 2004	$\beta$ -globin-CRE F	AACATGCTTCATCGTCGG	419	94°C 1'
	$\beta$ -globin-CRE R	TTC GGA TCA TCA GCT ACA CC		95°C 1'
				57°C 1'
				72°C 2'
				72°C 10'

Los productos obtenidos se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa (2%) que contenía 1.5  $\mu$ l de GelRed™ 10000x (Biotium), en tampón TAE 1x (40 mM Tris-acetato pH 8.3, 1 mM EDTA) durante 1h y 15min a 80 V constantes con una fuente Power Pac 3000 (Bio-Rad). Para la visualización de los geles se usó un transiluminador de luz ultravioleta Ultima 16si Plus (Isogen). En el caso del gen *Nr3c1/GR* la combinación de los tres cebadores daba lugar a tres bandas correspondientes a los siguientes alelos: *wild type* de 220 pb, GR<sup>loxP</sup> de 275 pb, y *null* de 390 pb, donde el exón 3 está eliminado (Figura 15, A izquierda). Para *Nr3c2/MR* observamos las bandas *wild type* de 285 pb, MR<sup>loxP</sup> de 335 pb, y *null* de 390 pb (Figura 15, A derecha). La PCR con los cebadores específicos para el gen *Sry* o *K5-Cre* daba lugar a un único producto de 402 pb y 419 pb, respectivamente (Figura 15, B y C).



**Figura 15. Imágenes representativas del genotipado de líneas transgénicas DKO. A** Ejemplo de electroforesis en gel correspondiente a un genotipado de ratones de la colonia DKO mediante PCR con cebadores específicos para *GR* (izquierda) y para *MR* (derecha). **B** Electroforesis en gel correspondiente a un genotipado de ratones DKO P0 para evaluar el género de cada uno de ellos mediante PCR con cebadores específicos para *Sry*. **C** Electroforesis en gel correspondiente a un genotipado de ratones K5-Cre para detectar la presencia de la recombinasa mediante PCR con cebadores específicos *Cre*.

### 1.3 Tratamientos tópicos

48h antes de realizar un tratamiento tópico, se afeitó la región dorsal de los ratones con afeitadora especial para animales (Aesculap Isis, B.Braun) para evitar posibles interferencias con irritaciones y heridas. Los animales se afeitaron dejando una línea de pelo en el centro del lomo delimitando así dos zonas de tratamiento; la parte izquierda y la parte derecha. En todos los casos, en la parte izquierda se aplicó el vehículo y en la derecha el tratamiento específico. Para los tratamientos utilizamos ratones hembra y de edades comprendidas entre las 8 y 12 semanas,

cuando el folículo piloso está en la fase de descanso o telogen (Paus et al. 1999).

Los tratamientos tópicos (región dorsal u orejas) incluían: Dex (8 µg/200 µl; 24 h, Sigma), PMA (8 µg/50 µl; 48 h en ambas orejas, Sigma), o vehículo (V, acetona, Merck). Cuando se realizaron tratamientos combinados, el lomo de los ratones se trató previamente con V o Dex (16 µg/200 µl; 24 h), seguido de un tratamiento con PMA (8 µg/200 µl; 48 h).

En los experimentos de inducción de psoriasis mediante IMQ se afeitó todo el lomo de los ratones machos, y se trató con vehículo (Vaselina, V, Fagron) o con 62.5 mg de Aldara® (5% IMQ, agonista de *Toll-Like Receptor 7* (TLR7) (Meda Pharma), durante 6 días consecutivos. Diariamente se realizó un estudio macroscópico para valorar eritema y descamación, otorgando a cada lesión cutánea una puntuación 0-5: 0, sin lesión; 1, leve; 2, moderada; 3, marcada; 4, alto; 5, muy alto.

## 1.4 Recogida de muestras

El sacrificio de los animales se realizó durante la mañana para no coincidir con el pico de expresión de corticoides (6-8 pm en roedores). En los experimentos indicados, los ratones fueron inyectados intraperitonealmente, 1 h antes del sacrificio, con una solución de 10 mg/ml de 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) en suero salino estéril al 0.7% (10 mg de BrdU por Kg de peso del ratón).

Los métodos de sacrificio animal utilizados en este trabajo son: asfixia por CO<sub>2</sub> o dislocación cervical. Después del sacrificio, según se indica, se determinó el peso total del ratón, así como el peso de los depósitos adiposos intraabdominales (incluidas la grasa perigonadal, retroperitoneal, perirrenal y mesentérica). Posteriormente se recogió la piel (de oreja o de lomo) con ayuda de pinzas, tijeras y bisturí para su posterior fijación para el análisis histopatológico y/o almacenamiento a -80°C para la futura extracción de ARN y/o proteínas.

### **1.4.1 Separación de epidermis, dermis y tejido adiposo**

Para poder evaluar la expresión a nivel de ARNm y de proteína de los distintos compartimentos de la piel, realizamos un protocolo de separación de epidermis, dermis y dWAT. Una vez recogida la piel, se estiró en una placa de Petri y con la ayuda de un bisturí, se recogió el tejido adiposo. Después, manteniendo la piel con la dermis en contacto con la placa, se hizo flotar en 1 mL de solución de tiocianato de amonio al 3.8% en tampón fosfato salino (PBS) 1x durante 10 min y a RT. A continuación, se separaron ambos compartimentos con ayuda de un bisturí. Antes de su congelación en N<sub>2</sub> líquido, se lavaron las muestras de dermis y epidermis en PBS 1x y, en los casos que fue necesaria una posterior extracción de proteína, en una solución de 5 mM EDTA (ácido etilendiaminotetraacético, Biowest) en PBS 1x.

### **1.5. Medición de los niveles de corticosterona endógenos a partir de explantes de piel**

La determinación de los niveles de corticosterona endógenos se realizó en ratones hembras de 8 semanas y de 13 meses de edad CO y MR<sup>EKO</sup>. Los ratones se afeitaron post-mórtem y se recogió un explante de piel dorsal con ayuda de material quirúrgico. Cada trozo de piel se calcó en una hoja transparente para determinar, *a posteriori*, el área total de tejido recogido. Seguidamente, y en cabina estéril, se llevó cabo la desinfección de la piel con solución iodada y varios lavados con EtOH 70% (Panreac) y PBS 1x. Después la piel se troceó y se incubó en placas de 24 pocillos con Opti-MEM<sup>TM</sup> I *Reduced Serum Medium* (ThermoFisher) durante 5 h a 37°C. Tras la incubación se recogió el sobrenadante para la detección de los niveles de corticosterona endógenos mediante el kit DetectX Corticosterone Immunoassay (Arbor Assays), siguiendo las instrucciones del proveedor.

Finalmente, la cuantificación de la señal colorimétrica (450 nm) se llevó a cabo en el espectrofotómetro Wallac 1420 Victor<sup>2</sup> Microplate Reader (Perkin Elmer). Los resultados están relativizados al área total del explante de piel recogido.

## **2. Análisis histológico y técnicas de inmunodetección**

### **2.1 Procesamiento de las muestras**

Para el estudio histológico, la piel se fijó en paraformaldehído (PFA, Panreac) 4% durante 24 h, seguido de un lavado con EtOH 70% durante 24 h más, o directamente en EtOH 70% durante 24 h. Después, las muestras se introdujeron en un procesador de tejidos STP 120; Myr (Micron) seguido de su procesamiento en una estación (EC-350; Myr, Micron) para su inclusión en parafina (Tabla 2). Después, se realizaron cortes seriados de las muestras (4  $\mu\text{m}$  de grosor) en un micrótopo de rotación (HM-340E; Micron) y se adhirieron a portaobjetos tratados con poli-lisina (Thermo Scientific).

**Tabla 2. Programa de la procesadora de tejidos.**

Reactivo	Tiempo (h)
Etanol 70%	1
Etanol I 95%	3
Etanol II 95%	1.5
Etanol I 100%	2
Etanol II 100%	6
Xilol I	1.5
Xilol II	2.5
Parafina I	2.5
Parafina II	2

### **2.2 Desparafinación e hidratación/deshidratación de las muestras**

Previamente a la realización de cualquier tinción o inmunohistoquímica, los portaobjetos con las muestras adheridas se

desparafinaron durante 30 min a 60°C, seguido de dos pasos de xilol (Panreac) de 10 min cada uno, y se hidrataron en sucesivos pases en etanoles con concentraciones decrecientes (100%, 10 min; 90%, 10 min; 70%, 10 min; 50%, 5 min) hasta finalizar con dos lavados de 5 min con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>. Tras la tinción o inmunodetección, se deshidrataron las muestras mediante su paso por etanoles crecientes (50%, 1 min; 70%, 1 min; 90%, 2 min; 100%, 10 min) y xilol durante 10 min.

### **2.3 Tinción con Hematoxilina-Eosina (H&E)**

Después de la rehidratación, los cortes se tiñeron mediante inmersión seriada en hematoxilina de Harris (Panreac), el reactivo de fijación *Bluing Reagent* (Thermo Scientific), y eosina amarilla (Panreac). Finalmente, se deshidrataron y se montaron con una resina sintética DPX (De-Pex, BDH). Las preparaciones se analizaron y se fotografiaron en el microscopio de campo claro Leica DM1000, al que va acoplado una cámara Leica EC3 que permite el análisis de la imagen mediante el uso del software Leica LAS EZ (Leica Microsystems).

### **2.4 Tinción con tricrómico de Masson**

Las muestras se sometieron en primer lugar a un proceso de desparafinación y rehidratación. Seguidamente, se sumergieron en una solución fresca de hematoxilina férrica de Weigert (solución A: solución B, 1:1, Sigma) durante 10 min y en oscuridad. Después se lavaron con abundante agua del grifo durante 10 min para eliminar por completo el exceso de hematoxilina. Posteriormente, las muestras se tiñeron con una solución de escarlata de Biebrich y fucsina ácida (Sigma) durante 15 min y al finalizar se lavaron con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>. Después, las muestras se sumergieron en una solución de ácido fosfomolibdico y ácido fosfotúngstico (Sigma) en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> (1:1:2) durante 15 min. Al finalizar, se transfirieron directamente a una solución de azul de anilina (Sigma) durante 12 min, y se lavaron con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>

para eliminar el exceso (tres lavados de dos segundos). Para fijar la tinción, los portaobjetos se sumergieron en ácido acético 1% durante 1 min. Finalmente se deshidrataron y se montaron con DPX para el posterior análisis en el microscopio óptico de campo claro.

## **2.5 Tinción azul de toluidina**

La detección de los mastocitos y macrófagos presentes en la dermis de los ratones de 13 meses de edad se llevó a cabo mediante la tinción con azul de toluidina. Para ello, las muestras se rehidrataron y, posteriormente, se sumergieron en una solución al 0.1% de azul de toluidina durante 3 min. Finalmente, las muestras se deshidrataron y se montaron con DPX para el posterior análisis en el microscopio óptico de campo claro.

## **2.6. Análisis inmunohistoquímico**

Después de la desparafinación y rehidratación de las muestras, estas se lavaron con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, seguido del bloqueo de la actividad peroxidasa endógena con una mezcla que contiene MetOH (Panreac) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en una proporción 29:1, durante 20 min y en oscuridad. Para las muestras fijadas en PFA 4%, y en primer lugar, se desenmascaró el antígeno con citrato sódico (10 mM, pH 6) a 95°C en el baño de agua durante 20 min. Después se dejó enfriar 30 min y se lavó con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> (dos lavados de 5 min) para seguir con el bloqueo de la peroxidasa.

A continuación, se lavaron las muestras con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> y se delimitó la muestra con un lápiz graso (Vector). Seguidamente, se bloquearon los sitios de unión inespecíficos durante 1 h en cámara oscura utilizando soluciones que contenían FBS o BSA, o leche en polvo, a distintas concentraciones, según las especificaciones de los anticuerpos. Después, añadimos el anticuerpo primario de interés, con la dilución indicada, y se incubó toda la noche a 4°C en la cámara oscura (Tabla 3). Al día siguiente, se lavaron las muestras con tres lavados de 5 min de PBS 1x o de TBST 1x (tampón tris

salino (TBS) 1x y Tween-20 0.1%, Sigma) y se incubaron a RT durante 1 h con el anticuerpo secundario específico conjugado con biotina (Tabla 3).

Tras lavar las muestras con PBS o TBST 1x (10 min cada lavado), se incubaron durante 30 min y a RT con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC Vectastain Elite, Vector Laboratories). Para revelar la reacción utilizamos el kit de diaminobenzidina como sustrato cromogénico para la peroxidasa (DAB, Vector Laboratories), siguiendo las recomendaciones técnicas del fabricante. El tiempo de revelado se estima observando la aparición de color utilizando microscopio óptico de campo claro; la reacción se para sumergiendo las muestras en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>. Finalmente, se contra-tiñó la señal con hematoxilina y se deshidrataron las muestras para el posterior montaje de los portaobjetos con DPX. Las preparaciones se analizaron y se fotografiaron mediante el sistema de microscopio de campo claro.

**Tabla 3. Anticuerpos, diluciones y fijaciones utilizadas para inmunohistoquímica.** Anticuerpos primarios y secundarios específicos para inmunohistoquímica, fijación del tejido, dilución, y casa comercial.

Anticuerpo primario	Fijación del tejido	Dilución	Compañía
BrdU (1170376)	EtOH 70%	1/100	Roche
CD3 (0452)	EtOH 70%	1/200	Agilent
p-H2AX (20E3)	EtOH 70%	1/50	Cell Signalling
HSD11B2 (sc-20176)	EtOH 70%	1/500	Santa Cruz
K6 (PRB-169P)	EtOH 70%	1/2000	Covance
Loricrina (PRB-145P)	EtOH 70%	1/2000	Covance
Ly6G (551459)	EtOH 70%	1/100	BD Pharmingen
p-p65-Nf-κB (sc-372)	EtOH 70%	1/100	Santa Cruz
p-ERK (Thr202/Tyr204) (# 4376)	PFA 4%	1/100	Cell Signalling
p-p38 (#4631)	PFA 4%	1/100	Cell Signalling
p-Smad2/3 (sc-11769-R)	EtOH 70%	1/100	Santa Cruz
Anticuerpo secundario	Dilución	Compañía	
Anti-conejo biotinilado	1/1000	Jackson ImmunoResearch	
Anti-ratón biotinilado	1/1000	Jackson ImmunoResearch	
Anti-rata biotinilado	1/1000	Jackson ImmunoResearch	



## 2.7 Inmunohistoquímica anti-BrdU

Para poder cuantificar el número de queratinocitos proliferativos en la capa basal de la epidermis, se llevó a cabo la inyección de BrdU seguida de inmunohistoquímica anti-BrdU. Los primeros pasos del protocolo son iguales a los descritos en el apartado 2.6 pero incluyen una inmersión de las muestras en HCl 1N a 37°C en la estufa durante 40 min antes del bloqueo, lo que permite la desnaturalización del ADN. Seguidamente se lavaron las muestras cinco veces con PBS 1X (10 min) y se prosiguió con el protocolo estandarizado de la inmunohistoquímica (apartado 2.6).

## 2.8 Inmunofluorescencia

Tras rehidratar las muestras, se bloqueó la actividad peroxidasa con una solución que contenía MetOH y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (29:1) durante 20 min y en la oscuridad. Seguidamente, se delimitaron las muestras con lápiz graso y se incubaron con una solución de bloqueo (suero de burro 5% en PBS) durante 1 h en cámara oscura. Transcurrido este tiempo, se incubaron con el anticuerpo primario (ver tabla 3, K6) diluido en la solución de bloqueo toda la noche a 4°C en cámara oscura.

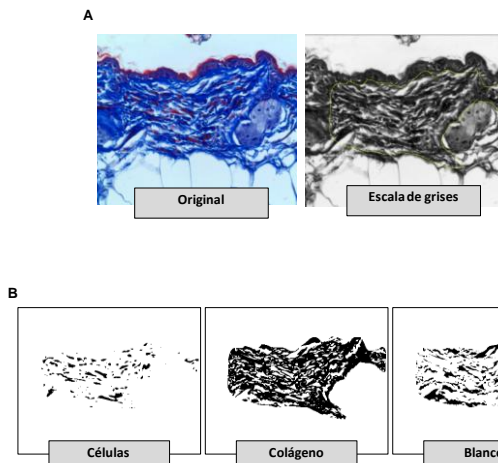
Al día siguiente se eliminó el exceso de anticuerpo primario realizando tres lavados de 5 min con PBS 1x y se incubaron las muestras con el anticuerpo secundario (Alexa fluor 555 anti-conejo, 1/1000, Life Technologies) y DAPI 1x, durante 1h a RT y en cámara oscura. Pasado este tiempo, el exceso de anticuerpo secundario se eliminó lavando varias veces con PBS 1x y una vez con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>. Después se montaron los portaobjetos con cubres utilizando el medio de montaje Mowiol (Calbiochem). 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 10x.

## 2.9 Análisis morfométrico

Para el análisis cuantitativo del grosor de la piel, edema de oreja, epidermis, dermis y tejido adiposo, se tomaron al menos cuatro microfotografías de cada sección de piel teñida con H&E, usando el microscopio de campo claro. A continuación, se tomaron al menos cinco medidas de cada imagen utilizando el software IMAGE J (NIH). Para ello, se siguió un método de randomización parcial, donde se excluyen las zonas alteradas (Boix et al. 2016b; Farman y Nguyen 2016).

Para la cuantificación de la celularidad dérmica, se contaron todos los núcleos teñidos con hematoxilina en cada microfotografía a un aumento de 20x. La cuantificación del número y tamaño de adipocitos, se hizo realizando microfotografías a 10x desde la región de la dermis reticular hasta el panículo carnoso. Después del contaje de adipocitos, estos se clasificaron en dos grupos de tamaño, mayor o menor que  $3000 \mu\text{m}^2$ .

En la cuantificación de la deposición de colágeno, cada microfotografía de la tinción con tricrómico se transformó a escala de grises y se segmentó manualmente para seleccionar el área ocupada específicamente por colágeno (Figura 16). Luego se determinó la densidad integrada de las fibras de colágeno (producto del área ocupada por el colágeno y la intensidad media del colágeno).



La cuantificación de queratinocitos interfoliculares basales positivos para BrdU se realizó contando grupos de 100 núcleos teñidos con hematoxilina, e identificando los núcleos positivos BrdU (microscopio campo claro, aumento utilizado de 40x). Los datos se expresaron como porcentaje de células BrdU-positivo en relación con el número total de núcleos teñidos con hematoxilina.

Para la cuantificación de las inmunohistoquímicas p-SMAD2/3 y CD3, así como la tinción azul de toluidina, cada célula positiva se contó en cuatro microfotografías por animal (aumento de 20x). Posteriormente, se calculó el porcentaje de células positivas en relación con el número total de núcleos teñidos con hematoxilina.

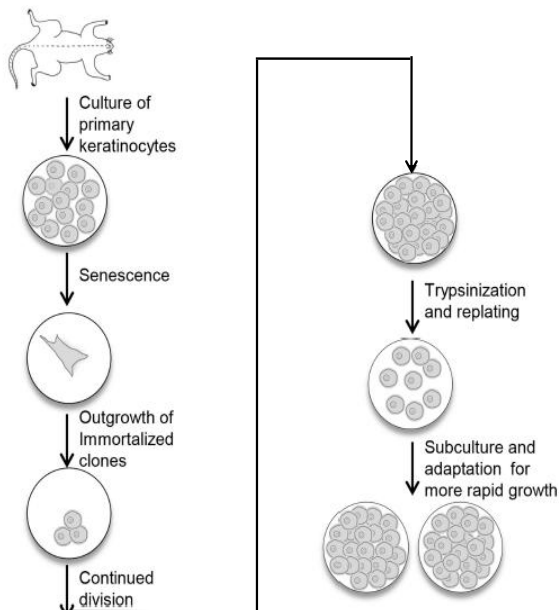
### **3. Generación y caracterización de las líneas de queratinocitos inmortalizados**

#### **3.1 Generación y mantenimiento de la línea de queratinocitos DKO**

Hemos llevado a cabo la inmortalización de queratinocitos epidérmicos primarios de ratón procedentes de ratones adultos DKO (Reichelt y Haase 2010), siguiendo el mismo protocolo usado para la generación y caracterización de las líneas inmortalizadas deficientes en GR (GR<sup>EKO</sup>; Sevilla et al. 2013), y MR (MR<sup>EKO</sup>; Boix et al. 2016b) (Figura 17).

Utilizamos hembras de 8 semanas de edad que, tras el sacrificio, se afeitaron en la región dorsal, que se desinfectó mediante inmersión en solución yodada. Después comenzamos el proceso de separación de la epidermis. Para ello es necesario estirar la piel en una placa Petri para poder eliminar, con la ayuda de un bisturí, toda la grasa subcutánea. Se volteó la piel para poder añadir debajo de la dermis 1 ml de tripsina 0.25% (Sigma) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente la epidermis se separó

fácilmente y se troceó en un medio de cultivo de queratinocitos para disgregarlos (Tabla 4). Después este medio se filtró utilizando filtros de 100  $\mu\text{m}$  de diámetro, y se centrifugó durante 5 min a 1400 rpm. Paralelamente a este proceso, preparamos frascos T75, pre-tratados con colágeno I durante mínimo 1 h a 37°C (Gibco), con fibroblastos 3T3 J2 (*feeders*) tratados con mitomicina C (Sigma) durante 2 h a 37°C para inactivarlos mitóticamente.



**Figura 17. Proceso de immortalización de queratinocitos primarios de ratón.** Tras el aislamiento de los queratinocitos epidérmicos, las células se cultivan a largo plazo en medio de cultivo para queratinocitos. En pocas semanas aparecen células senescentes y, finalmente, surgen pequeñas colonias que tienen un crecimiento más lento. Una vez se recupera la confluencia, las células se subcultivan y vuelven a llenar lentamente el frasco. Después de varios pases, las células se adaptan a las condiciones de cultivo y se subcultivan fácilmente manteniendo una morfología normal y siendo inmortales. Modificado de Hammiller et al. 2015.

Los queratinocitos se añadieron a los fibroblastos y se cultivaron a 32°C, 5% de CO<sub>2</sub>, cambiando el medio cada 48 h. Durante los primeros pases se dejó que los frascos llegasen a subconfluencia y se dividían 1:1, de modo que muchos de los queratinocitos se morían por senescencia programada. Los que sobrevivían, adquirirían mutaciones de forma

espontánea y se immortalizaban (Figura 17). Para realizar un pase de queratinocitos, tratamos primero el frasco T75 con Versene (EDTA 0,02%) durante 5 min a 37°C para eliminar los fibroblastos, y después con tripsina-EDTA 1x durante 5 min a 37°C para despegar los queratinocitos y resuspenderlos en medio de queratinocitos. Posteriormente, se contaron los queratinocitos mediante una cámara de Neubauer (Fisher), y se sembró la cantidad deseada en un frasco pre-tratado con colágeno y con fibroblastos inactivados con mitomicina C.

**Tabla 4. Composición del medio de cultivo para las líneas celulares de queratinocitos immortalizados.** Concentración de cada componente y casa comercial.

Medio DMEM-Ham's 7.5% FBSi con bajo calcio	
3:1 DMEM (sin calcio)-Ham's F12	Thermo Fisher Scientific/Biowest
7,5% FBSi: Suero Fetal Bovino inactivado	Biowest
0.35 mM CaCl <sub>2</sub>	Sigma
0.18 mM Adenina	Sigma
2 mM glutamina	Biowest
5 µg/ml Insulina	Sigma
10 <sup>-10</sup> 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

Los fibroblastos se mantuvieron en un medio convencional (Tabla 5). Cuando se cultivaron de forma individual en frascos T75 y llegaron a confluencia, se despegaron usando tripsina-EDTA 1x.

**Tabla 5. Composición del medio de cultivo para los fibroblastos 3T3 J2.** Concentración de cada componente y casa comercial.

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

La visualización y documentación de los cultivos se hizo mediante un microscopio invertido de contraste de fases Zeiss Axiovert 25 (objetivo 10x) y una cámara Canon acoplada a dicho microscopio.

### **3.2 Citometría de flujo**

La citometría de flujo se utilizó para determinar el tamaño celular (Forward Scatter Channel, FSC) y la complejidad celular (Side Scatter Channel, SSC) en los queratinocitos.

Después de la tripsinización, resuspensión en su medio de cultivo, y lavado con PBS (Lonza), los queratinocitos se resuspendieron en una solución que contiene PBS y BSA 2% (Sigma), y se evaluó el FSC y el SSC en el citómetro de flujo BD FACS Canto (Franklin Lakes). El análisis de los resultados se llevó a cabo utilizando el software FlowJo (BD Biosciences).

### **3.3 Ensayo de proliferación**

Los queratinocitos se tripsinizaron y plaquearon en placas de 96 pocillos a una densidad de 250 células/pocillo; el ensayo se realizó los días 0, 3, 5 y 7, mediante el uso del kit CellTiter 96® AQueous One Solution (Promega). Brevemente, se añadió al medio de cultivo de las células 20 µl del reactivo MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium inner salt) y se incubó durante 3 h a 37°C, dando como resultado un cambio de color del medio. Finalmente se midió la absorbancia (490 nm) de cada pocillo en el espectrofotómetro, que es directamente proporcional a la cantidad de células vivas en el medio.

### **3.4 Tratamientos de los queratinocitos en cultivo**

Para evaluar la respuesta a GCs en cultivo, los queratinocitos se incubaron previamente (al menos 16 h antes del tratamiento) con medio que contenía suero tratado con carbón (7.5%) para eliminar las hormonas

esteroideas (Tabla 4). Las células se incubaron con Dex 100 nM durante los tiempos indicados.

Para los ensayos con inhibidores farmacológicos, las células se incubaron con el inhibidor de p38 BIRB196 (1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M), o el inhibidor de ERK U0216 (1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M y 10  $\mu$ M) durante 24 h a 37°C.

### 3.5 Plásmidos, transfecciones y ensayos luciferasa

En este trabajo, hemos generado dos construcciones GR $\alpha$  nuevas, una sin etiqueta (pcDNA3-GR) y la otra con una etiqueta HA en el extremo N-terminal (pcDNA3-HAGR). El cADN que codifica para GR de pSV2Wrec (Danielsen, Northrop y Ringold 1986) se amplificó mediante PCR y se subclonó en los sitios *Bam*H1-*Xho*I de pcDNA3 (Invitrogen).

Los ensayos de rescate de función transitoria en queratinocitos DKO se realizaron mediante transfección con los plásmidos pcDNA3-GR y pcDNA4-MR (Aguilar-Sánchez et al. 2012). Las transfecciones para los ensayos luciferasa se realizaron utilizando combinaciones de los siguientes plásmidos: pcDNA4 (ThermoFisher), pcDNA4-MR, pcDNA3-GR y/o los distintos *reporter FireFly* luciferasa GRE-luc (pGRE2EIB-Luciferase, Allgood, Oakley, y Cidlowski 1993), NF- $\kappa$ B-luc (pGL3-NF-KB-5x-Luciferase, Torres y Watt 2008), AP-1-luc (-73/+63 Collagenase-Luciferase, Schüle et al. 1991) y TCF/LEF-luc (TOPFLASH/FOPFLASH, Milipore, Sigma). En estos ensayos, además se utiliza un control interno *renilla*-luc (pRLSV40 Renilla, Promega). Para el ensayo de inmunofluorescencia transfectamos las construcciones pcDNA3-HAGR y pcDNA4-GFP-MR (Danielsen, Northrop y Ringold 1986) cedida por el grupo de Diego Álvarez (ULL, Tenerife).

Para las transfecciones, se plaquearon los queratinocitos en placas de 24 pocillos hasta alcanzar una confluencia del 70-80%. Se añadió el ADN exógeno (480 ng) utilizando lipofectamina 2000 (Invitrogen) y solución Opti-

MEM™, y se incubó esta mezcla 5 min a RT. Después se añadieron 50µl de dicha mezcla a los pocillos correspondientes y se incubaron las placas 5 h a 37 °C. A continuación, y después de lavar con PBS, se añadió medio fresco de queratinocitos o medio charcoal (si las células se tratan con Dex).

Tras 12 h, y dependiendo del experimento, las células se trataron con Dex o con el inhibidor farmacológico correspondiente (ver apartado 3.4). Después se procedió a realizar el ensayo luciferasa con el kit Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega) según indicaciones del proveedor. Brevemente, las células se lisaron y se transfirieron en placas blancas de 96 pocillos Sterilin™ Microtiter™ (Fisher). Después se determinó la *FireFly* luciferasa en el espectrofotómetro añadiendo a la placa el reactivo *luciferase assay reagent II* (LAR II) que generó una señal luminiscente estable. Tras la cuantificación de la señal, la reacción se paró con la adición del reactivo Stop & Glo® y se inició simultáneamente la reacción de la *renilla*-luc produciendo una señal lumínica estable que decayó lentamente en el transcurso de la medición.

En los experimentos que utilizan *reporter* luciferasa, la señal correspondiente estaba asociada a la transactivación de secuencias GRE, NF-κB, o AP-1, que dirigen la expresión del *reporter*; la señal correspondiente a *renilla* sirvió como control de transfección, siendo indicativa de la cantidad de plásmido transfectado.

### **3.6 Inmunofluorescencia de células en cultivo**

Los experimentos de inmunofluorescencia se realizaron para detectar p65 endógeno, o GR (pcDNA3-HAGR) y MR (pcDNA4-GFP-MR) transfectados en células DKO.

Los queratinocitos se cultivaron sobre cubreobjetos previamente tratados con colágeno hasta alcanzar una confluencia aproximada del 80%, y se realizaron los tratamientos indicados (ver apartado 3.4). Después, las



células se fijaron con PFA 4% durante 10 min a RT, seguido de varios lavados con PBS 1x. Las células se permeabilizaron con Tritón X-100 0.2% en PBS 1x durante 5 min y se volvieron a lavar con PBS 1x. Después se añadió una solución de bloqueo (suero de burro 5% y BSA 0.5% en PBS) durante 1 h a RT y se añadió el anticuerpo primario (Tabla 6) diluido en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C.

Pasadas 12 h, se eliminó el exceso de anticuerpo primario lavando con PBS 1x, y se añadió el anticuerpo secundario (Tabla 6) y DAPI 1x durante 1 h a RT. Después de varios lavados con PBS 1x, los cubres se montaron con Mowiol y se visualizaron/fotografiaron en el microscopio vertical utilizando el objetivo de 40x.

**Tabla 6. Anticuerpos utilizados en inmunofluorescencia de queratinocitos.** Anticuerpos primarios y secundarios específicos para inmunofluorescencia, dilución, especie y casa comercial.

Anticuerpo		Dilución	Especie	Compañía
Primarios	GFP ab290	1/100	Conejo	Abcam
	HA-11	1/2000	Ratón	Covance
	p65-Nf-κB (sc-372)	1/50	Conejo	Santa Cruz
			Compañía	
Secundarios	Alexa fluor 555 anti-conejo	1/100	Life Technologies	
	Alexa fluor 488 anti-ratón	1/100	Life Technologies	

### 3.7 Proximity ligation assay (PLA)

El ensayo Duolink® Proximity Ligation Assay (PLA, Sigma) permite detectar *in situ* interacción entre proteínas endógenas con alta especificidad y sensibilidad. El protocolo incorpora pequeñas variaciones respecto a las especificaciones técnicas comerciales, para detectar GR y MR utilizando los dos anticuerpos primarios específicos (Jiménez-Canino et al. 2016).

Las células DKO transfectadas con pcDNA3-HAGR y pcDNA4-GFP-MR (1:1), y tratadas con Dex 100nM 16h (ver apartado 3.4), se fijaron con PFA 4% durante 30 min. Después de varios lavados con PBS 1x, las células

se permeabilizaron con tritón X-100 al 0.2% durante 5 min. A continuación, los queratinocitos se incubaron con la solución de bloqueo (suero de burro 5% y BSA 0.5% en PBS) durante 1 h a 37°C en cámara oscura, seguido de los anticuerpos primarios diluidos en la solución *Antibody Diluent* del kit durante toda la noche a 4°C (Tabla 7).

**Tabla 7. Anticuerpos utilizados para el ensayo PLA.** Anticuerpos primarios para el ensayo, dilución, especie y casa comercial.

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

Al día siguiente, se lavó el exceso de anticuerpo primario con tampón de lavado A del kit y se incubaron los queratinocitos con los anticuerpos secundarios de conejo y ratón, a las concentraciones indicadas por el fabricante, y DAPI 1x durante 1 h a 37°C. Estos anticuerpos secundarios se denominan sondas PLA porque cada una de ellas contiene una pequeña secuencia complementaria de ADN. Cuando estas sondas se encuentran suficientemente juntas ( $\leq 40$  nm) y en presencia de una solución que contiene ligasa durante 1 h a 37°C, sucede un proceso de ligación. Después, la adición de la polimerasa durante 1 h y 40 min a 37°C, amplifica el ADN, al incorporar múltiples oligonucleótidos marcados fluorescentemente (Sable et al. 2018; Boix et al. 2016b). Finalmente los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con el medio mowiol y se visualizaron/fotografiaron en el microscopio vertical, a un objetivo de 40x. La interacción de GR y MR se detectó debido a la emisión de un marcaje fluorescente de color rojo.

Como controles negativos se usaron células DKO transfectadas solo con una de las construcciones.

#### **4. Cultivo de fibroblastos 3T3-L1, ensayo de diferenciación y tinción Oil Red O**

Los pre-adipocitos 3T3-L1 (Zebisch et al. 2012) se cultivaron en el medio indicado (Tabla 8), y se plaquearon en placas de 24 pocillos hasta alcanzar una confluencia del 80%. Para este ensayo cultivamos pre-adipocitos 3T3-L1 en un medio basal de cultivo (Tabla 8). Las células se incubaron durante tres días con un cóctel de diferenciación (Tabla 8; Zebisch et al. 2012) y medio condicionado de queratinocitos CO o MR<sup>EKO</sup>. A partir del tercer día, y hasta el día 7, las células se incubaron con un medio basal con insulina (1 µg/ml), cambiando el medio cada 48 h. A día 7, las células se lavaron con PBS y se fijaron con formalina al 10% durante 45 min. Después se lavaron con H<sub>2</sub>O y se incubaron 5 min con isopropanol 60% antes de la tinción con Oil Red O. Para la tinción mezclamos 3 partes de la solución stock (3 mg/mL en isopropanol 100%) con 2 partes de H<sub>2</sub>O y filtramos la solución (0.2 µm). Seguidamente, las células se incubaron 20 min para su tinción, se lavaron con H<sub>2</sub>O, y se fotografiaron en el microscopio invertido Leica DMIL LED, con cámara acoplada a este microscopio Leica DMC4500 y el software Leica LAS EZ.

Para cuantificar la tinción, las células se lavaron con isopropanol 60% durante 5 min y se extrajo el tinte con isopropanol 100% para su posterior lectura en el espectrofotómetro a una absorbancia de 490 nm.

**Tabla 8. Composición del medio y del cóctel de diferenciación utilizados para el ensayo de diferenciación de los pre-adipocitos 3T3-L1.** Concentración de cada componente y casa comercial.

<b>Medio basal pre-adipocitos 3T3-L1</b>	
DMEM con calcio	Biowest
10% FBSi	Biowest
8 ng/mL Biotina	Sigma
100 u/ml Penicilina	Biowest
100 µg/ml Estreptomina	Biowest
0.25 µg/ml Anfotericina B	Biowest
<b>Cóctel de diferenciación</b>	
0.5 mM IBMX ( <i>3-isobutyl-1-methylxanthine</i> )	Sigma
1 mg/ml Insulina	Sigma
250 nM Dex	Sigma

## **5. Expresión e inmunodetección de proteínas**

### **5.1 Extracción de proteínas a partir de tejido**

Para la homogenización del tejido (piel de ratón), se introdujo la muestra en un mortero (almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ ), y se pulverizó con facilidad con la ayuda de un pistón.

A continuación, el pulverizado se resuspendió en buffer C (HEPES 20mM pH 7.9, NaCl 0.4M, EDTA 1mM, EGTA 1mM y 25% Glicerol) conteniendo DTT 0.1M e inhibidores de proteasas y fosfatasa 1x (complete Mini EDTA-free y PhosStop, Roche). Seguidamente, se lisaron las células mediante un proceso rápido de congelación y descongelación, se añadió el detergente IGEPAL al 1%, y se incubaron las muestras 15 min en hielo. Pasado este tiempo, centrifugamos las células 20 min a 10000 rpm y  $4^{\circ}\text{C}$  y recogimos el sobrenadante para medir la concentración de proteínas usando el reactivo de Bradford (BioRad) y una recta patrón de seroalbúmina bovina (BSA) de concentraciones conocidas. El resultado colorimétrico se midió en el espectrofotómetro con absorbancia de 590 nm.

### **5.2 Extracción de proteínas a partir de células**

Las células se lavaron con PBS 1x en frío y se añadió a las placas buffer RIPA 1x (NaCl 150mM, IGEPAL 1%, desoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1% y Tris-HCl 50mM pH 8.0) conteniendo inhibidores de proteasas y fosfatasa 1x. Después con la ayuda de un raspador, se despegaron las células, se resuspendieron en el buffer y se incubaron 10 min en el hielo. Posteriormente, se centrifugaron 10 min, se recogió el sobrenadante, y se determinó la concentración de proteínas. En este caso, como el tampón de lisis contenía SDS utilizamos el kit BCA (ThermoScientific) y una recta patrón de seroalbúmina bovina (BSA) de concentraciones conocidas. La reacción colorimétrica se cuantificó en el espectrofotómetro midiendo la absorbancia a 562 nm.

### 5.3 Western Blot (WB)

#### 5.3.1 Electroforesis SDS-PAGE y transferencia a membrana

Se utilizaron 20-30  $\mu\text{g}$  de proteína de cada muestra, se resuspendieron en tampón de carga Laemli (Tris-HCl 200 mM pH 6.8, SDS 8%, azul de bromofenol 0.04%, glicerol 40% y 2- $\beta$  mercaptoetanol 5%), y se incubaron a 95°C durante 10 min para la desnaturalización de las proteínas. Seguidamente, las muestras se resolvieron en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 8% ó 10%, según el peso molecular de las proteínas de interés (Tabla 9). Se utilizó un marcador (*Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder*, Thermo Scientific, 10  $\mu\text{l}$  por minigel) para estimar el peso molecular relativo de las proteínas. Las proteínas migraron con el tampón de electroforesis (Tabla 10) a voltaje constante de 80 V durante 2-3 h utilizando una fuente Power Pac 3000 de Biorad.

**Tabla 9. Composición de los geles SDS-PAGE de concentración y separación.** El gel de concentración se elabora con un 5% de poliacrilamida, mientras que los geles de separación son del 8% ó 10% de poliacrilamida.

	Gel de concentración		Gel de separación	
	5%		8%	10%
H <sub>2</sub> O <sub>MQ-E</sub>	1.46 ml	H <sub>2</sub> O <sub>MQ-E</sub>	2.65 ml	2.4 ml
1M Tris-HCl pH 6.8	250 $\mu\text{l}$	1.5M Tris-HCl pH 8.8	1.25 ml	1.25 ml
poliacrilamida 40%	250 $\mu\text{l}$	poliacrilamida 40%	1 ml	1.25 ml
SDS 10%	20 $\mu\text{l}$	SDS 10%	50 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$
APS 10%	20 $\mu\text{l}$	APS 10%	50 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$
TEMED	2 $\mu\text{l}$	TEMED	5 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$
<b>VOLUMEN TOTAL</b>	<b>2 ml</b>	<b>VOLUMEN TOTAL</b>	<b>5 ml</b>	<b>5 ml</b>

Seguidamente, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Amershan Protan Premium 0.45  $\mu\text{m}$ , GE Healthcare) usando el tampón de transferencia (Tabla 10) y el equipo de transferencia semi-seco *Trans Blot SD Semi-dry Transfer Cell* (BioRad) a 80 mA por minigel

durante 1 h y 15 min. Al finalizar la transferencia se comprobó su eficiencia mediante la tinción con Ponceau-S 0.1% (Sigma) y ácido acético glacial 5%.

**Tabla 10. Composición de los tampones usados durante el *Western Blot*.**

Tampón de electroforesis		Tampón de transferencia	
Tris base	30.3 g	Tris base	0.75 g
Glicina	144 g	Glicina	3.6 g
SDS 10%	100 ml	MetOH	50 ml
H <sub>2</sub> O <sub>MQ-E</sub>	Hasta 1 L	H <sub>2</sub> O <sub>MQ-E</sub>	Hasta 250 ml

### 5.3.2 Bloqueo, incubación con los anticuerpos y revelado

La membrana se bloqueó con leche desnatada en polvo al 5% en TBST 1x, 1 h a RT y en agitación para impedir uniones inespecíficas. Después, se incubó toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario correspondiente a la concentración indicada (Tabla 11), diluido en la misma solución de bloqueo. Cuando utilizamos anticuerpos frente a proteínas fosforiladas, utilizamos una solución de BSA 5% en TBST 1x, con lavados previos con TBST 1x para eliminar cualquier traza de leche. Al día siguiente, se lavó la membrana con TBST 1x y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa (Tabla 11), diluido en la misma solución de bloqueo, y durante 1 h a RT y en agitación. Después se eliminó el exceso de anticuerpo mediante lavados con TBST 1x y se reveló la membrana en el equipo de quimioluminiscencia ImageQuant™ LAS 4000 mini (GE Healthcare). Para el revelado, se incubó la membrana 5 min con una solución *Enhanced Chemiluminescence* (ECL 2 de Pierce, ThermoScientific).

**Tabla 11. Anticuerpos utilizados para el análisis de expresión de proteína por Western Blot.** Anticuerpos primarios y secundarios específicos, dilución, especie y casa comercial.

Anticuerpo primario	Dilución	Especie	Compañía
Actina (A2066)	1/1000	Conejo	Sigma
$\beta$ -catenin (sc7199)	1/2000	Conejo	Santa Cruz
E-caderina (610181)	1/2000	Ratón	BD Biosciences
ERK(2) (sc-154)	1/3000	Conejo	Santa Cruz
GR (sc-1004)	1/1000	Conejo	Santa Cruz
I $\kappa$ B $\alpha$ (sc-371)	1/1000	Conejo	Santa Cruz
IL-1 $\beta$ (sc7884)	1/500	Conejo	Santa Cruz
JNK (sc-474)	1/1000	Conejo	Santa Cruz
K5 (PRB-160P)	1/4000	Conejo	Biologend
Lamina (sc-6214)	1/200	Cabra	Santa Cruz
MKP1/2 (sc-1102)	1/250	Conejo	Santa Cruz
MR (ab64457)	1/500	Conejo	Abcam
p38 $\alpha$ (sc-535)	1/1000	Conejo	Santa Cruz
p63 (sc-8431)	1/1000	Ratón	Santa Cruz
p65-NF- $\kappa$ B (sc-372)	1/1000	Conejo	Santa Cruz
p-ERK (p44/p42)	1/2000	Conejo	Cell Signalling
p-GR Ser211 (4161S)	1/2000	Conejo	Cell Signalling
p-JNK (#9251S)	1/500	Conejo	Cell Signalling
p-p38 (#9211s)	1/1000	Conejo	Cell Signalling
S100A8 (AF3059)	1/500	Cabra	R&D Systems
Tubulina (T6199)	1/5000	Ratón	Sigma
Anticuerpo secundario	Dilución	Compañía	
anti-cabra	1/2000	Jackson Immunoresearch	
anti-conejo (NA934)	1/2000	GE Healthcare	
anti-ratón (NA931)	1/2000	GE Healthcare	

### 5.3.3 Cuantificación y normalización de la expresión

Las bandas obtenidas se cuantificaron mediante el programa Image J y se normalizaron asignando a la muestra control del experimento el valor arbitrario de 1. Los resultados se relativizaron a los controles de carga actina (para tejido) o tubulina (para células) o, en el caso de las proteínas fosforiladas, a las proteínas totales.

### **5.3.4 Reutilización de la membrana**

Para poder reutilizar la membrana, realizamos un *stripping* que elimina los anticuerpos adheridos. Dependiendo de la intensidad de la señal, incubamos la membrana con distintas soluciones: SDS 2%, Tris-HCl 62.5 mM y 2-β mercaptoetanol 0.7%) durante 20 min a 55°C (intensidad de señal elevada), ó Glicina 200 mM pH 2.5 y SDS 0.4% durante 30 min a RT y agitación (intensidad de señal débil). Para finalizar eliminamos esta solución con Tris 1M pH 7.5 durante 1min.

## **6. Análisis de expresión génica**

### **6.1 Procesamiento de las muestras y extracción de ARN**

Previamente a la extracción del ARN, las muestras de piel se homogeneizaron en TRizol (Invitrogen) usando un Polytron durante 1 min a máxima potencia. Las células en cultivo se lavaron con PBS 1x, se levantaron de la placa con 1 ml de TRizol, se centrifugaron 10 min a 10000 rpm y 4°C, y se recogió el sobrenadante. Seguidamente se añadieron 100 µl de BCP (1-Bromo-3-chloropropane, Sigma) al sobrenadante, se agitó vigorosamente la mezcla durante 15 segundos, y se dejó incubando durante 10 min a RT. Después se centrifugaron las muestras durante 15 min a 11400 rpm a 4°C. Se recogió la fase superior transparente que contenía el ARN, se mezcló con 500 µl de isopropanol por inversión, se incubó 10 min a RT, y se centrifugó 10 min a 11400 rpm a 4°C. El pellet resultante se lavó dos veces con 1 ml de EtOH 75% diluido en H<sub>2</sub>O libre de nucleasas. Tras el último lavado, se dejó secar el pellet en campana de extracción durante 10 min a RT. Para finalizar se añadió una cantidad adecuada de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas y se resuspendió el pellet incubando las muestras en el termobloque a 55°C durante 10 min y 300 rpm. Para determinar la



concentración de ARN se utilizó el equipo NanoDrop. La ratio A260/280 fue alrededor de 2, indicando una buena calidad del ARN.

## 6.2 Síntesis de ADN complementario (cADN)

A partir de 1 µg de ARN aislado de piel o queratinocitos, realizamos una reacción de transcriptasa inversa. Para ello utilizamos como cebadores 1µl de oligo dT (Thermofisher) que se incubó con la muestra 5 min a 65°C. Después se añadió en frío, hasta un volumen final de 12 µl, una mezcla con tampón de reacción 1x, dNTPs 2 mM, inhibidor de ARNasa (20 U/µl) y transcriptasa reversa (200 U/µl) (kit Thermo Scientific), y se incubó la mezcla 1 h a 42°C, seguido de 10 min a 70°C. Finalmente se diluyó el cADN 1/10 para obtener la concentración adecuada para la qPCR.

## 6.3 PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)

Para realizar la qPCR se preparó una mezcla de reacción que contenía 4 µl de cADN 1/10 y 16 µl de una solución con 0.6 µl de cada cebador (5' y 3', secuencia en Tabla 12), 10 µl de *FastStart Universal SYBR Green Master* (Roche) con ROX y H<sub>2</sub>O libre de nucleasas hasta un volumen final de 20 µl. La reacción se llevó a cabo en placas de 96 pocillos y en uno de los termocicladores disponibles: 7500 Fast o QuantStudio 5 (Applied Biosystems). El programa que utilizamos es el siguiente: 20 segundos a 50°C y 10 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de reacción (desnaturalización durante 15 segundos a 95°C y extensión de 1 min a 60°C). El gen de referencia utilizado en todos los casos es *Hprt1*.

**Tabla 12. Secuencias 5' y 3' de los cebadores utilizados para qPCR.**

Gen	Secuencia oligonucleótidos	
<i>Adipoq</i>	5'	CACACCAGGCCGTGATGGCA
	3'	GAAGCCCCGTGGCCCTTCAG
<i>Camp</i>	5'	CAAGGAACAGGGGGTGG
	3'	TCTGGCTGAGGTACAAGTTT
<i>Ccnd1</i>	5'	CATCAAGTGTGACCCGGACTG
	3'	CCTCCTCCTCAGTGGCCTTG

Gen	Secuencia oligonucleótidos	
<i>Dcn</i>	5'	TTCGCATCTCAGACACCAAC
	3'	ATGAGGAACATTGGCCAGAC
<i>Ddit4</i>	5'	GGGCCGGAGGAAGACTCCTCATA
	3'	CTGTATGCCAGGCGCAGGAGTTC
<i>Dusp1</i>	5'	CTCCACTCAAGTCTTCTTTCTCC
	3'	TAGGCACTGCCCAGGTAC
<i>Dusp4</i>	5'	GTCGAAGACAACCACAAGGC
	3'	CGCCCTCGACAGTCCTTTAC
<i>Fabp4</i>	5'	AATCACCCGACAGCAGACAGG
	3'	AACTCTTGTGGAAGTCACGC
<i>Fkbp51</i>	5'	CTTGACCACGCTATGGTTT
	3'	AACGACTCTGAGGC TTGGA
<i>Foxm1</i>	5'	CACTTGGATTGAGGACCACTT
	3'	GTCGTTTCTGCTGTGATTCC
<i>Hprt1</i>	5'	TCAGTCAACGGGGACATAAA
	3'	GGGGCTGTACTGCTTAACCAG
<i>Hsd11b1</i>	5'	GGAGCCGCACTTATCTGAA
	3'	GACCTGGCAGTCAATACCA
<i>Hsd11b2</i>	5'	CTGCAGATGGATCTGACCAA
	3'	GTCAGCTCAAGTGCACCAAA
<i>Il1b</i>	5'	GCAACTGTTCTGA ACTCAACT
	3'	ATCTTTGGGGTCCG TCAACT
<i>Il17f</i>	5'	CCCAGGGCTGTTCTAATCCTT
	3'	GACACAGGTGCAGCCACCTT
<i>Il6</i>	5'	GATGCTACCAA ACTGGATATAATC
	3'	GGTCC TTAGCCACTCCTTCTGTG
<i>Klf9</i>	5'	CAGTGGCTGTGGGAAAGTCT
	3'	GAGCGCGAGA ACTTTTTAAGG
<i>Krt1</i>	5'	TGGGAGATTTTCAGGAGGAGG
	3'	GCCACACTCTTGGAGATGCTC
<i>Krt77</i>	5'	GAGCAAAGATGAGGCTGAGG
	3'	CCTCCGCATCAGAAATCAAT
<i>Lcn2</i>	5'	GGCCCTGAGTGCATGTGC
	3'	TTCTGATCCAGTAGCGACAGC
<i>Lox11</i>	5'	AAGGCACAGCGGACTTTCTC
	3'	GAACTCGTCCATGCTGTGGTAA
<i>Mmp3</i>	5'	CCAGGTGTTGACTCAAGGGTGGAA
	3'	ACACAGGATGCC TTCC TTGGATCTC
<i>Nr3c1</i>	5'	TGCTATGCTTTGCTCCTGATCTG
	3'	TGTCAGTTGATAAAAACCGCTGCC
<i>Nr3c2</i>	5'	GTGGACAGTCCTTTCACTACCG
	3'	TGACACCCAGAAGCCTCATCTC
<i>P3h2</i>	5'	TGCTAAAACCGTGACTGCCT
	3'	TTACGCCATGAGGGTTCTC
<i>Pparg</i>	5'	AAGAAGCGGTGAACCACTGA
	3'	GGAATGCGAGTGGTCTTCCA
<i>S100a8</i>	5'	GGAGTTCTTTGCGATGGTGAT
	3'	TCTGCTACTCCTTGTGGCTGTCT
<i>Slpi</i>	5'	TGGCACCTTGACTGTGGAAGG
	3'	CCCGTCCCTCTGGCAGACAT

Gen	Secuencia oligonucleótidos	
<i>Spr2d</i>	5'	TGGTACTCAAGGCCGAGA
	3'	TTTGTCTGATGACTGCTGAAGAC
<i>Timp3</i>	5'	CTTCTGCAACTCCGACATCGT
	3'	GGGGCATCTTACTGAAGCCTC
<i>Tnfa</i>	5'	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT
	3'	GCTACGACGTGGGCTACAG
<i>Tslp1</i>	5'	CCAGGCTACCCTGAAACTGA
	3'	TCTGGAGATTGCATGAAGGA
<i>Vim</i>	5'	GAAATTGCAGGAGGAGATGC
	3'	TCCACTTCCGTTCAAGGTC
<i>Zbtb16</i>	5'	CCCAGTTCTCAAAGGAGGATG
	3'	TTCCACACAGCAGACAGAAG
<i>Zfp36</i>	5'	CCACCTCTCTCGATACAAGA
	3'	GCTTGCGAAGTTCACCCA

## 6.4 Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

La inmunoprecipitación de cromatina se llevó a cabo en la línea de queratinocitos DKO transfectados con pcDNA3 y pcDNA4-MR ó pcDNA3-GR y pcDNA4-MR (1:1), utilizando un anticuerpo frente a MR. Este ensayo se realizó siguiendo las especificaciones del kit ChIP de Millipore con pequeñas modificaciones (Sevilla et al. 2010). Los queratinocitos se plaquearon en placas p100 y se cultivaron hasta llegar a una confluencia del 85%. Después de una noche de incubación con medio Charcoal, las células se trataron en presencia o ausencia de Dex (ver apartado 3.4). El tratamiento se paró fijando las células y las uniones proteína-ADN con formaldehído al 1% durante 10 min a RT. Después se lisaron las células en tampón de lisis con inhibidores de proteasas y fosfatasas durante 10 min en hielo (Tabla 13). Para la sonicación, se usó un sonicador Bioruptor (Diagenode) a máxima potencia en tres rondas de 10min con ciclos de apagado/encendido de 30 segundos. Entre las distintas rondas, las muestras se agitaron con vórtex y se centrifugaron para mezclarlas bien.

Para la inmunoprecipitación, se resuspendieron 200  $\mu$ l de la muestra sonicada en 1.8 ml de tampón de dilución con inhibidores de proteasas y fosfatasas (Tabla 13). Después, se incubaron las muestras durante 2 h a 4°C y en rotación con 15  $\mu$ l de bolas magnéticas conjugadas con proteína A

(Dynabeads® Protein A, Invitrogen) para asegurar una inmunoprecipitación específica. A continuación, se eliminaron las uniones inespecíficas mediante un imán DynaMag™-2 (Invitrogen). El sobrenadante lo pasamos a otro tubo separando por una parte el *input* (40 µl), y por otra la muestra para la inmunoprecipitación. Esta se realizó utilizando 2 µg del anticuerpo anti-MR (sc11412, Santa Cruz) durante toda la noche, en rotación a 4°C.

Tras la unión del anticuerpo a los complejos MR-cromatina, se incubaron las muestras con 25 µl de bolas magnéticas durante 2 h a 4°C y en rotación para permitir la unión del anticuerpo a la proteína A. Los complejos unidos a las bolas se lavaron con distintas soluciones de lavado (Tabla 13).

Para la elución de los complejos, incubamos los inmunoprecipitados con el tampón de elución durante 15 min a 300 rpm y 25°C y recogimos el sobrenadante con ayuda del imán (Tabla 13).

**Tabla 13. Composición de los tampones (arriba) y de las soluciones de lavado usados en el ChIP (abajo).**

Tampón de lisis	Tampón de dilución	Tampón de elución
1% SDS	0.01% SDS	1% DSD
10mM EDTA	1.1% Triton X-100	0.1M NaHCO <sub>3</sub>
50mM Tris-Hcl pH 8.1	16.7mM Tris-Hcl pH 8.1	
	167 mM NaCl	

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 8.1
2 mM EDTA	2 mM EDTA	1 mM EDTA	
20 mM Tris-Hcl pH 8.1	20 mM Tris-Hcl pH 8.1	10 mM Tris-Hcl pH 8.1	
150 mM NaCl	500 mM NaCl		

Para liberar el ADN de la proteína A, las muestras se incubaron con NaCl 5 M toda la noche 65°C. Seguidamente, se eliminó el ARN contaminante con ARNasa A, y los restos de proteína con proteinasa K.

Este proceso finalizó con una purificación con una solución de fenol:cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) saturado con Tris 10 mM pH 8 y EDTA 1 mM.

Para usar este ADN en una RT-qPCR, la muestra se diluye 1/4. A partir del MR ChIP, determinamos el reclutamiento a las secuencias reguladoras de *Gilz* previamente identificadas por ChIP-seq, utilizando los cebadores específicos (5': GGAGGGAATGCAACTGGGAG y 3': CCCCTCCCTTGAATGCTGAA; Sevilla et al. 2015), en presencia o ausencia de Dex. Los valores finales fueron normalizados a los valores de amplificación de los *inputs*.

## **7. Análisis estadístico**

El tamaño de la muestra se indica en cada caso, e incluye como mínimo n=3 réplicas biológicas. Los datos experimentales fueron analizados mediante el uso de los programas informáticos Microsoft Excel e *IBM SPSS Statistics 25*. En todas las gráficas se muestran los valores de los promedios  $\pm$  su desviación.

Para las comparaciones entre dos grupos experimentales usamos la prueba *t* de *Student* (*unpaired two-tailed t-test*).

Cuando el estudio implicaba más de dos grupos experimentales los valores se relativizan a un control del experimento. Para el análisis estadístico fue necesaria una transformación logarítmica de estos datos y un test de *Levene* para determinar si las muestras de los distintos grupos tenían una varianza similar. Después se aplicó la prueba ANOVA, que si resultaba estadísticamente significativa iba seguida de la prueba *post hoc Tukey* para comparaciones múltiples. Los *p* valores menores de 0.05 han sido considerados estadísticamente significativos.





# **RESULTADOS**







## **1. Generación y caracterización de ratones con inactivación combinada de GR y MR específica de la epidermis (GR/MR epidermal knock-out o Double Knock-Out/DKO)**

### **1.1. Generación de ratones GR/MR epidermal knock-out o Double Knock-Out/DKO**

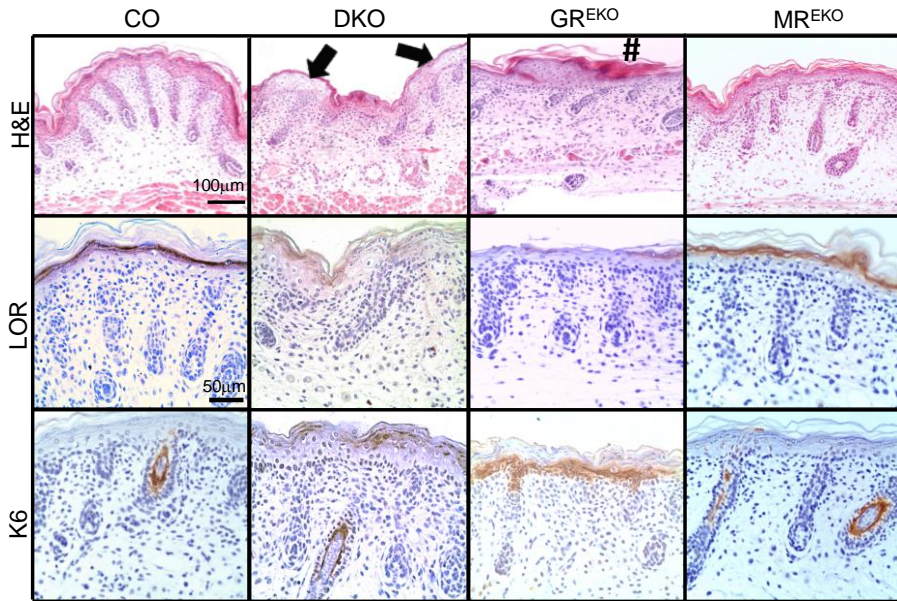
Los ratones con inactivación conjunta de GR y MR específica de la epidermis se han generado mediante la estrategia Cre/loxP, a partir de ratones K5-cre (Ramirez et al. 2004) y ratones MR<sup>loxP/loxP</sup>//GR<sup>loxP/loxP</sup> donde el exón 3 de ambos genes (Berger et al. 2006; Tronche et al. 1999) está flanqueado por secuencias loxP. Después de sucesivos cruces, obtuvimos una progenie de animales K5Cre<sup>+/-</sup>//MR<sup>loxP/loxP</sup>//GR<sup>loxP/loxP</sup> (GR/MR epidermal knock out o Double Knock-Out, DKO) y 0Cre MR<sup>loxP/loxP</sup>//GR<sup>loxP/loxP</sup> (control; CO). Las secuencias reguladoras de la K5 dirigen la expresión de CRE a la capa basal de la epidermis y otros epitelios estratificados que incluyen folículo piloso, glándulas sudoríparas y glándulas sebáceas. En los epitelios indicados de ratones DKO, se elimina el exón 3 de los receptores “floxeados”, resultando en la pérdida de expresión funcional de GR y MR; los ratones DKO son viables y fértiles.

La inactivación de GR y MR se verificó por RT-qPCR mediante el análisis de la expresión de los genes *Nr3c1/GR* y *Nr3c2/MR* a partir de la epidermis dorsal de ratones recién nacidos DKO y CO (Figura 20).

### **1.2. Análisis histopatológico y molecular de los ratones DKO durante el desarrollo. Estudio comparativo de ratones DKO, GR<sup>EKO</sup> y MR<sup>EKO</sup>**

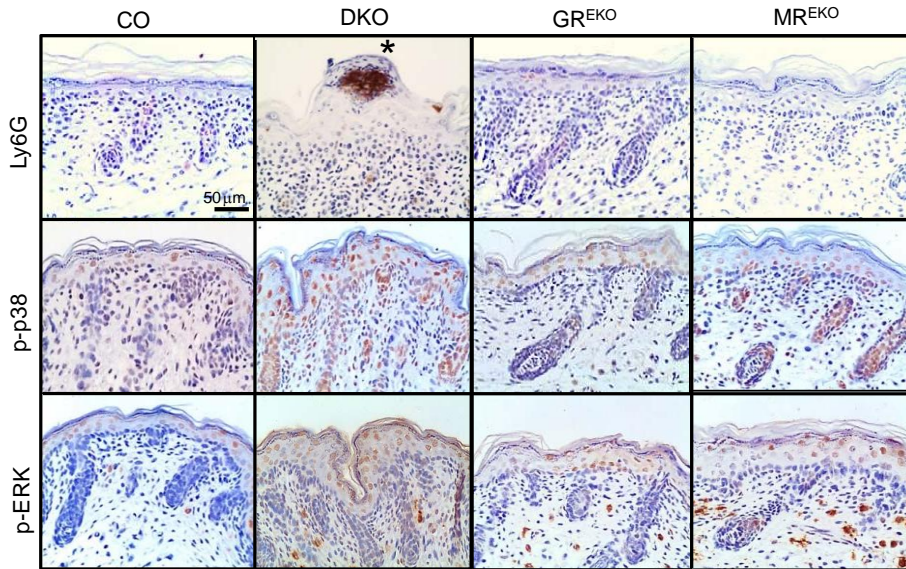
El análisis previo del fenotipo cutáneo de ratones GR<sup>EKO</sup> y MR<sup>EKO</sup> de edad P0 demostró defectos severos en la epidermis de los animales GR<sup>EKO</sup>, mientras que los animales MR<sup>EKO</sup> no presentaron anomalías evidentes (Boix et al. 2016b; Sevilla et al. 2013). Las alteraciones en proliferación y diferenciación epidérmicas en ratones GR<sup>EKO</sup> P0 sugieren que GR -pero no MR- juega un papel importante durante el desarrollo. Para entender cuál es la contribución relativa de GR y MR durante el desarrollo cutáneo, analizamos las consecuencias de la falta combinada de ambos receptores en la epidermis de ratones DKO en la etapa perinatal.

En primer lugar, realizamos una caracterización histológica de ratones DKO P0 mediante tinción H&E. Mientras que la epidermis de los ratones CO estaba completamente estratificada, los DKO mostraron defectos fenotípicos severos con regiones en la epidermis donde los queratinocitos no estaban organizados y no se aplanaban suprabasalmente; además detectamos una reducción drástica del estrato córneo (Figura 18). Esto indica que la pérdida conjunta de GR y MR en la epidermis da lugar a importantes defectos en diferenciación y proliferación. A continuación, analizamos mediante inmunohistoquímica la expresión de loricrina (LOR), marcador de diferenciación, y la queratina(K) 6, cuya expresión está restringida al folículo piloso en esta etapa del desarrollo (Figura 18). En los ratones CO, la expresión de LOR estaba restringida a la capa granular y K6 se detectó exclusivamente en los folículos pilosos. En cambio, en los ratones DKO observamos una expresión drásticamente reducida y parcheada de LOR, así como una expresión anómala de K6 en la capa granular de la epidermis. Estas alteraciones sugieren un estado patológico en los ratones DKO recién nacidos. Además, la comparativa histológica con los ratones GR<sup>EKO</sup> y MR<sup>EKO</sup> P0 mostró que, aunque la falta de GR epidérmico tenía un impacto relevante en el desarrollo de la piel, la inactivación combinada de ambos receptores, GR y MR, daba lugar a un fenotipo mucho más severo.



**Figura 18.** Los ratones DKO muestran defectos severos en diferenciación y proliferación epidérmica más acentuados que los de GR<sup>EKO</sup> y MR<sup>EKO</sup>. Imágenes representativas de piel dorsal de ratón CO, DKO, GR<sup>EKO</sup> y MR<sup>EKO</sup> P0. Se muestra tinción H&E e inmunohistoquímica utilizando anticuerpos específicos frente a loricrina (LOR) y queratina (K6). Flechas: defectos severos en diferenciación y ausencia de estrato córneo. Almohadilla: desprendimiento del estrato córneo. Barras: 100 μm y 50 μm.

Además, los ratones DKO mostraron un fenotipo inflamatorio único caracterizado por la presencia de microabscesos epidérmicos con infiltrados de neutrófilos, como revela el marcaje con el anticuerpo Ly6G (Figura 19). Este fenotipo no se observó en los ratones GR<sup>EKO</sup> o MR<sup>EKO</sup>, y es una característica distintiva de la psoriasis (Johnson-huang et al. 2012). Esta enfermedad cutánea se caracteriza por la alteración de distintas vías pro-inflamatorias, con un aumento de actividad en las MAPKs p38 y ERK (Johansen et al. 2005). Un análisis inmunohistoquímico utilizando anticuerpos frente a p-p38 y p-ERK (Figura 19), mostró un aumento constitutivo en la actividad de ambas MAPKs en la piel de los ratones DKO respecto a los CO. Este aumento también se observó en los ratones GR<sup>EKO</sup> y MR<sup>EKO</sup> pero en menor medida.



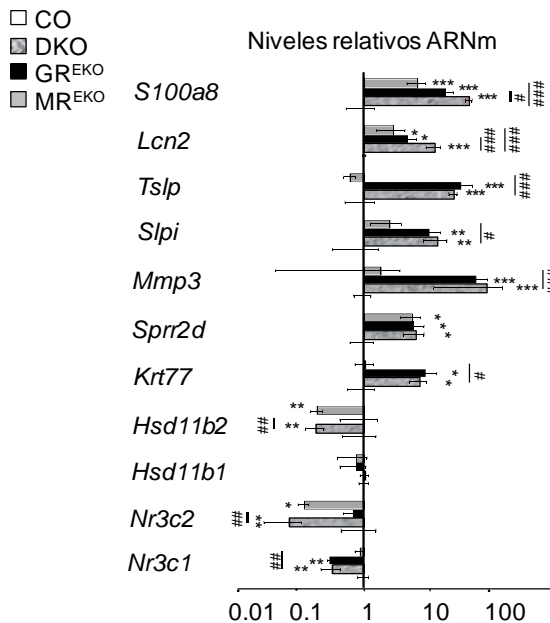
**Figura 19.** Los ratones DKO presentan un fenotipo cutáneo inflamatorio único que correlaciona con niveles constitutivamente elevados de p-p38 y p-ERK. Inmunohistoquímicas de piel dorsal de ratones CO, DKO, GR<sup>EKO</sup> y MR<sup>EKO</sup> (P0) utilizando anticuerpos específicos frente a Ly6G, p-p38 y p-ERK. Asterisco: microabsceso epidérmico. Barra: 50  $\mu$ m.

Para analizar si estas alteraciones daban lugar a cambios en la expresión génica, aislamos epidermis de recién nacidos de todos los genotipos, y evaluamos mediante RT-qPCR la expresión de genes relacionados con distintos procesos (Figura 20). La figura 20 confirma la falta de expresión de *Nr3c1/GR*, *Nr3c2/MR*, o ambos, en los genotipos GR<sup>EKO</sup>, MR<sup>EKO</sup> y DKO, respectivamente. A continuación analizamos la expresión de los enzimas Hsd11 $\beta$ 1 y -2, que regulan la interconversión de los GCs activos e inactivos (Chapman et al. 2013). Mientras que la expresión de *Hsd11b1* no estaba afectada por la pérdida de GR o MR, los niveles de *Hsd11b2* estaban reducidos en DKO y MR<sup>EKO</sup>, revelando que MR ejerce un papel importante en la regulación de esta isoforma (Figura 20).

El análisis muestra que los ratones DKO y GR<sup>EKO</sup> presentaban un aumento en la expresión de genes relacionados con la diferenciación epidérmica, *Krt77* y *Spr2d*, así como en genes pro-inflamatorios *Mmp3*,

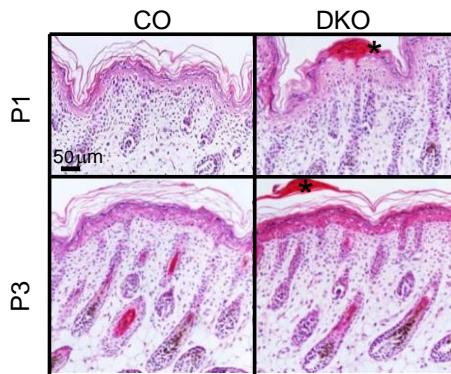
*Tslp* y *Secretory leukocyte peptidase inhibitor (Slpi)*, indicando que GR controla la expresión de genes relacionados con estos procesos. Por el contrario, y con la excepción de *Spr2d*, la ausencia de MR *per se* no tenía un impacto en la expresión de estos genes (Figura 20). Esto correlaciona con datos previos, donde se demostró que una situación de inflamación aguda en modelos de ratones con inactivación o disfunción de GR, inducía la expresión de genes pro-inflamatorios (Hua et al. 2016).

Sin embargo, la expresión de los genes pro-inflamatorios *Lcn2* y *S100a8* aumentó en la epidermis de los KO individuales, y mostró un aumento aditivo en los ratones DKO, lo que sugiere que ambos receptores actúan cooperativamente en la regulación de estos genes (Figura 20). Cabe destacar que tanto *Lcn2* como *S100a8* son marcadores de inflamación, cuya expresión aumenta en psoriasis (Kerkhoff et al. 2012). Estas alteraciones en la expresión génica de la epidermis de ratones DKO son consistentes con los datos histológicos, que mostraron un fenotipo inflamatorio severo en los ratones DKO.



**Figura 20. Alteraciones en la expresión génica en la epidermis de ratones con inactivación individual o conjunta de GR y MR.** Expresión génica mediante RT-qPCR de ARNm epidérmico de ratones P0 CO, DKO, GR<sup>EKO</sup> y MR<sup>EKO</sup>. Asteriscos: diferencias significativas respecto al CO. Almohadillas: diferencias significativas entre DKO y los KO individuales. \*, # p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\*, ### p<0.001; n<sub>≥</sub>3 en cada grupo experimental.

En resumen, nuestros datos indican que la falta conjunta de GR y MR epidérmicos da lugar a defectos severos en la estratificación de la epidermis durante el desarrollo, y causa un fenotipo inflamatorio único que, en conjunto, recapitula las características histopatológicas y moleculares de enfermedades inflamatorias como la psoriasis y AD (Chiricozzi et al. 2018; Guttman-Yassky et al. 2011). Las alteraciones epidérmicas en los ratones DKO recién nacidos parecen deberse a un retraso en la diferenciación, ya que a edad P1 el estrato córneo es detectable (Figura 21). A P3 no se detectaron alteraciones en la epidermis de ratones DKO y los microabscesos se habían perdido por descamación; la epidermis de DKO estaba completamente estratificada en ese estadio del desarrollo (Figura 21). Todo ello sugiere que los defectos observados en los DKO recién nacidos se resuelven de forma espontánea en la etapa post-natal mediante mecanismos aún por esclarecer.



**Figura 21. El fenotipo cutáneo inflamatorio de los ratones DKO se resuelve de forma espontánea a partir de edad P3.** Imágenes representativas de piel dorsal de ratones P1 y P3, CO y DKO teñidas con H&E. Asteriscos: microabscesos. Barra: 50  $\mu$ m.

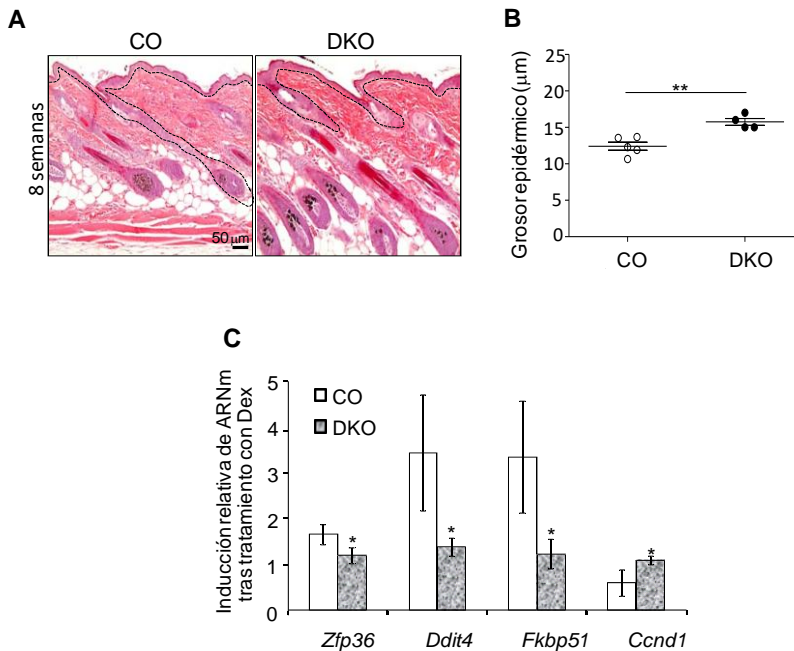
### **1.3. Caracterización fenotípica de los ratones DKO en la edad adulta**

En estudios previos se demostró que en la etapa adulta, la epidermis de los ratones GR<sup>EKO</sup> y MR<sup>EKO</sup> no mostraba grandes diferencias respecto a



la de los CO, a excepción de un ligero aumento de su grosor (Sevilla et al. 2013; Boix et al. 2016b). Para caracterizar fenotípicamente los ratones DKO en edad adulta, utilizamos hembras de 8 semanas de edad y en la medida de lo posible, hermanas de camada CO.

La piel dorsal de ratón adulto DKO estaba diferenciada con un pequeño aumento, aunque significativo, del grosor epidérmico relativo al CO (Figura 22, A y B).



**Figura 22. Los ratones adultos DKO presentan alteraciones menores en la arquitectura de la piel pero son deficientes en la respuesta transcripcional a un tratamiento tópico con GCs.** A Imágenes representativas de piel dorsal de ratón adulto CO y DKO teñida con H&E. Línea de puntos: delimita la epidermis/dermis. Barra: 50 µm. B Expresión génica de los genes diana de GCs: *Zfp36*, *Ddit4*, *Fkbp5* y *Ccnd1* en la piel dorsal de ratones CO y DKO tratados tópicamente con vehículo (V) o Dexametasona (Dex; 8 µg, 24 h), determinada mediante RT-qPCR, y representada como la ratio Dex vs V. Asterisco: diferencias estadísticamente significativas entre genotipos. \*  $p < 0.05$ ;  $n \geq 3$  por genotipo y tratamiento.

Dado que la identidad aminoacídica en el DBD de GR y MR, y su capacidad de reconocer secuencias GRE idénticas (Gómez-Sánchez y Gómez-Sánchez 2014), quisimos determinar las consecuencias de la

pérdida de ambos receptores epidérmicos en la regulación génica en respuesta a GCs. Para ello, realizamos un protocolo estandarizado de aplicación tópica de dexametasona (Dex; 8 µg, 24 h) en la piel dorsal de ratones CO y DKO. A continuación, evaluamos la expresión de los genes diana de GCs *Zinc finger protein 36 (Zfp36)*, *DNA Damage inducible transcript 4 (Ddit4/Redd1)*, *Fkbp51* y *Cyclin D1 (Ccdn1)* (Figura 22, C). En los ratones CO, Dex indujo la expresión de *Zfp36*, *Ddit4*, *Fkbp51* (2-3.5-veces), y reprimió *Ccdn1* (0.5-veces) de acuerdo con datos previos (Sevilla et al. 2010). Por el contrario, en los ratones DKO, el tratamiento con Dex no produjo ningún cambio en la expresión de estos genes (Figura 22, C).

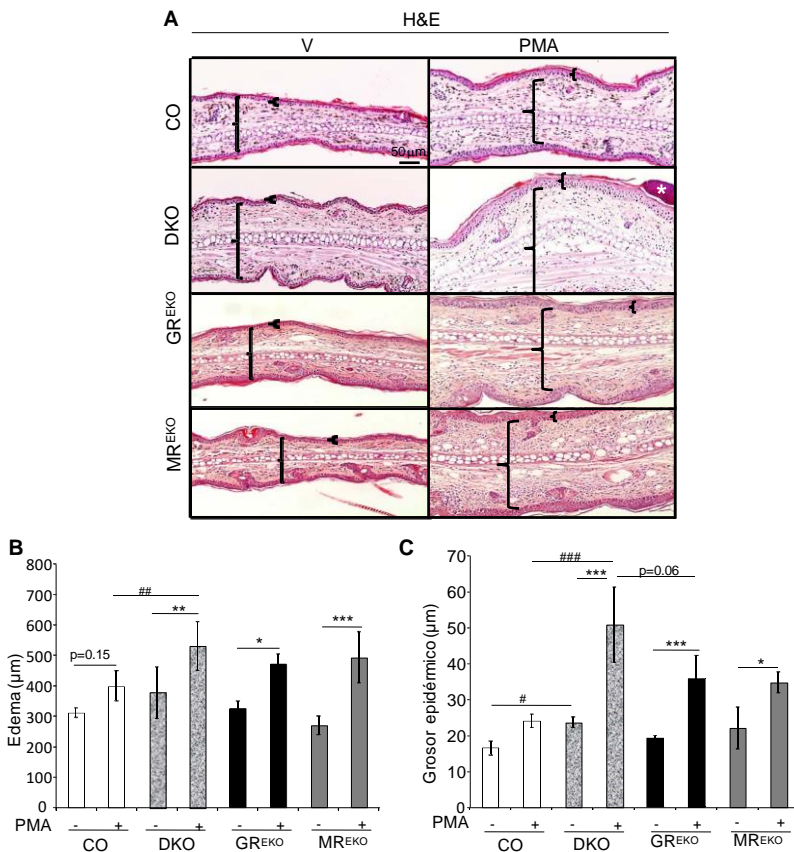
Los resultados muestran que, a pesar de que a nivel histológico la piel de los DKO es prácticamente normal, la falta de ambos receptores en la epidermis causa una falta de respuesta transcripcional a GCs en todo el tejido.

## **2. Estudio de susceptibilidad a inflamación cutánea en ratones adultos DKO**

### **2.1 Respuesta de los ratones DKO a un tratamiento tópico con PMA. Estudio comparativo de ratones DKO, GR<sup>EKO</sup> y MR<sup>EKO</sup>**

Se ha descrito que los defectos cutáneos en el desarrollo condicionan la susceptibilidad a patologías cutáneas en la edad adulta (Elias 2010; Segre 2006). Por ello, decidimos evaluar si los defectos en edad perinatal en los ratones DKO afectaban la respuesta a un tratamiento tópico con PMA, que induce hiperproliferación e inflamación en la edad adulta. Los ratones CO y DKO se trataron con vehículo (V, acetona) o PMA (8 µg) durante 48 h, en la región dorsal, o en oreja (Hua et al. 2016; Donet et al. 2008).

En ratones CO, el análisis histopatológico y morfométrico de las orejas no mostró engrosamiento significativo en respuesta al PMA (hiperplasia de epidermis y edema de oreja), aunque existe una tendencia al alza (Figura 23, A-C). Además, en ratones CO, PMA indujo la expresión ectópica de K6 en las capas basales de la epidermis, indicando hiperproliferación de queratinocitos (Figura 24), así como la presencia de varios núcleos positivos para el FT pro-inflamatorio p65-NF- $\kappa$ B (Figura 24).

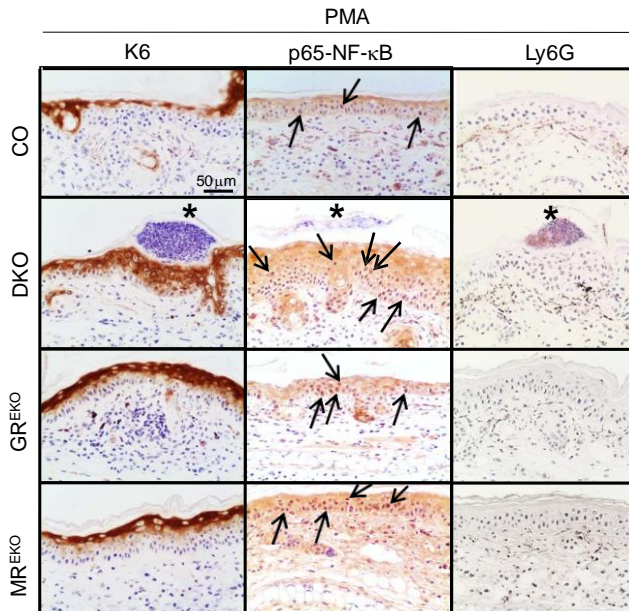


**Figura 23. Los ratones DKO muestran mayor susceptibilidad a hiperproliferación e inflamación inducida por la aplicación tópica de PMA. A** Imágenes representativas de secciones de oreja de ratón adulto CO, DKO, GR<sup>EKO</sup> y MR<sup>EKO</sup> tratadas con vehículo (V) o *Phorbol ester 12-Myristate 13-Acetate* (PMA, 8  $\mu$ g, 48 h) y teñidas con H&E. Asterisco: microabsceso. Corchetes: grosor de la oreja o de la epidermis. Barra: 50  $\mu$ m. **B y C** Cuantificaciones del edema y grosor epidérmico de ratones CO, DKO, GR<sup>EKO</sup> y MR<sup>EKO</sup> tratados con V o PMA. Asteriscos: diferencias estadísticamente significativas entre

## Resultados

tratamientos dentro del mismo genotipo. Almohadillas: diferencias estadísticamente significativas entre genotipos dentro del mismo tratamiento. \*, #  $p < 0.05$ , \*\*, ##  $p < 0.01$ , \*\*\*, ###  $p < 0.001$ ;  $n \geq 4$  por genotipo y tratamiento.

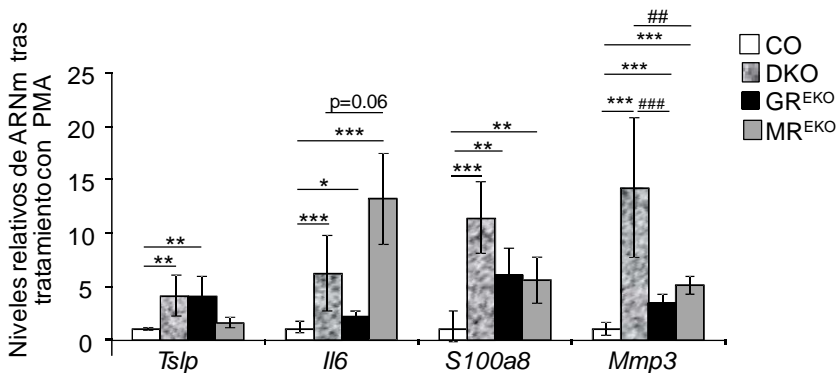
En los animales DKO, el tratamiento con PMA indujo las mismas características de daño epitelial que en los ratones CO, pero con mayor severidad (Figura 23, A-C); 1.5- y 2-veces respectivamente). En ratones DKO, este aumento de grosor se correlacionaba con una expresión anómala de K6 en todas las capas de queratinocitos, mientras que dicha expresión estaba restringida a las capas suprabasales de la epidermis en los KO individuales y CO (Figura 24). Además, los ratones DKO presentaban una mayor expresión nuclear de p65-NF- $\kappa$ B en comparación con los KO individuales y CO, y son los únicos que presentaron microabscesos con infiltrados de neutrófilos (Figura 24). Este fenotipo indica que en condiciones de inflamación, la pérdida conjunta de GR y MR tiene efectos más severos que la pérdida individual de cada uno de los receptores.



**Figura 24.** Alteraciones severas de los marcadores de hiperproliferación/inflamación K6, p65-NF- $\kappa$ B y Ly6G en los ratones DKO tratados con PMA. Comparativa con la respuesta en ratones CO, GR<sup>EKO</sup> y MR<sup>EKO</sup>. Inmunohistoquímica de secciones de oreja de los genotipos indicados tras tratamiento

con PMA (8 $\mu$ g, 48h) utilizando anticuerpos específicos frente a K6, p65-NF- $\kappa$ B, y Ly6G. Asteriscos: microabscesos. Flechas: núcleos positivos p65/NF- $\kappa$ B. Barra: 50  $\mu$ m.

A continuación analizamos los niveles de expresión génica en epidermis de las citoquinas pro-inflamatorias *Tslp*, *Il6*, y *S100a8*, así como de la *Mmp3*, tras el tratamiento tópico con PMA (Figura 25). Tanto los ratones DKO como los KO individuales mostraron mayores niveles de ARNm de todos estos genes respecto los CO, a excepción de *Tslp*, cuya expresión solo aumentó en los ratones DKO y GR<sup>EKO</sup>. Los niveles de *S100a8* aumentaron en todos los KO respecto a los CO, aunque sin diferencias significativas entre los DKO y los KO individuales. Sin embargo, observamos un efecto aditivo en la expresión de *Mmp3* en los ratones DKO respecto a los KO individuales (Figura 25).



**Figura 25. El tratamiento tópico con PMA induce un mayor aumento de marcadores de inflamación en los ratones DKO respecto a GR<sup>EKO</sup> y MR<sup>EKO</sup>.** Expresión de los genes: *Tslp*, *Il6*, *S100a8* y *Mmp3* en la epidermis de oreja de ratones CO, DKO, GR<sup>EKO</sup> y MR<sup>EKO</sup> tras tratamiento con PMA (8 $\mu$ g, 48h). Asteriscos: diferencias significativas respecto al CO. Almohadillas: diferencias significativas de los DKO respecto los KO individuales. \*  $p < 0.05$ , \*\*, ##  $p < 0.01$ , \*\*\*, ###  $p < 0.001$ ;  $n \geq 4$  por genotipo.

En conclusión, estos resultados sugieren que en una situación de inflamación cutánea aguda, tanto GR como MR epidérmicos ejercen un papel anti-inflamatorio y que además pueden ejercer efectos cooperativos.

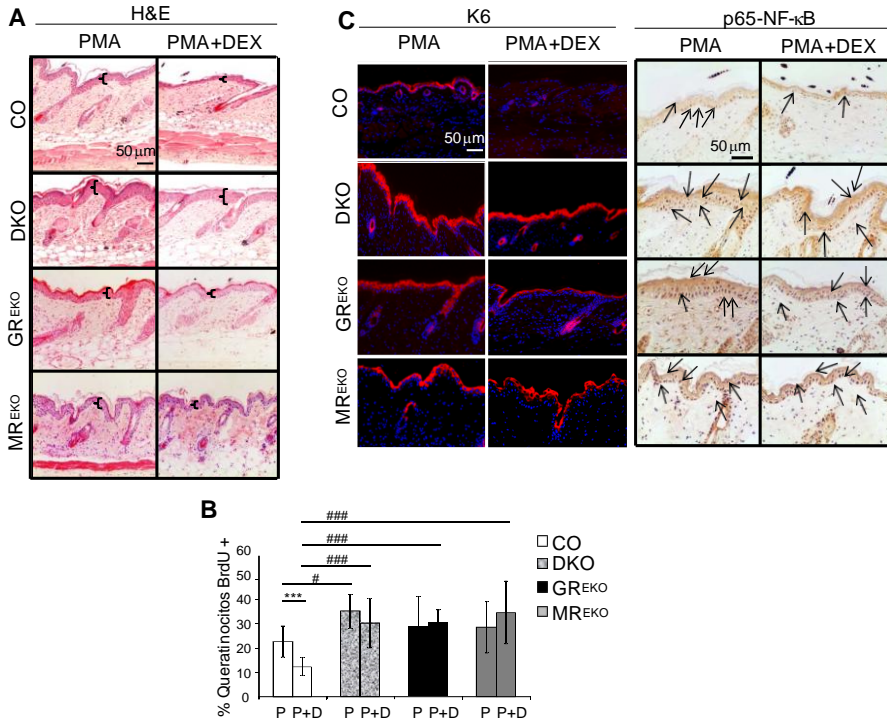
## 2.2 Análisis de los efectos terapéuticos de los GCs en ratones DKO tratados tópicamente con PMA

En clínica, las terapias más efectivas para el tratamiento de enfermedades inflamatorias cutáneas se basan en el uso de GCs sintéticos. Utilizando los modelos animales CO, DKO, GR<sup>EKO</sup> y MR<sup>EKO</sup>, quisimos investigar si la ausencia individual o combinada de GR y MR epidérmicos modificaba las acciones terapéuticas de los GCs en una situación de inflamación aguda. En estos experimentos, tratamos la región dorsal de los ratones con PMA solo (8 µg, 48 h) o con una combinación de Dex (16 µg, 24 h) seguida de PMA (8 µg, 48 h).

En ratones CO, Dex es capaz de llevar a cabo sus acciones anti-proliferativas y anti-inflamatorias, como muestra la reducción del grosor epidérmico y la tasa de queratinocitos proliferativos positivos para BrdU (Figura 26, A y B; comparar PMA y PMA+Dex). Además, el tratamiento con Dex, eliminaba la expresión ectópica de K6 y redujo el número de núcleos positivos para p65-NF-κB (Figura 26, C).

En cambio, en los ratones DKO observamos una falta casi total de respuesta a GCs, ya que la hiperplasia epidérmica causada por el PMA persistía tras la aplicación tópica de Dex (Figura 26, A). El tratamiento combinado PMA+Dex no disminuyó el número de queratinocitos proliferativos, la expresión de K6 (detectable en toda la epidermis), o la expresión de p65-NF-κB (Figura 26, B y C; BrdU). En los ratones KO individuales, la ausencia de uno u otro receptor también disminuía los efectos anti-proliferativos y anti-inflamatorios de Dex, aunque en menor medida que en los DKO, dado que la expresión de K6 se restringía a las capas suprabasales epidérmicas (Figura 26, B y C).

Así pues, nuestros datos indican que GR y MR epidérmicos son necesarios para mediar la respuesta terapéutica a los GCs tópicos en un contexto de inflamación aguda.



**Figura 26. Los efectos terapéuticos de los GCs tópicos requieren GR y MR epidérmicos.** **A** Imágenes representativas de piel dorsal de ratones CO, DKO, GR<sup>EKO</sup> y MR<sup>EKO</sup> tratados con PMA (8 μg, 48 h) o con la combinación Dex (16 μg, 24 h) y PMA (8 μg, 48 h), teñida con H&E. **B** Cuantificación de queratinocitos basales positivos con tinción BrdU de piel dorsal de ratón de los genotipos y tratamiento indicados (P, PMA; P+D, PMA+Dex). Asteriscos: diferencias significativas entre tratamientos en un mismo genotipo. Almohadillas: diferencias significativas entre genotipos en un mismo tratamiento. # p<0.05; \*\*\*, ### p<0.001; n≥4 ratones por grupo experimental. **C** Inmunodetección con anticuerpos específicos frente a K6 (rojo; DAPI, azul) y p65-NF-κB. Corchetes: grosor de la epidermis. Flechas: núcleos positivos p65-NF-κB. Barra: 50 μm.

### **2.3 Susceptibilidad de los ratones DKO a un protocolo de psoriasis inducida por imiquimod (IMQ). Análisis comparativo con los KO individuales**

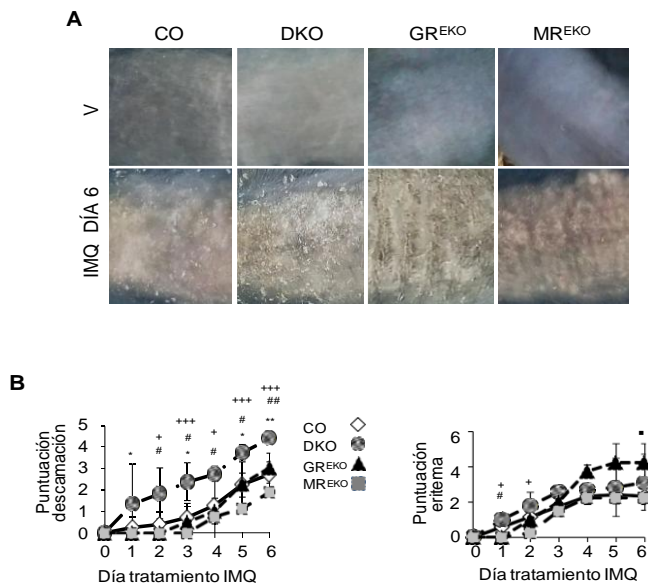
La psoriasis es una enfermedad inflamatoria crónica y autoinmune de la piel que tienen un alto índice de prevalencia, llegando a afectar entre un 2-3% de la población mundial (National Psoriasis Foundation: [www.psoriasis.org](http://www.psoriasis.org)). Tanto los queratinocitos como las células del sistema inmune participan en el desarrollo de la enfermedad (Albanesi et al. 2018). Los GCs tópicos constituyen la primera elección en el tratamiento de la psoriasis, debido a su eficacia tanto en monoterapia como en combinación con otros tratamientos; además, los GCs no suponen un coste económico elevado.

El análisis de los ratones DKO recién nacidos mostraba un fenotipo inflamatorio que recapitula las características de enfermedad inflamatoria cutánea, (Figura 18, H&E), y que se resuelve de forma espontánea. Dado que los defectos en el desarrollo cutáneo condicionan la susceptibilidad a enfermedades inflamatorias en la edad adulta, quisimos analizar si la falta conjunta de GR y MR epidérmicos tenía consecuencias en la aparición y/o desarrollo de la psoriasis. Para ello, utilizamos el modelo de psoriasis inducido por IMQ, que consiste en la aplicación tópica y repetitiva de la crema Aldara® (62.5 mg; 6 días; Van der Fits et al. 2009), que induce cambios histopatológicos y moleculares que mimetizan la enfermedad humana (Wagner et al. 2010).

En los ratones CO, la cinética de aparición de lesiones en respuesta a IMQ reflejaba una mayor severidad a partir del día 3 de tratamiento, siendo máxima a día 7 (Figura 27, B). El posterior análisis histológico revelaba una hiperplasia epidérmica y cierta descamación, así como la detección de infiltrados inmunes (Figura 28).

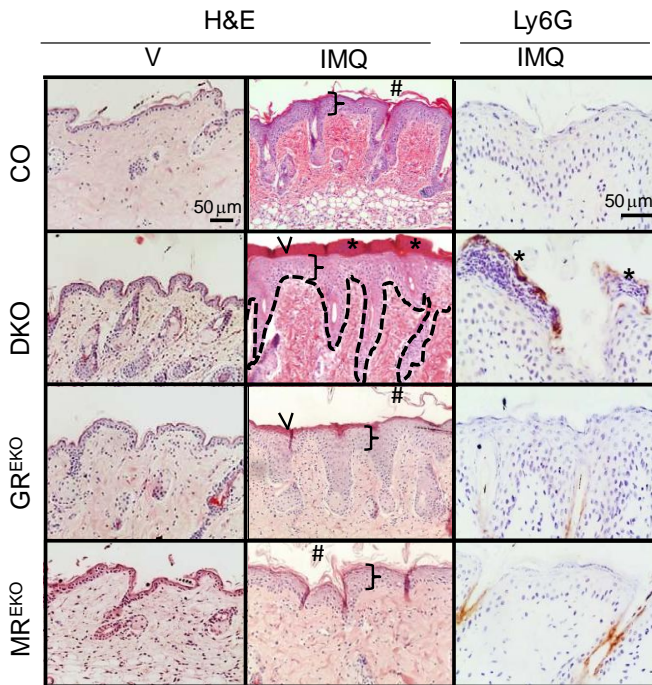


Cuando analizamos la susceptibilidad a psoriasis inducida por IMQ en los ratones KO detectamos alteraciones más acentuadas que en el CO, siendo los ratones DKO los que presentaban el mayor grado de severidad en términos de descamación y eritema (Figura 27, A). Además, la cinética también nos mostraba que las lesiones aparecían antes en los DKO que en cualquier otro genotipo (Figura 27, B). Las alteraciones histológicas eran también más acentuadas en los DKO mostrando una mayor hiperplasia epidérmica acompañada de una retención anormal de núcleos en el estrato córneo (denominada paraqueratosis) (Figura 27). De hecho esta es una característica de severidad de la enfermedad, así como la elongación de las crestas interpapilares y la presencia de un alto número de abscesos inflamatorios en la epidermis con infiltrados de neutrófilos (Guttman-Yassky et al. 2011), que se detectaba únicamente en los DKO.



**Figura 27. La psoriasis inducida por imiquimod es más severa y aparece antes en los animales DKO que en los KO individuales o CO.** **A** Imágenes macroscópicas y representativas de la piel dorsal de ratón CO, DKO, GR<sup>EKO</sup> y MR<sup>EKO</sup> a día 6 del tratamiento con vehículo (V, vaselina) o IMQ (62.5 mg, 6 días consecutivos). **B** Cinética de aparición de lesiones producidas por el tratamiento con IMQ. Puntuación de severidad: 0, no lesión; 1, leve; 2, moderada; 3, marcada; 4, alto; 5, muy alto. Asterisco: diferencias de los DKO relativo al CO. Almohadilla: diferencias del DKO respecto a los GR<sup>EKO</sup>. +:

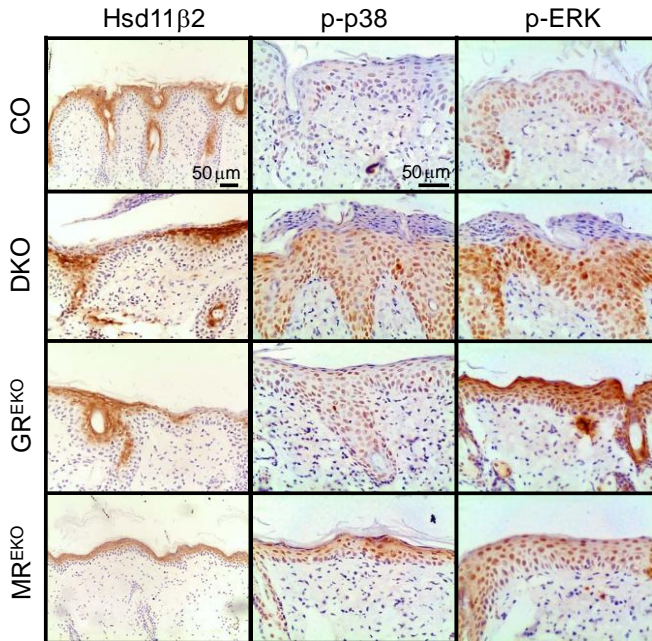
diferencias de los DKO respecto a los MR<sup>EKO</sup>. . : diferencias de GR<sup>EKO</sup> relativo a los CO.  
 \*, #, +, · p<0.05; \*\*, ##, ++ p<0.01; +++ p<0.001; n<sub>≥</sub>5 ratones por grupo experimental.



**Figura 28. Alteraciones histopatológicas en ratones DKO tratados con imiquimod. Comparativa de la respuesta con ratones GR<sup>EKO</sup> y MR<sup>EKO</sup>.** Imágenes representativas de secciones de piel dorsal de los genotipos indicados tratados con vehículo (V, vaselina) o IMQ (62.5 mg), teñida con H&E, e inmunohistoquímica con anticuerpo específico frente a Ly6G. Corchetes: grosor de la epidermis. Asteriscos: microabscesos. Almohadilla: descamación. >: paraqueratosis. Línea de puntos: delimita epidermis/dermis. Barras: 50 μm.

Dado que la piel de ratones DKO tratados con IMQ presentaba alteraciones en diferenciación e inflamación, analizamos la expresión de marcadores de estos procesos (Figura 29). Hsd11β2 se expresa normalmente en las capas suprabasales diferenciadas de la epidermis CO, y este patrón también se observó en MR<sup>EKO</sup> (Figura 29); sin embargo, los ratones DKO y GR<sup>EKO</sup> presentaron una expresión parcheada de Hsd11β2. Además, un análisis inmunohistoquímico reveló un aumento en la actividad de p38 y ERK en la piel de los ratones KO tratados con IMQ, en

comparación con los CO (Figura 30). Los niveles más elevados de expresión se detectaron en la piel de los ratones DKO tratados con IMQ.



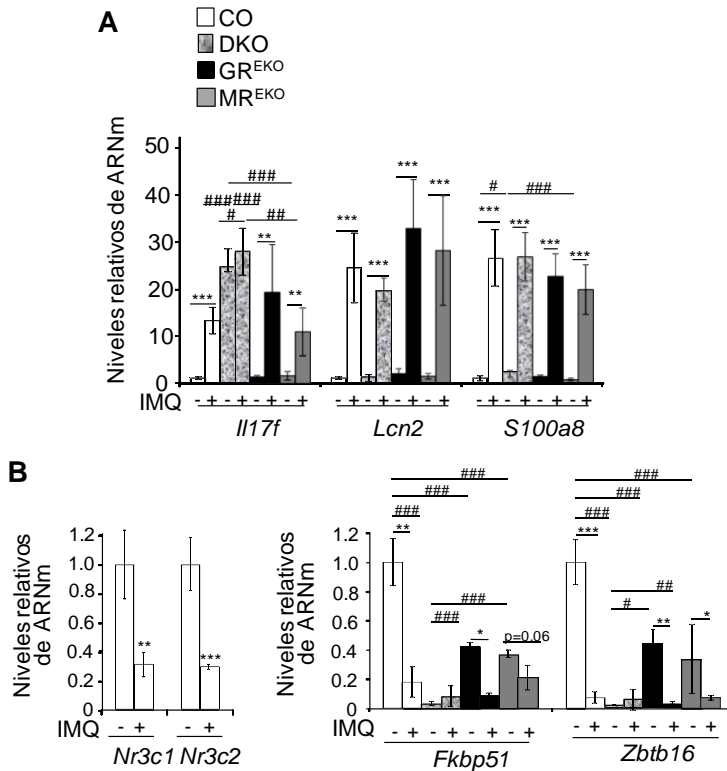
**Figura 29.** Alteraciones en la expresión de Hsd11 $\beta$ 2, p-p38 y p-ERK en los ratones DKO tratados con imiquimod. Comparativa de la respuesta con ratones GR<sup>EKO</sup> y MR<sup>EKO</sup>. Inmunohistoquímicas de piel dorsal de ratones CO, DKO, GR<sup>EKO</sup>, MR<sup>EKO</sup> a día 6 del tratamiento con IMQ (62.5 mg) utilizando anticuerpos frente a HSD11 $\beta$ 2, p-p38 y p-ERK. Barras: 50  $\mu$ m.

La piel psoriática se caracteriza por un aumento de citoquinas pro-inflamatorias que contribuyen a la inflamación sostenida de la enfermedad, entre las cuales *Il17f* juega un papel relevante (Zhu y Qian 2012). Nuestros resultados indican que la expresión de *Il17f* aumentó de forma constitutiva en los ratones DKO respecto a los CO, e incluso respecto a los KO individuales. Sin embargo, la ausencia combinada de GR y MR epidérmico no era suficiente para causar lesiones psoriáticas espontáneas (Figura 30, A). Después del tratamiento con IMQ, los niveles de *Il17f* incrementaban significativamente en los ratones CO, GR<sup>EKO</sup> y MR<sup>EKO</sup> (10-20 veces); sin embargo, los niveles de *Il17f* en DKO, aunque elevados, eran similares antes y después de IMQ (Figura 30, A). Mientras que la expresión del

marcador psoriático *Lcn2* (Abdel Hay et al. 2019) no variaba entre genotipos, en condiciones basales o patológicas, sí se observaba un aumento constitutivo de los niveles de *S100a8* en los DKO respecto a CO y MR<sup>EKO</sup> (Figura 30, A; 2 veces).

En los ratones CO tratados con IMQ, observamos una reducción en la expresión de *Nr3c1/GR* y *Nr3c2/MR*, así como de los genes diana de GCs, *Fkbp51* y *Zinc finger and BTB domain containing 16 (Zbtb16)* (Figura 30, B). Estos datos correlacionan con estudios recientes donde se demuestra que la expresión de estos genes disminuye en lesiones psoriáticas humanas (Sarkar et al. 2017). En consonancia con la pérdida de expresión de GR y MR epidérmicos, la piel de ratones DKO mostraba una disminución constitutiva en la expresión de *Fkbp51* y *Zbtb16* respecto a los CO, que se mantenía tras el tratamiento con IMQ (Figura 30, B; más de 20 veces). En condiciones basales, los ratones GR<sup>EKO</sup> y MR<sup>EKO</sup> presentaban una reducción de los niveles de *Fkbp51* y *Zbtb16* respecto a los CO (2.5 y 3 veces, respectivamente) y el IMQ reducía su expresión a niveles similares a los de los CO (Figura 30, B).

Estos hallazgos son importantes ya que indican que, los GCs no solo son efectivos para el tratamiento de la psoriasis sino que defectos en la señalización mediada por GCs pueden contribuir al desarrollo de la enfermedad.



**Figura 30. La mayor susceptibilidad a psoriasis inducida por imiquimod en los ratones DKO correlaciona con defectos en la señalización mediada por GCs. A y B** Expresión de los genes indicados en la piel dorsal de ratones CO, DKO, GR<sup>EKO</sup> y MR<sup>EKO</sup> tratados con vehículo (V, vaselina) o IMQ (62.5 mg), determinada mediante RT-qPCR. Asteriscos: diferencias estadísticas entre tratamientos de un mismo genotipo. Almohadillas: diferencias significativas entre genotipos en un mismo tratamiento. \*, #  $p < 0.05$ , \*\*, ##  $p < 0.01$ , \*\*\*, ###  $p < 0.001$ ;  $n \geq 4$  en cada grupo experimental.

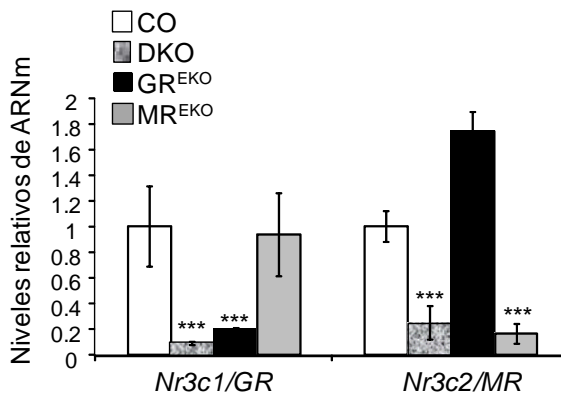
### 3. Generación y caracterización de queratinocitos inmortalizados con inactivación combinada de GR y MR (DKO)

#### 3.1. Generación de queratinocitos inmortalizados DKO

El análisis previo de líneas de queratinocitos inmortalizados GR<sup>EKO</sup> y MR<sup>EKO</sup>, demostró cambios severos en su morfología y tasa de proliferación

respecto a la línea CO (Latorre et al. 2013; Boix et al. 2016b). En este trabajo, nos planteamos generar una línea celular DKO para analizar las consecuencias de la ausencia conjunta de GR y MR en los queratinocitos epidérmicos. Para ello, aislamos los queratinocitos de la epidermis de ratones adultos hembra y generamos la línea celular de queratinocitos mediante un proceso de inmortalización por amplificación (Reichelt y Haase 2010).

La pérdida de GR, MR o de ambos receptores, se confirmó mediante RT-qPCR en las distintas líneas celulares (Figura 31).

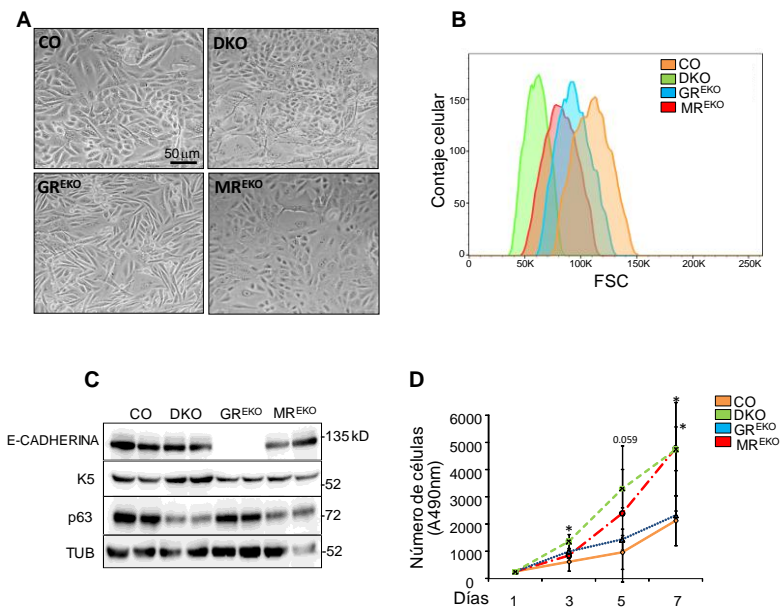


**Figura 31. Niveles de *Nr3c1/GR* y *Nr3c2/MR* de las líneas inmortalizadas de queratinocitos CO, DKO, GR<sup>EKO</sup> y MR<sup>EKO</sup>.** Expresión de *Nr3c1/GR* y *Nr3c2/MR* en las líneas celulares de queratinocitos inmortalizados, determinada mediante RT-qPCR. Asteriscos: diferencias significativas respecto al CO. \*\*\*,  $p < 0.001$ ;  $n \geq 4$  réplicas biológicas por genotipo.

Las imágenes de contraste de fase mostraban diferencias morfológicas entre las distintas líneas celulares, que correlacionaban con los resultados obtenidos con la citometría de flujo (Figura 32, A y B). Los queratinocitos DKO presentaban un menor tamaño en comparación con la línea CO, y también respecto a las líneas KO individuales, si bien los queratinocitos MR<sup>EKO</sup> también presentaban un tamaño menor respecto a los CO. La línea GR<sup>EKO</sup> presentaba una morfología elongada acorde con el fenotipo parcial de transición epitelio-mesénquima ya descrita (Latorre et al.

2013). Consistente con dicho fenotipo, la expresión proteica del marcador epitelio-específico E-cadherina se perdía en los queratinocitos  $GR^{EKO}$ , siendo esta característica exclusiva de dicho genotipo, lo que sugiere que las alteraciones de la línea  $GR^{EKO}$  no están asociadas a la falta de GR sino a un rol patológico de MR en ausencia de GR (Figura 32, C).

La expresión de K5 (Figura 32, C) aparecía aumentada solo en los queratinocitos DKO, mientras que la expresión del marcador epitelial p63 disminuía en las líneas DKO y  $MR^{EKO}$ . Previamente hemos demostrado que GR regula negativamente la expresión de p63 (Sevilla et al. 2015).



**Figura 32. El fenotipo de los queratinocitos DKO es único en comparación con las líneas CO,  $GR^{EKO}$  y  $MR^{EKO}$ , con alteraciones en el tamaño y proliferación celular. A** Imágenes representativas de contraste de fase de queratinocitos inmortalizados CO, DKO,  $GR^{EKO}$  y  $MR^{EKO}$ . Barra: 50  $\mu$ m. **B** Representación del número de células y del tamaño celular (*Forward Scatter Channel*, FSC) de las líneas de queratinocitos indicadas, mediante citometría de flujo y el software FlowJo (n=3). **C** Western Blot de lisados celulares de las líneas de queratinocitos indicadas para la detección de E-cadherina, K5, p63 y tubulina (TUB) en. **D** Cinética de proliferación de queratinocitos inmortalizados CO, DKO,  $GR^{EKO}$  y  $MR^{EKO}$ . Asteriscos: diferencias significativas respecto a la línea CO. \*  $p < 0.05$ ;  $n \geq 4$  réplicas biológicas por genotipo.

El análisis de la cinética de proliferación de las líneas de queratinocitos inmortalizados CO, DKO, GR<sup>EKO</sup> y MR<sup>EKO</sup> mostró que a día 7, las líneas DKO y MR<sup>EKO</sup> presentaban una mayor tasa de proliferación (Figura 32, D; 3 veces más) en consonancia con el papel anti-proliferativo descrito para MR en queratinocitos epidérmicos (Boix et al. 2016b). En cambio, a pesar de los efectos anti-proliferativos conocidos de GR en queratinocitos (Latorre et al. 2013; Sevilla et al. 2013), nuestros datos no mostraron un aumento en la cinética de proliferación de la línea GR<sup>EKO</sup>, y tan solo un aumento marginal de la línea DKO respecto a la MR<sup>EKO</sup> (Figura 32, D).

En resumen, estos datos indican que las acciones conjuntas de GR y MR en queratinocitos son necesarias para la correcta proliferación y expresión de los marcadores epiteliales. Estos datos correlacionan con el aumento en la expresión del marcador de proliferación K5 exclusivamente en la línea DKO.

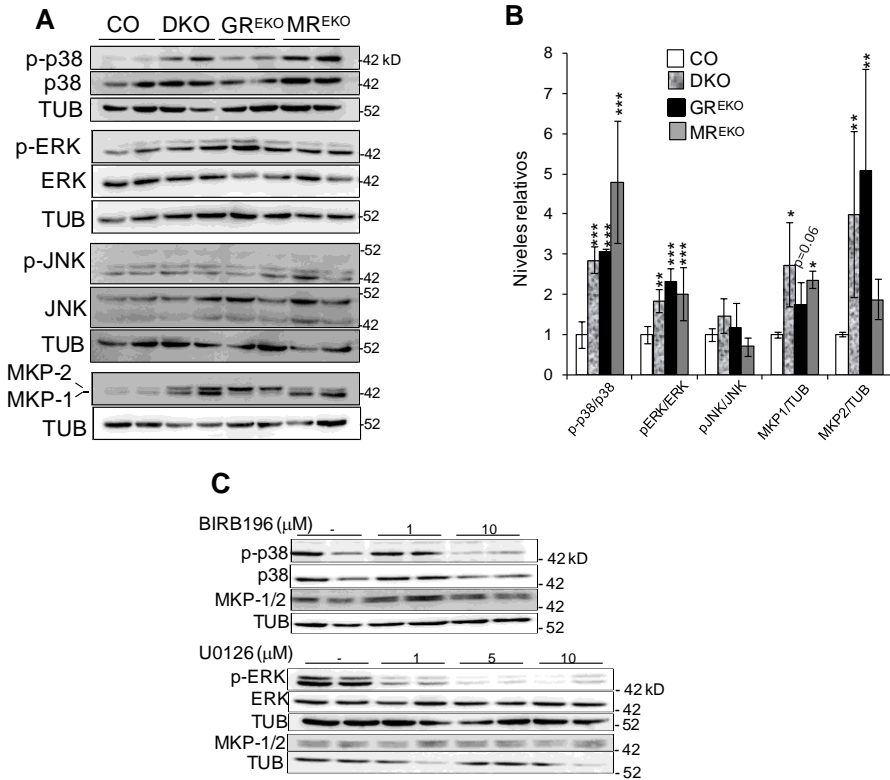
### **3.2 Análisis de las vías de señalización MAPK/MKP en las líneas de queratinocitos inmortalizados**

Los estudios *in vivo* han demostrado que los ratones KO individuales o DKO son más susceptibles a un protocolo de inflamación cutánea que los CO (Figuras 23 y 28). Para evaluar la contribución de los queratinocitos a esta respuesta inflamatoria, utilizamos las líneas de queratinocitos inmortalizados CO, DKO, GR<sup>EKO</sup> y MR<sup>EKO</sup>.

Dado que las MAPKs modulan positivamente la proliferación de los queratinocitos (Kondoh y Nishida 2007), y que GR es capaz de inhibir estas vías de señalización (Davies et al. 2008) analizamos los niveles de proteína total y fosforilada de MAPKs en las líneas celulares CO, DKO, GR<sup>EKO</sup> y MR<sup>EKO</sup>. Los resultados indicaban, tal y como se observaba en la piel de los ratones KO recién nacidos (Figura 19, A), un aumento constitutivo de p-p38



y p-ERK en todas las líneas KO respecto a la CO (Figura 33, A y B). Por tanto, los datos sugieren que el control de estas MAPKs se ejerce mediante ambos receptores. Dado que no se observaban diferencias entre las líneas de queratinocitos GR<sup>EKO</sup>, MR<sup>EKO</sup>, y DKO, es probable que tanto GR como MR inhiban la actividad de estas MAPKs mediante mecanismos similares. Por otro lado, no se observaban diferencias en la actividad de JNK entre las cuatro líneas celulares (Figura 33, A y B). Se sabe que uno de los mecanismos responsables de la inhibición de la actividad de las MAPKs por los GCs es la inducción transcripcional de las *Dual specificity phosphatase/mitogen-activated protein kinase phosphatases*, DUSP-1/MKP-1 y DUSP-4/MKP-2 (Shah et al. 2014). En condiciones fisiológicas, las dianas específicas de MKP-1 son p38 y JNK, mientras que MKP-2 defosforila ERK (Chen et al. 2019a). Nuestros datos indicaron que la falta de MR aumentaba los niveles de MKP-1, y la ausencia de GR aumentaba los niveles de MKP-2 (Figura 33, A y B), sugiriendo que los receptores de GCs modulan la expresión de MKPs de forma opuesta. La sobreactivación de las MKPs en la línea DKO no depende directamente de la activación de p38 y ERK, ya que el bloqueo farmacológico de ambos (utilizando BIRB196 y U0129 respectivamente), no influía en la expresión de las MKPs (Figura 33, C).

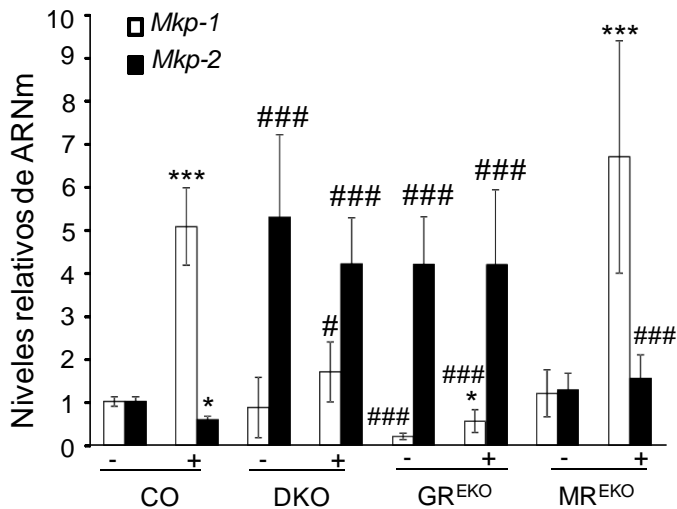


**Figura 33. Alteraciones constitutivas en la expresión de MAPKs/MKPs en las líneas de queratinocitos inmortalizados DKO, GR<sup>EKO</sup> y MR<sup>EKO</sup>.** **A** Western Blot de lisados celulares de las líneas de queratinocitos indicadas para la detección de proteínas totales y fosforiladas (p) correspondientes a las MAPKs: p38, ERK y JNK; MKP-1 y MKP-2; y tubulina (TUB). **B** Cuantificación de los ratios p38/p38, p-ERK/ERK, p-JNK/JNK, MKP-1/tubulina y MKP-2/tubulina de cada línea de queratinocitos KO respecto al CO. Asteriscos: diferencias significativas relativo al CO. \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001; n ≥ 4 réplicas biológicas por genotipo. **C** Western Blot de lisados celulares de las líneas de queratinocitos DKO tratada con las concentraciones indicadas de BIRB196 y U0126, para la detección de las proteínas indicadas.

Estudios anteriores demostraron que, en queratinocitos, los GCs inducen la expresión de *Mkp-1*, mientras que reprimen la expresión de *Mkp-2*; sin embargo, se desconoce en gran medida si dicha regulación está mediada por GR, MR, o ambos (Stojadinovic et al. 2007). Para determinar si GR y/o MR también regulan la expresión de estas fosfatasa a nivel transcripcional, analizamos los niveles de ARNm de *Mkp-1* y *Mkp-2* en cada

una de las líneas celulares, antes y después del tratamiento con Dex. Los datos indicaban que tras el tratamiento con GCs, GR inducía *Mkp-1* y reprimía *Mkp-2*, acción en la cual MR también jugaba un papel importante (Figura 34).

En resumen, estos hallazgos muestran que GR y MR son moduladores cruciales de la actividad de las MAPKS p38 y ERK, y además señalan que tanto GR como MR ejercen distintas funciones modulando la actividad de las MKPs en queratinocitos epidérmicos.



**Figura 34. Expresión génica de *Dusp-1/Mkp-1* y *Dusp-4/Mkp-2* en las líneas de queratinocitos inmortalizados CO, DKO, GR<sup>EKO</sup> y MR<sup>EKO</sup> tratadas con vehículo o Dex.** Expresión de los genes *Dusp-1/Mkp-1* y *Dusp-4/Mkp-2* en las líneas de queratinocitos indicados tras un tratamiento con V (-) o Dex (+, 100 nM, 3 h), determinada mediante RT-qPCR. Asteriscos: diferencias significativas en un mismo genotipo. Almohadillas: diferencias en un mismo tratamiento respecto a la línea CO. \*, # p<0.05; \*\*\*, ### p< 0.001; n≥4 réplicas biológicas por genotipo.

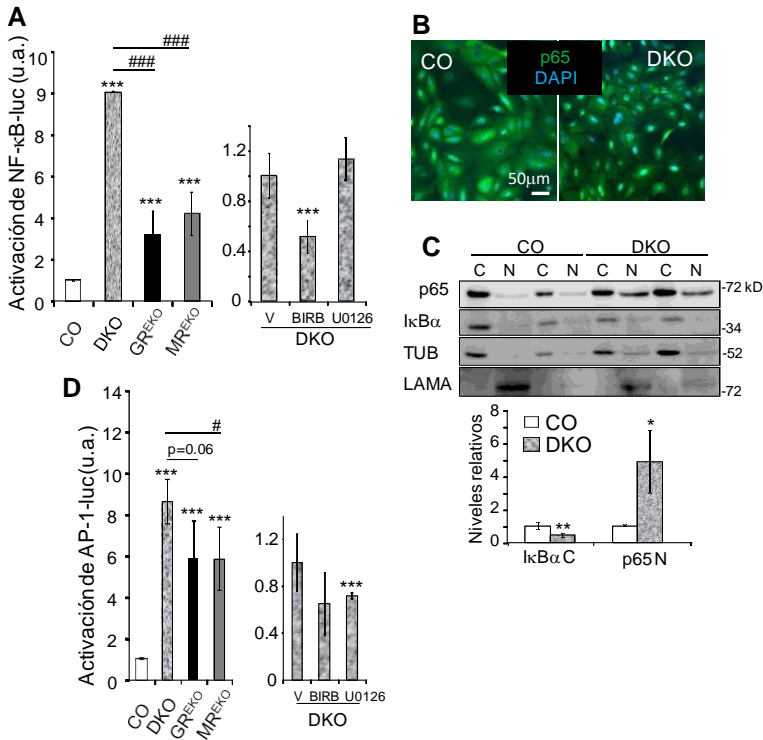
### **3.3 Estudio de las rutas pro-inflamatorias NF- $\kappa$ B y AP-1 en las líneas celulares de queratinocitos inmortalizados**

Se sabe que las MAPKs participan en la activación de dos de las rutas pro-inflamatorias más conocidas, las vías de señalización NF- $\kappa$ B y AP-1 (Liu et al. 2017; Qiao et al. 2016). Para valorar si la activación basal de las MAPKs en los queratinocitos KO daba lugar a una activación constitutiva de estos FT, realizamos experimentos de transfección utilizando un *reporter* NF- $\kappa$ B- o AP-1-luciferasa. Anteriormente demostramos que en queratinocitos, GR ejerce parte de sus acciones anti-inflamatorias interfiriendo negativamente con NF- $\kappa$ B y AP-1 pero además, MR también inhibe la actividad de estos FT, a pesar de que ejerza acciones pro-inflamatorias en la mayoría de tipos celulares (Jaisser y Farman 2016).

Los experimentos mostraban una mayor actividad basal del *reporter* NF- $\kappa$ B-luciferasa en las líneas KO individuales respecto a la CO (Figura 35, A, aproximadamente 3-4 veces). Es importante destacar que la expresión de este *reporter* era 10 veces mayor en las células DKO, sugiriendo que, en condiciones basales, GR y MR ejercen efectos sinérgicos para el control de la actividad NF- $\kappa$ B. Para evaluar el rol de las MAPKs p38 y ERK en la activación constitutiva de NF- $\kappa$ B en los queratinocitos DKO, realizamos experimentos adicionales de transfección utilizando los inhibidores farmacológicos BIRB196 y U0129. Los resultados mostraban que el bloqueo de la actividad p38 vía BIRB196 revierte un 50% la activación del *reporter* NF- $\kappa$ B-luciferasa (Figura 35, A). También analizamos la localización subcelular de p65-NF- $\kappa$ B y del inhibidor de la translocación nuclear del complejo p65/p50, I $\kappa$ B $\alpha$ . Mediante inmunofluorescencia y fraccionamiento citoplásmico/nuclear detectamos un aumento de p65 en el núcleo, que correlacionaba con una reducción de I $\kappa$ B $\alpha$  en el citoplasma en las células

DKO vs CO (Figura 35, B y C). Estos datos eran consistentes con el aumento constitutivo de actividad NF- $\kappa$ B observado (Figura 35, B y C).

Asimismo, evaluamos la actividad AP-1 utilizando un *reporter* AP-1-luciferasa, y detectamos un aumento significativo en los KO individuales relativo a los CO (6 veces) y un aumento mayor en la línea DKO, que sugiere efectos aditivos debidos a la inactivación conjunta de GR y MR en queratinocitos (Figura 35, D). Los resultados del bloqueo farmacológico de ERK en las células DKO sugieren un papel importante para esta MAPK, ya que su inhibición reducía un 30% la actividad del *reporter* AP-1-luc. Estos datos sugieren la existencia de mecanismos adicionales que bloquean la vía AP-1, mediante *tethering* o debido a una falta de inducción de complejos represores (Dougherty et al. 2016).



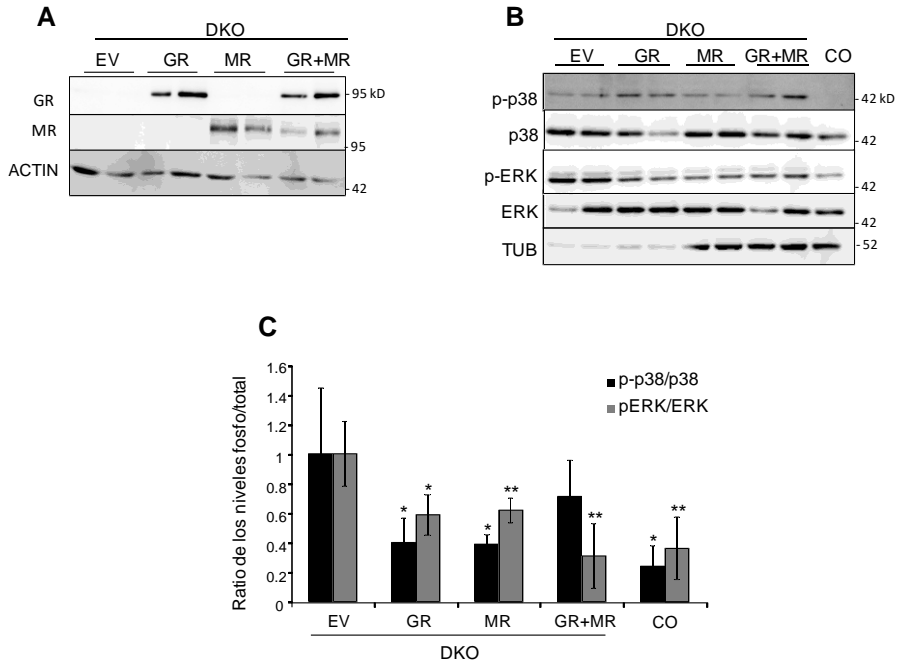
**Figura 35. Activación constitutiva de las vías pro-inflamatorias NF- $\kappa$ B y AP-1 en los queratinocitos DKO, GR<sup>EKO</sup> y MR<sup>EKO</sup>.** A y D Las líneas celulares indicadas se transfectaron con plásmidos conteniendo el *reporter* NF- $\kappa$ B-luciferasa (A) o AP-1-

luciferasa (**D**). Las células DKO fueron tratadas, con vehículo (V), el inhibidor de p38 BIRB196 (BIRB, 10  $\mu$ M, 24 h) o el inhibidor de ERK, U0216 (5  $\mu$ M, 24 h), según se indica. Asteriscos: diferencias significativas respecto al CO. Almohadillas: diferencias significativas entre las líneas KO individuales y la línea DKO. #p < 0.05; \*\*\*, ###p < 0.001; n  $\geq$  4 réplicas biológicas por genotipo. **B** Inmunofluorescencia con anticuerpo específico para p65 (verde) en las células CO y DKO teñidas con DAPI (azul). Barra: 50  $\mu$ m. **C** Western Blot de extractos citoplásmicos (C) y nucleares (N) de queratinocitos CO y DKO para la detección de p65, IKB $\alpha$ , tubulina (TUB) y lamina A (LAMA). Cuantificación de los niveles de proteína en cada compartimento relativo a los CO. Asteriscos: indican diferencias significativas relativas al CO. \* p<0.05; \*\* p<0.01; n=3 réplicas biológicas por grupo experimental.

### **3.4. Generación y caracterización de las líneas de queratinocitos inmortalizados DKO con reinserción de GR, MR o ambos**

Para evaluar si las alteraciones en las vías de MAPKs eran consecuencia directa de la pérdida de los receptores de GCs, nos planteamos un experimento de rescate mediante reinserción de GR, MR o ambos, en la línea DKO. Los resultados de WB demostraron la eficiencia de las transfecciones (Figura 36, A).

La reinserción de GR o MR en la línea parental DKO resultó en una reducción significativa de los niveles de p-p38 y p-ERK, que alcanzaron niveles similares a los de queratinocitos CO (Figura 36, B y C). Es importante destacar que la reinserción conjunta de ambos receptores no disminuyó más la actividad de estas MAPKs. Este hecho es consistente con datos previos que muestran que la pérdida de uno o ambos receptores tiene la misma consecuencia en el aumento constitutivo de la actividad de las MAPKs (Figura 33, A y B).

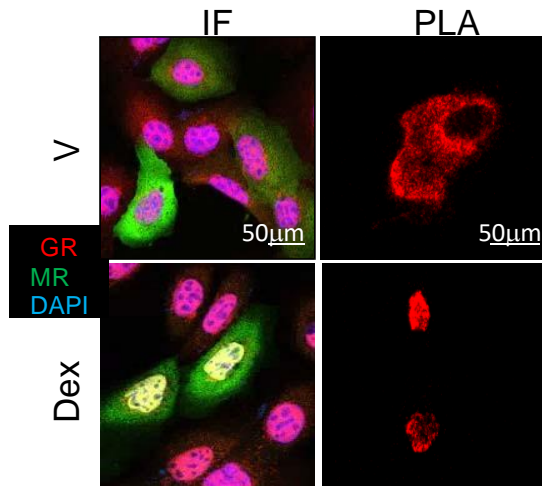


**Figura 36. La reinserción de GR, MR, o ambos en queratinocitos DKO reduce parcialmente el aumento de actividad de p38 y ERK. A y B** Western Blot de lisados celulares de la línea DKO transfectada con GR, MR o ambos para la detección de las proteínas indicadas. En B se incluyen lisados celulares de la línea CO y tubulina (TUB). **C** Cuantificación de los ratios p38/p38 y p-ERK/ERK en células CO y DKO transfectadas. Asteriscos: diferencias significativas respecto de las células DKO transfectadas respecto a EV. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ;  $n \geq 3$  réplicas biológicas por grupo.

### 3.4.1. Evaluación de la respuesta transcripcional a GCs en queratinocitos DKO con reinserción de GR y MR

A continuación nos planteamos evaluar si GR y MR median la respuesta transcripcional a GCs de forma cooperativa. Para ello, y en primer lugar, analizamos mediante inmunofluorescencia la translocación nuclear de cada uno de los receptores en queratinocitos en cultivo en respuesta a Dex. Estos experimentos se realizaron mediante co-transfección de GR y MR en células DKO seguida de un tratamiento con vehículo o Dex. Nuestros datos confirmaban que Dex induce la translocación de GR y MR al núcleo (Figura

37, IF). Además, los ensayos de PLA demostraron que GR y MR interaccionan físicamente en el núcleo después del tratamiento con hormona, pero también en ausencia de ligando, de forma constitutiva en el citoplasma (Figura 37, PLA).



**Figura 37. Co-localización nuclear de GR y MR en queratinocitos tras el tratamiento con Dex de células DKO con re inserción de GR y MR.** Inmunofluorescencia (IF) para HA (rojo) o GFP (verde) en queratinocitos DKO transfectados con HA-GR y GFP-MR y tratados con vehículo (V) o Dex (100 nM, 1 h). *Proximity ligation assay* (PLA) en células DKO co-transfectadas con HA-GR y GFP-MR y tratadas con V o con Dex (100 nM, 16 h). Rojo: interacción física entre GR y MR en queratinocitos. Barra: 50  $\mu$ m.

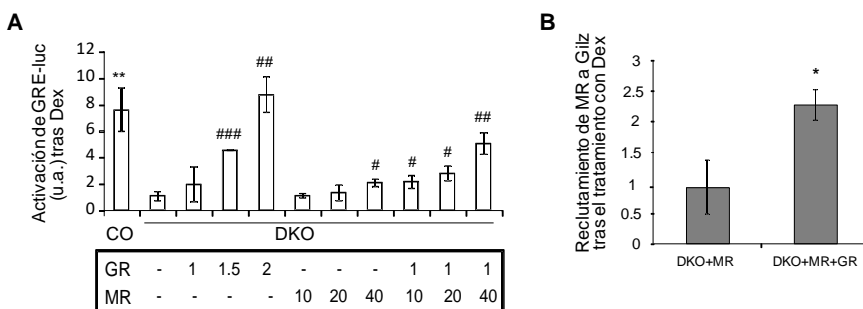
Dado que GR y MR translocan al núcleo y co-localizan en este compartimento en respuesta a hormona, quisimos examinar la contribución relativa de los distintos homo- o hetero-dímeros de GR y MR en la regulación transcripcional (Mifsud y Reul 2016; Liu et al. 1995). Para ello, realizamos experimentos de co-transfección en células DKO utilizando distintas dosis de vectores de expresión de GR y/o MR, y un *reporter* GRE-luciferasa (Figura 38, A). Como se esperaba, Dex indujo la actividad del *reporter* GRE-luciferasa aproximadamente de 7 veces en los CO; en la línea DKO no detectamos activación del *reporter* GRE-luciferasa en respuesta a Dex (Figura 38, A). Cuando reinsertamos GR en la línea DKO, observamos que la actividad transcripcional aumentaba de forma dosis-dependiente,



incluso con cantidades bajas del receptor (Figura 38, A). Por el contrario, cuando reinsertamos MR necesitamos dosis mucho mayores para activar el *reporter* GRE-luciferasa en respuesta a Dex. Sin embargo, cuando se co-transfectaron GR y MR a dosis bajas, observamos un efecto aditivo en la activación del *reporter* GRE-luciferasa, que alcanzó niveles similares a los de la línea CO (Figura 38, A). Este resultado indica que GR y MR cooperan para mediar la respuesta transcripcional a GCs en queratinocitos en cultivo.

A continuación, analizamos la expresión del gen endógeno *Gilz*, diana clásica de GCs regulado vía GRE, en queratinocitos. Para valorar cómo participa MR en la inducción transcripcional de este gen, analizamos el reclutamiento de MR a secuencias reguladores GRE de *Gilz* mediante ensayos de MR CHIP seguidos de qPCR utilizando la línea DKO transfectada con MR o con una combinación de MR y GR (Figura 38, B). Los datos mostraban que solo se detectaba reclutamiento significativo de MR (Figura 38, B; aproximadamente 2.5 veces) cuando ambos receptores estaban presentes.

Así pues, concluimos que en respuesta a GCs, GR y MR co-localizan en el núcleo e interaccionan físicamente para modular una respuesta transcripcional óptima a GCs.



**Figura 38. GR y MR son necesarios para la respuesta transcripcional óptima a GCs en queratinocitos inmortalizados.** **A** La línea de queratinocitos inmortalizados DKO se transfectó con las cantidades relativas indicadas de vectores de expresión de GR y MR; y con un *reporter* GRE-luciferasa, y se trató con vehículo o Dex (100 nM, 5 h). Las células CO se utilizan como referencia. Asteriscos: transactivación en las células CO tras el

tratamiento con Dex. Almohadillas: diferencias significativas entre transfección de GR y/o MR y EV. #p < 0.05; ##, \*\*p < 0.005; ###p < 0.001; n ≥ 5 réplicas biológicas por grupo. **B** MR ChIP seguido de RT-qPCR para analizar el reclutamiento de MR a las secuencias GRE de *Gilz* en queratinocitos DKO transfectados con MR o con MR+GR después de un tratamiento con vehículo (V) o Dex (100 nm, 2 h). Asteriscos: diferencias significativas entre transfecciones. \* p<0.05; n=3 réplicas biológicas por grupo.

#### **4. Análisis de la contribución relativa de GR y MR al envejecimiento cronológico cutáneo**

En la piel, el envejecimiento se caracteriza por una atrofia cutánea con reducción de todos los compartimentos de la piel: epidermis, dermis y tejido adiposo subcutáneo (dWAT). Estos cambios están causados, entre otros, por estrés oxidativo, inflamación crónica de bajo grado, y cambios metabólicos que incluyen la desregulación hormonal. En concreto, se ha descrito que el aumento de los niveles de GC endógenos tanto sistémicos como locales contribuye al envejecimiento cutáneo (Veldhuis et al. 2013; Tiganescu et al. 2011). Es importante mencionar que la atrofia cutánea asociada al envejecimiento cutáneo es similar a los efectos de tratamiento tópicos continuados con GCs.

Dado que los ratones MR<sup>EKO</sup>, al contrario que los CO, eran parcialmente resistentes a la atrofia cutánea inducida por un tratamiento tópico continuado con GCs (Boix et al. 2016b), quisimos evaluar las consecuencias del envejecimiento cronológico en esos ratones.

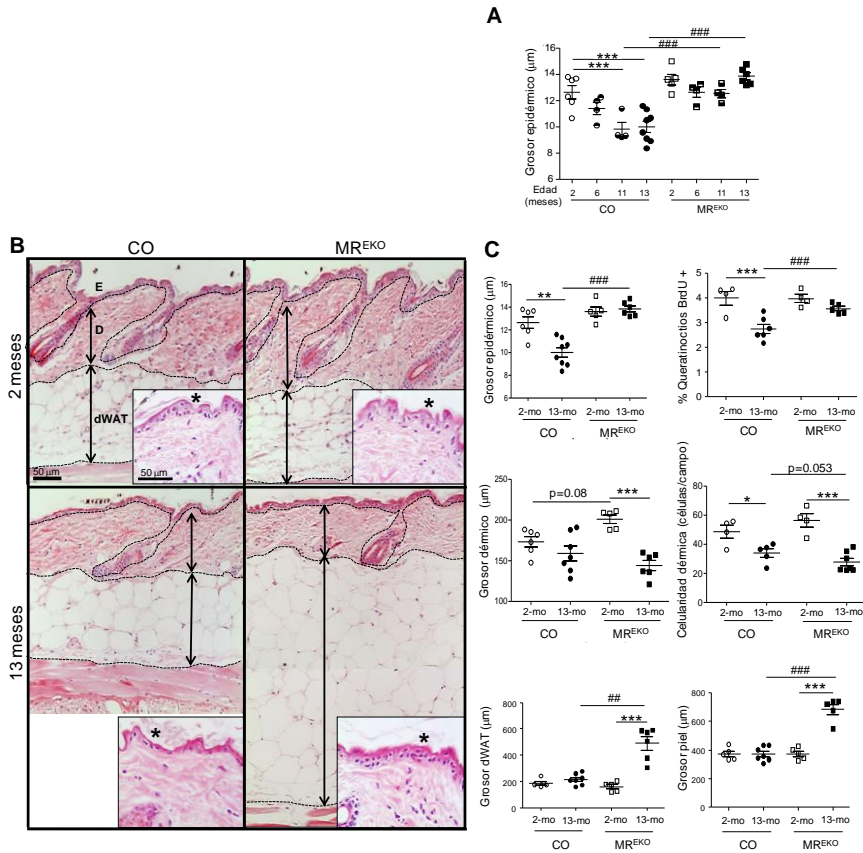
La evolución de los cambios asociados al envejecimiento cutáneo depende del género y del fondo genético del animal. En este estudio, hemos utilizado ratones CO y MR<sup>EKO</sup> hembras (fondo genético B6D2) de 2 meses y 13 meses de edad. Dado que los ratones B6D2 tienen una vida media de 2 años (Wang et al. 2013), la caracterización de ratones de 13 meses de edad debe considerarse como edad adulta y no envejecida estrictamente (Kruglikov y Scherer 2016).

#### 4.1 Estudio histopatológico del envejecimiento cronológico en ratones MR<sup>EKO</sup>

Hemos comparado la arquitectura de la piel de ratones CO y MR<sup>EKO</sup> de 2 y 13 meses de edad mediante tinción H&E y análisis morfométrico de las secciones de piel dorsal. El grosor epidérmico disminuyó progresivamente y de forma significativa con la edad en ratones CO pero no en MR<sup>EKO</sup> (Figura 39, A-C). La reducción del grosor epidérmico en ratones CO de 13 meses correlaciona con una disminución en la tasa de proliferación de queratinocitos epidérmicos (Figura 39, B, 30%). Los cambios en el grosor dérmico y dWAT no fueron significativos en ratones CO de 13 meses, sin embargo, detectamos una disminución en la celularidad dérmica respecto a los CO de 2 meses (Figura 39, B y C).

Los ratones MR<sup>EKO</sup> de 13 meses no mostraron cambios en la tasa de proliferación de queratinocitos en comparación con los de 2 meses (Figura 39, A y B). Sin embargo, presentaron una reducción tanto del grosor dérmico, como de la celularidad dérmica (30% y 50% respectivamente) (Figura 39, B y C). Uno de los hallazgos histológicos más significativos en estos ratones es el aumento del grosor de dWAT (2.5 veces), opuesto a la reducción de este compartimento descrita durante el envejecimiento cronológico cutáneo (Figura 39, B y C; Rivera-Gonzalez et al. 2014).

En conjunto, la piel de ratones MR<sup>EKO</sup> de 13 meses presenta un aumento global del grosor respecto a CO de la misma edad (Figura 39, A-C). Es importante que la pérdida de MR epidérmico tenga repercusiones en dermis y dWAT, subrayando la importancia en la comunicación entre distintos compartimentos de la piel. Además, los datos sugieren que MR epidérmico puede ejercer efectos protectores o deletéreos, dependiendo del compartimento. La inactivación de MR atenúa la atrofia de la epidermis y dWAT, mientras que la dermis muestra signos más pronunciados de envejecimiento.



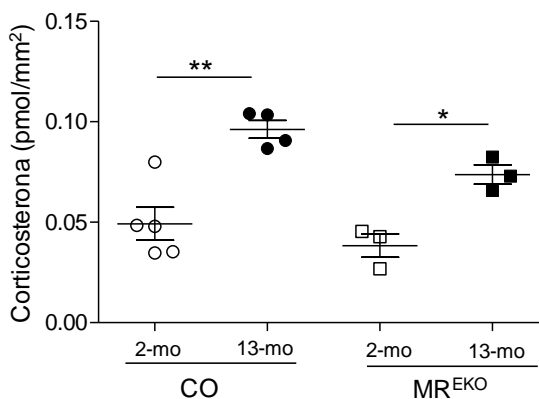
**Figura 39. La pérdida de MR epidérmico tiene consecuencias en la homeostasis de todos los compartimentos de la piel en ratones de 13 meses. A** Cuantificación del grosor epidérmico ( $\mu\text{m}$ ) de la piel de ratones CO y MR<sup>EKO</sup> en las edades indicadas. **B** Imágenes representativas de secciones de piel dorsal de ratones CO y MR<sup>EKO</sup> de 2 y 13 meses teñidas con H&E. Punteado: separación epidermis (E), dermis (D) y tejido adiposo (dWAT). Flechas: grosor de los compartimentos de la piel. Asteriscos: estrato córneo. Barra: 50  $\mu\text{m}$ . **C** Análisis morfométrico de la piel de ratones CO y MR<sup>EKO</sup> de 2 y 13 meses de edad: grosor de la epidermis, dermis, y dWAT ( $\mu\text{m}$ ), porcentaje (%) de queratinocitos positivos para BrdU; y celularidad dérmica (número de células/campo). Para todos los paneles; asterisco: diferencias significativas entre las dos edades en el mismo genotipo; almohadilla: diferencias significativas entre genotipos en una misma edad. \*  $p < 0.05$ , \*\*, ##  $p < 0.01$ , \*\*\*, ###  $p < 0.001$ ;  $n \geq 4$  por grupo experimental.

## 4.2 Evaluación de las posibles alteraciones en la señalización por GCs en los ratones MR<sup>EKO</sup> de 13 meses de edad

Los niveles elevados de GCs durante el envejecimiento cronológico cutáneo son el resultado de una alteración en los niveles de Hsd11 $\beta$ 1 (Tiganescu et al. 2013; Tiganescu et al. 2011). Nuestra hipótesis plantea que el fenotipo de los ratones MR<sup>EKO</sup> de 13 meses se debe a alteraciones en la vía de señalización por GCs, que pueden ocurrir como consecuencia de alteraciones en los niveles de GCs, cambios en su biodisponibilidad local, o alteraciones en la expresión y/o función de GR/MR.

### 4.2.1 Análisis de los niveles endógenos de corticosterona en explantes de piel de ratón CO y MR<sup>EKO</sup> de 2 y 13 meses de edad

Hemos evaluado los niveles de corticosterona, el GC endógeno mayoritario en ratones, en explantes de piel dorsal de ratones CO y MR<sup>EKO</sup> de 2 y 13 meses mediante un ensayo ELISA (Figura 40). Los resultados muestran que los niveles de corticosterona aumentaron con la edad en la piel de ratones CO y MR<sup>EKO</sup> (Figura 40; 2 y 1.7 veces respectivamente). Sin embargo, no detectamos diferencias entre ambos genotipos a los 13 meses de edad.

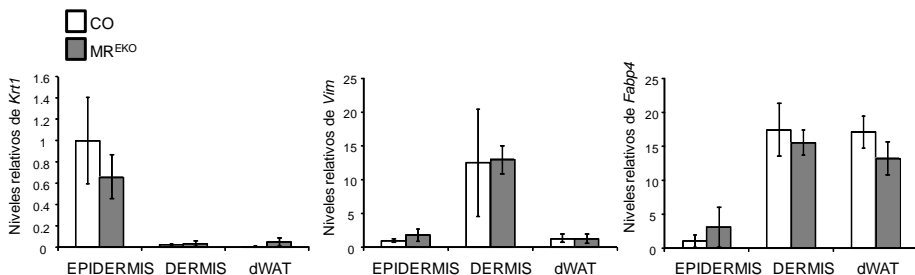


**Figura 40. Los niveles de corticosterona aumentan con la edad en explantes de piel dorsal de ratones CO y MR<sup>EKO</sup>.** Medición de los niveles de corticosterona (pmol/mm<sup>2</sup>) en explantes de piel de ratones CO y MR<sup>EKO</sup> de 2 y 13 meses de edad mediante ELISA. Asteriscos: diferencias significativas entre 2 y 13 meses de edad en un mismo genotipo. \* p<0.05, \*\* p<0.01; n>3 por grupo experimental.

## 4.2.2 Estudio de las alteraciones en la expresión y/o función de GR/MR en los distintos compartimentos de la piel de ratones CO y MR<sup>EKO</sup> de 13 meses de edad

A continuación, evaluamos si los cambios fenotípicos en ratones MR<sup>EKO</sup> de 13 meses se debían a alteraciones en la expresión y/o función de GR/MR en los distintos compartimentos de la piel.

En primer lugar, separamos la epidermis, dermis y dWAT de ratones CO y MR<sup>EKO</sup> de 13 meses y verificamos la calidad de la separación examinando genes específicos para cada compartimento mediante RT-qPCR. La expresión de *Krt1* y *Vimentin (Vim)* estaban restringidas a la epidermis y dermis respectivamente, mientras que *Fatty acid binding protein 4 (Fabp4)*, se expresaba tanto en dermis como en dWAT (Figura 41).

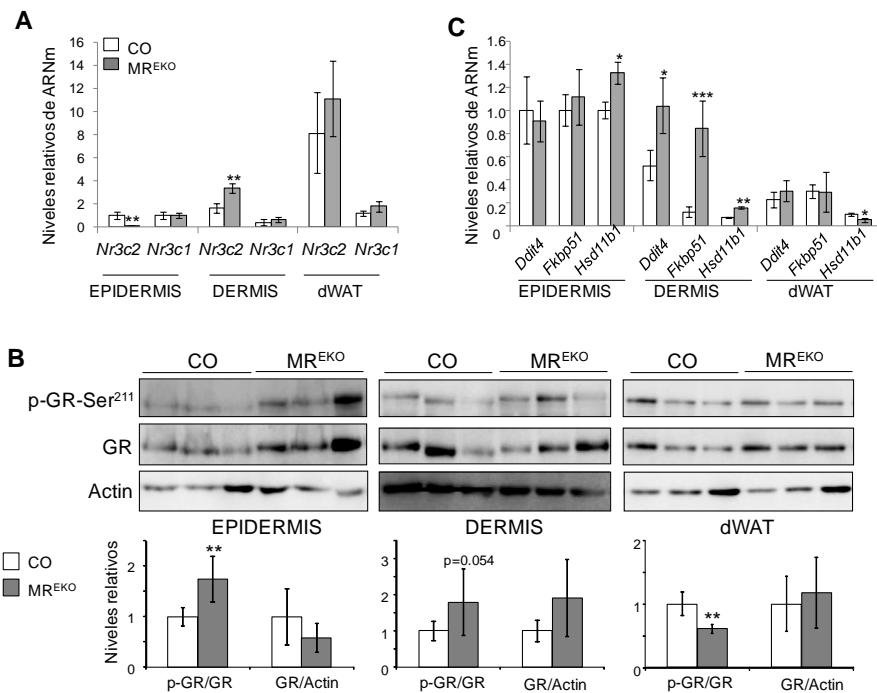


**Figura 41. Control de calidad de la pureza en la separación de epidermis, dermis y dWAT.** Expresión relativa de los genes indicados, utilizando marcadores de los distintos compartimentos de piel dorsal de ratones CO y MR<sup>EKO</sup> de 13 meses de edad, determinada mediante RT-qPCR: epidermis (*Krt1*), dermis (*Vim*), y dWAT (*Fabp4*).  $n \geq 3$  por grupo experimental.

En la epidermis de ratones MR<sup>EKO</sup>, la expresión de *Nr3c2/MR* era residual respecto a los CO, como corresponde a un KO, mientras que *Nr3c1/GR* se expresaba por igual en ambos genotipos (Figura 42, A). Cuando examinamos la actividad de GR, utilizando como parámetro la ratio de la tasa de fosforilación de la serina 211 (p-GR-Ser<sup>211</sup>) respecto al GR total (p-GR/GR), detectamos un aumento de 1.7 veces en la epidermis de los ratones MR<sup>EKO</sup> respecto a los CO (Figura 42, B). Este aumento

correlaciona con una mayor expresión de los niveles de ARNm de *Hsd11b1*, gen diana de GR en la epidermis (Figura 42, C; Tiganescu et al. 2013). No obstante, otros genes diana de GR, como *Ddit4* y *Fkbp51*, no mostraron cambios de expresión en la epidermis de los ratones MR<sup>EKO</sup> respecto a los CO de 13 meses de edad (Figura 42, C).

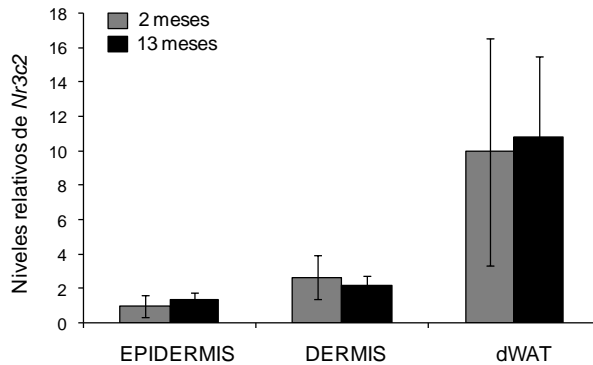
En la dermis MR<sup>EKO</sup>, se detectó un aumento en la expresión de *Nr3c2* respecto a los CO (Figura 42 A, 2 veces). Además, y aunque no se observaron cambios en la expresión de *Nr3c1*, se detectó una tendencia al alza en la actividad de GR ( $p=0.054$ ) en la dermis de MR<sup>EKO</sup> (Figura 42, A y B), consistente con el aumento de expresión de *Ddit4*, *Fkbp51* y *Hsd11b1* (Figura 42, C; 2-, 7- y 2.8-veces respectivamente).



**Figura 42. Los ratones MR<sup>EKO</sup> de 13 meses presentan alteraciones específicas en la señalización por GCs en los distintos compartimentos de la piel. A** Expresión relativa de los genes MR/*Nr3c2* y GR/*Nr3c1* en epidermis, dermis, y dWAT de piel dorsal de ratones CO y MR<sup>EKO</sup> de 13 meses de edad, determinada mediante RT-qPCR. Los valores son relativos a la epidermis de los CO. **B Panel superior** Expresión de p-GR-Ser211, GR, y actina en los mismos compartimentos y genotipos que A, determinada mediante

Western Blot. **Panel inferior** Cuantificación del Western Blot. Los valores son relativos al CO. **C** Expresión relativa de *Ddit4*, *Fkbp51* y *Hsd11b1* en los mismos compartimentos y genotipos que A, determinada mediante RT-qPCR. Valores relativos a la epidermis de los CO. En todos los apartados, asteriscos: diferencias significativas entre genotipos. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ; A y C epidermis, dermis,  $n \geq 3$ ; dWAT  $n = 6$ ; B  $n = 5-7$  por grupo experimental.

Por último, examinamos la expresión de *Nr3c2* en dWAT de ratones CO y  $MR^{EKO}$  de 13 meses, sin detectar diferencias entre genotipos (Figura 42, A). Cabe destacar que en ratones CO de 2 y 13 meses, los niveles relativos de *Nr3c2* son significativamente mayores en dWAT respecto a los otros compartimentos (Figura 43). Aunque la expresión de *Nr3c1* era similar en dWAT de CO y  $MR^{EKO}$ , tanto la actividad de GR, como la expresión de *Hsd11b1* disminuyeron significativamente en dWAT de ratones  $MR^{EKO}$ . Sin embargo, la expresión de *Ddit4* y *Fkbp51* en dWAT no mostró diferencias entre ambos genotipos a los 13 meses (Figura 42, A-C).



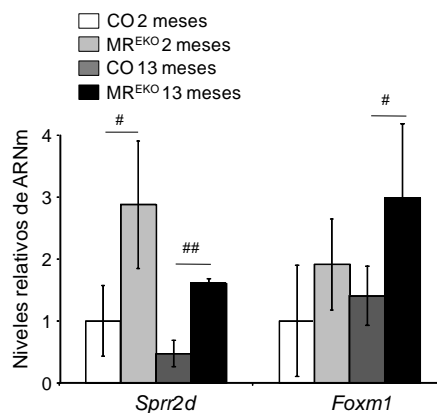
**Figura 43. Los niveles relativos de expresión de *Nr3c2* son mayores en dWAT respecto a la epidermis y dermis de ratones CO de 2 y 13 meses de edad.** Expresión relativa del gen *Nr3c2* en epidermis, dermis y dWAT de ratones CO de 2 y 13 meses de edad, determinada mediante RT-qPCR. Epidermis, dermis  $n \geq 3$  y dWAT  $n = 6$ .



### 4.3 Estudio del estatus inflamatorio en piel de ratones CO y MR<sup>EKO</sup> de 13 meses de edad

El envejecimiento se caracteriza por un estatus pro-inflamatorio crónico de bajo grado, que ocurre en ausencia de infección, con aumento de mediadores pro-inflamatorios que alteran la homeostasis tisular (Velarde y Demaria 2016). Dicho estatus se ha definido como “*inflamm-aging*”, y representa un factor de riesgo significativo de morbilidad y mortalidad en los ancianos (Sanada et al. 2018).

En la piel, este estatus de inflamación crónica de bajo grado junto con alteraciones en la diferenciación comprometen su función de barrera (McCullough y Kelly 2006). Para evaluar posibles alteraciones en la funcionalidad de la piel de ratones MR<sup>EKO</sup> de 13 meses, analizamos genes implicados en el balance proliferación/diferenciación epidérmica. Los niveles de *Spr2d*, eran mayores en la piel de ratones MR<sup>EKO</sup> respecto a los CO (Figura 44; 3 veces). Los niveles de *Forkhead box M1 (Foxm1)*, gen que codifica para un FT importante en proliferación y diferenciación epiteliales (Golson y Kaestner 2016; Smirnov et al. 2016), aumentaron en piel de ratones MR<sup>EKO</sup> de 13 meses respecto a los CO (Figura 44; 2 veces).

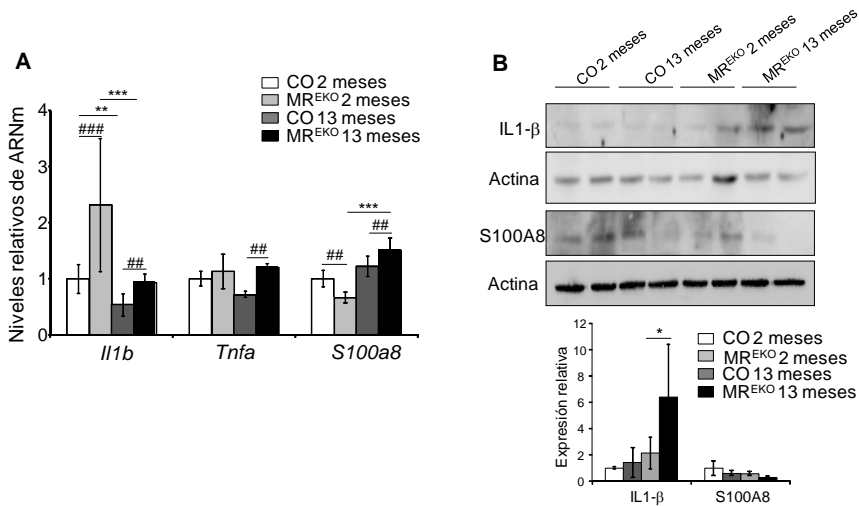


**Figura 44. Alteraciones en la expresión de genes implicados en el balance proliferación/diferenciación en ratones MR<sup>EKO</sup> de 13 meses de edad.** Expresión relativa de los genes *Spr2d* y *Foxm1* en la piel dorsal de ratones CO y MR<sup>EKO</sup> de 2 y 13 meses de edad, determinada mediante RT-qPCR. Almohadillas: diferencias

## Resultados

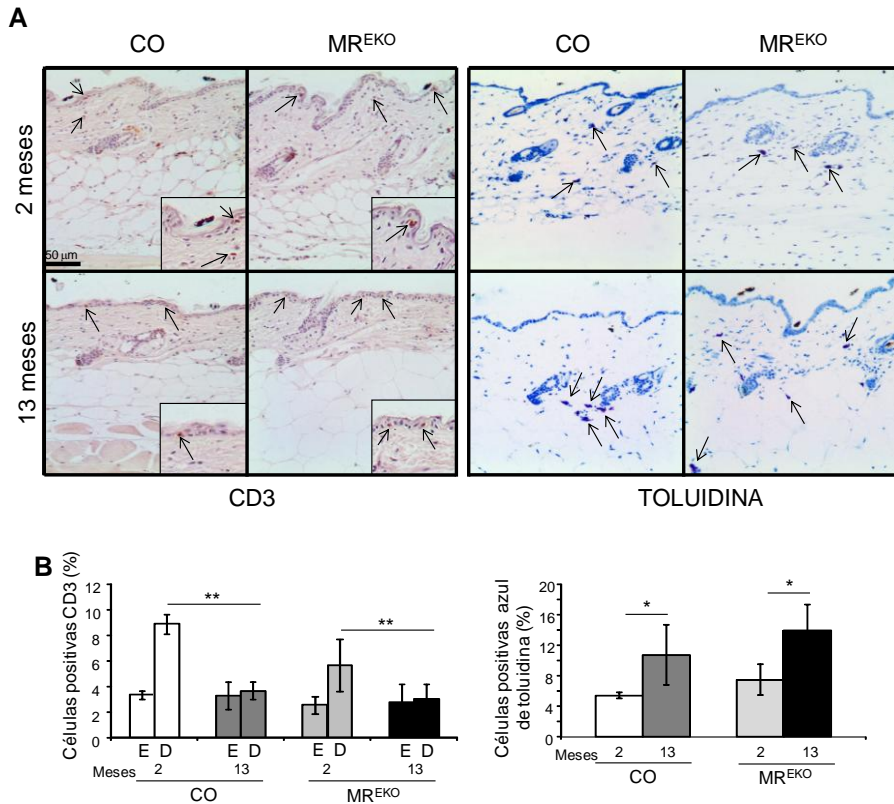
estadísticamente significativas entre genotipos de la misma edad. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ;  $n = 3-5$  por grupo experimental.

A continuación evaluamos la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias *Il1b*, *Tnfa* y *S100a8*, en la piel de los ratones CO y MR<sup>EKO</sup> de 2 y 13 meses. Los ratones MR<sup>EKO</sup> de 13 meses mostraron incrementos pequeños, pero significativos de estos marcadores a nivel de ARNm respecto a los CO (Figura 45, A, B). A nivel de proteína, el aumento de IL1- $\beta$  resultó también significativo en ratones MR<sup>EKO</sup> de 13 meses respecto a los CO de la misma edad (Figura 45, B). Asimismo, analizamos posibles cambios en la composición del infiltrado inflamatorio mediante tinción y cuantificación de células T (CD3+); y mastocitos y macrófagos (azul de toluidina). Los datos no revelaron diferencias significativas en la localización o número de células inflamatorias en la piel de los MR<sup>EKO</sup> respecto a los CO durante envejecimiento cronológico (Figura 46, A y B).



**Figura 45. La inflamación de bajo grado no contribuye significativamente al fenotipo de ratones MR<sup>EKO</sup> de 13 meses de edad. A y B panel superior** Expresión relativa de las citoquinas *Il1b*, *Tnfa* y *S100a8* en la piel dorsal de ratones CO y MR<sup>EKO</sup> de 2 y 13 meses de edad, determinada mediante RT-qPCR y WB. **B panel inferior** Cuantificación del WB. En todos los paneles, asteriscos: diferencias significativas entre edades de un mismo genotipo. Almohadillas: diferencias estadísticamente significativas

entre genotipos de la misma edad. \*\*, ##  $p < 0.01$ , \*\*\*, ###  $p < 0.001$ ;  $n = 3-6$  por grupo experimental.

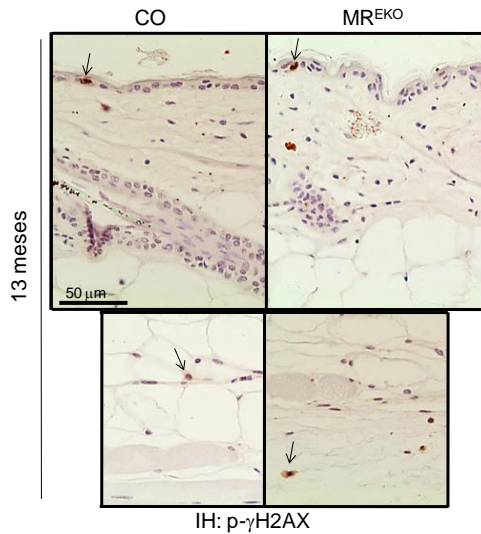


**Figura 46. El infiltrado inmune cutáneo no contribuye significativamente al fenotipo de ratones MR<sup>EKO</sup> de 13 meses de edad.** **A** Inmunohistoquímica de secciones de piel dorsal de los genotipos y edades indicados utilizando anticuerpos específicos frente a CD3 y tinción con azul de toluidina. Flechas: células T (CD3); y mastocitos y macrófagos (toluidina). Barra: 50  $\mu\text{m}$ . **B** Porcentaje de células positivas para CD3 en epidermis (E) y dermis (D) y azul de toluidina (mastocitos y macrófagos) en piel completa relativo al número total de núcleos. Asteriscos: diferencias significativas entre edades de un mismo genotipo. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ ;  $n \geq 5$  por grupo experimental.

Dado que la senescencia celular da lugar a inflamación, y que la disminución de *Foxm1* durante el envejecimiento induce la apoptosis de los queratinocitos y su senescencia (Smirnov et al. 2016), quisimos evaluar posibles diferencias en la piel de ratones CO y MR<sup>EKO</sup>. Mediante inmunohistoquímica, analizamos los niveles de fosfo (p)-histona H2AX,

como marcador de daño al ADN y por tanto de senescencia; sin embargo no detectamos diferencias en su expresión/localización entre genotipos (Figura 47).

Globalmente estos resultados indican que, aunque la pérdida de MR epidérmico contribuye a aumentos menores de citoquinas pro-inflamatorias en la piel envejecida, estos no son suficientes para desencadenar inflamación crónica o senescencia.



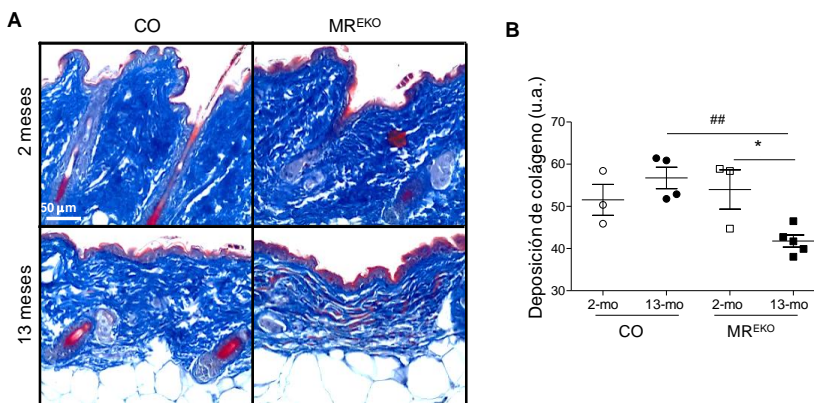
**Figura 47. La expresión de p- $\gamma$ H2AX no muestra cambios en ratones CO y MR<sup>EKO</sup> de 13 meses de edad.** Inmunohistoquímica de secciones de piel dorsal ratones CO y MR<sup>EKO</sup> de 13 meses de edad, utilizando el anticuerpo específico frente a p- $\gamma$ H2AX. Flechas: células positivas. Barra: 50  $\mu$ m.

#### 4.4 Alteraciones en la matriz extracelular en ratones MR<sup>EKO</sup> de 13 meses

Nuestros datos histológicos y moleculares (apartado 4.1 y 4.2.2) revelan una atrofia dérmica en ratones MR<sup>EKO</sup> de 13 meses respecto a CO de la misma edad, que sugiere mayor sensibilidad al envejecimiento cronológico en este compartimento.

Las proteínas ECM de la dermis juegan un papel crucial en el envejecimiento cronológico y la fisiopatología asociada (Naylor et al. 2011; Giangreco et al. 2008), y sus modificaciones afectan la integridad y la funcionalidad del tejido (Guilbert et al. 2016). Entre los componentes de ECM, el colágeno tipo I representa la proteína fibrosa más abundante en humanos y el componente estructural fibrilar clave de varios tejidos como la piel, los huesos o los tendones (Tiganescu et al. 2013). Además, el colágeno I sufre severas alteraciones durante el envejecimiento cutáneo (Rittié y Fisher 2015).

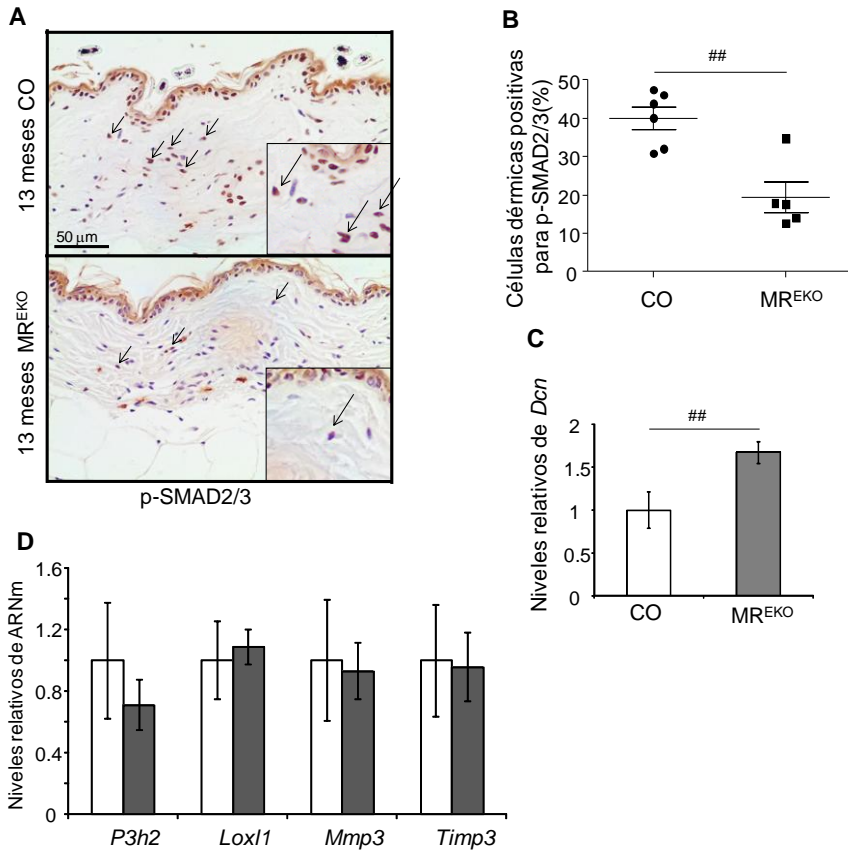
En primer lugar, examinamos la deposición de las fibras de colágeno mediante una tinción de tricrómico utilizando secciones de piel dorsal de ratones CO y MR<sup>EKO</sup> de 2 y 13 meses de edad (Figura 48, A). A los 13 meses, no observamos una variación en la deposición de fibras de colágeno en ratones CO respecto a animales jóvenes; sin embargo, los ratones MR<sup>EKO</sup> de 13 meses presentaban una reducción significativa en el contenido de fibras de colágeno respecto a los de 2 meses (Figura 48, B, 24%). La comparativa entre genotipos muestra que a los 13 meses se detecta una disminución en la deposición de fibras de colágeno MR<sup>EKO</sup> respecto a los CO (Figura 48, B, 27%).



**Figura 48. Los ratones MR<sup>EKO</sup> de 13 meses muestran alteraciones en la deposición de las fibras de colágeno respecto a los CO. A** Imágenes representativas de secciones

de piel dorsal de ratón CO y MR<sup>EKO</sup> de 2 y 13 meses de edad, teñidas con tricrómico. Azul intenso: colágeno; rojo: citoplasma y queratinas. Barra: 50  $\mu$ m. **B** Cuantificación de la deposición de colágeno de las imágenes de tricrómico (A) mediante el software Image J. Asteriscos: diferencias significativas entre edades de un mismo genotipo. Almohadillas: diferencias estadísticamente significativas entre genotipos de la misma edad. \*  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$ ;  $n \geq 3$  por grupo experimental.

Uno de los mecanismos que regula la deposición de colágeno es la vía de señalización TGF- $\beta$  que controla la síntesis y degradación de colágeno modulando la actividad de los FT SMAD2/3. Por otro lado, el proteoglicano decorina (DCN) inhibe la actividad de TGF- $\beta$  compitiendo por la unión a sus receptores TGF- $\beta$ RI/II (Zhang et al. 2019). Mediante técnicas inmunohistoquímicas seguidas de cuantificación, detectamos una disminución de actividad de SMAD2/3 (fosfo (p)-SMAD2/3) en los ratones MR<sup>EKO</sup> de 13 meses respecto a los CO (Figura 49, A y B). Esto correlacionaba con unos niveles relativos mayores de *Dcn* en los MR<sup>EKO</sup> de 13 meses (1.7 veces), y es consistente con la reducción de deposición de colágeno (Figura 49, C). Sin embargo, los ratones MR<sup>EKO</sup> de 13 meses no mostraron cambios en la expresión de otros reguladores de la ECM como *Prolyl 3-hydroxylase 2 (P3h2)*, *Lysyl oxidase-like 1 (Lox11)*, *Mmp3* y *Tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (Timp3)* respecto a los CO (Figura 49, D).



**Figura 49. Los ratones MR<sup>EKO</sup> de 13 meses muestran alteraciones en la actividad SMAD2/3 y en la expresión de decorina.** **A** Inmunohistoquímica de secciones de piel dorsal de ratones CO y MR<sup>EKO</sup> de 13 meses de edad utilizando el anticuerpo específico frente a p-SMAD2/3. Flechas: células positivas. Barra: 50  $\mu$ m. **B** Porcentaje de células dérmicas positivas para pSMAD2/3 y relativo al total de núcleos teñidos con hematoxilina. ## $p < 0.01$ ,  $n \geq 5$  por grupo experimental. **C** Expresión relativa de *Dcn* en la dermis de piel dorsal de ratones CO y MR<sup>EKO</sup> de 13 meses de edad, determinada mediante RT-qPCR. Almohadillas: diferencias estadísticamente significativas entre genotipos de la misma edad. ##  $p < 0.01$ ;  $n \geq 3$  por grupo experimental. **D** Expresión relativa de los genes indicados en la dermis de piel dorsal de ratones CO y MR<sup>EKO</sup> de 13 meses de edad, determinada mediante RT-qPCR.  $n \geq 3$  por grupo experimental.

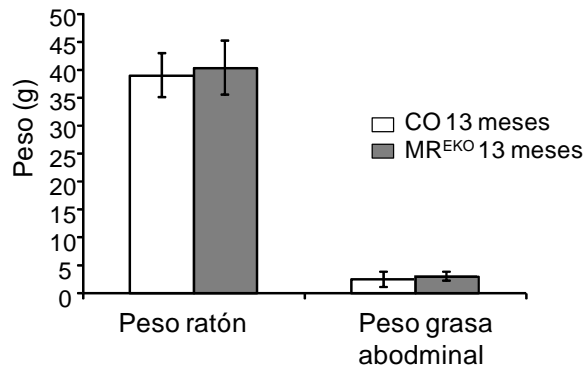
## **4.5 Análisis del dWAT en los ratones MR<sup>EKO</sup> de 13 meses**

### **4.5.1 Estudio histológico y molecular de los adipocitos**

El fenotipo histológico más llamativo de los ratones MR<sup>EKO</sup> de 13 meses, es el engrosamiento del dWAT. Tradicionalmente, se pensaba que los adipocitos dentro de la piel actuaban como depósitos de energía, reguladores térmicos, o soporte estructural. Los datos recientes revelan que además, los adipocitos dérmicos desempeñan funciones adicionales que incluyen la regulación del ciclo del folículo piloso (Zhang et al. 2019; Rivera-Gonzalez et al. 2014).

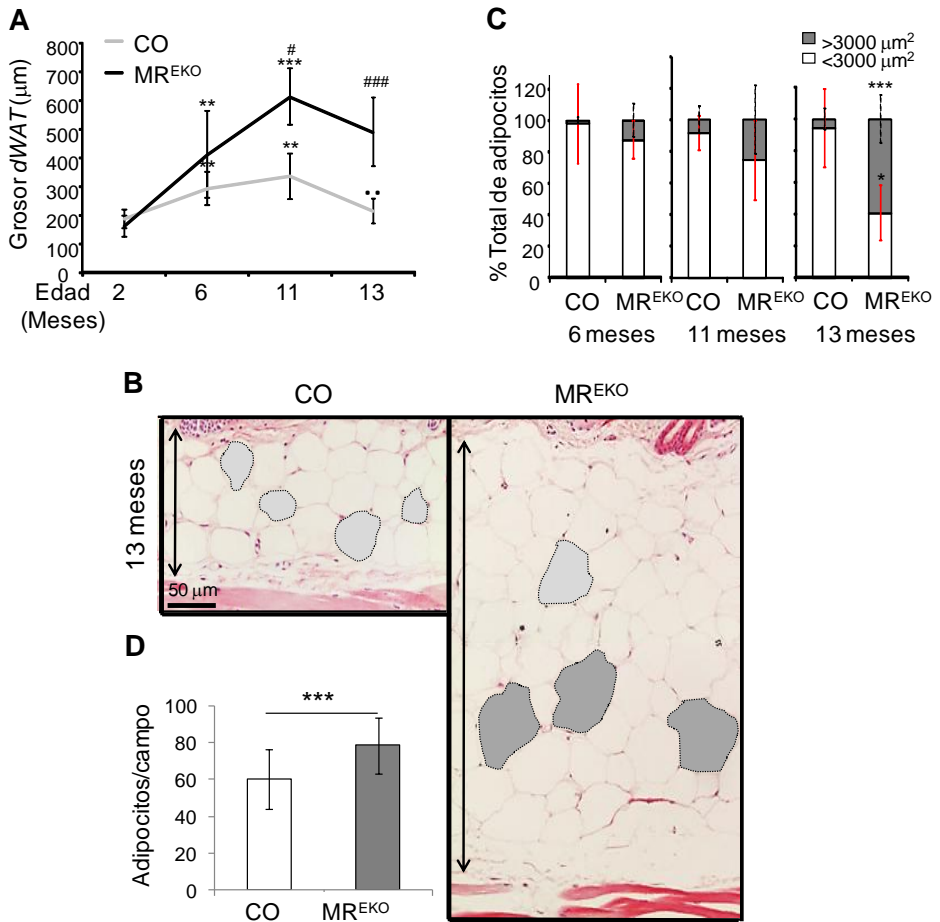
En primer lugar, evaluamos las oscilaciones en el grosor del dWAT en ratones CO y MR<sup>EKO</sup> de 2, 6, 11 y 13 meses (Figura 51, A; Foster et al. 2018; Kruglikov y Scherer 2016; Wang et al. 2013). En los ratones CO, y en concordancia con estudios previos en ratones hembras B6D2 (Wang et al. 2013), el grosor del dWAT se incrementó a 6 y 11 meses, con una reducción significativa a los 13 meses de edad (Figura 51, A). La cinética de cambios de grosor del dWAT en los ratones MR<sup>EKO</sup> siguió el mismo patrón que los CO; sin embargo, el valor absoluto del grosor del dWAT a 11 meses era el doble que el de los CO, y mostró una tendencia a la baja a los 13 meses (Figura 51, A). Cabe destacar que las alteraciones observadas en ratones CO y MR<sup>EKO</sup> de 13 meses se restringen al depósito adiposo del dWAT; no se identificaron diferencias en el peso total o la cantidad de grasa abdominal de dichos ratones (Figura 50).





**Figura 50. El peso de los ratones MR<sup>EKO</sup> a los 13 meses, así como la grasa abdominal, no difieren en comparación a ratones CO.** Se determinaron los pesos totales de los ratones CO y MR<sup>EKO</sup> de 13 meses, así como el peso del tejido adiposo abdominal, y no se encontraron cambios significativos entre los genotipos. n=3 por grupo experimental.

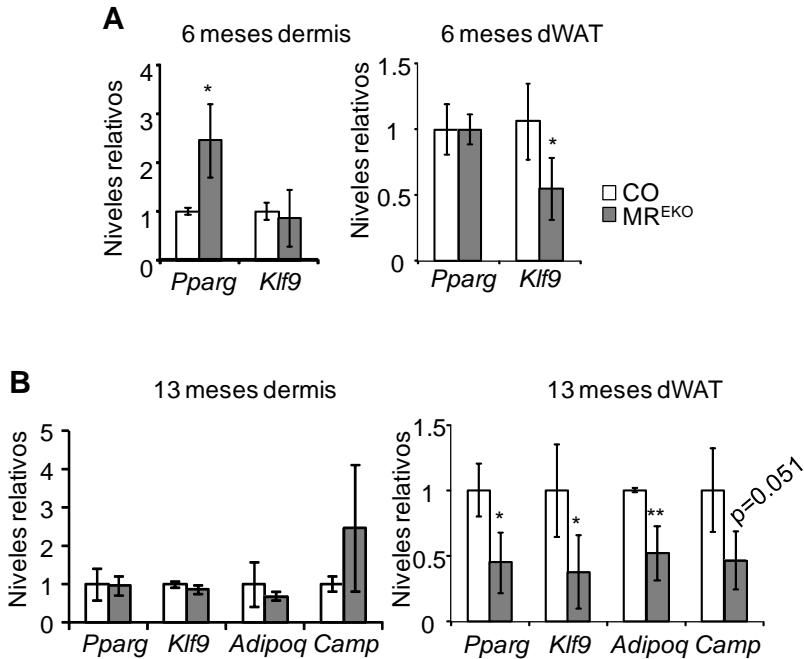
El aumento del dWAT en los ratones MR<sup>EKO</sup> de 13 meses de edad, se debía tanto al mayor tamaño o hipertrofia de los adipocitos (Figura 51, B y C), como a su mayor número (Figura 51, B y D). Mientras que los CO tenían más del 95% de adipocitos con tamaño menor que 3000  $\mu\text{m}^2$ , los MR<sup>EKO</sup> tenían un 55% de adipocitos más grandes que 3000  $\mu\text{m}^2$  (Figura 51, C). El conteo de adipocitos reflejó un aumento significativo en ratones MR<sup>EKO</sup> de 13 meses respecto a los CO (Figura 51, D; 28%). Estos resultados sugieren alteraciones en la diferenciación de los adipocitos.



**Figura 51. Hiperplasia e hipertrofia en los adipocitos de los ratones MR<sup>EKO</sup> de 13 meses.** **A** Grosor del dWAT en las edades indicadas. Asteriscos: diferencias significativas respecto a los 2 meses de edad en cada genotipo. Puntos: diferencias entre los 11 y los 13 meses de edad en CO. #  $p < 0.05$ ; \*\*, \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*, ###  $p < 0.001$ ;  $n \geq 4$  por grupo experimental. **B** Imágenes representativas del dWAT de secciones de piel dorsal de ratón adulto CO y MR<sup>EKO</sup> de 13 meses (H&E). Flechas: grosor del dWAT. Línea punteada: adipocitos de distintos tamaños (de menor tamaño, gris claro; mayor tamaño, gris oscuro). Barra: 50 μm. **C** Porcentaje de adipocitos de tamaño <math>< 3000 \mu\text{m}^2</math> de >math>3000 \mu\text{m}^2</math>. **D** Promedio de adipocitos por campo (aumento 10x) de secciones de piel dorsal de ratones de 13 meses teñidas con H&E. **C y D** Asteriscos: diferencias significativas respecto a los CO. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ;  $n = 5$  por grupo experimental.

La adipogénesis se inicia en los pre-adipocitos que residen en la dermis inferior, que se diferencian a adipocitos mediante un proceso en el que participan dos FT centrales *Kruppel-Like Factor 9* (KLF9,) y *Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma* (PPAR $\gamma$ ), ambos regulados por GR, juegan un papel central (Lee et al. 2018; Lee et al. 2014). Para determinar posibles alteraciones en estos FT, decidimos evaluar su expresión en la dermis y el dWAT de ratones CO y MR<sup>EKO</sup> de 6 meses y 13 meses de edad (Figura 52). Los resultados mostraron que, la expresión dérmica de *Pparg* es 2.5 veces mayor en ratones MR<sup>EKO</sup> de 6 meses que en CO, mientras que no vemos diferencias en la expresión de *Klf9* (Figura 52, A). No obstante, la expresión de *Pparg* no difiere en el dWAT entre genotipos; sin embargo la expresión de *Klf9* disminuía en los MR<sup>EKO</sup> respecto a los CO (Figura 52, A).

Además, no detectamos diferencias en la expresión de la adipocina anti-inflamatoria adiponectina (*Adipoq*), ni del péptido antimicrobiano catelicidina (*Camp*) en la dermis de CO y MR<sup>EKO</sup> de 13 meses de edad (Figura 52, B). Por tanto estos resultados indican que la hipertrofia e hiperplasia de los adipocitos en ratones MR<sup>EKO</sup> ocurre a partir de los de 6 meses de edad, y correlaciona con el aumento de la expresión de *Pparg*. A los 13 meses, detectamos una menor expresión de *Pparg* y *Klf9* en el dWAT de MR<sup>EKO</sup> (Figura 52, B), que concuerda con los datos de menor actividad de GR en este compartimento (Figura 42, B). Además, también observamos una disminución de expresión de *Adipoq* y *Camp* en el dWAT de ratones MR<sup>EKO</sup>.



**Figura 52. Alteración de factores adipogénicos en la dermis y dWAT de ratones MR<sup>EKO</sup> de 13 meses.** Expresión relativa de los genes adipogénicos indicados en la dermis y dWAT de ratones CO y MR<sup>EKO</sup> de 6 y 13 meses de edad, determinada mediante RT-qPCR. Asteriscos: diferencias estadísticamente significativas entre genotipos. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ;  $n \geq 3$  por grupo.

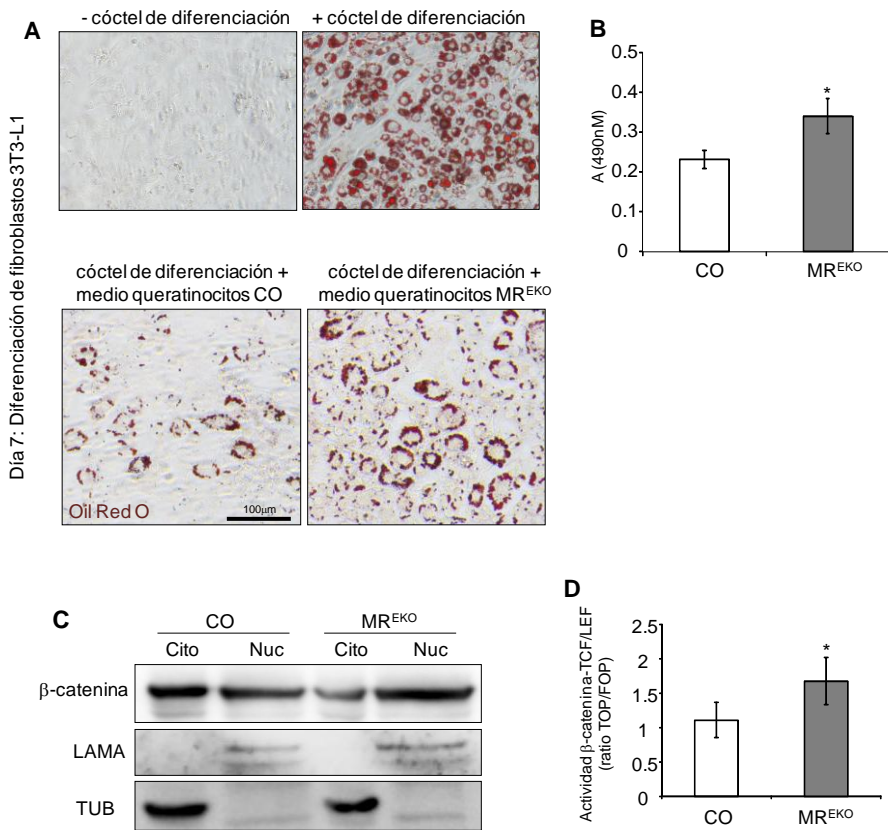
#### 4.5.2. Análisis del proceso de adipogénesis en los ratones MR<sup>EKO</sup> de 13 meses

Estudios recientes han demostrado que la epidermis es capaz de regular la adipogénesis a través de mecanismos paracrinos (Zwick et al. 2018; Donati et al. 2014). Por tanto, analizamos si las alteraciones en adipogénesis de los ratones MR<sup>EKO</sup> de 13 meses eran consecuencia del impacto de la pérdida de MR epidérmico en el dWAT. Para estos experimentos, utilizamos la línea de fibroblastos 3T3-L1 como modelo estandarizado de diferenciación de conversión de fibroblastos a adipocitos (Zebisch et al. 2012). La diferenciación se induce durante 7 días mediante un cóctel de diferenciación que contiene Dex, insulina y 3-isobutil-1-

metilxantina (IBMX) (Zebisch et al. 2012). En estas condiciones, los fibroblastos empiezan a acumular lípidos, que se tiñen con Oil Red O y se cuantifican mediante análisis colorimétrico (Figura 53, A, panel superior).

Para poder evaluar si la pérdida de MR epidérmico implica la secreción de reguladores adipogénicos, se incubaron las células 3T3-L1 con una mezcla que contenía el cóctel de diferenciación y el medio condicionado de queratinocitos CO o MR<sup>EKO</sup>. Después de 7 días, observamos la diferenciación de los fibroblastos 3T3-L1 a adipocitos en ambos genotipos, aunque el contenido en lípidos (Oil Red O) era significativamente mayor en presencia del medio condicionado de queratinocitos MR<sup>EKO</sup> (Figura 53, A panel inferior y B; 1.4 veces).

Se ha descrito que el mecanismo por el que la epidermis regula la adipogénesis implica la activación de la vía de WNT/ $\beta$ -catenina (Donati et al. 2014). Mediante WB detectamos que la translocación citoplásmico/nuclear de  $\beta$ -catenina era mayor en queratinocitos MR<sup>EKO</sup> que en los CO (Figura 53, C). Quisimos determinar si este aumento correlacionaba con una mayor activación del *reporter*  $\beta$ -catenina (TCF/LEF), detectando un aumento constitutivo en queratinocitos MR<sup>EKO</sup> respecto a los CO, consistente con un aumento de la localización nuclear y mayor actividad de  $\beta$ -catenina (Figura 53, D).



**Figura 53. La conversión de fibroblastos a adipocitos aumenta en presencia de medio condicionado procedente de queratinocitos MR<sup>EKO</sup>.** **A** Imágenes representativas de células 3T3-L1 a día 7 de diferenciación sin medio condicionado (panel superior) o con medio condicionado procedente de queratinocitos CO o MR<sup>EKO</sup> (panel inferior), teñidas con Oil Red O. Barra: 100 µm. **B** Cuantificación de lípidos extraídos en (A) mediante absorbancia a 490nm del Oil Red O. \*p<0.05, n=3. **C** Western Blot de extractos citoplásmicos y nucleares de queratinocitos en cultivo CO y MR<sup>EKO</sup> para la detección de β-catenina, lamina A (LAMA) y tubulina (TUB). **D** Ensayos luciferasa en queratinocitos CO y MR<sup>EKO</sup> para medir la actividad β-catenina-TCF/LEF usando los *reporter* TOPFLASH y el mutante FOPFLASH. Los valores se normalizaron al control interno *renilla-luc*. \*p<0.05, n=4.

# **DISCUSIÓN**





Los GCs desempeñan un papel central en la homeostasis cutánea señalizando a través de los receptores hormonales GR y MR. Mientras que el papel de GR en el desarrollo epidérmico, cicatrización, inflamación cutánea, y tumorigénesis se ha investigado a fondo (Whirlledge y DeFranco 2018; Latorre et al. 2013; Sanchis et al. 2012; Pérez 2011); la función de MR en la biología de la piel ha recibido menos atención hasta hace poco (Sevilla y Pérez 2018b). En los últimos años, nuestro grupo ha generado y caracterizado ratones con inactivación específica en la epidermis de GR o MR, denominados GR<sup>EKO</sup> y MR<sup>EKO</sup>, respectivamente (Sevilla et al. 2013; Boix et al. 2016b). Estos modelos animales nos han permitido demostrar que GR, pero no MR, juega un papel central en el desarrollo de la piel. Sin embargo, en la edad adulta, ambos receptores son importantes, dado que tanto los ratones GR<sup>EKO</sup> como MR<sup>EKO</sup> presentaron mayor susceptibilidad a inflamación cutánea inducida tópicamente (Sevilla et al. 2013; Boix et al. 2016b). Sin embargo, anteriormente no se habían abordado las posibles acciones conjuntas de GR y MR en la piel, o si estos receptores actuaban de forma cooperativa o antagónica.

En este trabajo, mostramos la generación y caracterización de ratones con inactivación conjunta de GR y MR en la epidermis, que denominamos ratones DKO. Nuestros datos muestran que ambos receptores tienen un impacto funcional importante en la fisiopatología de la piel durante la vida del individuo. Esta discusión se enfoca en las acciones conjuntas de GR y MR durante el desarrollo cutáneo y en la respuesta inflamatoria; y en el rol de MR en la atrofia cutánea inducida por el envejecimiento cronológico.

## **1. Contribución de GR y MR en desarrollo**

La caracterización histológica de los ratones DKO en la etapa perinatal mostró alteraciones fenotípicas severas respecto a los ratones GR<sup>EKO</sup> y MR<sup>EKO</sup>, con defectos en estrato córneo, expresión anómala de los marcadores de diferenciación y proliferación, y presencia de microabscesos con alto contenido en neutrófilos. Estos datos sugieren que GR y MR son necesarios para el correcto desarrollo de la epidermis, y actúan cooperativamente. El estudio de expresión génica en los distintos genotipos también apoya la cooperatividad de GR y MR en la regulación transcripcional, al observarse un aumento aditivo de los genes pro-inflamatorios *Lnc2* y *S100a8* en la epidermis de ratones DKO respecto a los KO individuales (Figura 20).

Sin embargo, es importante subrayar que las acciones conjuntas de GR y MR dependen del tipo celular. Así, un estudio reciente en cardiomiocitos demuestra que ambos receptores ejercen funciones antagónicas en ratón adulto (Oakley et al. 2019). Los ratones GR KO en cardiomiocitos presentaban defectos cardíacos severos mientras que los ratones MR KO en el mismo tipo celular no presentaban ningún fenotipo evidente. Sin embargo, la inactivación conjunta de ambos receptores en cardiomiocitos dio lugar a una reversión del fenotipo causado por la falta de GR en este tipo celular. El análisis de expresión génica en cardiomiocitos en estos modelos animales demostró alteraciones en genes relacionados con apoptosis exclusivamente en los ratones GR KO, pero no en los doble KO, sugiriendo que MR desempeña un papel patológico tan solo en ausencia de GR. En este sentido, este hallazgo es análogo al que describimos en este trabajo, dónde la pérdida de expresión del marcador epitelial E-cadherina se detectó exclusivamente en queratinocitos GR<sup>EKO</sup>, pero no en DKO (Figura 32, C). De hecho la línea GR<sup>EKO</sup> es la única que presentaba cambios morfológicos similares a los observados en la transición parcial epitelio-mesénquima.

Por otro lado, los queratinocitos MR<sup>EKO</sup> y DKO presentaron un tamaño celular menor. Se ha descrito que las alteraciones en la vía de señalización de mTOR están relacionadas con cambios en el tamaño celular (Tee 2018) y, además, mTOR es una diana molecular de GCs que podría estar implicada en la atrofia cutánea inducida por estos compuestos (Baida et al. 2015). Sin embargo, no detectamos cambios significativos en la expresión de mTOR en las líneas inmortalizadas (datos no mostrados).

El hallazgo de un fenotipo inflamatorio único en los ratones DKO en la etapa perinatal indica sin lugar a dudas que MR también ejerce un papel anti-inflamatorio durante el desarrollo. Aunque desconocemos los mecanismos responsables de la resolución espontánea de dicho fenotipo en la etapa post-natal temprana, basándonos en el *cross-talk* entre compartimentos de la piel, podemos especular que podría deberse a la participación de otros tipos celulares.

## **2. Contribución de GR y MR a la inflamación cutánea (edad adulta)**

El fenotipo cutáneo de los ratones DKO adultos no mostró grandes diferencias respecto a los KO individuales; en todos los casos la pérdida del receptor dio lugar a un aumento pequeño pero significativo del grosor epidérmico respecto a los CO (Figura 22). Estos resultados indican que GR y MR no son de vital importancia para mantener la homeostasis de la piel en edad adulta en condiciones fisiológicas, sin embargo, juegan un papel fundamental en condiciones patológicas.

### **2.1 Susceptibilidad a patologías inflamatorias cutáneas**

Los experimento de inflamación *in vivo* en respuesta a distintos protocolos de inflamación, tanto en respuesta a PMA (inflamación aguda),

como el modelo de psoriasis inducida con IMQ revelaron una susceptibilidad mayor en los DKO respecto a los KO individuales. La mayor severidad fenotípica se caracterizó por una mayor proliferación (engrosamiento epidérmico y expresión anómala de K6 en todas las capas epidérmicas) e inflamación (edema de oreja, presencia de microabscesos con infiltrados de neutrófilos, y mayor presencia de p65 nuclear). Además, la pérdida conjunta de GR y MR resultó en una disminución notable de las acciones terapéuticas de Dex, respecto a los CO, e incluso respecto a los KO individuales (Figura 26). En conjunto, nuestros resultados indican que GR y MR epidérmicos son necesarios para mediar la respuesta terapéutica a GCs tópicos en un contexto inflamatorio.

La activación constitutiva de p38 y ERK en DKO respecto a CO aparece como un denominador común en los estudios *in vivo* (piel de ratones DKO) e *in vitro* (queratinocitos inmortalizados DKO) (Figuras 19 y 33). Aunque estos resultados indican que tanto GR como MR son moduladores cruciales de la actividad de estas MAPKs en queratinocitos, no detectamos diferencias significativas entre las acciones combinadas e individuales de los receptores.

Por otro lado, los experimentos de actividad luciferasa demostraron que GR y MR ejercen efectos aditivos en el control de la vía AP-1, y efectos sinérgicos en el control de la vía NF- $\kappa$ B (Figura 35). Aunque estos datos sugieren una cooperación entre ambos receptores en queratinocitos para reprimir mediadores pro-inflamatorios, dicha respuesta no fue aditiva o sinérgica *in vivo* (ratones DKO vs KO individuales; Figura 23 y 28). Este hecho sugiere que la pérdida conjunta de GR y MR en la epidermis podría desencadenar alteraciones en otros compartimentos de la piel, y contrarrestar parcialmente el aumento de susceptibilidad a inflamación cutánea de los ratones DKO.

Una de las terapias que se usan actualmente para el tratamiento de la psoriasis son los anticuerpos frente a la citoquina IL17, que juega un papel relevante en la inmunopatogenia de la enfermedad (Han et al. 2012; Johnson-Huang et al. 2012). Aunque nuestros resultados mostraron un aumento constitutivo del gen *Il17f* en los ratones DKO, éstos no desarrollaron lesiones psoriáticas espontáneas, sugiriendo que los niveles de *Il17f per se* no son suficientes para desarrollar la enfermedad. IL17F comparte un 55% de identidad aminoacídica con IL17A, y ratones con sobreexpresión de IL17A presentaron un cuadro inflamatorio severo, con grandes infiltrados de células T (Dubin y Kolls 2009). Estas diferencias podrían deberse a que los infiltrados de células T no están tan elevados en el modelo de IMQ, lo que atenuaría las posibles lesiones espontáneas en los DKO.

Una observación importante, no descrita anteriormente, es que el tratamiento con IMQ redujo los niveles endógenos de *GR/Nr3c1* y *MR/Nr3c2*, así como de genes regulados por GCs, en la piel de ratones CO (Figura 30). Estos datos demuestran que los GCs no solo son efectivos para el tratamiento de la psoriasis sino que las deficiencias en la señalización mediada por GCs pueden contribuir a la aparición/progresión de la enfermedad. Estos datos son consistentes con varios trabajos que describen una menor expresión de *GR/NR3C1* y *MR/NR3C2* en lesiones de pacientes con psoriasis (Sarkar et al. 2017; Suárez-Fariñas et al. 2012). Además, varios trabajos recientes han descrito que la deficiencia local de GCs, la reducción de la expresión de GR en lesiones de pacientes con psoriasis, o la reducción de enzimas clave para la síntesis local de GCs en lesiones de pacientes con psoriasis, contribuyen a la patogénesis de la enfermedad (Hannen et al. 2017; Sarkar et al. 2017). Por tanto, las vías de esteroidogénesis, los receptores, y los genes diana, aparecen como candidatos para diseñar nuevas estrategias –basadas en los GCs- para el tratamiento de la psoriasis.

## **2.2 Acciones conjuntas de GR y MR: posibles implicaciones en los tratamientos con GCs**

El análisis integrado de las acciones de GR y MR pretende en última instancia conocer en detalle los mecanismos de acción de estos FT e identificar sus dianas transcripcionales, para poder mejorar las terapias basadas en los GCs. Los estudios acerca de MR en piel sugieren que esta proteína podría ser responsable de algunos de los efectos secundarios no deseados asociados al exceso de GCs, en concreto la atrofia cutánea (Boix et al. 2018; Boix et al. 2016b; Farman y Nguyen 2016; Maubec et al. 2015). Sin embargo, al contrario que en la mayoría de tipos celulares donde MR desempeña un papel pro-inflamatorio, MR actúa como anti-inflamatorio en la piel (Boix et al. 2018; Boix et al. 2016b).

Nuestra hipótesis inicial planteaba el uso combinado de GCs y antagonistas de MR, con objeto de preservar los efectos beneficiosos anti-inflamatorios de los GCs y disminuir los efectos secundarios asociados al exceso de GCs. Dicha hipótesis se demostró mediante abordajes genéticos y farmacológicos en ratones y explantes de piel humana, donde la inactivación de MR mejoró efectivamente la atrofia cutánea inducida por GCs (Boix et al. 2018; Boix et al. 2016b). Sin embargo, en experimentos en explantes de piel humana sujetas a irritación (tratados con SDS), observamos que el uso combinado de GCs e inhibidores de MR, además de disminuir los efectos atrofogénicos de los GCs, también atenuó sus efectos anti-inflamatorios (Boix et al. 2018). Además, la mayor susceptibilidad a inflamación cutánea de los ratones adultos MR<sup>EKO</sup> (Boix et al. 2016b), y el fenotipo cutáneo en desarrollo más acentuado en ratones DKO respecto a los KO individuales, argumenta en la misma dirección (Figura 18).

Por tanto, nuestros datos aconsejan cautela en el uso de tratamientos combinados basados en el uso de GCs y antagonistas de MR, ya que podrían restar efectividad al uso terapéutico de los GCs (Boix et al. 2016b).

### 2.3 Especificidad y selectividad de los dímeros GR/MR en la respuesta a GCs en queratinocitos

En queratinocitos en cultivo, GR y MR pueden actuar de manera individual o coordinada, como muestran los ensayos de activación del *reporter* GRE-luciferasa (Figura 38). GR activa dicho *reporter* de manera mucho más eficiente que MR, sugiriendo que la capacidad transcripcional de los dímeros GR/GR es mucho mayor que la de los dímeros MR/MR, para una dosis y tiempo de respuesta determinado. Además, mientras que niveles subóptimos de GR o MR eran incapaces de transactivar el *reporter* GRE-luciferasa, la co-transfección de ambos receptores en dosis bajas resultó en una interacción funcional y acciones transcripcionales aditivas (Figura 38).

La idea de que GR y MR regulen los mismos genes va en contra de la especificidad de acción de estos receptores en distintos contextos fisiopatológicos, y cuestiona además la especificidad de acción en respuesta a distintos ligandos. Recientemente, varios trabajos han descrito que los homodímeros (GR/GR, MR/MR) y los heterodímeros (GR/MR) reconocen distintas secuencias reguladoras (Le Billan et al. 2018; Mifsud y Reul 2016). Existen varios factores que pueden modular la formación de homo- vs hetero-dímeros en un tipo celular determinado, incluyendo la ratio GR:MR, la cinética de translocación de GR y MR, o el reclutamiento selectivo de distintos co-reguladores transcripcionales, co-activadores o co-represores (Weikum et al. 2017; Mifsud y Reul 2016; Sacta et al. 2016). Todos estos factores condicionarán la respuesta transcripcional final.

En los distintos tipos celulares, las ratios GR:MR son muy diferentes; en hipocampo y cardiomiocitos oscilan entre 1:1 y 30:1 respectivamente (Farman y Rafestin-Oblin 2001). Nuestros análisis de expresión génica mediante RT-qPCR en queratinocitos/epidermis indican una ratio GR:MR de 20:1 (Figura 31), y cuando reinsertamos ambos receptores necesitamos una

ratio 1:40 para conseguir una activación transcripcional óptima (Figura 38). Sin embargo, la estimación de estas ratios está condicionada por la falta de herramientas técnicas adecuadas para detectar la expresión de MR endógeno. La cantidad relativa de GR:MR en cada tipo celular puede ser particularmente importante en condiciones donde GR no es funcional, puesto que como se ha descrito, MR puede desarrollar un papel patológico (Oakley et al. 2019; Oakley y Cidlowski 2015).

Hasta el momento, no hemos realizado un estudio sistemático de la cinética de translocación al núcleo de GR y MR, o de su reclutamiento a regiones genómicas en respuesta a GCs, cuando se expresan de forma individual o combinada. Sin embargo, el reclutamiento de MR a las secuencias GRE del gen *Gilz* es óptimo solo cuando se permite la formación de heterodímeros (Figura 38; reinserción de MR o de MR y GR en la línea DKO). Hay que tener en cuenta que en estos experimentos se determinó el reclutamiento en condiciones de sobreexpresión de los receptores (transfecciones) en lugar de utilizar receptores endógenos (Figura 38).

### **3. El papel de los GCs en el envejecimiento cutáneo cronológico**

El envejecimiento de la piel es un proceso biológico complejo consecuencia de factores intrínsecos o genéticamente programados, entre los que incluyen un aumento local o sistémico de GCs; y de factores extrínsecos, principalmente radiación ultravioleta (Rittié y Fisher 2015). Aunque muchos de los cambios asociados con el envejecimiento cutáneo como la atrofia generalizada y la aparición de arrugas, se asocian a cuestiones estéticas, es importante señalar que dichos cambios repercuten en la funcionalidad del tejido y, en última instancia aumentan la susceptibilidad a infecciones, enfermedades inflamatorias, y producen un retraso en la cicatrización de heridas (Rinnerthaler et al. 2015; Rittié y Fisher 2015; Puizina-Ivié 2008). El aumento del envejecimiento de la población y



su impacto psicosocial, ha creado una demanda de intervenciones efectivas para reducir, posponer y, en algunos casos, reparar los efectos adversos asociados (McCullough y Kelly 2006).

### **3.1 La ausencia de MR epidérmico altera la homeostasis de la piel en el envejecimiento cronológico**

Nuestros análisis utilizando explantes de piel CO y MR<sup>EKO</sup> de ratones de 2 y 13 meses han demostrado que con la edad se produce un exceso de GCs locales detectable mediante ensayos ELISA (Figura 40). Sin embargo, no detectamos diferencias entre genotipos, cuestionando por qué la repercusión es distinta en ratones MR<sup>EKO</sup> vs CO. Los datos sugieren cambios en la señalización mediada por GCs, que se originan en la epidermis y repercuten mediante acciones paracrinas en todo el tejido. El hecho de que los ratones MR<sup>EKO</sup> de 13 meses no presentaran adelgazamiento epidérmico, al contrario que los CO de la misma edad, sugiere que MR participa en las acciones anti-proliferativas inducidas por exceso de GCs. Estos datos son consistentes con nuestros estudios previos que demostraron que los ratones MR<sup>EKO</sup> eran parcialmente resistentes a un tratamiento farmacológico prolongado con GCs (Boix et al. 2018; Boix et al. 2016b; Maubec et al. 2015).

La reducción del grosor dérmico, la disminución de la celularidad dérmica, y la disminución en la deposición de colágeno durante el proceso de envejecimiento en los MR<sup>EKO</sup> conlleva alteraciones en la ECM y, por tanto, fragilidad cutánea (Rittié y Fisher 2015) que correlaciona con cambios en la actividad de GR, así como en toda su vía de señalización (Figura 42). Para la correcta función dérmica, es necesario un equilibrio de la actividad de DCN y TGF- $\beta$ , proteínas que tienen efectos anti- y pro-fibróticos respectivamente. En los ratones MR<sup>EKO</sup>, el exceso de GCs supuso un aumento de los niveles de *Dcn* en la dermis, similar al descrito en

fibroblastos humanos tratados con GCs (Tiganescu et al. 2013). La sobreexpresión de *Fkbp51* y *Ddit4* en la dermis de los ratones MR<sup>EKO</sup> de 13 meses, correlaciona con la atrofia de este compartimiento, y es consistente con el papel atrofogénico descrito para estos genes (Baida et al. 2018; Baida et al. 2015). De hecho, los ratones *Fkbp51*<sup>-/-</sup> y *Ddit4*<sup>-/-</sup> muestran una protección frente a la hipoplasia dérmica después de un tratamiento con GCs (Baida et al. 2018; Baida et al. 2015).

Uno de los mecanismos plausibles para explicar el fenotipo de los ratones MR<sup>EKO</sup> de 13 meses incluye alteraciones en la ruta de señalización de los GCs. Gran parte de los estudios relativos a los efectos de los GCs en envejecimiento cutáneo se basan en el modelo KO para Hsd11β1 (Morgan et al. 2014; Tiganescu et al. 2013). Los ratones *Hsd11β1*<sup>-/-</sup> mostraron cierta protección frente a la atrofia cutánea inducida por envejecimiento cronológico, con mejor deposición de fibras de colágeno y cicatrización respecto a los CO (Tiganescu et al. 2013). Además la inhibición farmacológica de Hsd11β1 parece una de las estrategias más prometedoras para reducir los niveles de GCs, y aminorar los efectos secundarios asociados.

Sin embargo, los datos que vinculan directamente GR y envejecimiento cutáneo son casi inexistentes (Lili et al. 2019). En cuanto a MR, su papel en este proceso tan solo se ha estudiado en un modelo de ratón con síndrome metabólico expuesto a radiación UV, donde se describió una correlación entre el aumento de expresión de MR y los signos de envejecimiento (Nagase et al. 2013). Las alteraciones metabólicas y hormonales (aumento de adipocitoquinas, resistencia a insulina y estrés oxidativo) correlacionaron con daño cutáneo e infiltración de células inflamatorias, y se redujeron mediante el bloqueo farmacológico de MR (Nagase et al. 2013). Estos signos de inflamación y resistencia a insulina también se han descrito en el tejido adiposo visceral de ratones obesos,

indicando un escenario molecular común entre la piel y el tejido adiposo en modelos murinos con esta patología (Hirata et al. 2009; Guo et al. 2008).

En este trabajo, hemos analizado la contribución de GR y MR a los cambios histológicos y moleculares durante el proceso de envejecimiento cutáneo utilizando el modelo animal MR<sup>EKO</sup>. Es importante destacar que la pérdida de MR epidérmico en ratones de 2 meses de edad no repercute en la homeostasis de la piel en condiciones fisiológicas; tampoco se observan cambios aparentes en los distintos compartimentos de la piel (Figura 39).

### **3.2 Las alteraciones en la vía de señalización por GCs en los MR<sup>EKO</sup> de 13 meses repercuten en el dWAT**

Uno de los hallazgos más importantes de este estudio, ha sido la detección de un engrosamiento significativo del dWAT en la piel de los MR<sup>EKO</sup> de 13 meses (Figura 51; 2,5 veces). Recientemente se ha descrito que el engrosamiento del dWAT es un signo favorable en el proceso de envejecimiento, ya que se acompaña con una disminución del factor profibrótico TGF- $\beta$  (Chen et al. 2019b; Zhang et al. 2019). En este sentido, el aumento del dWAT sería consistente con una menor actividad de la ruta TGF- $\beta$ /SMAD2/3 en la dermis de ratones MR<sup>EKO</sup> de 13 meses de edad (Figura 49).

Existen numerosos estudios que describen la importancia de los GCs como moduladores de la adipogénesis (John et al. 2016; Lee et al. 2014; Campbell et al. 2011; Campbell et al. 2009; Pantoja et al. 2008). Si bien el aumento de los niveles de los GCs sistémicos (Cushing) o locales (mayor actividad de Hsd11 $\beta$ 1 en el tejido adiposo) resulta en el engrosamiento de la grasa visceral, también se correlaciona con una disminución de los depósitos de grasa subcutáneos, como el dWAT (Ferraù y Korbonits 2015). Un dato interesante es que el fenotipo observado en el dWAT de los MR<sup>EKO</sup> de 13 meses no es consistente con la reducción del tejido adiposo

subcutáneo de los ratones *Hsd11 $\beta$ 1<sup>-/-</sup>* (Morgan et al. 2014). Esta aparente discrepancia puede deberse a mecanismos de regulación distintos en estos dos modelos de ratones transgénicos.

Estudios previos han revelado la contribución relativa de GR, MR, o ambos, en la adipogénesis del dWAT inducida por GCs (Lee et al. 2014; Caprio et al. 2007). Se ha demostrado que GR y otros FT adipogénicos promueven la expresión de PPAR $\gamma$ , regulador central de la adipogénesis. No obstante, en un estudio *in vivo* utilizando fibroblastos GR KO, se demostró que éstos son capaces de formar adipocitos funcionales pero de menor tamaño (Bauerle et al. 2018), y que la señalización a través de GR no parece influir de forma significativa en la función endocrina y lipídica (Lee et al. 2018). Sin embargo, existen datos aparentemente contradictorios, ya que los ratones KO del gen diana de GR, *Redd1/Ddit4*, mostraron un aumento del grosor del dWAT, detectable desde etapas tempranas del desarrollo, debido a una mayor generación de nuevos adipocitos maduros, y alteraciones en su diferenciación. Este aumento del dWAT persistió durante toda la vida de los ratones *Redd1/Ddit4* KO y era independiente del ciclo del pelo (Rivera-Gonzalez et al. 2020).

Por otro lado, la inhibición farmacológica de MR en fibroblastos en cultivo mostró una menor tasa de conversión a adipocitos, como consecuencia de una menor expresión de *Pparg* (Jia et al. 2017; Caprio et al. 2011, Caprio et al. 2007). Un estudio reciente ha demostrado que la inactivación de MR específica en adipocitos disminuye la expresión de genes con un papel clave en adipogénesis (*Pparg*, *Cebpa*, *Dexras1*, *Lpin1* y *Lpin3*) (Ferguson et al. 2020). Estos defectos pueden mitigarse mediante la adición *in vitro* de un agonista de PPAR $\gamma$  o su sobreexpresión. Además, la inactivación específica de MR en adipocitos conlleva una expresión reducida de GR (45% menos), sugiriendo que ambos receptores actúan de forma coordinada en este tipo celular (Ferguson et al. 2020). Nuestros resultados en ratones MR<sup>EKO</sup> sugieren que MR epidérmico tiene un papel

central en la regulación específica del dWAT, mediado por *Pparg*, que se induce alrededor de los 6 meses de edad y da lugar a un aumento en la adipogénesis. Las evidencias recientes indican que el bloqueo selectivo de MR es una nueva opción terapéutica para el control del depósito excesivo de tejido adiposo y sus complicaciones metabólicas (Ferguson et al. 2020; Infante et al. 2019).

Otro hallazgo importante de nuestros estudios ha consistido en demostrar que la pérdida de MR epidérmico da lugar a la activación de  $\beta$ -catenina mediante acciones paracrinas; sin embargo, hasta el momento no hemos identificado los mediadores solubles responsables de estos efectos. Estos datos son consistentes con estudios previos que proponen que la epidermis regula la adipogénesis a través de mediadores paracrinos generados por la activación de  $\beta$ -catenina (Zwick et al. 2018; Donati et al. 2014).

Las oscilaciones del dWAT afectan la regulación del ciclo del pelo (Zwick et al. 2018), y muchas de las vías propuestas como mediadores paracrinos están relacionadas con este proceso, incluyendo la activación de *Hedgehog* (Hh), *Bone Morphogenetic Proteins* (BMP) e *Insulin-like Growth Factor* (IGF) (Zwick et al. 2018; Donati et al. 2014). En estudios previos, examinamos el ciclo del pelo en ratones MR<sup>EKO</sup> adultos, y no detectamos cambios respecto a los CO (Boix et al. 2016b). En este trabajo tampoco hemos detectado variaciones significativas en la morfología o número de los folículos pilosos de ratones MR<sup>EKO</sup> de distintas edades.

Este trabajo, centrado en los mecanismos de acción de los receptores de corticosteroides GR y MR en la respuesta a GCs en piel, subraya la importancia de un control estricto y coordinado de estos FT, de la especificidad de acción de tipo celular, y del contexto fisiopatológico.









# **CONCLUSIONES**



1. Los ratones transgénicos con inactivación conjunta de GR y MR específica en epidermis ( $K5-Cre^{+/-} // MR^{loxP/loxP} // GR^{loxP/loxP}$ , *GR/MR epidermal knock out* o *Double Knock-Out*, DKO) son viables y fértiles.

2. En ratones DKO recién nacidos (P0), la pérdida combinada de GR y MR epidérmicos da lugar a efectos severos en la estratificación de la epidermis y causa un fenotipo inflamatorio, con aumento en la actividad p38 y ERK, sobreexpresión de genes pro-inflamatorios, y presencia única de microabscesos que, en conjunto, recapitula las características de patologías cutáneas inflamatorias prevalentes. El fenotipo se resuelve de forma espontánea en la etapa post-natal temprana mediante mecanismos aún sin esclarecer.

3. En ratones adultos, GR y MR epidérmicos ejercen acciones anti-inflamatorias conjuntas en inflamación aguda (PMA) y en un modelo de psoriasis inducido por imiquimod (IMQ). En ambos casos el fenotipo de los ratones DKO es más severo que el de los KO individuales, con microabscesos y alteraciones moleculares que incluyen una mayor activación de la actividad p38 y ERK. Los ratones DKO tratados con PMA son resistentes a los efectos anti-proliferativos y anti-inflamatorios del GC sintético dexametasona (Dex), sugiriendo que GR y MR epidérmicos son necesarios para mediar los efectos terapéuticos de los GCs.

4. La generación y caracterización de una línea inmortalizada de queratinocitos DKO ha demostrado que GR y MR endógenos modulan la proliferación y el tamaño celular. Los queratinocitos DKO muestran activación constitutiva de las vías de señalización MAPK, NF- $\kappa$ B y AP-1, que se revierte parcialmente tras la re inserción de GR o MR.

5. En queratinocitos, el tratamiento con GCs induce la translocación al núcleo de GR y MR, donde co-localizan e interaccionan físicamente para regular la transcripción en respuesta a GCs. La eficiencia transcripcional de GR es mayor que la de MR, aunque a dosis bajas, ambos receptores actúan

de forma cooperativa para modular una respuesta transcripcional óptima a GCs.

6. Durante el envejecimiento fisiológico, MR epidérmico ejerce un papel importante en el *cross-talk* entre compartimentos de la piel a través de mecanismos que modulan la actividad de GR. La epidermis de los ratones MR<sup>EKO</sup> de 13 meses es resistente a los signos de atrofia que acompañan al envejecimiento, mientras que se detecta mayor reducción del grosor dérmico, menor celularidad, y alteraciones en la vía de TGF- $\beta$ /SMAD2/3 que correlacionan con una menor deposición de colágeno. Los cambios fenotípicos y moleculares se deben, al menos en parte, a alteraciones específicas en la señalización por GCs en los distintos compartimentos.

7. Los ratones MR<sup>EKO</sup> de 13 meses presentan un aumento de más de 2 veces en el grosor del dWAT, debido al aumento del número y tamaño de adipocitos. Los cambios en adipogénesis se observan a partir de los 6 meses de edad, y correlacionan con una sobreexpresión de *Pparg*. Los experimentos *in vitro* sugieren que los queratinocitos MR<sup>EKO</sup> estimulan la adipogénesis vía activación de WNT/ $\beta$ -catenina.

# **BIBLIOGRAFÍA**



- Abdel Hay R, Samir N, Safwat M, Rashed L, Soliman M. Tissue lipocalin-2 in psoriasis: is it a marker of metabolic disturbance or a possible marker of therapeutic efficacy after narrow band ultraviolet B? *J. Dermatolog. Treat.* Taylor & Francis; 2019;0(0):1471-14753
- Abuhilal M, Walsh S, Shear N. The role of IL-17 in the pathogenesis of psoriasis and update on IL-17 inhibitors for the treatment of plaque psoriasis. *J. Cutan. Med. Surg.* 2016;20(6):509-516
- 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):3517-3525
- Albanesi C, Madonna S, Gisondi P, Girolomoni G. The interplay between keratinocytes and immune cells in the pathogenesis of psoriasis. *Front. Immunol.* 2018;9:1549
- 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(28):20870-20676
- Annelies J, Polman E, Ronald De Kloet E, Datson NA. Two populations of glucocorticoid receptor-binding sites in the male rat hippocampal genome. *Endocrinology.* 2013;154:1832-1844
- Aranda A, Pascual A. Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. *Physiol. Rev.* 2001;81(3):1269-304
- Ashton AW, Le TYL, Gomez-Sanchez CE, Morel-Kopp MC, McWhinney B, Hudson A, et al. Role of nongenomic signaling pathways activated by aldosterone during cardiac reperfusion injury. *Mol. Endocrinol.* 2015;29(8):1144-1155
- Aszterbaum M, Feingold KR, Menon GK, Williams ML. Glucocorticoids accelerate fetal maturation of the epidermal permeability barrier in the rat. *J. Clin. Invest.* 1993;91:2703- 2708.
- Ayroldi E, Cannarile L, Migliorati G, Nocentini G, Delfino D V., Riccardi C. Mechanisms of the anti-inflammatory effects of glucocorticoids: Genomic and nongenomic interference with MAPK signaling pathways. *FASEB J.* 2012;26(12):4805-4820
- Baida G, Bhalla P, Kirsanov K, Lesovaya E, Yakubovskaya M, Yuen K, Guo S, Lavker RM, Readhead B, Dudley JT, Budunova I. REDD 1 functions at the crossroads between the therapeutic and adverse effects of topical glucocorticoids. *EMBO Mol. Med.* 2015;7(1):42-58

- Baida G, Bhalla P, Yemelyanov A, Stechschulte LA, Shou W, Readhead B, Dudley JT, Sánchez ER, Budunova I. Deletion of the glucocorticoid receptor chaperone FKBP51 prevents glucocorticoid-induced skin atrophy. *Oncotarget*. 2018;9(78):34772-34783
- Barnes PJ, Adcock IM. Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. *Lancet*. 2009;373(9678):1905-1917
- Bartoli M, Platt D, Lemtalsi T, Gu X, Brooks SE, Marrero MB, Caldwell RB. VEGF differentially activates STAT3 in microvascular endothelial cells. *FASEB J*. 2003;17(11):1562-1564
- Bauerle KT, Hutson I, Scheller EL, Harris CA. Glucocorticoid receptor signaling is not required for in vivo adipogenesis. *Endocrinology*. 2018;159(5):2050-2061
- 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):1377-1388
- Berger S, Bleich M, Schmid W, Cole TJ, Peters JJ, Watanabe H, Kriz W, Warth R, Greger R, Schütz G. Mineralocorticoid receptor knockout mice: Pathophysiology of Na metabolism. *Genetics*. 1998; 95: 9424–9429
- Berger S, Bleich M, Schmid W, Greger R, Gü G, Schütz G. Mineralocorticoid receptor knockout mice: Lessons on Na<sup>+</sup> metabolism. *Kidney Int*. 2000;57:1295-1298
- 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;103(1):1995-2000
- Bettini M, Vignali DAA. Regulatory T cells and inhibitory cytokines in autoimmunity. *Curr Opin Immunol*. 2009;21(6):612-618
- Bleich M, Warth R, Schmidt-Hieber M, Schulz-Baldes A, Hasselblatt P, Fisch D, Berger S, Kunzelmann K, Kriz W, Schütz G, Greger R. Rescue of the mineralocorticoid receptor knock-out mouse. *Pflugers Arch*. 1999;438(3):245-254
- Bochénska K, Smolińska E, Moskot M, Jakóbkiewicz-Banecka J, Gabig-Cimińska M. Models in the research process of psoriasis. *Int. J. Mol. Sci*. 2017;18(12):1-17
- Boehncke WH, Schön MP. Psoriasis. *Lancet*. 2015;386(9997):983-994
- Boix J, Bigas J, Sevilla LM, Iacobone M, Citton M, Torresan F, Caroccia B,



- Rossi GP, Pérez P. Primary aldosteronism patients show skin alterations and abnormal activation of glucocorticoid receptor in keratinocytes. *Sci. Rep.* 2017;7(1):1-10
- Boix J, Carceller E, Sevilla LM, Marcos-Garcés V, Pérez P. The mineralocorticoid receptor plays a transient role in mouse skin development. *Exp. Dermatol.* 2016a;25(1):69-71
- Boix J, Nguyen VT, Farman N, Aractingi S, Pérez P. Mineralocorticoid receptor blockade improves glucocorticoid-induced skin atrophy but partially ameliorates anti-inflammatory actions in an irritative model in human skin explants. *Exp. Dermatol.* 2018;27(2):185-187
- 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.* 2016b;136(12):2417-2426
- Boyman O, Hefti HP, Conrad C, Nickoloff BJ, Suter M, Nestle FO. Spontaneous development of psoriasis in a new animal model shows an essential role for resident T cells and tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* 2004;199(5):731-736
- Callera GE, Yogi A, Briones AM, Montezano ACI, He Y, Tostes RCA, Schiffrin EL, Touyz RM. Vascular proinflammatory responses by aldosterone are mediated via c-Src trafficking to cholesterol-rich microdomains: Role of PDGFR. *Cardiovasc. Res.* 2011;91(4):720-731
- Campbell JE, Hawke TJ, Riddell MC. Glucocorticoids are capable of stimulating both lipolysis and adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *Can. J. Diabetes.* 2009;33(3):302-303
- Campbell JE, Peckett AJ, D'souza AM, Hawke TJ, Riddell MC. Adipogenic and lipolytic effects of chronic glucocorticoid exposure. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2011;300:198-209
- Campisi J. Aging, Cellular Senescence, and Cancer. *Annu Rev Physiol.* 2013;75:685-705
- Candi E, Schmidt R, Melino G. The cornified envelope: A model of cell death in the skin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2005;6(4):328-340
- Caprio M, Antelmi A, Rard Chetrite G, Muscat A, Mammi C, Marzolla V, Fabbri A, Zennaro MC, Fève B. Antiadipogenic effects of the mineralocorticoid receptor antagonist drospirenone: potential implications for the treatment of metabolic syndrome. *Endocrinology.* 2011;152: 113–125

- Caprio M, Fève B, Claës A, Viengchareun S, Lombès M, Zennaro MC. Pivotal role of the mineralocorticoid receptor in corticosteroid-induced adipogenesis. *FASEB J.* 2007;21(9):2185-94
- Cascallana JL, Bravo A, Donet E, Leis H, Lara MF, Paramio JM, Jorcano JL, Pérez P. Ectoderm-targeted overexpression of the glucocorticoid receptor induces hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Endocrinology.* 2005;146(6):2629-2638
- Cartwright MJ, Schlauch K, Lenburg ME, Tchkonja T, Pirtskhalava Y, Cartwright A, et al. Aging, depot origin, and preadipocyte gene expression. *J. Gerontol.* 2010;65A(3) 242–251
- Cervantes-Durán C, Velázquez-Hernández ME, Valentín-Escalera J, Bartolomé-Camacho MC, Rodríguez-Orozco AR, García-Pérez ME. Small molecules under development for psoriasis: on the road to the individualized therapies. *Arch. Dermatol. Res.* 2020
- Chapman K, Holmes M, Seckl J. 11B-hydroxysteroid dehydrogenases intracellular gate-keepers of tissue glucocorticoid action. *Physiol. Rev.* 2013;93(3):1139-1206
- Chen HF, Chuang HC, Tan TH. Molecular sciences regulation of dual-specificity phosphatase (dusp) ubiquitination and protein stability. 2019a;20:2668
- Chen SX, Zhang LJ, Gallo RL. Dermal white adipose tissue: a newly recognized layer of skin innate defense. *J. Invest. Dermatol.* 2019b;139(5):1002-1009
- Chiricozzi A, Romanelli P, Volpe E, Borsellino G, Romanelli M. Scanning the immunopathogenesis of psoriasis. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19:179
- Claessens F, Gewirth DT. DNA recognition by nuclear receptors. *Essays Biochem.* 2004;40:59-72
- Clark AR. Anti-inflammatory functions of glucocorticoid-induced genes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2007;275(1-2):79-97
- Clark AR, Lasa M. Crosstalk between glucocorticoids and mitogen-activated protein kinase signalling pathways. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2003;3(4):404-411
- Cole TJ, Blendy JA, Monaghan AP, Kriegstein 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;9(13):1608-1621

- Cole TJ, Terella L, Morgan J, Alexiadis M, Yao Y-Z, Enriori P, Young M, Fuller P. Aldosterone-mediated renal sodium transport requires intact mineralocorticoid receptor DNA-binding in the mouse. *Endocrinology*. 2015;156: 2958–2968
- Cornelissen LH, Oomens CWJ, Huyghe JM, Baaijens FPT. Mechanisms that play a role in the maintenance of the calcium gradient in the epidermis. *Ski. Res. Technol*. 2007;13(4):369-376
- Coutinho P, Vega C, Pojoga LH, Rivera A, Prado GN, Yao TM, Adler G, Torres-Grajales M, Maldonado ER, Ramos-Rivera A, Williams JS, Williams G, Romero JR. Aldosterone's rapid, nongenomic effects are mediated by striatin: A modulator of aldosterone's effect on estrogen action. *Endocrinology*. 2014;155(6):2233-2243
- Cruz-Topete D, Cidlowski JA. One hormone two actions: anti-and pro-inflammatory effects of glucocorticoids. 2014;22:20–32
- Cui W, Fowles DJ, Cousins FM, Duffie E, Bryson S, Balmain A, Akhurst RJ. Concerted action of TGF- $\beta$ 1 and its type II receptor in control of epidermal homeostasis in transgenic mice. *Genes Dev*. 1995;9(8):945-55
- Dąbrowska AK, Spano F, Derler S, Adlhart C, Spencer ND, Rossi RM. The relationship between skin function, barrier properties, and body-dependent factors. *Ski. Res. Technol*. 2018;24(2):165-174
- Danielsen M, Northrop JP, Ringold GM, Beato M. The mouse glucocorticoid receptor: mapping of functional domains by cloning, sequencing and expression of wild-type and mutant receptor proteins. *EMBO J*. 1986; 10:2513-2522
- Datson NA, Polman JAE, De Jonge RT, Van Boheemen PTM, Van Maanen EMT, Welten J, et al. Specific regulatory motifs predict glucocorticoid responsiveness of hippocampal gene expression. 2011;152:3749-3757
- Davies L, Karthikeyan N, Lynch JT, Sial EA, Gkourtsa A, Demonacos C, Krstic-Demonacos M. Cross talk of signaling pathways in the regulation of the glucocorticoid receptor function. *Mol. Endocrinol*. 2008;22(6):1331-1344
- De Bosscher K, Haegeman G. Minireview: Latest perspectives on antiinflammatory actions of glucocorticoids. *Mol. Endocrinol*. 2009;23(3):281-291
- Desmet SJ, De Bosscher K. Glucocorticoid receptors: finding the middle ground. *J. Clin. Invest*. 2017;127(4):1136–1145.
- Donati G, Proserpio V, Lichtenberger BM, Natsuga K, Sinclair R, Fujiwara H,

- Watt FM. Epidermal Wnt/-catenin signaling regulates adipocyte differentiation via secretion of adipogenic factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2014;111(15):E1501-1509
- 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; 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. *J. Biol. Chem.* 2016; 291:45
- Dubin PJ, Kolls JK. Interleukin-17A and Interleukin-17F: a tale of two cytokines. *Immunity.* 2009;30:9-11
- Elias PM. Therapeutic Implications of a barrier-based pathogenesis of atopic dermatitis. *Ann Dermatol.* 2010;22(3):245
- Elias PM, Schmuth M. Abnormal skin barrier in the etiopathogenesis of atopic dermatitis. *Curr. Opin. Allergy. Clin. Immunol.* 2009 October ; 9(5): 437–446
- Elsholz F, Harteneck C, Muller W, Friedland K. Calcium - A central regulator of keratinocyte differentiation in health and disease. *Eur. J. Dermatology.* 2014;24(6):650-661
- Faergemann J, Särnhult T, Hedner E, Carlsson B, Lavin T, Zhao XH, Sun XY. Dose-response effects of tri-iodothyroacetic acid (Triac) and other thyroid hormone analogues on glucocorticoid-induced skin atrophy in the haired mouse. *Acta Derm. Venereol.* 2002;82(3):179-183
- Faresse N. Post-translational modifications of the mineralocorticoid receptor: How to dress the receptor according to the circumstances? *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2014;143:334-342
- 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.* 2009;19(2):100-107
- Farman N, Nguyen VT. A novel actor in skin biology: the mineralocorticoid receptor. *Exp. Dermatol.* 2016;25(1):24-25
- Farman N, Rafestin-Oblin ME. Multiple aspects of mineralocorticoid selectivity. *Am J Physiol Ren. Physiol.* 2001;280: F181–F192
- Ferguson D, Hutson I, Tycksen E, Pietka TA, Bauerle K, Harris CA. Role of

- mineralocorticoid receptor in adipogenesis and obesity in male mice. *Endocrinology*. 2020;161(2):1-18
- Foster AR, Nicu C, Schneider MR, Hinde E, Paus R. Dermal white adipose tissue undergoes major morphological changes during the spontaneous and induced murine hair follicle cycling: a reappraisal. *Arch. Dermatol. Res*. 2018;310(5):453-62
- Ferrau F, Korbonits M. Metabolic comorbidities in Cushing's syndrome. *Eur. J. Endocrinol*. 2015;173:4 M133–M157
- Fuchs E, Horsley V. More than one way to skin... 2008; 22:976–985
- Fuller PJ, Yang J, Young MJ. 30 Years of the mineralocorticoid receptor: coregulators as mediators of mineralocorticoid receptor signalling diversity. *J. Endocrinol*. 2017; 234:1 T23–T34
- Fuller PJ, Yang J, Young MJ. Mechanisms of Mineralocorticoid Receptor Signaling. *Vitam. Horm*. 2019;109:37-68
- Furie M, Kadono T. “Inflammatory skin march” in atopic dermatitis and psoriasis. *Inflamm. Res*. 2017;66(10):833-842
- Giangreco A, Qin M, Pintar JE, Watt FM. Epidermal stem cells are retained in vivo throughout skin aging. *Aging Cell*. 2008;7:250-259
- Gittler JK, Shemer A, Suárez-Fariñas M, Fuentes-Duculan J, Gulewicz KJ, Wang CQF, Mitsui H, Cardinale I, Strong CG, Krueger JG, Guttman-Yassky E. Progressive activation of Th2/Th22 cytokines and selective epidermal proteins characterizes acute and chronic atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;130(6):1344-1354
- Golson ML, Kaestner KH. Fox transcription factors: from development to disease. *Dev*. 2016;143(24):4558-4570
- Gomez-Sanchez E, Gomez-Sanchez CE. The Multifaceted Mineralocorticoid Receptor. *Compr. Physiol*. 2014;4(3):965-994
- Granner DK, Wang J-C, Yamamoto KR. Regulatory actions of glucocorticoid hormones: from organisms to mechanisms. *Adv. Exp. Med. Biol*. 2015;872:253-278
- Grbesa I, Hakim O. Genomic effects of glucocorticoids. *Protoplasma*. *Protoplasma*; 2017;254(3):1175-1185
- Groeneweg FL, Karst H, de Kloet ER, Joëls M. Rapid non-genomic effects of corticosteroids and their role in the central stress response. *J. Endocrinol*. 2011;209(2):153-167

- Grossmann C, Husse B, Mildenerger S, Schreier B, Schuman K, Gekle M. Colocalization of mineralocorticoid and EGF receptor at the plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* 2010;1803(5):584-590
- Grossmann C, Krug AW, Freudinger R, Mildenerger S, Voelker K, Gekle M. Aldosterone-induced EGFR expression: interaction between the human mineralocorticoid receptor and the human EGFR promoter. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2007;292:1790-800
- Gubbay J, Vivian N, Economou A, Jacksont D, Goodfellowt P, Lovell-Badge R. Inverted repeat structure of the Sry locus in mice. *Genetics.* 1992;89:7953-7957
- Gudjonsson JE, Johnston A, Dyson M, Valdimarsson H, Elder JT. Mouse models of psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* 2007;127(6):1292-308
- Guilbert M, Roig B, Terryn C, Garnotel R, Jeannesson P, Sockalingum GD, et al. Highlighting the impact of aging on type I collagen: Label-free investigation using confocal reflectance microscopy and diffuse reflectance spectroscopy in 3D matrix model. *Oncotarget.* 2016;7(8):8546-5855
- Guo C, Ricchiuti V, Lian BQ, Yao TM, Coutinho P, Romero JR, et al. Mineralocorticoid receptor blockade reverses obesity-related changes in expression of adiponectin, PPAR $\gamma$  and pro-inflammatory adipokines. *Circulation.* 2008;117(17):2253-2261
- Guttman-Yassky E, Krueger JG, Lebwohl MG. Systemic immune mechanisms in atopic dermatitis and psoriasis with implications for treatment. *Exp. Dermatol.* 2018; 409-417
- Guttman-Yassky E, Nograles KE, Krueger JG, York N. Contrasting pathogenesis of atopic dermatitis and psoriasis-Part I: Clinical and pathologic concepts. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011;127:1110-1118
- Hammiller BO, El-Abaseri TB, Dlugosz AA, Hansen LA. A method for the immortalization of newborn mouse skin keratinocytes. *Front. Oncol.* 2015;5:1-9
- Han G, Li F, Singh TP, Wolf P, Wang X-J. The pro-inflammatory role of TGF $\beta$ 1: A paradox? *Int. J. Biol. Sci.* 2012;8(2):228-235
- Hanley K, Feingold KR, Kömüves LG, Elias PM, Muglia LJ, Majzoub JA, Williams ML. Glucocorticoid deficiency delays stratum corneum maturation in the fetal mouse. *J. Invest. Dermatol.* 1998;111:440-444
- Hannen R, Udeh-Momoh C, Upton J, Wright M, Michael A, Gulati A, Rajpopat S, Clayton N, Halsall D, BurrinJ, Flower R, Sevilla L, Latorre V,

- Frame J, Lightman S, Perez P, Philpott M. Dysfunctional skin-derived glucocorticoid synthesis is a pathogenic mechanism of psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* 2017;137(8):1630-1637
- Hawkes JE, Adalsteinsson JA, Gudjonsson JE, Ward NL. Murine Models of Human Psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* 2018;138(1):e1-8
- Hawkes JE, Gudjonsson JE, Ward NL. The snowballing literature on imiquimod-induced skin inflammation in mice: a critical appraisal. *J. Invest. Dermatol.* 2017;137(3):546-549
- Hengge UR, Ruzicka T, Schwartz RA, Cork MJ. Adverse effects of topical glucocorticosteroids. *J Am Acad Dermatol.* 2006;54(1):1-15
- Hinds TD, Ramakrishnan S, Cash HA, Stechschulte LA, Heinrich G, Najjar SM, Sanchez ED. Discovery of glucocorticoid receptor- $\beta$  in mice with a role in metabolism. *Mol. Endocrinol.* 2010;24(9):1715-1727
- Hirata A, Maeda N, Hiuge A, Hibuse T, Fujita K, Okada T, et al. Blockade of mineralocorticoid receptor reverses adipocyte dysfunction and insulin resistance in obese mice. *Cardiovasc. Res.* 2009;84:164-172
- 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;113(5):E635-643
- Hübner S, Dejager L, Libert C, Tuckermann JP. The glucocorticoid receptor in inflammatory processes: Transrepression is not enough. *Biol. Chem.* 2015;396(11):1223-1231
- Infante M, Armani A, Marzolla V, Fabbri A, Caprio M. Adipocyte Mineralocorticoid Receptor. *Vitam. Horm.* 2019; 109:189-209
- Jaisser F, Farman N. Emerging roles of the mineralocorticoid receptor in pathology: toward new paradigms in clinical pharmacology. 2016; 68:49–75
- Jia G, Arora AR, Sowers JR. The role of mineralocorticoid receptor signaling in the cross-talk between adipose tissue and the vascular wall. *Cardiovasc. Res.* 2017;113:1055–1063
- 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;291(36):19068-19078
- Jiménez-Panizo A, Pérez P, Rojas AM, Fuentes-Prior P, Estébanez-Perpiñá

- E. Non-canonical dimerization of the androgen receptor and other nuclear receptors: Implications for human disease. *Endocr. Relat. Cancer.* 2019;26(8):R479-497
- John K, Marino JS, Sanchez ER, Hinds TD. The glucocorticoid receptor: Cause of or cure for obesity? *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2016;310(4):E249- E257
- Johansen C, Kragballe K, Westergaard M, Henningsen J, Kristiansen K, Iversen L. The mitogen-activated protein kinases p38 and ERK1/2 are increased in lesional psoriatic skin. *Br. J. Dermatol.* 2005;152(1):37-42
- Johnson-huang LM, Lowes MA, Krueger JG. Putting together the psoriasis puzzle : an update on developing targeted therapies. *Dis. Model. Mech.* 2012;433:423-433
- Kadmiel M, Cidlowski JA. Glucocorticoid receptor signaling in health and disease. *Trends Pharmacol Sci.* 2013; 34(9): 518–530
- Kane CJM, Knapp M, Mansbridge JN, Hanawalt PC. Transforming growth factor- $\beta$ 1: localization in normal and psoriatic epidermal. *J. Cell. Physiol.* 1990;150:144-150
- Kanemaru K, Matsuyuki A, Nakamura Y, Fukami K. Obesity exacerbates imiquimod-induced psoriasis-like epidermal hyperplasia and interleukin-17 and interleukin-22 production in mice. *Exp. Dermatol.* 2015;24(6):436-442
- Kenouch S, Lombès M, Delahaye F, Eugene E, Bonvalet J-P, Farman N. Human Skin as Target for Aldosterone: Coexpression of mineralocorticoid receptors and 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1994;79(5):1334-1341
- 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(11):822-826
- Kim J, Krueger JG. Highly effective new treatments for psoriasis target the IL-23/Type 17 T cell autoimmune axis. *Annu. Rev. Med.* 2017;68(1):255-269
- Kondoh K, Nishida E. Regulation of MAP kinases by MAP kinase phosphatases. *Biochim. Biophys. Acta.* 2007;1227-1237
- Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature.* 1991;351:117-121



- Korting HC, Unholzer A, Schäfer-Korting M, Tausch I, Gassmueller J, Nietsch KH. Different skin thinning potential of equipotent medium-strength glucocorticoids. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* 2002;15(2):85-91
- Kuhn E, Lombès M. The mineralocorticoid receptor: A new player controlling energy homeostasis. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* 2013;15(2):59-69
- Kruglikov IL, Scherer PE. Skin aging: Are adipocytes the next target? *Aging* 2016;8(7):1457-1469
- Lacroix A, Feelders RA, Stratakis CA, Nieman LK. Cushing's syndrome. *Lancet.* 2015;913-27
- Lambert JF, Benoit BO, Colvin GA, Carlson J, Delville Y, Quesenberry PJ. Quick sex determination of mouse fetuses. *J. Neurosci. Methods.* 2000;95(2):127-132
- 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(12):2771-2779
- Le Billan F, Amazit L, Bleakley K, Xue QY, Pussard E, Lhadj C, et al. Corticosteroid receptors adopt distinct cyclical transcriptional signatures. *FASEB J.* 2018;32(10):5626-5639
- 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;29(9):3977-3989
- Lee RA, Harris CA, Wang J-C. Glucocorticoid Receptor and Adipocyte Biology. *Nucl. Recept. Res.* 2018;5:1-18
- Lee MJ, Pramyothin P, Karastergiou K, Fried SK. Deconstructing the roles of glucocorticoids in adipose tissue biology and the development of central obesity. *Biochim. Biophys. Acta.* 2014;1842(3):473-481
- Leis H, Page A, Ramírez A, Bravo A, Segrelles C, Paramio J, Baretino D, Jorcano JL, Pérez P. Glucocorticoid receptor counteracts tumorigenic activity of Akt in skin through interference with the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. 2004; 18(2):303-311
- Li AG, Wang D, Feng X-H, Wang X-J. Latent TGF $\beta$ 1 overexpression in keratinocytes results in a severe psoriasis-like skin disorder. *EMBO J.* 2004;23:1770-81
- Lili LN, Klopot A, Readhead B, Baida G, Dudley JT, Budunova I. Transcriptomic network interactions in human skin treated with topical

- glucocorticoid clobetasol propionate. *J. Invest. Dermatol.* 2019;139(11):2281-2291
- Liu W, Wang J, Sauter NK, Pearce D, Yamamoto R. Steroid receptor heterodimerization demonstrated in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995; 92:12480-12484
- Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2017;2
- Manicone AM, McGuire JK. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 2008;19(1):34-41
- Martinerie L, Munier M, Le Menuet D, Meduri G, Viengchareun S, Lombès M. The mineralocorticoid signaling pathway throughout development: Expression, regulation and pathophysiological implications. *Biochimie.* 2012;95(2):148-157
- 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(7):1781-1789
- McCullough JL, Kelly KM. Prevention and treatment of skin aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006;1067(1):323-331
- Meinel S, Gekle M, Grossmann C. Mineralocorticoid receptor signaling: Crosstalk with membrane receptors and other modulators. *Steroids.* 2014;91:3-10
- Menter A, Korman NJ, Elmets CA, Feldman SR, Gelfand JM, Gordon KB, et al. Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis. *Am. Academy Dermatology.* 2009;60:643-659
- Mifsud KR, Reul JMHM. Acute stress enhances heterodimerization and binding of corticosteroid receptors at glucocorticoid target genes in the hippocampus. *PNAS.* 2016;113(40): 11336–11341
- Mifsud KR, Reul JMHM. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptor-mediated control of genomic responses to stress in the brain. *Stress.* 2018;21:5, 389-402
- Mine S, Fortunel NO, Pagon H, Asselineau D. Aging alters functionally human dermal papillary fibroblasts but not reticular fibroblasts: A new view of skin morphogenesis and aging. *PLoS One.* 2008;3(12)
- Morgan SA, McCabe EL, Gathercole LL, Hassan-Smith ZK, Larner DP, Bujalska IJ, et al. 11 $\beta$ -HSD1 is the major regulator of the tissue-specific

- effects of circulating glucocorticoid excess. *PNAS*. 2014; E2482–E2491
- 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(1):50-57
- Nakajima K, Sano S. Mouse models of psoriasis and their relevance. *J. Dermatol*. 2018;45(3):252-263
- Nakamura Y, Yamazaki Y, Konosu-Fukaya S, Ise K, Satoh F, Sasano H. Aldosterone biosynthesis in the human adrenal cortex and associated disorders. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*. 2015;153:57-62
- Naylor EC, Watson REB, Sherratt MJ. Molecular aspects of skin ageing. *Maturitas*. 2011;69(3):249-256
- Newton R, Holden NS. Separating transrepression and transactivation: A distressing divorce for the glucocorticoid receptor? *Mol. Pharmacol*. 2007;72(4):799-809
- Nicolaides NC, Charmandari E. Novel insights into the molecular mechanisms underlying generalized glucocorticoid resistance and hypersensitivity syndromes. *Hormones*. 2017; 16(2):124-138
- Nikolakis G, Stratakis CA, Kanaki T, Slominski A, Zouboulis CC. Skin steroidogenesis in health and disease. *Rev. Endocr. Metab. Disord*. 2016;247-58
- Nishi M, Tanaka M, Matsuda K-I, Sunaguchi M, Kawata M. Visualization of glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor interactions in living cells with GFP-based fluorescence resonance energy transfer. *J. Neurosci*. 2004;24(21):4918-4927
- Novac N, Heinzl T. Nuclear receptors: Overview and classification. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy*. 2004;3(4):335-346
- Oakley RH, Cidlowski JA. Glucocorticoid signaling in the heart: a cardiomyocyte perspective. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2015;153:27-34
- Oakley RH, Cruz-Topete D, He B, Foley JF, Myers PH, Xu X, et al. Cardiomyocyte glucocorticoid and mineralocorticoid receptors directly and antagonistically regulate heart disease in mice. *Sci. Signal*. 2019;12(577)
- Oakley RH, Ramamoorthy S, Foley JF, Busada JT, Lu NZ, Cidlowski JA. Glucocorticoid receptor isoform-specific regulation of development, circadian rhythm, and inflammation in mice. *FASEB J*. 2018;5258-5271

- Ogawa E, Sato Y, Minagawa A, Okuyama R. Pathogenesis of psoriasis and development of treatment. *J. Dermatol.* 2018;45(3):264-272
- Oishi Y, Fu ZW, Ohnuki Y, Kato H, Noguchi T. Molecular basis of the alteration in skin collagen metabolism in response to in vivo dexamethasone treatment: Effects on the synthesis of collagen type I and III, collagenase, and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Br. J. Dermatol.* 2002;147(5):859-68
- Orioli D, Dellambra E. Epigenetic regulation of skin cells in natural aging and premature aging diseases. *Cells.* 2018;7(268)
- Palmer CNA, Irvine AD, Terron-Kwiatkowski A, Zhao Y, Liao H, Lee SP, et al. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat. Genet.* 2006;38(4):441-446
- Pantoja C, Huff JT, Yamamoto KR. Glucocorticoid signaling defines a novel commitment state during adipogenesis in vitro. *Mol. Biol. Cell.* 2008;19:4032-4041
- Pascual-Le Tallec L, Lombès M. The mineralocorticoid receptor: a journey exploring its diversity and specificity of action. 2005;19(9):2211–2221
- Pastar I, Stojadinovic O, Yin NC, Ramirez H, Nusbaum AG, Sawaya A, et al. Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. *Adv. Wound Care.* 2014;3(7): 445-462
- Paus R, Mu S, Veen C Van Der, Maurer M, Eichmu S, Ling G. A comprehensive guide for the recognition and classification of distinct stages of hair follicle. *J. Invest. Dermatol.* 1999;113:523-532
- Pearce D. Determinants of subnuclear organization of mineralocorticoid receptor characterized through analysis of wild type and mutant receptors. *J. Biol. Chem.* 2001; 277(2):1451–1456
- Pérez P. Glucocorticoid receptors, epidermal homeostasis and hair follicle differentiation. *Dermato-endocrinol.* 2011;3(3):1-9
- Pérez P, Page A, Bravo A, Del Río M, Giménez-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;2030-2032
- Pooley JR, Rivers CA, Kilcooley MT, Paul SN, Derya Cavga A, Kershaw YM, et al. Beyond the heterodimer model for mineralocorticoid and glucocorticoid receptor interactions in nuclei and at DNA. *PLoS One.* 2020;15(1):e0227520

- Presman DM, Ogara MF, Stortz M, Alvarez LD, Pooley JR. Live cell imaging unveils multiple domain requirements for in vivo dimerization of the glucocorticoid receptor. *PLoS Biol.* 2014;12(3)
- Proksch E, Fölster-Holst R, Jensen JM. Skin barrier function, epidermal proliferation and differentiation in eczema. *J. Dermatol. Sci.* 2006;43(3):159-169
- Puizina-Ivié. *Skin Aging. Acta Dermatoven APA.* 2008;17(2):536
- Qiao Y, He H, Jonsson P, Sinha I, Zhao C, Dahlman-Wright K. AP-1 is a key regulator of proinflammatory cytokine TNF $\alpha$ -mediated triple-negative breast cancer progression. *J. Biol. Chem.* 2016;291(10):5068-5079
- 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;42(1):15-31
- Ramírez A, Bravo A, Jorcano JL, Vidal M. Sequences 5' of the bovine keratin 5 gene direct tissue- and cell-type-specific expression of a lacZ gene in the adult and during development. *Differentiation.* 1994;58(1):53-64
- Ramirez 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(1):52-57
- Ratman D, Vanden Berghe W, Dejager L, Libert C, Tavernier J, Beck IM, et al. How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: A scope beyond tethering. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2013;380(1-2):41-54
- Ray DW, Suen CS, Brass A, Soden J, White A. Structure/function of the human glucocorticoid receptor: Tyrosine 735 is important for transactivation. *Mol. Endocrinol.* 1999;13(11):1855-1863
- Reddy TE, Pauli F, Sprouse RO, Neff NF, Newberry KM, Garabedian MJ, et al. Genomic determination of the glucocorticoid response reveals unexpected mechanisms of gene regulation. *Genome Res.* 2009;19:2163-2171
- Reichardt HM, Kaestner KH, Tuckermann J, Kretz O, Wessely O, Bock R, et al. DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell.* 1998;93(4):531-41

- Reichelt J, Haase I. Establishment of spontaneously immortalized keratinocyte celllines 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.
- Rinnerthaler M, Bischof J, Streubel MK, Trost A, Richter K. Oxidative Stress in Aging Human Skin. *Biomol.* 2015;5(2):545
- Rittié L, Fisher GJ. Natural and sun-induced aging of human skin. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2015;5(1):1-14
- Rivera-Gonzalez G, Klopot A, Sabin K, Baida G, Horsley V, Budunova I. Regulated in development and DNA damage responses 1 prevents dermal adipocyte differentiation and is required for hair cycle–Dependent dermal adipose expansion. *J. Invest. Dermatol.* 2020
- Rivera-Gonzalez G, Shook B, Horsley V. Adipocytes in skin health and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2014;4(3)
- Rivers CA, Rogers MF, Stubbs FE, Conway-Campbell BL, Lightman SL, Pooley JR. Glucocorticoid receptor-tethered mineralocorticoid receptors increase glucocorticoid-induced transcriptional responses. *Endocrinology.* 2019;160:1044-1056
- Ruhs S, Nolze A, Hübschmann R, Grossmann C. 30 Years of the mineralocorticoid receptor: Nongenomic effects via the mineralocorticoid receptor. *J. Endocrinol.* 2017;234(1):T107-124
- Sable R, Jambunathan N, Singh S, Pallerla S, Kousoulas KG, Jois S. Proximity ligation assay to study protein-protein interactions of proteins on two different cells. *BioTechniques.* 2018;65(3):149 –157
- Sacta MA, Chinenov Y, Rogatsky I. Glucocorticoid Signaling: An Update from a Genomic Perspective. *Annu. Rev. Physiol.* 2016;78(1):155-180
- 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(3):846-860
- Samarasinghe RA, Witchel SF, DeFranco DB. Cooperativity and complementarity: Synergies in non-classical and classical glucocorticoid signaling. *Cell cycle.* 2012;11(15):2819-2827
- Sanada F, Taniyama Y, Muratsu J, Otsu R, Shimizu H, Rakugi H, et al. Source of chronic inflammation in aging. *Front. Cardiovasc. Med. Frontiers.* 2018;5(12)

- 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(1): e29701
- Sano S, Chan KS, Carbajal S, Clifford J, Peavey M, Kiguchi K, et al. Stat3 links activated keratinocytes and immunocytes required for development of psoriasis in a novel transgenic mouse model. *Nat. Med*. 2005;11(1):43-49
- Sarkar MK, Kaplan N, Tsoi LC, Xing X, Liang Y, Swindell WR, et al. Endogenous glucocorticoid deficiency in psoriasis promotes inflammation and abnormal differentiation. *J Invest Dermatol*. 2017;137(7):1474-1483
- Savory JGA, Fontaine GGP, Lamprecht C, Liao M, Walther RF, Lefebvre YA, et al. Glucocorticoid receptor homodimers and glucocorticoid-mineralocorticoid receptor heterodimers form in the cytoplasm through alternative dimerization interfaces. *Mol. Cell. Biol*. 2001;21(3):781-793
- Schäcke H, Döcke W-D, Asadullah K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol. Ther*. 2002;96:23-43
- Schiller BJ, Chodankar R, Watson LC, Stallcup MR, Yamamoto KR. Glucocorticoid receptor binds half sites as a monomer and regulates specific target genes. *Gen. Biol*. 2014;15:418
- Schipper BM, Marra KG, Zhang W, Donnenberg AD, Rubin JP, Plast A, et al. Regional anatomic and age effects on cell function of human adipose-derived stem cells. *Ann Plast Surg*. 2008;60(5):538-544
- Schneider MR. Genetic mouse models for skin research: strategies and resources. *Genesis*. 2012;50(9):652-664
- Schoepe S, Schacke H, May E, Asadullah K. Glucocorticoid therapy-induced skin atrophy. *Exp. Dermatol*. 2006;15(6):406-420
- Schonthaler HB, Huggenberger R, Wculek SK, Detmar M, Wagner EF, Karin M. Systemic anti-VEGF treatment strongly reduces skin inflammation in a mouse model of psoriasis. *PNAS*. 2009;106(50):21264–21269
- Schüle R, Rangarajant P, Yangtt NA, Kliewert S, Ransonet LJ, Boladot J, et al. Retinoic acid is a negative regulator of AP-1-responsive genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991;88:6092-6096
- Segre JA. Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders. *J. Clin. Invest*. 2006;1150-1158
- Sevilla LM, Bayo P, Latorre V, Sanchis A, Pérez P. Glucocorticoid receptor regulates overlapping and differential gene subsets in developing and

- adult skin. *Mol. Endocrinol.* 2010;24(11):2166-2178
- Sevilla LM, Latorre V, Carceller E, Boix J, Vodák D, Mills IG, et al. Glucocorticoid receptor and Klf4 co-regulate anti-inflammatory genes in keratinocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2015;412:281-289
- 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;133(2):361-370
- Sevilla LM, Pérez P. Glucocorticoid Receptor Signaling in Skin Barrier. In: Miroslav Blumenberg. Editor: IntechOpen. *Keratin.* 2018a
- Sevilla LM, Pérez P. Roles of the glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in skin pathophysiology. *Int. J. Mol. Sci.* 2018b;19:1906
- Shah S, King EM, Chandrasekhar A, Newton R. Roles for the mitogen-Activated protein kinase (MAPK) phosphatase, DUSP1, in feedback control of inflammatory gene expression and repression by dexamethasone. *J. Biol. Chem.* 2014;289(19):13667-136679
- Silverberg JI. Comorbidities and the impact of atopic dermatitis. *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* 2019;123:144-151
- Slominski AT, Manna PR, Tuckey RC. Cutaneous glucocorticosteroidogenesis: securing local homeostasis and the skin integrity. *Exp Dermatol.* 2014;23(6):369-374
- Smirnov A, Panatta E, Lena AM, Castiglia D, Daniele N Di, Melino G, et al. FOXM1 regulates proliferation, senescence and oxidative stress in keratinocytes and cancer cells. *Aging.* 2016;8(7):1384-1397
- Soler DC, McCormick TS. The dark side of regulatory T cells in psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2011;131(9):1785-1786
- Spergel JM, Paller AS. Atopic dermatitis and the atopic march. 2003;112(6):S118-S127
- Stojadinovic O, Lee B, Vouthounis C, Vukelic S, Pastar I, Blumenberg M, et al. 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;282(6):4021-4034
- Stojadinovic O, Sawaya A, Pastar I, Tomic-Canic M. Glucocorticoid receptor localizes to adherens junctions at the plasma membrane of keratinocytes. *PLoS One.* 2013;8(4):63453



- Stratakis CA. Skin manifestations of Cushing's syndrome. *Rev Endocr Metab Disord.* 2016;17(3):283-286
- Suárez-Fariñas M, Li K, Fuentes-Duculan J, Hayden K, Brodmerkel C, Krueger JG. Expanding the psoriasis disease profile: Interrogation of the skin and serum of patients with moderate-to-severe psoriasis. *J. Invest. Dermatol.* 2012;132(11):2552-2564
- Sugiyama H, Gyulai R, Toichi E, Garaczi E, Shimada S, Stevens SR, et al. Dysfunctional blood and target tissue CD4+CD25<sup>high</sup> regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation 1. *J Immunol.* 2005;174(1): 164–173.
- Surjit M, Ganti KP, Mukherji A, Ye T, Hua G, Metzger D, et al. Widespread negative response elements mediate direct repression by agonist-liganded glucocorticoid receptor. *Cell.* 2011;145:224-241
- Talabér G, Jondal M, Okret S. Extra-adrenal glucocorticoid synthesis: Immune regulation and aspects on local organ homeostasis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2013;380(1-2):89-98
- Talbot LP, Lombès M. The mineralocorticoid receptor: A journey exploring its diversity and specificity of action. *Mol. Endocrinol.* 2005;19(9):2211-2221
- 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)
- Tee AR. The target of rapamycin and mechanisms of cell growth. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19(3):1-13
- Terao M, Katayama I. Local cortisol/corticosterone activation in skin physiology and pathology. *J. Dermatol. Sci.* 2016;11-6
- Terao M, Tani M, Itoi S, Yoshimura T, Hamasaki T, Murota H, et al. 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 1 specific inhibitor increased dermal collagen content and promotes fibroblast proliferation. *PLoS One.* 2014;9(3)
- Tiganescu A, Hupe M, Uchida Y, Mauro T, Elias PM, Holleran WM. Topical 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibition corrects cutaneous features of systemic glucocorticoid excess in female mice. *Endocrinology.* 2018;159(1):547-556
- Tiganescu A, Tahrani AA, Morgan SA, Otranto M, Desmoulière A, Abrahams L, et al. 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase blockade prevents age-induced skin structure and function defects. *J. Clin. Invest.*

2013;123(7):3051-3060

- Tiganescu A, Walker EA, Hardy RS, Mayes AE, Stewart PM. Localization, age- and site-dependent expression, and regulation of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in skin. *J. Invest. Dermatol.* 2011;131(1):30-36
- Torres T, Ferreira EO, Gonçalo M, Mendes-Bastos P, Selores M, Filipe P. Update on atopic dermatitis. *Acta Med. Port.* 2019;32(9):606-613
- Torres J, Watt FM. Nanog maintains pluripotency of mouse embryonic stem cells by inhibiting NF $\kappa$ B and cooperating with Stat3. *Nat. Cell Biol.* 2008;10(2):194-201
- Trapp T, Rupprecht R, Castren M, Reul JM, Holsboer F. Heterodimerization between mineralocorticoid and glucocorticoid receptor: A new principle of glucocorticoid action in the CNS. *Neuron.* 1994;13(6):1457-1462
- Tronche F, Kellendonk C, Kretz O, Gass P, Anlag K, Orban PC, et al. Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat. Genet.* 1999;23(1):99-103
- Ueda K, Fujiki K, Shirahige K, Gomez-Sanchez CE, Fujita T, Nangaku M, et al. Genome-wide analysis of murine renal distal convoluted tubular cells for the target genes of mineralocorticoid receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014;445(1):132-137
- Uhlenhaut NH, Barish GD, Yu RT, Downes M, Karunasiri M, Liddle C, et al. Insights into negative regulation by the glucocorticoid receptor from genome-wide profiling of inflammatory cistromes. *Mol Cell.* 2013;49(1):158–171
- Uva L, Miguel D, Pinheiro C, Antunes J, Cruz D, Ferreira J, et al. Mechanisms of action of topical corticosteroids in psoriasis. *Int. J. Endocrinol.* 2012
- Van der Fits L, Mourits S, Voerman JSA, Kant M, Boon L, Laman JD, Cornelissen F, Mus AM, Florencia E, Prens EP, Lubberts E. IL-23/IL-17 axis inflammation in mice is mediated via the imiquimod-induced psoriasis-like skin. *J. Immunol.* 2009;182:5836-45
- Van Weert LTCM, Buurstede JC, Mahfouz A, Braakhuis PSM, Annelies J, Polman E, et al. NeuroD factors discriminate mineralocorticoid from glucocorticoid receptor DNA binding in the male rat brain. *Endocrinology.* 2017;158:1511–1522
- Vandevyver S, Dejager L, Libert C. Comprehensive overview of the structure

- and regulation of the glucocorticoid receptor. *Endocr. Rev.* 2014;35(4):671-693
- Vandewalle J, Luybaert A, De Bosscher K, Libert C. Therapeutic Mechanisms of Glucocorticoids. *Trends Endocrinol. Metab.* 2018;29(1):42-54
- Vitellius G, Trabado S, Bouligand J, Delemer B, Lombès M. Pathophysiology of glucocorticoid signaling. *Ann. Endocrinol.* 2018;79(3):98-106
- Velarde MC, Demaria M. Targeting senescent cells: Possible implications for delaying skin aging: A mini-review. *Gerontology.* 2016;62(5):513-518
- Veldhuis JD, Sharma A, Roelfsema F. Age-dependent and gender-dependent regulation of hypothalamic-adrenocorticotrophic-adrenal axis: overview of regulated glucocorticoid production. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2013;42(2):201-225
- Veras Ribeiro Filho H, Tambones IL, Mariano Gonçalves Dias M, Bernardi Videira N, Bruder M, Amorim Amato A, et al. Modulation of nuclear receptor function: Targeting the protein-DNA interface. *Mol. Cell. Endocrinol. Elsevier;* 2019;484:1-14
- Viengchareun 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. 2007;5:e012
- Wagner EF, Schonhaler HB, Guinea-Viniegra J, Tschachler E. Psoriasis: What we have learned from mouse models. *Nat. Rev. Rheumatol. Nature Publishing Group;* 2010;6(12):704-714
- Wang QA, Tao C, Gupta RK, Scherer PE. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat. Med.* 2013;19(10):1338-1344
- Watt FM. Mammalian skin cell biology: At the interface between laboratory and clinic. *Science.* 2014;346(6212):937-940
- Weikum ER, Knuesel MT, Ortlund EA, Yamamoto KR. Glucocorticoid receptor control of transcription: precision and plasticity via allostery. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2017;18(3):159-174
- Werner S, Grose R. Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines. 2003;83: 581–632
- Whirlledge S, DeFranco DB. Glucocorticoid signaling in health and disease: Insights from tissue-Specific GR knockout mice. *Endocrinology.* 2018;159(1):46-61

- Williams DM. Clinical pharmacology of corticosteroids. *Respir. Care.* American Association for Respiratory Care; 2018;63(6):655-670
- Wolk K, Witte E, Wallace E, Döcke WD, Kunz S, Asadullah K, et al. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: A potential role in psoriasis. *Eur. J. Immunol.* 2006;36(5):1309-1323
- Wong R, Geyer S, Weninger W, Guimberteau J-C, Wong JK. The dynamic anatomy and patterning of skin. *Exp. Dermatol.* 2016;25(2):92-98
- Wrone-Smith T, Nickoloff JB. Dermal injection of immunocytes induces psoriasis. *Clin. Invest.* 1996;1878–1887
- Yick-Lun So A, Chaivorapol C, Bolton EC, Li H, Yamamoto KR. Determinants of cell-and gene-specific transcriptional regulation by the glucocorticoid receptor. *Plos Genet.* 2007;3(6): e94.
- Youm J-K, 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(5):715-722
- Zebisch K, Voigt V, Wabitsch M, Brandsch M. Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. *Anal. Biochem.* 2012;425(1):88-90
- Zenz R, Eferl R, Kenner L, Florin L, Hummerich L, Mehic D, et al. Psoriasis-like skin disease and arthritis caused by inducible epidermal deletion of Jun proteins. *Nature.* 2005;437(7057):369-375
- Zhang L Juan, Chen SX, Guerrero-Juarez CF, Li F, Tong Y, Liang Y, et al. Age-related loss of innate immune antimicrobial function of dermal fat is mediated by transforming growth factor beta. *Immunity.* 2019;50(1):121-136.
- Zhu S, Qian Y. IL-17/IL-17 receptor system in autoimmune disease: Mechanisms and therapeutic potential. *Clin. Sci.* 2012;122(11):487-511
- Zwick RK, Guerrero-Juarez CF, Horsley V, Plikus M V. Anatomical, physiological, and functional diversity of adipose tissue. *Cell Metab.* 2018;27(1):68-83



**ANEXO**







Publicaciones científicas derivadas de esta tesis doctoral:

**Bigas J**, Sevilla LM, Pérez P. Epidermal mineralocorticoid receptor inactivation affects the homeostasis of all skin layers in chronologically aged mice. *J. Invest. Dermatol.* 2020; S0022-202X (20): 31194-31195. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32199993/>

**Bigas J**, Sevilla LM, Carceller E, Boix J, Pérez P. Epidermal glucocorticoid and mineralocorticoid receptors act cooperatively to regulate epidermal development and counteract skin inflammation. *Cell. Death. Dis.* 2018;9:588.<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29789551/>





ARTICLE

Open Access

# Epidermal glucocorticoid and mineralocorticoid receptors act cooperatively to regulate epidermal development and counteract skin inflammation

Judit Bigas<sup>1</sup>, Lisa M. Sevilla<sup>1</sup>, Elena Carceller<sup>1</sup>, Julia Boix<sup>1</sup> and Paloma Pérez<sup>1</sup> 

## Abstract

Endogenous and synthetic glucocorticoids (GCs) regulate epidermal development and combat skin inflammatory diseases. GC actions can be mediated through the GC receptor (GR) and/or the mineralocorticoid receptor (MR), highly homologous ligand-activated transcription factors. While the role of GR as a potent anti-inflammatory mediator is well known, that of MR is not as clear, nor is whether these receptors cooperate or antagonize each other in the epidermis. To address this, we generated mice with epidermal-specific loss of both receptors (double knockout, DKO), and analyzed the phenotypical and functional consequences relative to single KO or controls (CO). At birth, DKO epidermis displayed a phenotype of defective differentiation and inflammation, which was more severe than in either single KO, featuring neutrophil-containing infiltrates, and gene dysregulation characteristic of human psoriatic lesions. This phenotype resolved spontaneously. However, in adulthood, single or combined loss of GC receptors increased susceptibility to inflammation and hyperproliferation triggered by phorbol ester which, different to CO, was not effectively counteracted by GC treatment. Also, DKOs were more susceptible to Imiquimod-induced psoriasis than CO showing severe defective epidermal differentiation and microabscesses while single KOs showed an intermediate response. Immortalized DKO keratinocytes featured increased proliferation kinetics and reduced cell size, a unique phenotype relative to single KO cells. The lack of GR and MR in keratinocytes, individual or combined, caused constitutive increases in p38 and ERK activities, which were partially reversed upon reinsertion of receptors into DKO cells. DKO keratinocytes also displayed significant increases in AP-1 and NF- $\kappa$ B transcriptional activities, which were partially rescued by ERK and p38 inhibition, respectively. Reinsertion of GR and MR in DKO keratinocytes resulted in physical and cooperative functional interactions that restored the transcriptional response to GCs. In conclusion, our data have revealed that epidermal GR and MR act cooperatively to regulate epidermal development and counteract skin inflammation.

## Introduction

Glucocorticoid (GC) derivatives are the most effective and widely prescribed compounds for treating

inflammatory and autoimmune diseases. However, their therapeutic use is limited by the adverse side-effect profile that in skin includes epidermal thinning, dermal atrophy, impaired wound healing and increased fragility, dehydration and infection risk<sup>1–3</sup>. These adverse effects are similar to symptoms of individuals with abnormally high endogenous production of GCs (Cushing's syndrome) as

Correspondence: Paloma Pérez (pperez@ibv.csic.es)

<sup>1</sup>Instituto de Biomedicina de Valencia-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IBV-CSIC), Jaime Roig 11, 46100 Valencia, Spain  
These authors contributed equally: Judit Bigas, Lisa M. Sevilla  
Edited by H-U. Simon

© The Author(s) 2018



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

well as in the elderly population. GC deficiency (Addison's disease, also featuring mineralocorticoid deficiency) also results in skin alterations<sup>4,5</sup>, highlighting the requirement for appropriate GC levels for normal tissue function.

The skin prevents dehydration, mechanical trauma, and infection<sup>6</sup>. The epidermis, the epithelial compartment of the skin, is mainly composed of keratinocytes which undergo terminal differentiation to generate the dead, flattened squames of the stratum corneum (SC), required for barrier function<sup>6,7</sup>. Defects in differentiation are associated with inflammation as a faulty epidermal barrier allows the entrance of allergens that stimulate the immune response leading to the prevalent inflammatory skin disorders atopic dermatitis and psoriasis<sup>8,9</sup>.

GC synthesis in the adrenal cortex is controlled by the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis<sup>10</sup>. GCs exert their effects through binding to the GC receptor (GR) and the mineralocorticoid receptor (MR), structurally and functionally homologous ligand-activated transcription factors<sup>1,11–13</sup>. In response to endogenous hormones and synthetic ligands, GR and MR dissociate from multimeric cytoplasmic inhibitory complexes, undergo post-translational modifications, translocate to the nucleus and bind to GC response elements (GREs) in target genes.

The therapeutic actions of GC-activated GR occur through distinct mechanisms, including: (i) physical interaction (tethering) with pro-inflammatory transcription factors such as NF- $\kappa$ B and AP-1, independent of DNA-binding; (ii) antagonism with MAPKs p38, ERK, and JNK, which act upstream of AP-1 and in the case of p38, NF- $\kappa$ B; and (iii) transcriptional induction of anti-inflammatory genes (e.g., *Dusp1/Mkp1* and *Tsc22d3/Gilz*) by binding to GREs<sup>1,11,14</sup>.

GR is ubiquitously expressed, however, MR shows a more restricted expression pattern with highest levels in kidney and cardiovascular tissues<sup>11–13</sup>. Both receptors are expressed in the epidermis and its appendages<sup>5,15–18</sup>. Importantly, MR has a 10-fold higher affinity for GCs than GR. Expression of the GC-inactivating enzyme 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD11B) type 2 in tissues such as kidney and heart protects MR from constant GC occupation and allows activation by aldosterone, which has key roles in electrolyte balance<sup>10,13</sup>. In these tissues, MR activation is involved in pathophysiological effects ultimately leading to inflammation and fibrosis and MR antagonists are beneficial for patients with cardiovascular and renal disease<sup>19</sup>. However, it is currently accepted that MR exerts a broader range of functions in non-classical tissues, such as in the brain, and that its activation can be beneficial<sup>19</sup>.

Our previous studies addressed the consequences of epidermal loss of either GR (GR epidermal KO or GR<sup>EKO</sup>)<sup>15</sup> or MR (MR epidermal KO or MR<sup>EKO</sup>)<sup>16</sup> in skin. Newborn GR<sup>EKO</sup> mice showed an impaired epidermal

barrier with increased proliferation and defective differentiation while MR<sup>EKO</sup> mice showed minor defects. Numerous genes were upregulated in GR<sup>EKO</sup> epidermis which are overexpressed in psoriatic patients, however, these alterations resolved spontaneously early after birth<sup>15</sup> suggesting MR may have a compensatory role.

Adult GR<sup>EKO</sup> and MR<sup>EKO</sup> mice featured minor skin defects but had worsened responses to inflammatory triggers compared to controls (CO) demonstrating that both epidermal GR and MR act as anti-inflammatory mediators<sup>15,16</sup>. However, whether GR and MR cooperate to counteract skin inflammation was unknown.

In this study, the generation and characterization of mice and cell lines lacking epidermal expression of both GR and MR (GR<sup>EKO</sup>/MR<sup>EKO</sup> double knockout, DKO) has revealed cooperation between these receptors during development as well as additive anti-inflammatory roles in diseased skin.

## Results

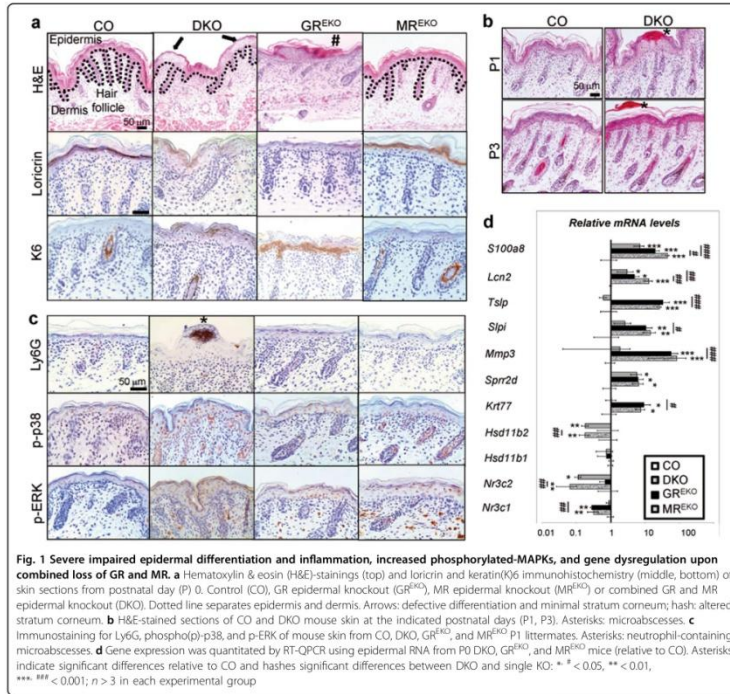
### Combined loss of GR and MR severely impairs epidermal development

To understand the relative roles of GR and MR in skin homeostasis, we generated DKO mice with epidermal-specific loss of both receptors, and analyzed the phenotypic and functional differences relative to single KO or CO mice (Fig. 1).

DKOs were viable and fertile. At postnatal day 0 (P0), DKOs displayed a striking phenotype of defective epidermal differentiation, more severe than in GR or MR single KOs, with patches of decreased granular layer and minimal SC (Fig. 1a, arrows). Morphological changes were evident, with keratinocytes appearing disorganized and failing to flatten suprabasally. The differentiation marker loricrin showed reduced patchy expression in both GR<sup>EKO</sup> and DKO compared to MR<sup>EKO</sup> and CO (Fig. 1a). Both DKO and GR<sup>EKO</sup> showed aberrant epidermal expression of Keratin (K)6, though in the basal layer in GR<sup>EKO</sup> and the granular layer of DKO (Fig. 1a).

The epidermal alterations in P0 DKOs were likely due to a delay in differentiation since SC was apparent at P1 (Fig. 1b). Remarkably, we detected epidermal microabscesses in DKOs, a phenotype not observed in single KO or CO mice (Fig. 1b, c; asterisks). Microabscesses are associated with inflammatory pathologies such as psoriasis and usually contain neutrophil infiltrates<sup>20</sup>. Indeed, we detected Ly6G-positive cells in DKO microabscesses (Fig. 1c). By P3, the epidermis of DKO animals appeared almost entirely normal, and microabscesses were being lost through desquamation (Fig. 1b). We also detected increased levels of the phosphorylated (p-) forms of p38 and ERK in the epidermis of P0 DKO and single KOs relative to CO (Fig. 1c).

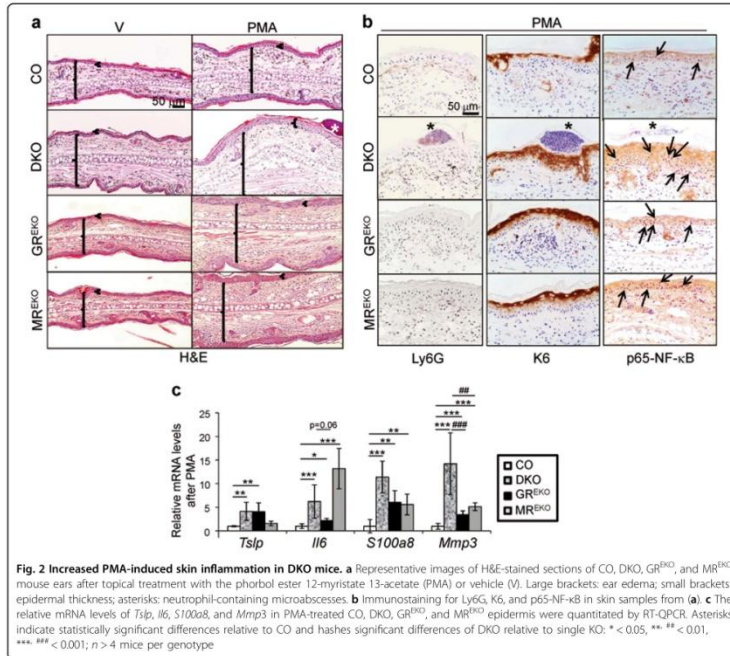
We assessed the expression of genes involved in epidermal development (*Krt17*, *Sppr2d*) and inflammation



(*Mmp3*, *Slpi*, *Tslp*, *Lcn2*, and *S100a8*) and found increased mRNA levels in DKO vs. CO newborn epidermis (Fig. 1d). Similar dysregulation of *Krt77*, *Sprr2d*, *Mmp3*, *Slpi*, and *Tslp* was observed in GR<sup>EKO</sup> but not MR<sup>EKO</sup> epidermis, suggesting GR-dependent regulation (Fig. 1d). On the other hand, *Hsd11b2* was drastically reduced in both DKO and MR<sup>EKO</sup>—but not GR<sup>EKO</sup>—suggesting dependence on MR (Fig. 1d). *Sprr2d* was increased in all KOs suggesting involvement of both receptors in its regulation while *Hsd11b1* expression was not affected by the loss of either or both receptors (Fig. 1d). Importantly, *Lcn2* and *S100a8* were upregulated in all KOs with additive increases in DKO relative to single KOs, suggesting cooperative actions (Fig. 1d).

The skin phenotype of DKOs resolved around P5 and adult skin sections showed no major differences relative to CO except for an increase in epidermal thickness (Fig. S1a). These alterations were similar to those observed in each single KO<sup>16,17</sup> suggesting similar roles for GR and MR in adult skin homeostasis.

However, the transcriptional response of DKO skin to topically applied dexamethasone (Dex) was absent as there was no induction of GC-target genes *Zfp36*, *Ddit4*, and *Fkbp51* or repression of *Cand1* (Fig. S1b). These data indicate that the absence of GR and MR in epidermis, even though other skin cells have intact expression of both receptors, is sufficient to impair the GC-dependent transcriptional activity in skin.



#### Adult DKO mice show increased PMA-induced skin inflammation

Next, we assessed the consequences of combined epidermal loss of GR and MR in inflammation *in vivo* by inducing ear edema via topical application of the phorbol ester 12-myristate 13-acetate (PMA). PMA treatment significantly increased edema and epidermal thickness in DKO—but not in single KO—relative to CO (Fig. 2a, and S2). Importantly, only DKO ears displayed epithelial microabscesses containing neutrophils after PMA treatment (Fig. 2b, Ly6G, asterisks). We also detected increased interfollicular expression of K6 in PMA-treated DKO and single KO vs. CO skin. However, while K6 was detected throughout all epidermal layers in the DKO it was restricted to suprabasal keratinocytes in the single KOs (Fig. 2b). In PMA-treated DKO and single KO skin,

the nuclear p65-NF-κB was strongly increased in basal and suprabasal keratinocytes relative to CO (Fig. 2b, arrows).

Consistent with these results, PMA triggered increased upregulation of the inflammatory markers *Il6*, *S100a8*, and *Mmp3* in DKO and single KOs relative to CO ear epidermis (Fig. 2c). While *Tslp* was induced only in GR<sup>EKO</sup> and DKO, *Il6* showed the strongest upregulation in MR<sup>EKO</sup> epidermis. There was an increased trend of *S100a8* expression in DKO as compared to GR<sup>EKO</sup> or MR<sup>EKO</sup> although it did not reach statistical significance; however *Mmp3* expression showed additive increases in DKO relative to single KOs (Fig. 2c).

We asked whether the individual or combined absence of epidermal GR and MR reduced the therapeutic effects of GCs on skin inflammation by treating dorsal skin with

PMA alone or in combination with Dex. In CO mice, Dex reduced the PMA-induced epidermal thickening, K6 expression, and the number of BrdU-positive proliferating keratinocytes (Fig. S3a–c). In contrast, these effects of Dex were drastically reduced in DKO and single KOs (Fig. S3a–c). Also, the increased nuclear p65-NF- $\kappa$ B in DKO and single KO epidermis remained elevated even after PMA plus Dex treatment (Fig. S3b). These results show that both epidermal GR and MR are required for the anti-proliferative and protective actions of GCs in inflamed skin.

#### Increased sensitivity of DKO to IMQ-induced psoriasis correlates with decreased expression of GC targets

We next investigated the consequences of epidermal-specific GR and MR loss in psoriasis using the imiquimod (IMQ)-induced protocol which consists in topical repetitive applications of Aldara®, a cream containing 5% of the toll-like receptor 7 (TLR7)-agonist IMQ, which induces histopathological and molecular changes that closely recapitulate the human disease<sup>21</sup>.

Mice were treated with IMQ and erythema and scaling were scored daily, with increases in desquamation in DKO relative to CO or single KOs observed from day 3 onwards (Fig. 3a and S4). DKO showed an increased response to IMQ relative to CO, GR<sup>EKO</sup> or MR<sup>EKO</sup> mice, including increased epidermal thickening and abnormal keratinocyte differentiation (retention of the nuclei in the SC or parakeratosis; Fig. 3b, brackets, and arrowheads, respectively). Focal loss of HSD11B2, normally expressed in differentiated epidermis was observed in DKO and GR<sup>EKO</sup> (Fig. S5). Immunostaining of IMQ-treated skin sections showed increases in p-p38 and p-ERK in the epidermis of all KOs relative to CO animals (Fig. S5). Importantly, DKO showed features of increased disease severity not apparent in single KOs, including abundant immune infiltrates containing neutrophils resembling Munro-like abscesses in psoriatic lesions (Fig. 3b, Ly6G).

Although the absence of GR and MR in keratinocytes did not cause spontaneous psoriasis *per se*, we detected constitutive upregulation of several genes contributing to the disease such as *Il17f*, *Il22*, and *Il23* in vehicle-treated DKO skin relative to single KO or CO (Fig. 3c, and data not shown). After IMQ treatment *Il17f* levels increased in CO and single KO and remained high in DKO. However, the expression of the psoriasis marker *Lcn2* did not differ between genotypes in basal or disease conditions while *S100a8* was 2-fold upregulated in vehicle-treated DKO vs. CO and MR<sup>EKO</sup> (Fig. 3c).

Recent findings reported decreases in mRNA levels of GR/*NR3C1* and MR/*NR3C2*, as well as GC-target genes *FKBP51* and *ZBTB16* in human psoriatic lesions<sup>22,23</sup>. Consistently, we detected strong downregulation of *Nr3c1* and *Nr3c2* as well as *Fkbp51* and *Zbtb16* in IMQ-treated

CO skin (Fig. 3d, e). Importantly, *Fkbp51* and *Zbtb16* were constitutively downregulated in DKO relative to CO mice (>20-fold) and IMQ treatment did not further decrease their expression (Fig. 3e). In GR<sup>EKO</sup> and MR<sup>EKO</sup>, *Fkbp51* and *Zbtb16* also showed decreased basal expression relative to CO (2.5- to 3-fold) and IMQ reduced their expression to a similar extent as in CO (Fig. 3e).

#### Immortalized DKO keratinocytes show a unique phenotype relative to GR<sup>EKO</sup>, MR<sup>EKO</sup>, and CO

To unequivocally decipher the cell-type specific roles of GR and MR, we established immortalized DKO keratinocyte cell lines from adult epidermis (Fig. S6), and performed comparative assessment of their morphology, degree of differentiation, and growth kinetics relative to previously established single KO and CO cells<sup>16,24</sup>.

DKO keratinocytes showed reduced cell size relative to CO or single KO, which was confirmed by flow cytometry (Fig. 4a, b). The expression of the epithelial-specific marker E-cadherin was absent only in GR<sup>EKO</sup> keratinocytes consistent with its previously reported epithelial-mesenchymal transition phenotype<sup>24</sup>. The downregulation of E-cadherin in GR-deficient but not DKO cells suggests that keratinocyte alterations are not due to intrinsic GR deficiency but rather to a pathological role of MR in the absence of GR (Fig. 4c).

The expression of K5 was upregulated while the epithelial marker p63 was downregulated in DKO relative to the other cell lines (Fig. 4c). Overall, these data suggest that both GR and MR are required in keratinocytes for the proper expression of epithelial markers<sup>7,8</sup>, although their individual or combined loss does not impede the expression of the keratinocyte marker K5.

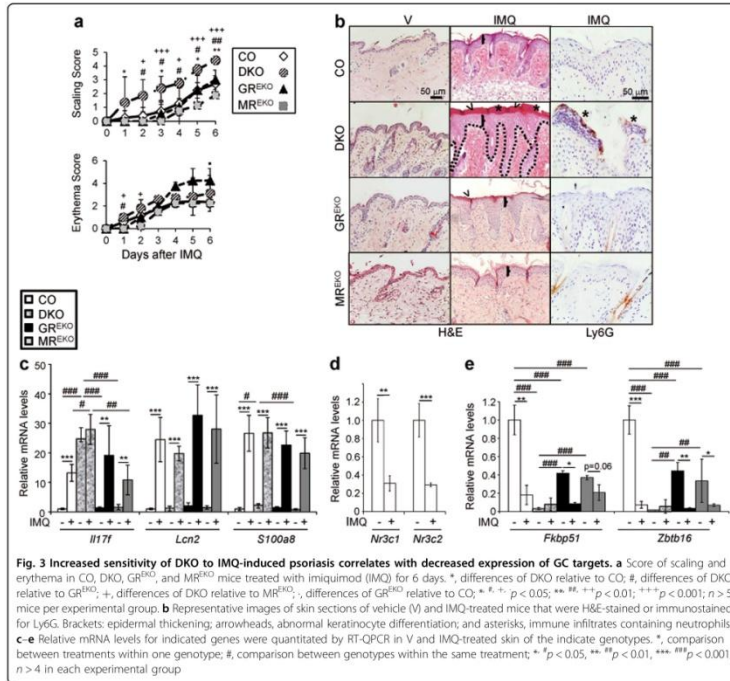
Examination of the growth rate of CO, single KO and DKO keratinocytes in culture revealed higher proliferation of DKO and MR<sup>EKO</sup> cells relative to GR<sup>EKO</sup> and CO with statistical significance at day 7 (Fig. 4d). These data are consistent with the known anti-proliferative role of GR and MR in epidermis<sup>15,16,24</sup>.

#### Lack of GR and MR results in dysregulation of the MAPK/ MAPK phosphatase and NF- $\kappa$ B pathways in keratinocytes

It is well known that MAPKs positively regulate keratinocyte proliferation and also that GC-activated GR inhibits MAPK signaling<sup>14,25</sup>. GCs also control the gene expression of negative MAPK regulators including the *Dusp1/Mkp1* and *Dusp4/Mkp2*<sup>26</sup>.

We checked the total and phosphorylated protein levels of MAPKs in CO, DKO, GR<sup>EKO</sup>, and MR<sup>EKO</sup> cells (Fig. 5a). In single KO cells there were statistically significant increases of the p-p38/p38 and p-ERK/ERK ratios relative to CO indicating that both receptors are required to control these MAPKs. Also, as DKO cells showed

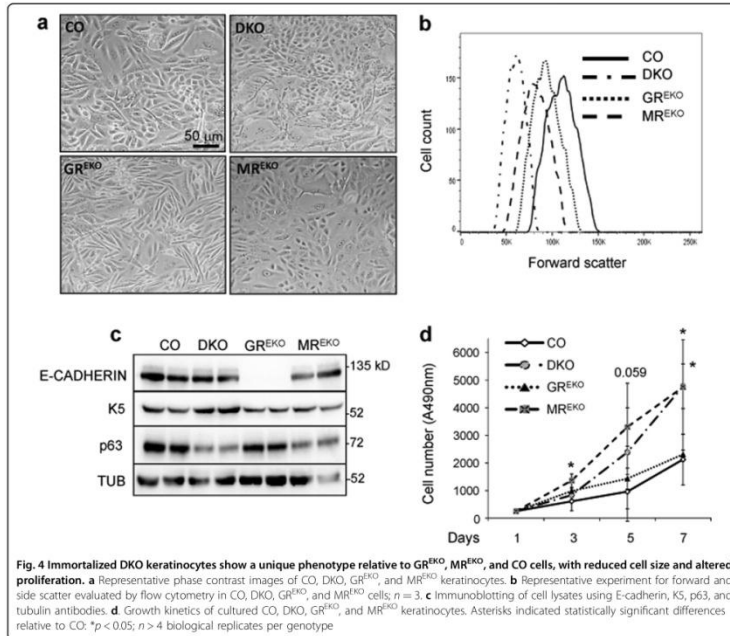




quantitatively similar changes compared to single KO, our data suggest that GR and MR target these MAPKs through common pathways. In contrast, JNK activity was unchanged among cell lines (Fig. 5a, b).

We found that the absence of MR in MR<sup>EKO</sup> or DKO cells, but not GR, correlated with statistically significant upregulation of MKP-1 (Fig. 5a, b). Conversely, in the absence of GR, MKP-2 was upregulated to a similar extent in GR<sup>EKO</sup> and DKO keratinocytes while it was unchanged in MR<sup>EKO</sup> cells. While MKP-1 targets preferentially p38 and JNK, MKP-2 preferably dephosphorylates ERK and JNK<sup>15</sup>. Previous studies in keratinocytes showed that GCs transcriptionally induced *Mkp1* while they downregulated *Mkp2*<sup>27</sup>. However, it has not been addressed whether this regulation is mediated by MR or GR.

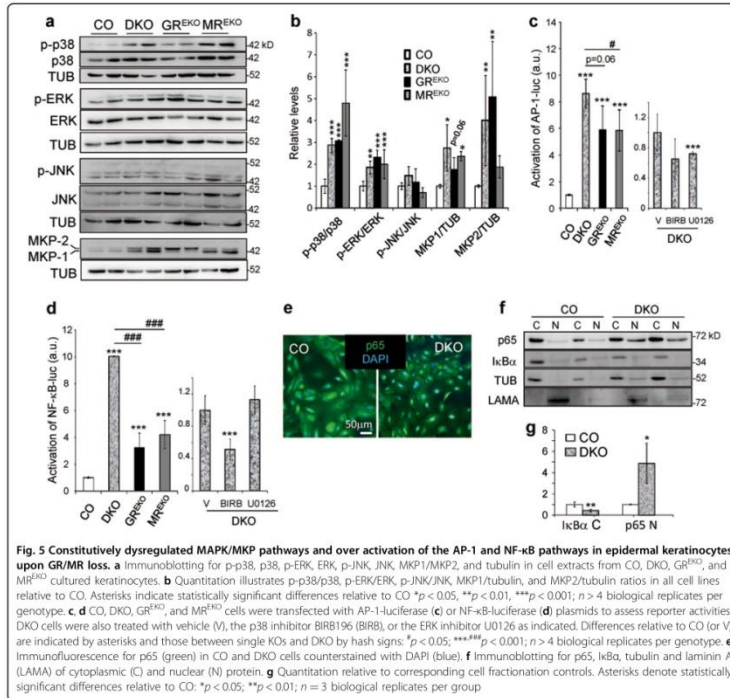
Therefore, we investigated whether the changes in protein levels of these phosphatases were due to the lack of transcriptional control by GR and/or MR. Dex strongly induced *Mkp-1* in CO and MR<sup>EKO</sup> cultured keratinocytes but not in GR<sup>EKO</sup> or DKO, suggesting that GR is necessary and sufficient for the full induction of this gene (Fig. S7). On the other hand, Dex repressed *Mkp-2* only in CO cells, indicating that both GR and MR are required for its regulation (Fig. S7). These findings indicate that GR and MR have specific roles in modulating the expression of MKP-1/2 in epidermal keratinocytes. In addition, MKP-1/2 upregulation in DKO keratinocytes was not a direct consequence of p38 or ERK over activation since treatment with specific pharmacological antagonists did not modify phosphatase levels (Fig. S8).



We next assessed downstream AP-1 activity using luciferase reporter assays and found constitutive increases in single KO (6-fold) and DKO cells (9-fold) relative to CO (Fig. 5c), demonstrating that both receptors are required for regulation of this inflammatory signaling pathway. The increase in activity (1.5-fold) observed between DKO and single KO cells indicates cooperation between GR and MR. The pharmacological inhibition of ERK but not p38 partially ameliorated the AP-1 activity in DKO cells (Fig. 5c). The increased AP-1 activity in DKO cells even in the absence of active ERK may reflect transcriptional repression mediated by tethering of GR/MR to AP-1 or the lack of induction of other negative repressors of this pathway. Moreover, these mechanisms could account for the differences in AP-1 activity observed between single KO and DKO

cells, despite having similar levels of ERK and p38 activation<sup>28</sup>.

Our recent work demonstrated that similar to GR, MR has anti-inflammatory roles in inflamed skin at least partially through inhibition of the NF- $\kappa$ B activity in keratinocytes<sup>16</sup>. Consistent with this, in single KO cells, NF- $\kappa$ B-luciferase activity was constitutively augmented by 3- to 4-fold relative to CO and, remarkably, DKO cells showed a 10-fold increase, indicating synergistic regulation by GR and MR (Fig. 5d). Inhibition of p38 but not ERK resulted in significant decrease in NF- $\kappa$ B activity (Fig. 5d). Cell fractionation and immunofluorescence analyses demonstrated a significant increase in nuclear p65 and a decrease in I $\kappa$ B $\alpha$  in DKO vs. CO keratinocytes, another cause for the elevated NF- $\kappa$ B activity in these cells (Fig. 5e-g).



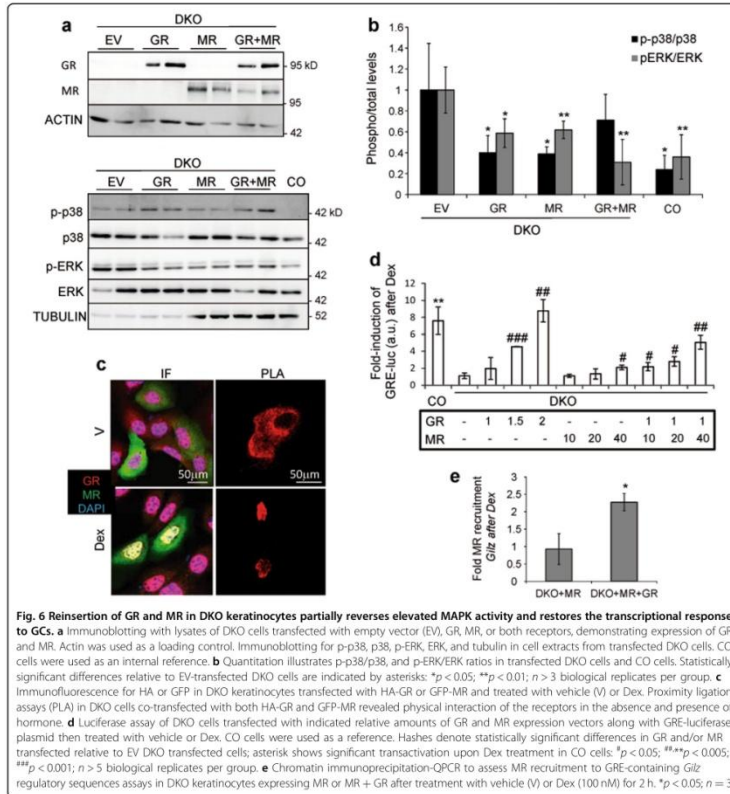
#### Reinsertion of GR and MR in immortalized DKO keratinocytes results in physical and functional interactions that restore the transcriptional response to GCs

To unequivocally demonstrate that the impaired activation of the MAPK pathway is due to the loss of GC receptors, we attempted to reverse the relative increases in p38 and ERK activities by reinsertion of empty vector (EV), GR, MR, or both, into DKO cells (Fig. 6a). The expression of either receptor resulted in significant decreases in p38 and ERK activities which reached similar levels to those in CO keratinocytes (Fig. 6a, b). However, the co-transfection of both receptors did not achieve further decrease, which is consistent with the fact that the

loss of either or both receptors has the same consequence for MAPK activity (Fig. 5a).

We next assessed GC-induced nuclear translocation of GR and MR by co-transfection of both receptors into DKO cells followed by Dex treatment. Immunofluorescence demonstrated nuclear co-localization of GR and MR (Fig. 6c, IF). Also, Proximity ligation assays (PLA) revealed physical interaction of GR and MR in the cytoplasm even in the absence of hormone and, upon Dex treatment this interaction was detected specifically in the nuclear compartment (Fig. 6c).

The formation of GR- and MR- homo- and heterodimers has been previously reported<sup>29,30</sup>. To decipher the relative contribution of GR and MR dimers in the



**Fig. 6** Reinsertion of GR and MR in DKO keratinocytes partially reverses elevated MAPK activity and restores the transcriptional response to GCs. **a** Immunoblotting with lysates of DKO cells transfected with empty vector (EV), GR, MR, or both receptors, demonstrating expression of GR and MR. Actin was used as a loading control. Immunoblotting for p-p38, p38, p-ERK, ERK, and tubulin in cell extracts from transfected DKO cells. CO cells were used as an internal reference. **b** Quantitation illustrates p-p38/p38, and p-ERK/ERK ratios in transfected DKO cells and CO cells. Statistically significant differences relative to EV-transfected DKO cells are indicated by asterisks: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ;  $n > 3$  biological replicates per group. **c** Immunofluorescence for HA or GFP in DKO keratinocytes transfected with HA-GR or GFP-MR and treated with vehicle (V) or Dex. Proximity ligation assays (PLA) in DKO cells co-transfected with both HA-GR and GFP-MR revealed physical interaction of the receptors in the absence and presence of hormone. **d** Luciferase assay of DKO cells transfected with indicated relative amounts of GR and MR expression vectors along with GRE-luciferase plasmid then treated with vehicle or Dex. CO cells were used as a reference. Hashes denote statistically significant differences in GR and/or MR transfected relative to EV DKO transfected cells; asterisk shows significant transactivation upon Dex treatment in CO cells. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ;  $n > 5$  biological replicates per group. **e** Chromatin immunoprecipitation-QPCR to assess MR recruitment to GRE-containing *Gilz* regulatory sequences assays in DKO keratinocytes expressing MR or MR + GR after treatment with vehicle (V) or Dex (100 nM) for 2 h. \* $p < 0.05$ ;  $n = 3$

transcriptional response to GCs in keratinocytes, we used DKO cells that were transfected with distinct amounts and ratios of each receptor along with a GRE-luciferase reporter plasmid. In CO, Dex induced transactivation of the GRE-luciferase reporter by ~7-fold while this response was abolished in DKO keratinocytes (Fig. 6d). The transfection of increasing amounts of GR into DKO cells restored the response to Dex in a dose-dependent manner

while much higher doses of MR were required for transactivation of the GRE-luciferase reporter (Fig. 6d). However, while suboptimal doses of individually transfected GR or MR did not result in reporter transactivation after Dex treatment, their combined use achieved additive effects restoring the response to a similar extent as in CO cells (Fig. 6d). We also assessed MR recruitment to GRE-containing regulatory sequences in the classical GC-target

*Gilz* by chromatin immunoprecipitation-qPCR assays and found that binding was only detected when GR was also present (Fig. 6e).

These data taken together with those showing physical interaction between receptors support the functional and cooperative role of GR and MR in mediating GC transcriptional responses in keratinocytes.

## Discussion

While the crucial role of GR in regulating epidermal morphogenesis, skin wound repair, cutaneous inflammation, and tumorigenesis has been reported<sup>5</sup>, the knowledge regarding MR function in skin biology is much more limited. Studies have focused on MR as responsible for some of the cutaneous undesired side-effects when GCs are in excess<sup>16–18</sup>. Likewise, it was reported that under physiological conditions, GR but not MR is essential for normal cardiac function and that the adverse effects in the cardiomyocyte-GR KO mice were due to GC-induced MR over activation (rather than to the loss of GR)<sup>31,32</sup>.

By using genetic and pharmacological approaches in mice and human skin explants, we and others demonstrated that blockade of the MR effectively improved GC-induced skin atrophy<sup>5,16,18</sup>. However, caution is advised for treating inflamed skin with GCs and MR inhibitors as their combined use decreased the anti-inflammatory actions of GCs in SDS-treated human skin explants<sup>33</sup>.

Given that GR<sup>-/-</sup> and MR<sup>-/-</sup> mice die perinatally<sup>34,35</sup> assessing the combined actions of both receptors *in vivo* has been precluded. The generation of epidermal DKO mice has allowed us to unequivocally demonstrate the individual and combined roles of GR and MR in skin pathophysiology.

The combined deletion of epidermal GR and MR resulted in a severe skin phenotype at birth relative to single KOs suggesting cooperative and unique roles of GR and MR in modulating epidermal development and inflammation (Fig. 1). We also demonstrate that in response to PMA and IMQ, epidermal GR and MR have anti-inflammatory roles in adult skin by targeting the MAPK/AP-1 and NF- $\kappa$ B pathways and repressing the expression of inflammatory mediators. Also, the fact that neutrophil-containing microabscesses were only detected in DKO mice, during development or after inflammatory triggers, support cooperation between these receptors.

DKO were more susceptible to PMA and IMQ-induced psoriasis than CO while GR<sup>EKO</sup> and MR<sup>EKO</sup> mice showed an intermediate response. While the combined inactivation of epidermal GR and MR is not sufficient to cause spontaneous psoriasis it contributes to sustained inflammation (e.g., increased *Il17f* levels) and ultimately increases the susceptibility of DKOs to this disease (Fig. 3). In DKO skin, impaired GC signaling contributes to the lack of negative regulation of pro-inflammatory

genes and a defective induction of anti-inflammatory mediators. These data are consistent with recent reports demonstrating that defective local GC production in skin—as this organ can synthesize and metabolize GCs<sup>36,37</sup>, could contribute to the pathogenesis of psoriasis<sup>38</sup>.

Our data suggest that the role of distinct GR- and MR-homo- and hetero-dimers<sup>29,30</sup> is relevant for regulating gene expression (Fig. 6). This raises the question of the underlying mechanisms for specificity given that both receptors can theoretically bind to identical GREs. One possible explanation is that differential interactions of GR or MR with other transcriptional regulators result in non-overlapping transcriptional activities. In cultured keratinocytes, either GR or MR were transcriptionally efficient in response to GCs, although GR showed much higher transactivation capability relative to MR. However, while suboptimal doses of GR and MR were individually unable to transactivate a GRE-containing reporter, co-transfection of both receptors resulted in functional interaction and additive transcriptional actions (Fig. 6).

In conclusion, we provide insights into the relative roles of GR and MR in keratinocytes by generating mice and cell lines lacking both receptors, which may be useful for better understanding the consequences of impaired GC signaling in the skin, and ultimately improving GC-based skin therapies.

## Materials and methods

### Antibodies and reagents

Unless otherwise specified all chemicals were from Sigma. Antibodies were from Biologend: HA (MMS-101P), K5 (PRB-160P), K6 (PRB-169P), Loricrin (PRB-145P); Santa Cruz Biotechnology: p38 $\alpha$  (sc-535), p63 (sc-8431), p65-NF- $\kappa$ B (sc-372), ERK (sc-154), GR (sc-1004), HSD11B2 (sc-20176), I $\kappa$ B(sc-371), Mkp1/2 (sc-1102), MR (sc-11412, ChIP), LaminA (sc-6214); Abcam: MR (ab64457); Cell Signalling Technology: p-ERK (Thr202/Tyr204; #4376), p-p38 (#9211S and #4631 for immunohistochemistry), p-JNK (#9251), JNK (#9252); ThermoFisher: GFP (A6455); Sigma: Tubulin (T6199), Actin (A2066); Roche: BrdU (11170376001) and BD Biosciences: E-cadherin (610181), Ly6G (551459). Secondary biotin-conjugated anti-rabbit, anti-mouse and anti-rat antibodies (Jackson ImmunoResearch) and secondary Alexa Fluor<sup>®</sup> anti-rabbit (555, A-31572) antibody (ThermoFisher) were used for immunostaining. Secondary peroxidase-conjugated anti-rabbit (NA934), anti-mouse (NA931) antibodies (GE Healthcare), and anti-goat (Jackson Immunoresearch) were used for immunoblotting.

### Animal experimentation

Animal experimentation was conducted according to current Spanish and European regulations and approved

by our institution's ethics committee (approval ID for project SAF2014-59474-R). Mice were maintained at 12 light/12 dark cycle, caged in groups (3–6 per cage), and had access to ad libitum food and water. Unless otherwise indicated, 8-week old mice in the telogen phase of the hair cycle were used for experiments and were treated and killed in the morning.

$MR^{loxP/loxP}/GR^{loxP/loxP}$  mice were generated by intercrossing  $MR^{loxP/loxP}$  with  $GR^{loxP/loxP}$  animals<sup>39,40</sup>. To generate double GR/MR epidermal knockout mice (DKO; keratin 5 (K5)-Cre// $MR^{loxP/loxP}/GR^{loxP/loxP}$ ), K5-Cre// $MR^{loxP/loxP}$  ( $MR^{EKO}$ )<sup>16</sup> males were bred with  $MR^{loxP/loxP}/GR^{loxP/loxP}$  females. K5-Cre// $GR^{loxP/loxP}$  ( $GR^{EKO}$ ) mice have been previously described<sup>15</sup>. The colony was maintained by crossing DKO males with  $MR^{loxP/loxP}/GR^{loxP/loxP}$  females.  $MR^{loxP/loxP}/GR^{loxP/loxP}$  littermates were used as experimental controls (CO).

Skin phenotype of developing and newborn CO and DKO littermates was assessed macroscopically and histologically at E18.5 (16 CO, 20 DKO), P0 (5 CO, 5 DKO), P1 (12 CO, 11 DKO), and P3 (4 CO, 4 DKO). Epidermis for preparation of RNA or protein from P0/P1 mice was isolated by incubating dorsal skin with 1 mg/ml dispase II. Samples were from 7 CO, 9 DKO, 2  $GR^{loxP/loxP}$ , 4  $GR^{EKO}$ , 2  $MR^{loxP/loxP}$ , and 4  $MR^{EKO}$  mice.

To determine keratinocyte proliferation, mice were injected with BrdU (130 µg/g of body weight) 1 h before killing. To assess GC-mediated gene expression, dorsal skin ( $n \geq 4$  per experimental group) was treated with Vehicle (Acetone) or Dex (8 µg/200 µl) 24 h prior to killing. The phorbol ester PMA was applied to both sides of mouse ears (8 µg/50 µl) 48 h prior to killing ( $n \geq 4$  per experimental group). To test the anti-inflammatory capacity of GCs, vehicle or Dex were applied (16 µg/200 µl) to dorsal skin 24 h prior to and upon treatment with PMA (8 µg/200 µl) 48 h prior to killing ( $n \geq 4$  per experimental group).

For IMQ-induced psoriasis, mice between 8–12 weeks old, ( $n \geq 5$  per experimental group) were used and Aldara® (5% IMQ, 3 M Pharmaceuticals; 62.5 mg) was applied to dorsal skin daily for 6 consecutive days. On day 7, mice were killed. Macroscopic parameters such as skin erythema and scaling were scored daily independently on a scale from 0 to 5: 0, none; 1, slight; 2, moderate; 3, marked; 4, very marked; 5, severe.

#### Histochemical analysis

Tissues collected from mice were fixed in 4% PFA or 70% ethanol and paraffin-embedded for histopathological analysis as described<sup>15</sup>. 4 µm-thick sections were either stained with hematoxylin–eosin or used for immunofluorescence (see below) or immunohistochemistry performed following manufacturers' indications for antibodies. After incubation with primary and secondary

biotin-conjugated antibodies, immunoreactivity was revealed using the VECTASTAIN® Elite ABC-Peroxidase Staining Kit (Vector Labs) and the sections were counterstained with hematoxylin, mounted and analyzed using a Leica DM1000 microscope, Leica EC3 camera and LAS EZ software (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany). Quantitation of BrdU-positive nuclei was performed by counting 100 hematoxylin-stained nuclei in the basal layer of the interfollicular epidermis in 6 random areas per immunostained section. Data were expressed as percentages relative to total hematoxylin-stained nuclei ( $n \geq 4$  biological replicates per experimental group). Measurements of ear edema and epidermal thickness were done using Image J software as described<sup>17</sup>.

#### Immunoblotting

All protein extraction buffers were supplemented with Complete protease and phosphatase inhibitor cocktails (Roche). Whole cell protein extracts from cultured keratinocytes were prepared using RIPA buffer and those from mouse tissues were prepared by pulverizing frozen tissue, then subjecting it to 3 freeze thaw cycles in 20 mM HEPES pH7.9, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EDTA, 25% glycerol, then adding *IGEPAL*® CA-630 NP-40 to a final concentration of 1%. Nuclear cytoplasmic fractionation was carried out as described<sup>41</sup>. Samples (25–30 µg/lane) were boiled in Laemmli buffer, separated on SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (GE Healthcare). Membranes were blocked and incubated with specific primary antibodies then peroxidase-conjugated secondary antibodies following manufacturers' indications. Immunoreactive signal was detected with Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate (ThermoFisher) and the ImageQuant 4000 Biomolecular Imager (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Band intensities were quantitated using Image J software. All signals were normalized to loading controls (tubulin, actin or laminA).

#### RNA isolation and quantitative RT-PCR

Trizol (ThermoFisher) was used to extract RNA from cells, whole skin or epidermis. In the cases of whole skin or epidermis, a polytron (PT1600E, Kinematica, Luzern, Switzerland) was used to homogenize samples. cDNA was generated using RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (ThermoFisher) and oligo dT primers (ThermoFisher). RT-qPCR was performed in the 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) using specific oligonucleotides (0.3 µM each) and FastStart Universal SYBR Green Master ROX (Roche). *Hprt1* was used as housekeeping gene. Oligonucleotide sequences can be found in Table S1. Technical triplicates were used; and at least three biological replicates per experiment group were assessed to calculate the mean value  $\pm$  SD.

### Cell culture and treatments

Mouse keratinocyte cell lines were established following published protocols<sup>42,43</sup>. Briefly, keratinocytes were isolated from 8-wk-old female mouse dorsal skin and cultured on mitomycin C treated J2-3T3 feeders in type I collagen-coated flasks in DMEM-Ham's F12 (3:1) medium (ThermoFisher) supplemented with  $1.8 \times 10^{-4}$  mol/l adenine, 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,  $10^{-10}$ M cholera toxin, and 10 ng/ml EGF (Peprotech). Following approximately 8 passages, spontaneously immortalized lines arose, which were maintained using the above conditions.

To evaluate response to GCs, cells were grown overnight in medium containing charcoal-stripped serum to deplete steroids, and then treated with vehicle (EtOH) or 100 nM Dex for indicated time periods. In specified experiments, cells were treated with 100 nM PMA, 10 µM BIRB196, or 5 µM U0126 (Merck Millipore).

### Plasmids, transfections, and luciferase assays

Two mouse GRalpha constructs were generated, one untagged (pcDNA3-GR) and the other with an N-terminal HA tag (pcDNA3-HAGR). The cDNA encoding GR from pSV2Wrec<sup>44</sup> was amplified by PCR and then subcloned into the *Bam*H1-*Xho*I sites of pcDNA3 (Invitrogen). Constructs were sequence verified prior to use (Table S1).

Keratinocytes at 70–90% confluence were transfected with combinations of the following plasmids: pcDNA4 (ThermoFisher), pcDNA4-MR<sup>45</sup>, pcDNA3-GR, pGRE2EIB-Luciferase<sup>46</sup>, pGL3-NF-KB-5x-Luciferase<sup>47</sup>, -73/+63 Collagenase-Luciferase<sup>48</sup>, and the internal control pRL-SV40 Renilla (Promega) using Lipofectamine 2000 Reagent (ThermoFisher). Luciferase activity was measured using the Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System (Promega) and a Wallac 1420 Victor2 Microplate Reader (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts). Firefly-luciferase levels were normalized to those of Renilla luciferase.

### Proliferation assays

Overall, 250 keratinocytes were plated per well ( $n = 4$  per genotype and time point) in 96-well plates on day 0, 3, 5, and 7, 20 µl per well of CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay Reagent (Promega) was added and incubated for 3 h at 37 °C. Absorbance was measured at 490 nm using a Wallac Victor2 1420 multi-label counter (Perkin Elmer).

### Flow cytometry

Following trypsinization, resuspension in serum-containing media, and washing with PBS, cultured keratinocytes were resuspended in DPBS + 2% BSA. Forward

and side scatter were evaluated using a BD FACS Canto Flow Cytometer (Franklin Lakes, New Jersey) and data were analyzed using FlowJo Software (BD Biosciences).

### Immunofluorescence and proximity ligation assay (PLA)

Keratinocytes were cultured on collagen I-coated coverslips, fixed with 4% PFA and permeabilized with 0.2% Triton X100 in PBS prior to blocking with 5% donkey serum in PBS and overnight incubation with primary antibodies at 4 °C. The following day, samples were washed with PBS, and incubated 1 h with secondary antibodies and DAPI (ThermoFisher). The same protocol, omitting the permeabilization step, was used for dewaxed sections of paraffin-embedded EtOH-fixed mouse skin. Samples were mounted using Mowiol (Calbiochem) and DABCO and then analyzed using a Leica DM RXA2 fluorescent microscope.

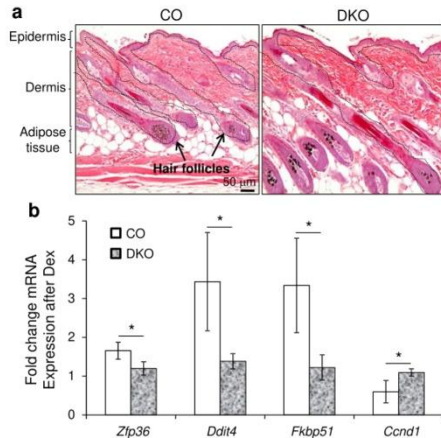
Proximity ligation assays (PLA) were performed as described with PLA Duolink<sup>®</sup> In Situ Red Starter Kit Mouse/Rabbit (Sigma)<sup>49</sup>. Briefly, for detection of GR/MR interactions, GFP-MR<sup>44</sup> and HA-GR constructs were transfected into DKO cells at a 1:1 ratio, then cells were treated with Dex 100 nM for 16 h. Protein interaction was detected using anti-GFP and anti-HA primary antibodies diluted in Antibody Diluent solution overnight at 4 °C. As negative controls, cells transfected with either GFP-MR or HA-GR were used.

### Chromatin immunoprecipitation

MR chromatin immunoprecipitations were performed as described using DKO keratinocytes transfected with 1:1 ratios of pcDNA3-empty vector and pcDNA4-MR or pcDNA3-GR and pcDNA4-MR<sup>50</sup>. QPCR was performed to determine the relative amplification of sequences corresponding to a *Gilz* enhancer in Dex- vs. vehicle-treated chromatin immunoprecipitations, which were normalized to the amplification values of respective inputs (primers; Supplementary Table S1).

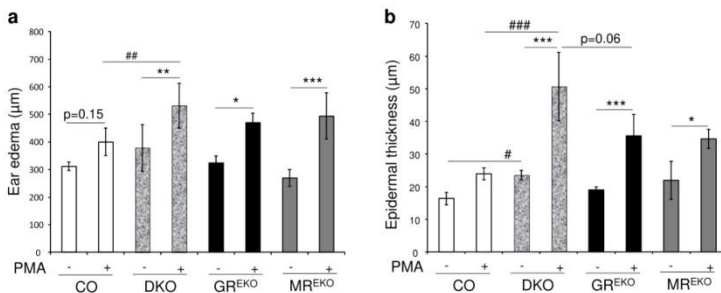
### Statistical analysis

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



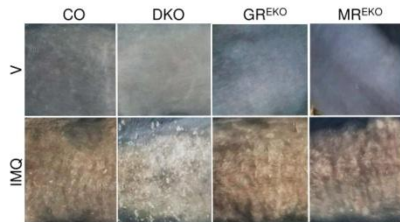
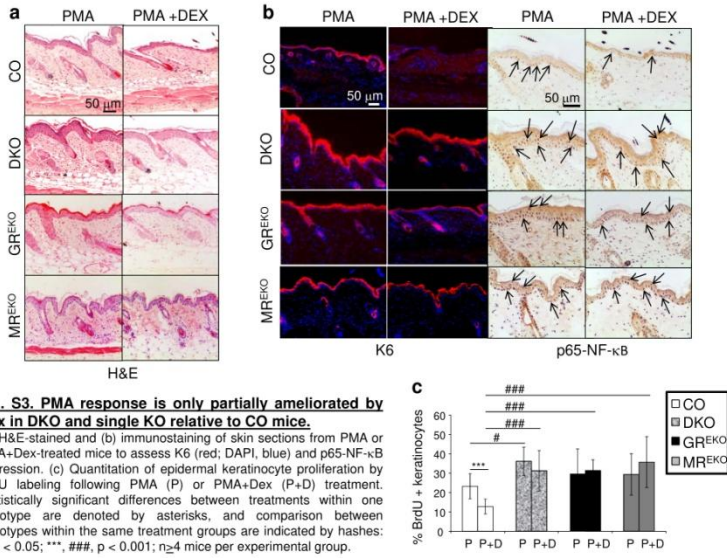
**Fig. S1. DKO adult mice feature relatively normal skin architecture but lack response to topical GC treatment.**

(a) Representative images of H&E-stained sections from CO and DKO adult dorsal skin. (b) Gene expression was quantitated by RT-QPCR using dorsal skin from CO and DKO littermates treated with vehicle or dexamethasone (Dex) for 24h. Asterisks indicate statistically significant differences between genotypes in the fold change of gene expression upon Dex treatment: \*,  $p < 0.05$ ;  $n \geq 3$  mice per genotype and treatment.

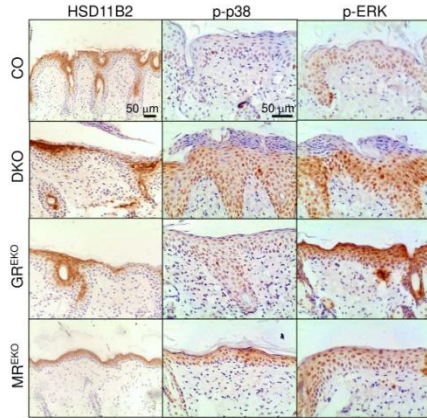


**Fig. S2. PMA-induced ear edema and epidermal thickness in CO, DKO, GRE<sup>EKO</sup>, and MR<sup>EKO</sup> mice.** Quantitation of ear edema and epidermal thickness after 48h topical treatment of CO, DKO, GRE<sup>EKO</sup>, or MR<sup>EKO</sup> mice with vehicle (-) or PMA (16 mg/ear). Asterisks denote statistically differences between treatment groups, and hash sign statistically significant differences between genotypes: \*, #  $p < 0.05$ , \*\*, ###  $p < 0.01$ , \*\*\*, ###  $p < 0.001$ .  $n \geq 4$  per genotype and treatment.



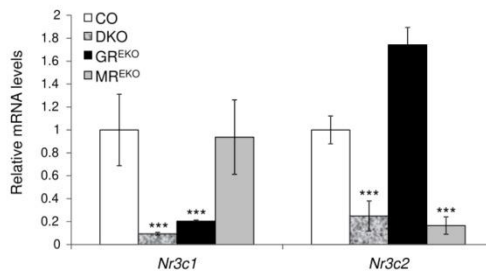


**Fig. S4. Increased scaling in IMQ-treated DKO relative to single KO and CO mice.**  
Representative images illustrate scaling in CO, DKO, GR<sup>EKO</sup>, or MR<sup>EKO</sup> mice at experimental end-point. V, vaseline; IMQ, imiquimod treatment.



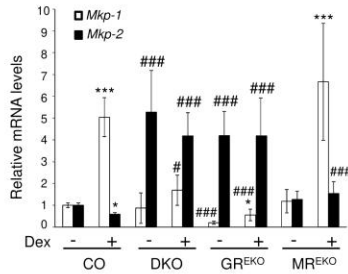
**Fig. S5. Altered expression of HSD11B2, p-p38, and p-ERK in DKO and single KO relative to CO mice after IMQ treatment.**

Representative images illustrate immunostaining for HSD11B2, p-p38, and p-ERK in CO, DKO, GREKO, or MREKO mice at experimental end-point.

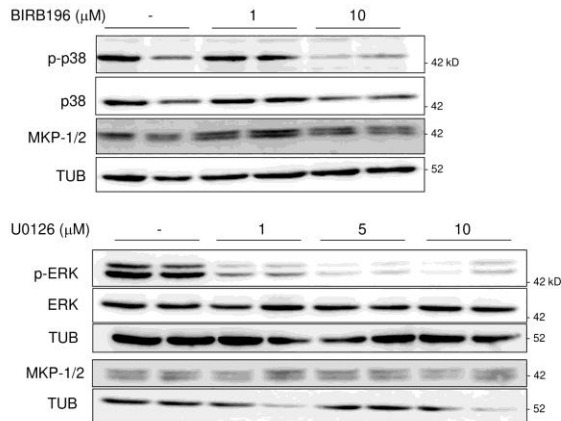


**Fig. S6. Relative *Nr3c1* and *Nr3c2* mRNA levels in CO, DKO, GREKO, and MREKO cell lines.**

The relative mRNA levels of *Nr3c1* and *Nr3c2* were quantitated by RT-QPCR in the indicated cell lines. Asterisks indicate statistically significant differences relative to control: \*\*\*,  $p < 0.001$ ;  $n \geq 4$  biological replicates per genotype.



**Fig. S7. *Dusp1/Dusp4* mRNA expression in cells treated with vehicle or Dex.**  
 The relative mRNA levels of *Dusp1/Mkp1* and *Dusp4/Mkp2* were quantitated by RT-QPCR in CO, DKO, GR<sup>EKO</sup>, and MR<sup>EKO</sup> keratinocytes after culture in charcoal-treated serum, then treatment with vehicle or Dex (100 nM, 3h). Statistically significant differences within each genotype in response to ligand are indicated by asterisks and those relative to CO (the same treatment group) with hash signs: \*, #,  $p < 0.05$ ; \*\*\*, ###,  $p < 0.001$ ;  $n \geq 4$  biological replicates per genotype.



**Fig. S8. MKP1/2 up-regulation is not due to ERK or p38 overactivation in DKO keratinocytes.**  
 Immunoblotting for p-p38, p38, p-ERK, ERK, MKP1/MKP2, and tubulin in cell extracts from DKO keratinocytes in the absence (-) or presence of the indicated concentrations of inhibitors BIRB196 or U0126.

**Table S1**

**Primers used for RT-QPCR**

Gene	Forward	Reverse	Product size
<i>Ccnd1</i>	CATCAAGTGTGACCCGGACTG	CCTCCTCCTCAGTGGCCTTG	116
<i>Ddit4</i>	GGGCCGGAGGAAGACTCCTCATA	CTGTATGCCAGGGGAGGAGTTG	218
<i>Dusp1</i>	CTCCACTCAAGTCTTCTTCTCC	TAGGCATGCCCAGGTAC	219
<i>Dusp4</i>	GTGAAAGACACCCAGGAGGC	GGCCTGAGCACTCCTTAC	86
<i>Fhbg51</i>	CTTGACCACCGTATGGTTT	AACGACTCTGAGGCTTTGGA	290
<i>Hprt1</i>	TCAGTCAACGGGGACATAAA	GGGGGTGACTGCTTAACCA	142
<i>Hsd11b1</i>	GGAGCCGCACTTATCTGAA	GACCTGGCAGTCAATACCA	253
<i>Hsd11b2</i>	CTGCAGATGGATCTGACCAA	GTGAGTCAAGTGCACCAA	197
<i>Il17</i>	CCACGAGGTGTTCTAATTCCTT	GACACAGTGGAGCCACCTTT	65
<i>Il6</i>	GATGCTACCAAAGTGGATATAATC	GGTCTTAGCCACTCCTCTGTG	269
<i>Krt77</i>	GAGCAAGATGAGGCTGAGG	CCTCCGCATCAGAAATCAAT	200
<i>Lcn2</i>	GGCCTGAGTGTCTATGTGC	TTCTGATCCAGTAGCGACAGC	308
<i>Mmp3</i>	CCAGGTGTTGACTCAAGGGTGGA	ACACAGGATGCCTTCCTGGATCTC	172
<i>Nr3c1</i>	TGCTATGCTTTGCTCCTGATCTG	TGTCAGTTGATAAACCGGTGCC	299
<i>Nr3c2</i>	GTGGAGAGTCTTTGACTACCG	TGACACCCAGAAAGCCTCACTGC	286
<i>S100a8</i>	GGAGTTCCTTGGGATGGTAT	TCTGCTACTCCTTGTGGCTGTCT	68
<i>Sipi</i>	TGGCACCTGGACTGTGGAAGG	CCCGTCCCTCTGGCAGACAT	278
<i>Spr2d</i>	TGGTACTCAAGCCGAGGA	TTTGCTGATGACTGCTGAAGAC	336
<i>Tslp1</i>	CCAGGCTACCCTGAACTGA	TCTGGAGATTGCATGAAGGA	125
<i>Zbtb16</i>	CCAGTTCCTCAAAGGAGGATG	TTCCACACAGCAGACAGAAAG	88
<i>Zfp36</i>	CCACTCCTCTCGATACAAGA	GCTTGGCGAAGTCCACCA	112

**Primers used in PCR subcloning into pcDNA3**

cDNA	Forward	Reverse	Product size	Restriction sites
GR	GCGGGATCCGCCACCATGGACTCCAAAGAA	GGCTCGAGTCATTTCTGTATGAAACAGAAAGC	2376	<i>Bam</i> HI 5', <i>Xho</i> I 3'
HA-GR	GCGGGATCCGCCACCATGACCCCTACGAC	GGGCTCGAGTCATTTCTGTATGAAACAGAAAGC	2439	<i>Bam</i> HI 5', <i>Xho</i> I 3'

**GR sequencing primers**

nt	Sequence	Strand
nt 555	GCAAAATAGAAAAGCCAGCC	forward
nt 1153	CAAGGCTCGAGAGGACAA	forward
nt 1900	AACCTGCTATGCTTTGCTCC	forward
nt 1846	TCATGATACGTAGAGGGTCA	reverse
nt 1255		

**Primers used in chromatin immunoprecipitation QPCR**

Gene	Forward	Reverse	Product size
<i>Gilz</i>	GGAGGGAATGCAACTGGGAG	CCCCTCCCTTGAATGCTGAA	91



# Epidermal Mineralocorticoid Receptor Inactivation Affects the Homeostasis of All Skin Layers in Chronologically Aged Mice JID Open

Judit Bigas<sup>1,2</sup>, Lisa M. Sevilla<sup>1,2</sup> and Paloma Pérez<sup>1</sup>

The increased production of endogenous glucocorticoids (GCs) in the skin of the elderly population contributes to age-related defects strikingly similar to those occurring after pharmacologic treatments with GCs. GCs act through the ligand-dependent transcription factors GC receptor (GR) and mineralocorticoid receptor (MR). We reported that epidermal MR plays nonredundant roles relative to GR in adult mouse skin homeostasis; however, its relative contribution to natural skin aging has not been previously investigated.

A 13-month-old MR epidermal knockout (MR<sup>EKO</sup>) mice showed differential features of aging relative to controls (CO) in all skin compartments. MR<sup>EKO</sup> mice were resistant to age-induced epidermal atrophy but showed reduced dermal thickness, with decreased collagen deposition and decreased SMAD2 and 3 activity. Importantly, the dermal white adipose tissue (dWAT) was 2.5-fold enlarged in 13-month MR<sup>EKO</sup> versus CO, featuring adipocyte hyperplasia and hypertrophy at least in part through early increases in *Pparg*. These changes correlated with compartment-specific alterations in GC signaling. In addition, conditioned medium from MR<sup>EKO</sup> keratinocytes increased adipocyte differentiation, indicating paracrine regulation of adipogenesis through mechanisms that include activation of  $\beta$ -catenin signaling. These findings highlight the importance of epidermal MR in regulating cross-talk among skin compartments in naturally aged skin through GC and  $\beta$ -catenin signaling pathways.

Journal of Investigative Dermatology (2020) ■, ■-■, doi:10.1016/j.jid.2020.03.933

## INTRODUCTION

Structurally and functionally, the skin is formed by three main compartments, the epidermis and its appendages, the dermis, and the dermal white adipose tissue (dWAT), each composed of different cell types among which extensive cross-talk occurs (Rognoni and Watt, 2018). Intrinsic or chronological skin aging is characterized by gradual loss of the structural and functional characteristics of the tissue, with atrophy of all compartments. This, together with alterations in dermal extracellular matrix (ECM) proteins and stratum corneum lipids, results in impaired barrier function, increased fragility, and wrinkle formation. Although intrinsic skin aging affects nonexposed areas and is due mainly to genetic factors and endocrine alterations, extrinsic or pathologic aging results from repeated exposure to UV irradiation (Rittié and Fisher, 2015). The role of low-grade persistent inflammation and oxidative damage is recognized as causative to age-associated skin defects, mainly, but not exclusively, as the

result of UV irradiation (Rinnerthaler et al., 2015; Zhuang and Lyga, 2014).

Endogenous glucocorticoids (GCs) play key roles in skin pathophysiology in humans and mice (Sevilla and Pérez, 2018). Abnormally high levels of GCs, as in patients with Cushing syndrome or in those treated with pharmacologic doses of GC analogs, affect the skin in ways that strikingly parallel what is observed in aging (Ferrà and Korbonits, 2015). Skin anomalies associated with prolonged elevated GC levels also found in the elderly population include epidermal thinning and dermal atrophy with increased fragility, tearing and bruising, impaired wound healing, increased dehydration, and increased infection risk (Pérez, 2011; Schäcke et al., 2002). Indeed, GCs are likely responsible for many of these detrimental effects as they can be elevated systemically in the elderly owing to alterations in circadian rhythm and impaired sensitivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (Yiallouris et al., 2019). Furthermore, even before serum cortisol levels are detected as increased in aging individuals, active GCs are predicted to be elevated in aging skin as a result of increased local production (Tiganescu et al., 2018).

It is well-known that GCs can bind and activate the GC receptor (GR) and the mineralocorticoid receptor (MR). Both proteins belong to the steroid receptor superfamily and act as ligand-activated transcription factors that theoretically recognize the same GC responsive elements on target genes (Gomez-Sanchez and Gomez-Sanchez, 2014; Oakley and Cidlowski, 2013). GR and MR ligand occupancy is controlled at the prereceptor level by 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and 2 (HSD11B1/2), which mediate

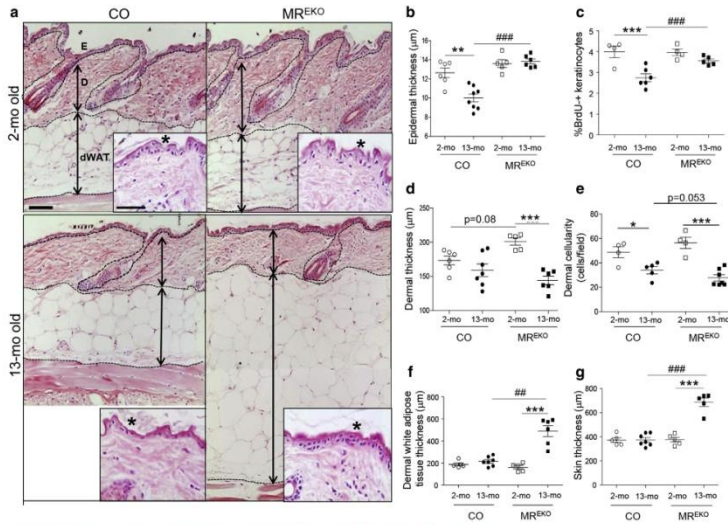
<sup>1</sup>Instituto de Biomedicina de Valencia-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IBV-CSIC), Jaime Roig, Valencia, Spain

<sup>2</sup>These authors equally contributed to this work.

Correspondence: Paloma Pérez, Instituto de Biomedicina de Valencia-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IBV-CSIC), Jaime Roig 11, E-46101 Valencia, Spain. E-mail: pperez@ibv.csic.es

Abbreviations: CO, control; dWAT, dermal white adipose tissue; ECM, extracellular matrix; GC, glucocorticoid; GR, GC receptor; HSD11B1/2, 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and 2; MR, mineralocorticoid receptor; MR<sup>EKO</sup>, MR epidermal knockout; TGF, transforming growth factor

Received 30 October 2019; revised 17 February 2020; accepted 2 March 2020; accepted manuscript published online XXX; corrected proof published online XXX



**Figure 1. Epidermal MR inactivation affects homeostasis of all skin layers in chronologically aged mice.** (a) Images of H&E-stained sections of 2-month and 13-month skin. Dotted lines: separation between epidermis, dermis, and dWAT. Arrows: thickness of skin layers. Asterisks in insets, epidermal thickness. Bar = 50 µm. From left to right, top to bottom: quantifications of (b) epidermal thickness, (c) bromodeoxyuridine-positive keratinocytes, (d) dermal thickness, (e) dermal cellularity, (f) dWAT thickness, and (g) skin thickness in 2-month and 13-month mice. Asterisks: differences between 2-month and 13-month mice of same genotype; pound signs: differences between genotypes of same age; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ;  $n > 4$  per experimental group. CO, control; dWAT, dermal white adipose tissue; H&E, hematoxylin & eosin; MR, mineralocorticoid receptor; MREKO, MR epidermal knockout.

the interconversion between inactive and active GCs, thus modulating hormone availability (Chapman et al., 2013). In addition, HSD11B1 is a transcriptional target of GR, thus forming a positive feedback loop with this transcription factor (Chapman et al., 2013). The final outcome of GC actions thus depends on the formation of different GC-GR and/or GC-MR complexes in a given cell type.

To ameliorate age-related skin defects and improve GC-based treatments, it is crucial to understand the relative roles of GR and MR in skin compartments. Recently, the generation of mice with epidermal-specific loss of MR (MR epidermal knockout [MREKO]) (Boix et al., 2016) revealed that epidermal MR plays nonredundant roles relative to GR in adult skin homeostasis. Eight- to ten-week-old MREKO mice featured a mild phenotype with increased keratinocyte proliferation and differentiation. Importantly, genetic or pharmacologic MR inactivation in mice and humans resulted in resistance to epidermal thinning induced by topical GC treatment (Boix et al., 2016; Maubec et al., 2015). In addition, in pathologic settings, such as acute inflammation or wounding, MREKO mice showed defective responses with augmented keratinocyte proliferation, upregulation of pro-

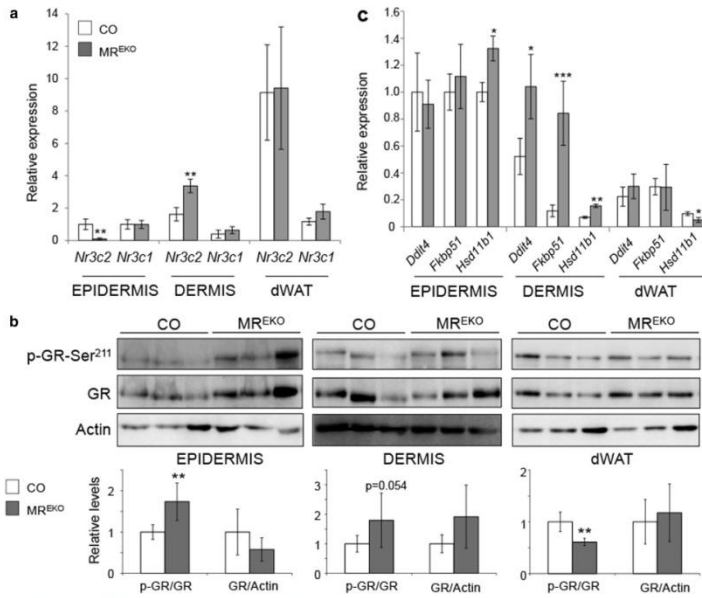
inflammatory cytokines, and increases in nuclear factor kappa B and activator protein-1 activities (Boix et al., 2016). However, the long-term consequences of epidermal MR loss on skin function were not previously investigated.

As epidermal MR is required to mediate responses to GCs (Boix et al., 2018, 2016; Maubec et al., 2015), we assessed its contribution to chronological skin aging in 13-month-old MREKO versus control (CO) mice. Epidermal MR loss impacts all skin compartments, with alterations in epidermal proliferation and differentiation, reductions in dermal collagen density, and pronounced expansion of dWAT. These phenotypic changes in 13-month MREKO mice correlated with compartment-specific alterations in GC signaling. One key finding is that MR absence in keratinocytes increased adipogenesis through paracrine mediators likely generated by  $\beta$ -catenin activation.

## RESULTS

### Epidermal MR inactivation affects homeostasis of all skin layers in chronologically aged mice

Owing to the reported role of endogenous GCs in chronologically aged skin and that epidermal MR contributes to GC



**Figure 2. Middle-aged MR<sup>EKO</sup> skin features compartment-specific alterations in GC signaling.** (a) RT-qPCR to determine expression of *Nr3c2* (MR) and *Nr3c1* (GR) in epidermis, dermis, and dWAT from 13-month dorsal skin. Values shown are relative to CO epidermis. (b) Top: Immunoblotting for phospho-p-GR-Ser<sup>211</sup>, GR, and actin with lysates from epidermis, dermis, and dWAT. Bottom: Quantification of band intensities. Values shown are relative to CO. (c) RT-qPCR of GC-target genes in CO and MR<sup>EKO</sup> skin compartments. Values shown are relative to those in CO epidermis. In all panels, asterisks show statistically significant differences between genotypes, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; (a) epidermis, dermis,  $n > 3$ ; dWAT,  $n = 6$ ; (b), (c)  $n = 5-7$  per experimental group. CO, control; dWAT, dermal white adipose tissue; GC, glucocorticoid; GR, glucocorticoid receptor; MR, mineralocorticoid receptor; MR<sup>EKO</sup>, MR epidermal knockout; RT-qPCR, quantitative reverse transcriptase-PCR.

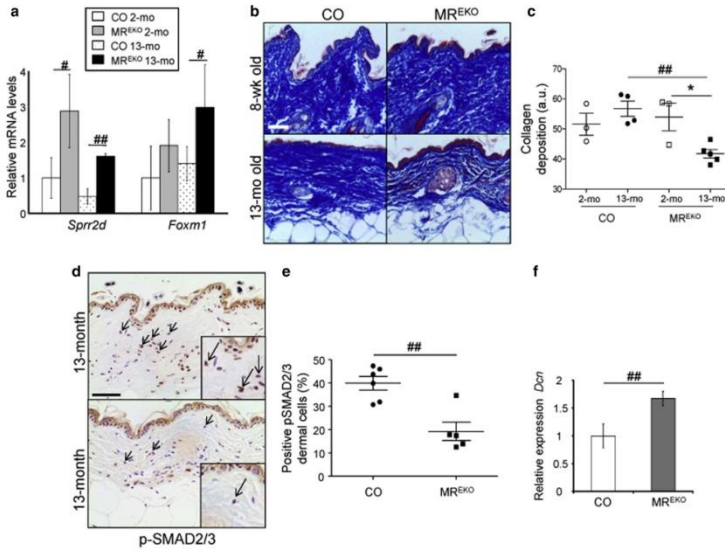
action in adult skin homeostasis, we assessed the consequences of epidermal MR loss in skin aging. Aging is affected by mouse strain and gender; and the lifespan of B6D2, the genetic background of our mouse models, is approximately two years (Wang et al., 2013b). In this study, we compared 2-month versus 13-month-old CO and MR<sup>EKO</sup> female mice. Unless otherwise indicated, we would refer to 13-month mice as middle-aged. Hematoxylin and eosin-stained skin sections from both genotypes were assessed by histopathologic and morphometric analyses (Figure 1).

In CO, chronological aging resulted in a 24% decrease in epidermal thickness, along with a 30% reduction in bromodeoxyuridine-positive proliferating basal keratinocytes (Figure 1a–c). The reduction in epidermal width was already significant at 11-month (Supplementary Figure S1). Neither the thickness of the dermis nor the dWAT was significantly altered in middle-aged versus young CO mice. However,

dermal cellularity decreased by 30% in 13-month CO animals (Figure 1d–f).

In contrast to CO, middle-aged MR<sup>EKO</sup> showed no decrease in epidermal thickness or in keratinocyte proliferation relative to young mice (Figure 1a–c) (Supplementary Figure S1). Moreover, dermal thickness and cellularity were reduced by approximately 30% and 50%, respectively, in 13-month versus 2-month MR<sup>EKO</sup> (Figure 1d and e). Importantly, dWAT thickness was increased by 2.5-fold in middle-aged versus young MR<sup>EKO</sup> (Figure 1a and f). This, together with lack of epidermal thinning, resulted in an overall 40% increase in skin thickness during aging (Figure 1g). These findings indicate that epidermal MR loss impacts natural aging, with differential effects in each skin compartment. Although epidermal MR inactivation seemed to be protective in the epidermis, the dermis featured signs of accentuated aging.





**Figure 3. Natural aging elicits seemingly dual effects in MR<sup>EKO</sup> skin.** (a) RT-qPCR of *Spr2d* and *Foxm1* in skin. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ,  $n = 3$ –5 per experimental group. In all panels, statistically significant differences between 2- and 13-month-old mice of the same genotype are shown by asterisks and those between genotypes of the same age by pound signs. (b) Images of Masson's trichrome-stained skin sections. Blue: collagen; Red: cytoplasm, muscle, erythrocytes; Black: nuclei. (c) Quantification of dermal collagen deposition. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ,  $n > 3$  per experimental group. (d) Phosphorylated-SMAD2 and 3 immunostaining in 13-month skin. Arrows: positive nuclei. Bar = 50  $\mu$ m. (e) Percentage phosphorylated-SMAD2- and 3-positive dermal cells relative to total hematoxylin-stained nuclei. \*\* $P < 0.01$ ,  $n > 5$  per experimental group. (f) RT-qPCR of *Dcn* in dermis of 13-month mice. \*\* $P < 0.01$ ,  $n > 3$  per experimental group. CO, control; dWAT, dermal white adipose tissue; MR, mineralocorticoid receptor; MR<sup>EKO</sup>, MR epidermal knockout; RT-qPCR, quantitative reverse transcriptase-PCR.

#### Middle-aged MR epidermal knockout skin features compartment-specific alterations in GCs signaling

We hypothesized that the phenotype in middle-aged MR<sup>EKO</sup> skin results from alterations in the MR-GR balance or in local GC synthesis and/or availability leading to compartment-specific perturbations in this signaling pathway. To assess this, we separated the epidermis, dermis, and dWAT of 13-month CO and MR<sup>EKO</sup> mice, with the purity of separated compartments validated with RT-qPCR for *Krt1*, *Vim*, and *Fabp4*, respectively (Supplementary Figure S2).

We first assessed the status of MR/*Nr3c2* mRNA levels in the skin compartments of CO mice during aging and found no differences (Supplementary Figure S3). As expected, MR/*Nr3c2* expression was nearly absent in MR<sup>EKO</sup> epidermis (Figure 2a). Although epidermal GR/*Nr3c1* was unchanged, there was a 1.7-fold increase in GR activity as determined by phospho(p)-GR-Ser<sup>211</sup> to total GR ratio (Figure 2a and b). This finding correlated with upregulation of *Hsd11b1*, a

downstream target of GR; however, the expression of the stress-inducible mTOR inhibitor, *Redd1/Ddit4*, and the chaperone FK506-binding protein 51 (*Fkbp51*)—two classic GC-target genes—was unchanged in MR<sup>EKO</sup> relative to CO epidermis (Figure 2c).

In MR<sup>EKO</sup> dermis, *Nr3c2* levels increased by two-fold, and there was a trend toward increased GR activity (Figure 2a and b; two-fold,  $P = 0.054$ ). These changes were concomitant with the upregulation of *Ddit4*, *Fkbp51*, and *Hsd11b1* in this compartment (2-fold, 7-fold, and 2.8-fold, respectively; Figure 2c), suggesting cooperative transcriptional effects of GR and MR (Bigas et al., 2018; Boix et al., 2016). The increased levels of *Ddit4* and *Fkbp51* are consistent with their reported role as skin atrophogens, as the MR<sup>EKO</sup> dermis showed atrophy (Baida et al., 2018, 2015) (Figure 1a and d).

*Nr3c1* and *Nr3c2* expression in dWAT of 13-month MR<sup>EKO</sup> was unchanged relative to CO, although GR activity was reduced (Figure 2a and b). In MR<sup>EKO</sup> dWAT, *Hsd11b1*

expression was decreased and that of *Ddit4* and *Fkbp51* was unchanged (Figure 2c).

HSD11B1 expression and activity is increased in aged human and mouse skin and accounts for local increases in GC levels (Tiganescu et al., 2013). We thus assessed possible changes in the skin-specific production of the endogenous GC, corticosterone, by ELISA. Although skin corticosterone was significantly upregulated with age in both genotypes (2-fold and 1.7-fold, respectively; Supplementary Figure S4), no differences were detected between 13-month MR<sup>EKO</sup> and CO.

#### Natural aging elicits seemingly dual effects in MR epidermal knockout skin

As skin barrier function is compromised in aged individuals as a result of impaired differentiation and low-grade persistent inflammation (McCullough and Kelly, 2006), we assessed the expression of several markers for these processes. The epidermal marker of differentiation, *Spr2d*, was upregulated in MR<sup>EKO</sup> relative to CO at 2- and 13-month (three-fold; Figure 3a). *Foxm1* that encodes a transcription factor with key roles in maintaining the balance between proliferation and differentiation was also upregulated in middle-aged MR<sup>EKO</sup> versus CO skin (two-fold; Figure 3a). It has been reported that *Foxm1* contributes to the high proliferative potential of keratinocytes and that its decrease in aging can induce keratinocyte apoptosis and senescence (Smirnov et al., 2016).

We assessed levels of the phospho-histone H2A variant  $\gamma$ -H2AX as a surrogate marker of DNA double-strand breaks implicated in age-related diseases (Mah et al., 2010). However, immunostaining did not reveal changes in p- $\gamma$ -H2AX in 13-month MR<sup>EKO</sup> relative to CO skin (Supplementary Figure S5a). In addition, the secretion of pro-inflammatory mediators during aging contributes to chronic inflammation and altered tissue homeostasis (Velarde and Demaria, 2016). We detected minor increases of the pro-inflammatory cytokines *Il1b*, *Tnfa*, and *S100a8* in middle-aged MR<sup>EKO</sup> versus CO skin (1.7-fold, 1.7-fold, and 1.2-fold, respectively; Supplementary Figure S5b), which resulted in significant increases only for IL1- $\beta$  at the protein level (Supplementary Figure S5c and d). Also, the expression and localization pattern or numbers of T cells, mast cells, or macrophages were similar in MR<sup>EKO</sup> versus CO skin (Supplementary Figure S6), suggesting that changes in inflammation are not the primary cause of the MR<sup>EKO</sup> skin phenotype at middle age.

Because alterations in type I collagen, the most abundant structural protein in skin, constitute a hallmark of skin aging (Rittie and Fisher, 2015), we quantitated collagen deposition in Masson trichrome-stained sections. In line with the decreased dermal thickness and cellularity, the relative collagen deposition decreased by 24% in middle-aged versus young MR<sup>EKO</sup> (Figure 3b and c). The relative collagen deposition was also 27% decreased in 13-month MR<sup>EKO</sup> versus CO (Figure 3b and c).

Skin collagen homeostasis is tightly controlled as abnormal ECM accumulation causes fibrosis and, conversely, reduced collagen levels also have negative impacts on this tissue causing fragility (Quan et al., 2010). Transforming growth

factor (TGF)- $\beta$  controls collagen synthesis and degradation by modulating several signaling pathways, including the transcription factors SMAD2 and 3, which target many ECM genes (Finsson et al., 2013). The proteoglycan *Dcn* inhibits TGF- $\beta$  activity by competing with binding of this ligand to its receptors TGF- $\beta$ RI/II (Zhang et al., 2018).

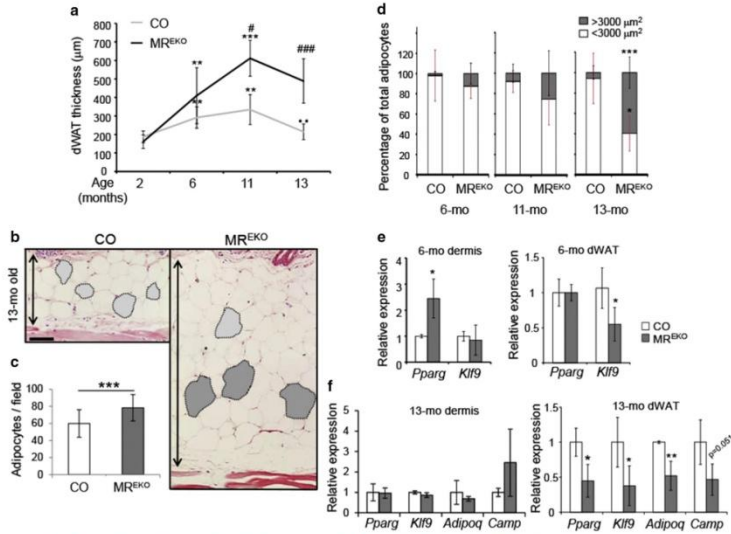
Phosphorylated (p)-SMAD2/3 was two-fold reduced in aged MR<sup>EKO</sup> versus CO dermis, as shown by quantitation of immunostaining (Figure 3d and e). Conversely, *Dcn* was upregulated in 13-month MR<sup>EKO</sup> versus CO dermis (1.7-fold; Figure 3f), consistent with the reduced collagen deposition and suggestive of accentuated aging in this compartment. However, the expression of other dermal ECM regulators, such as *P3h2*, *Lox1*, *Mmp3*, and *Timp3*, was unchanged in middle-aged MR<sup>EKO</sup> versus CO mice (Supplementary Figure S7).

#### The dermal white adipose tissue of middle-aged mineralocorticoid receptor epidermal knockout skin mice features adipocyte hypertrophy and impaired expression of adipogenic regulators

Recent work highlighted the importance of adipocytes in maintaining skin homeostasis, contributing to the regulation of hair cycle, wound healing, and immune function (Chen et al., 2019; Rivera-Gonzalez et al., 2014). We assessed the age-related oscillations of dWAT in 2-, 6-, 11-, and 13-month-old mice (Foster et al., 2018; Kruglikov and Scherer, 2016; Wang et al., 2013a). Consistent with previous reports in B6D2 females (Wang et al., 2013b), CO dWAT thickness increased at 6- and 11-months relative to 2-month and was significantly reduced at 13-month relative to 11-month (Figure 4a). In MR<sup>EKO</sup>, dWAT also increased at 6- and 11-month relative to young mice, although to a higher extent than in CO, and showed similar thinning as CO at 13-month relative to 11-month (Figure 4a). We quantitated the average number of adipocytes per section and detected small but consistent increases in adipose hyperplasia in MR<sup>EKO</sup> relative to CO (Figure 4b and c).

One major finding was the pronounced cell hypertrophy in 13-month MR<sup>EKO</sup>, with significant differences in the distribution of adipocyte size between genotypes (Figure 4b and d). The size of more than 95% of CO adipocytes was <3,000  $\mu$ m<sup>2</sup> in contrast to only 45% adipocytes in MR<sup>EKO</sup> (Figure 4d). Importantly, 55% of adipocytes in middle-aged MR<sup>EKO</sup> were larger than 3,000  $\mu$ m<sup>2</sup> (Figure 4d). Despite the involvement of the crucial regulator of metabolism, mTOR, in controlling adipocyte cell size (Lee et al., 2017), we did not detect differences in the levels of phospho-mTOR among genotypes (data not shown). The fact that there was a trend toward increased cell size in 6-month and 11-month MR<sup>EKO</sup> mice relative to age-matched controls suggested that in MR<sup>EKO</sup> mice, the increased adipogenesis took place at earlier time-points (Figure 4d).

Preadipocytes reside in the lower dermis where they can be stimulated to differentiate into adipocytes, a process in which KLF9 and PPAR $\gamma$ , two GR primary targets, play crucial roles (Lee et al., 2018, 2014; Lili et al., 2019). To determine whether these genes were involved in the adipocyte hypertrophy and/or hyperplasia observed in MR<sup>EKO</sup>, we assessed their expression in 6-month and 13-month dermis and dWAT.



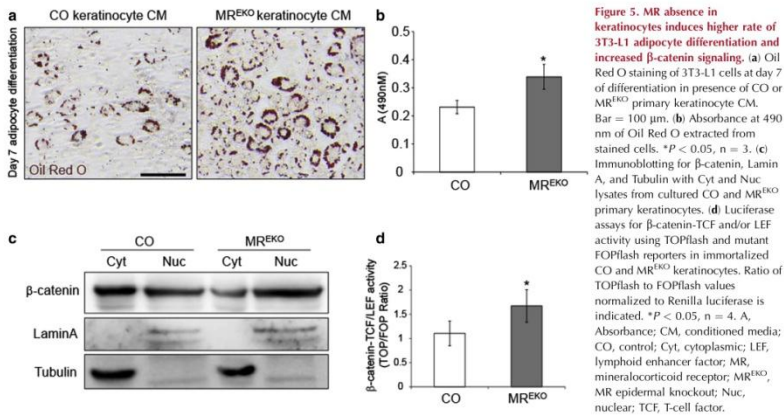
**Figure 4. Adipocyte hyperplasia and hypertrophy and altered expression of adipogenic regulators in MR<sup>EKO</sup> dermis and dWAT.** (a) dWAT thickness at indicated ages. Asterisks: differences relative to two-month within the same genotype; pound signs: differences between genotypes of the same age; dots: differences between 11- and 13-month in CO. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ;  $n > 4$  per group. (b) H&E-stained 13-month dorsal skin showing dWAT (arrows). Adipocytes (dotted lines). Bar = 50  $\mu\text{m}$ . (c) Average number adipocytes per 10 times field of H&E-stained sections from 13-month-old skin. \*\*\* $P < 0.001$ ;  $n = 5$  per group. (d) Percentage adipocytes greater or less than 3,000  $\mu\text{m}^2$ . \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ ;  $n = 5$  per group. (e, f) RT-qPCR of genes associated with adipogenesis in dWAT and dermis at (e) 6-month and (f) 13-month. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ;  $n > 3$  per group. CO, control; dWAT, dermal white adipose tissue; H&E, hematoxylin & eosin; MR, mineralocorticoid receptor; MR<sup>EKO</sup>, MR epidermal knockout; RT-qPCR, quantitative reverse transcriptase-PCR.

Indeed, *Pparg* expression was 2.5-fold increased in 6-month MR<sup>EKO</sup> dermis, whereas that of *Klf9* was unchanged (Figure 4e). However, in 6-month MR<sup>EKO</sup> dWAT, *Pparg* expression was unchanged, whereas *Klf9* showed decreased expression (Figure 4e).

In dermis of 13-month old mice, there were no significant differences in the expression of these genes or in the *Adipoq* with anti-inflammatory activity or the antimicrobial peptide *Camp* (Figure 4f). Overall, these data suggest that the adipose hyperplasia and hypertrophy occur in younger MR<sup>EKO</sup> mice at least in part through increased *Pparg* expression. In 13-month MR<sup>EKO</sup> dWAT, *Pparg* and *Klf9* showed decreased expression (Figure 4f), consistent with the decrease in GR activity observed in this compartment (Figure 2b). *Adipoq* was also reduced in middle-aged MR<sup>EKO</sup> versus CO dWAT (0.5-fold; Figure 4f). The upregulation of *Camp* has been recently shown as a protective mechanism of dWAT against infection known as reactive adipogenesis (Zhang et al., 2019); however, in 13-month MR<sup>EKO</sup> dWAT, *Camp* showed a tendency toward decreased expression relative to CO (0.46-fold,  $P = 0.051$ ; Figure 4f).

#### Epidermal mineralocorticoid receptor loss results in altered adipogenesis in vitro

The fact that epidermal MR loss has consequences in the dWAT is consistent with previous reports sustaining that the epidermis can regulate adipogenesis through paracrine mechanisms (Donati et al., 2014; Zwick et al., 2018). We used 3T3-L1 cells as an in vitro model to assess the conversion of fibroblasts into adipocytes in the presence of dexamethasone, insulin, and methylisobutylxanthine—the so called differentiation cocktail (Zebisch et al., 2012). Remarkably, the transcriptomic profile of 3T3-L1 cells fully differentiated into adipocytes was similar to that of adult anagen fibroblasts, in particular, a gene set enriched for steroids metabolic processes and fat cell differentiation (Donati et al., 2014). To assess whether epidermal MR loss resulted in the secretion of adipogenic regulators by keratinocytes, we incubated 3T3-L1 cells with the differentiation cocktail, together with conditioned medium collected from CO or MR<sup>EKO</sup> cultured primary keratinocytes. After seven days of culture, lipid production was assessed by Oil Red O staining and quantitated by absorbance A490 nm (Figure 5) and



presence of conditioned medium from MR<sup>EKO</sup> keratinocytes increased adipocyte differentiation with a 1.4-fold increase in A490 nm (Figure 5a and b).

As one of the reported paracrine mechanisms inducing adipogenesis is the activation of epidermal  $\beta$ -catenin (Donati et al., 2014), we assessed the localization and activity of this transcription factor. Immunoblotting of keratinocyte extracts revealed a slight decrease in cytoplasmic along with an increase in nuclear  $\beta$ -catenin in MR<sup>EKO</sup> versus CO (Figure 5c). Nuclear  $\beta$ -catenin binds to T-cell factor and/or lymphoid enhancer factor family transcription factors, regulating expression of target genes. T-cell factor and/or lymphoid enhancer factor, luciferase reporter assays, revealed 1.5-fold increase in transcriptional activity in MR<sup>EKO</sup> versus CO cells (Figure 5d). These findings reveal that the absence of MR in keratinocytes can directly affect adipogenesis through paracrine mechanisms at least partially through activation of  $\beta$ -catenin signaling.

## DISCUSSION

The increasing elderly population and the negative effects of aging on QOL emphasize the clinical relevance of the identification of mechanisms by which high endogenous GC levels cause age-related skin defects. When GC levels are elevated (systemically and/or locally), it is expected that both GR and MR are activated. Multiple parameters, including the levels of circulating and local GCs, the balance between HSD11B1:HSD11B2 activities, and the relative GRtoMR ratio, can modulate the final outcome of GC signaling (Sevilla and Pérez, 2018). In a mouse model of metabolic syndrome, MR expression was elevated after UV-induced aging and MR blockade rescued the feature of skin aging (Nagase et al., 2013). However, to our knowledge, no previous

investigation has addressed the specific contribution of MR to skin alterations in naturally aged skin.

The initial hypothesis that MR may be responsible for some of the undesired side effects of excess GCs, including epidermal atrophy (Boix et al., 2018, 2016; Maubec et al., 2015), has also been proven true in this study with chronologically aged mice.

The decreased dermal cellularity of MR<sup>EKO</sup> relative to CO mice, along with decreased collagen deposition during the aging process, was consistent with features of accentuated aging (Figures 1 and 3). Excessive ECM accumulation can cause fibrosis, whereas defective ECM has a negative impact on the skin connective function, leading to fragility (Rittié and Fisher, 2015). Dcn and TGF- $\beta$  are considered as anti and profibrotic, respectively, and their regulation is required for proper dermal structure and function. Increased GC signaling correlated with upregulation of Dcn in the dermis of MR<sup>EKO</sup> mice (Figure 3), consistent with the induction of Dcn mRNA levels in GC-treated human dermal fibroblasts (Tiganescu et al., 2013). The upregulation of Fkbp51 and Ddit4 in the context of the dermal atrophy in middle-aged MR<sup>EKO</sup> mice is in line with the phenotype of Fkbp5<sup>-/-</sup> and Ddit4<sup>-/-</sup> mice, which are protected against the hypoplastic effects of GCs (Baida et al., 2018, 2015).

One major finding in our study is the unique impact of epidermal MR loss on the dermal adipose depot in middle-aged MR<sup>EKO</sup> mice as no changes in other depots, such as abdominal adipose tissue or in the overall weight of animals, were found relative to CO mice (Supplementary Figure S8). GCs are key modulators of adipogenesis, having much greater impact on the central (visceral and omental) relative to the peripheral (subcutaneous and dWAT) adipose depots. Although increased GC levels, systemic (patients with

Cushing syndrome) or local (owing to augmented HSD11B1 activity in the adipose tissue), result in the expansion of visceral fat depots, elevated GCs also correlate with depletion of subcutaneous depots (Ferràu and Korbonits, 2015). However, the mechanisms underlying the specific actions of GCs in different adipose depots need to be further characterized. Previous reports have discussed the contribution of GR, MR, or both, to cortisol-induced adipogenesis (Caprio et al., 2007; Lee and Fried, 2014). Our findings suggest a central role for epidermal MR in the regulation of dWAT, although these effects are mediated at least in part through changes in GR transcriptional targets, such as *Pparg* (Figures 2 and 4).

Myofibroblasts are able to generate new adipocytes under specific conditions, such as wounding (Plikus et al., 2017). Conversely, using lineage tracing and ex vivo differentiation assays in mouse skin, it was reported that dermal adipocytes may transdifferentiate to myofibroblasts in response to profibrotic agents, such as TGF- $\beta$ . Importantly, it has been suggested that this adipocyte-to-myofibroblast transition could have a role in skin aging (Chen et al., 2019; Zhang et al., 2019). In this regard, the decreased TGF- $\beta$  and/or SMAD2 and 3 activity in the dermis of aged MR<sup>EKO</sup> versus CO mice, together with the enlargement of the dWAT, is suggestive of overall improved skin aging.

Tissue-specific inhibition of HSD11B1 was proposed as a strategy to reduce GC signaling and was tested by genetic and pharmacologic approaches with promising results (Matsumoto et al., 2018; Morgan et al., 2014; Tiganescu et al., 2018, 2013). *Hsd11b1*<sup>-/-</sup> mice were partially protected against age-induced skin damage, showing increased collagen density and improved wound healing relative to CO (Tiganescu et al., 2013).

*Hsd11b1* was upregulated in the epidermis and dermis and downregulated in the dWAT of middle-aged MR<sup>EKO</sup> mice (Figure 2). These changes were consistent with the increased or decreased GR activity in these skin compartments, respectively. However, the MR<sup>EKO</sup> dWAT phenotype is seemingly contradictory with the finding of reduced subcutaneous adipocyte hypertrophy in *Hsd11b1*<sup>-/-</sup> mice, which may be as a result of differences in the regulation of these adipose depots (Morgan et al., 2014). In contrast, the upregulation of *Hsd11b1* in the MR<sup>EKO</sup> epidermis and dermis also likely exerts an effect on the underlying dWAT.

Our results indicate that although epidermal MR loss contributes to minor increases of pro-inflammatory cytokines in naturally aged skin, they are not sufficient to trigger chronic inflammation or senescence (Supplementary Figures S5 and S6). However, owing to the impact of epidermal MR loss in the homeostasis of other skin compartments, caution is required in the long-term use of MR antagonists for treating inflammatory skin diseases (Boix et al., 2018; Jaisser and Farman, 2016; Sevilla and Pérez, 2018).

The dWAT has been shown to affect the epidermal compartment by regulating the hair cycle (Zwick et al., 2018). However, we did not observe any changes in the thickness of dWAT or in hair follicles of CO and MR<sup>EKO</sup> mice at different timepoints during the first synchronized hair cycles (data not shown). We did not observe obvious alterations

in hair follicles in middle-aged MR<sup>EKO</sup> versus CO mice. Conversely, the impact of epidermal-specific MR loss of function on the dWAT supports a role of the epidermis in regulating adipogenesis through paracrine mediators generated by  $\beta$ -catenin activation (Donati et al., 2014; Zwick et al., 2018).

Collectively, these findings highlight the importance of epidermal MR in regulating cross-talk among skin compartments in naturally aged skin through GC and  $\beta$ -catenin signaling pathways.

## MATERIALS AND METHODS

### Animal experimentation

Procedures with animals were performed following current Spanish and European regulations and were approved by our institution's ethics committee (approval ID for project: SAF2014-59474-R). Mice were kept in groups of 3 to 6 in conventional cages under standard conditions: access to food and water as much as necessary, controlled temperature (20–22 °C), humidity (50–60%), and a 12-hour light-dark cycle. Unless otherwise indicated, 2-month-old female mice in the telogen phase of the hair cycle and 13-month-old mice were used for experiments and killed in the morning.

### Separation of skin compartments

Dorsal skin was excised, and dWAT was collected by scraping the underside of the skin with a scalpel. Once removed, the skin was floated dermal side down on 3.8% ammonium thiocyanate in Dulbecco's phosphate-buffered saline for 10 minutes at room temperature. The epidermis was then separated from the dermis by scraping, and both layers were washed extensively in Dulbecco's phosphate-buffered saline, minced, and snap frozen in liquid nitrogen.

### Statistical analysis

Experimental data were analyzed using Microsoft Excel and IBM SPSS Statistics 25 software. In all graphs, mean values  $\pm$ SD are shown. When statistical analysis was performed with relative values, data were first subjected to logarithmic transformation. Before parametric testing, the Levene's test was used to determine whether samples within groups had equal variance. For comparisons between two experimental groups, the Student's unpaired two-tailed *t*-test was used. For comparisons among more than two experimental groups, one-way ANOVA was used, which if statistically significant was followed by a post hoc Tukey multiple comparison test. *P* values less than 0.05 were considered statistically significant.

Mouse generation, breeding, and genotyping; Phenotypic, histochemical, and morphometric analyses; Immunoblotting, RNA isolation, and RT-qPCR; culture of primary and immortalized mouse keratinocytes; and 3T3-L1 adipocyte differentiation assays and luciferase assays are described in Supplementary Materials and Methods.

### Data availability statement

No data sets were generated or analyzed during this study.

### ORCID

Judit Bigas: <http://orcid.org/0000-0001-9734-2864>  
 Lisa M. Sevilla: <http://orcid.org/0000-0002-7134-0411>  
 Paloma Pérez: <http://orcid.org/0000-0002-7166-2824>

### CONFLICT OF INTEREST

The authors state no conflict of interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by grant SAF2017-880464-R (Ministerio de Economía y Competitividad [MINECO], Spanish Government). JB is a recipient of Formación Personal Investigador fellowship from MINECO (BES2015-072722). The authors thank MINECO Nuclear Receptors in Cancer, Metabolism, and Inflammation for Networks of Excellence grant (SAF2017-90604-REDT).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization: PP, Data Curation: JB, LMS, PP; Formal Analysis: JB, LMS, PP; Funding Acquisition: JB; Investigation: JB, LMS; Methodology: JB, LMS, PP; Project Administration: PP; Resources: PP; Supervision: PP; Validation: JB, LMS, PP; Visualization: JB, LMS, PP; Writing - Original Draft Preparation: PP; Writing - Review and Editing: JB, LMS, PP

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is linked to the online version of the paper at [www.jidonline.org](http://www.jidonline.org), and at <https://doi.org/10.1016/j.jid.2020.03.933>

## REFERENCES

- Batida G, Bhalha P, Kirsanov K, Lesovaya E, Yakubovskaya M, Yuen K, et al. REDD1 functions as the crossroads between the therapeutic and adverse effects of topical glucocorticoids. *EMBO Mol Med* 2015;7:42–58.
- Batida G, Bhalha P, Yemelyanov A, Stechschulte LA, Shou W, Readhead B, et al. Deletion of the glucocorticoid receptor chaperone FKBP51 prevents glucocorticoid-induced skin atrophy. *Oncotarget* 2018;9:34772–83.
- Bigas J, Sevilla LM, Carceller E, Boix J, Pérez P. Epidermal glucocorticoid and mineralocorticoid receptors act cooperatively to regulate epidermal development and counteract skin inflammation. *Cell Death Dis* 2018;9:588.
- Boix J, Nguyen VT, Farman N, Aractingi S, Pérez P. Mineralocorticoid receptor blockade improves glucocorticoid-induced skin atrophy but partially ameliorates anti-inflammatory actions in an irritative model in human skin explants. *Exp Dermatol* 2018;27:185–7.
- 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;136:2417–26.
- Caprio M, Fève B, Claës A, Viengchareun S, Lombès M, Zennaro MC. Pivotal role of the mineralocorticoid receptor in corticosteroid-induced adipogenesis. *FASEB J* 2007;21:2185–94.
- Chapman K, Holmes M, Seckl J. 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenases: intracellular Gate-Keepers of Tissue Glucocorticoid Action. *Physiol Rev* 2013;93:1139–206.
- Chen SX, Zhang JJ, Gallo RL. Dermal white adipose tissue: a newly recognized layer of skin innate defense. *J Invest Dermatol* 2019;139:1002–9.
- Donati G, Proserpio V, Lichtenberger BM, Natsuga K, Sinclair R, Fujiwara H, et al. Epidermal Wnt/ $\beta$ -catenin signaling regulates adipocyte differentiation via secretion of adipogenic factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111:E1501–9.
- Ferraù F, Korbonits M. Metabolic comorbidities in Cushing's syndrome. *Eur J Endocrinol* 2015;173:M133–57.
- Finson KW, Arany PR, Philip A. Transforming growth factor beta signaling in cutaneous wound healing: lessons learned from animal studies. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2013;2:225–37.
- Foster AR, Nicu C, Schneider MR, Hinde E, Paus R. Dermal white adipose tissue undergoes major morphological changes during the spontaneous and induced murine hair follicle cycling: a reappraisal. *Arch Dermatol Res* 2018;310:453–62.
- Gomez-Sanchez E, Gomez-Sanchez CE. The multifaceted mineralocorticoid receptor. *Compr Physiol* 2014;4:965–94.
- Jaisser F, Farman N. Emerging roles of the mineralocorticoid receptor in pathology: toward new paradigms in clinical pharmacology. *Pharmacol Rev* 2016;68:49–75.
- Kruglikov IL, Scherer PE. Skin aging: are adipocytes the next target? *Aging (Albany NY)* 2016;8:1457–69.
- Lee MJ, Fried SK. The glucocorticoid receptor, not the mineralocorticoid receptor, plays the dominant role in adipogenesis and adipokine production in human adipocytes. *Int J Obes* 2014;38:228–33.
- Lee MJ, Pramyothin P, Karastergiou K, Fried SK. Deconstructing the roles of glucocorticoids in adipose tissue biology and the development of central obesity. *Biochim Biophys Acta* 2014;1842:473–81.
- Lee RA, Harris CA, Wang JC. Glucocorticoid receptor and adipocyte biology. *Nucl Receptor Res* 2018;5:101373.
- Lili LN, Klopot A, Readhead B, Batida G, Dudley JT, Budunova I. Transcriptional network interactions in human skin treated with topical glucocorticoid clobetasol propionate. *J Invest Dermatol* 2019;139:281–91.
- Mah LJ, El-Osta A, Karagiannis TC. GammaH2AX as a molecular marker of aging and disease. *Epigenetics* 2010;5:129–36.
- Matsumoto A, Murota H, Terao M, Katayama I. Attenuated activation of homeostatic glucocorticoid in keratinocytes induces alopecia via aberrant artemin production. *J Invest Dermatol* 2018;138:1491–500.
- Maubec E, Laouénan C, Deschamps L, Nguyen VT, Scheer-Senayrich 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.
- McCullough JL, Kelly KM. Prevention and treatment of skin aging. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1067:323–31.
- Morgan SA, McCabe EL, Gathercole LL, Hassan-Smith ZK, Larner DP, Bujalska IJ, et al. 11 $\beta$ -HSD1 is the major regulator of the tissue-specific effects of circulating glucocorticoid excess. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111:E2482–91.
- Nagase T, Akase T, Sanada H, Minematsu T, Ikuji 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.
- Pérez P. Glucocorticoid receptors, epidermal homeostasis and hair follicle differentiation. *Dermatolendocrinol* 2011;3:166–74.
- Lee PL, Jung SM, Guertin DA. The complex roles of mTOR in adipocytes and beyond. *Trends Endocrinol Metab* 2017;28:319–39.
- Plikus MV, Guerrero-Juarez CF, Ito M, Li YR, Dedia PH, Zheng Y, et al. Regeneration of fat cells from myofibroblasts during wound healing. *Science* 2017;355:748–52.
- Quan T, Shao Y, He T, Voorhees JJ, Fisher GJ. Reduced expression of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2), increases collagen loss in chronologically aged human skin. *J Invest Dermatol* 2010;23:1–7.
- Rinnerthaler M, Bischof J, Streubel MK, Trost A, Richter K. Oxidative stress in aging human skin. *Biomolecules* 2015;5:545–89.
- Rittlé L, Fisher GJ. Natural and Sun-induced aging of human skin. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015;5:a015370.
- Rivera-Gonzalez G, Shook B, Horsley V. Adipocytes in skin health and disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014;4:1–18.
- Rognoni E, Watt FM. Skin cell heterogeneity in development, wound healing, and cancer. *Trends Cell Biol* 2018;28:709–22.
- Schäcke H, Döcke WD, Asadullah K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther* 2002;96:23–43.
- Sevilla LM, Pérez P. Roles of the glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in skin pathophysiology. *Int J Mol Sci* 2018;19:1906.
- Smirnov A, Panatta E, Lena A, Castiglia D, Daniele N, Meliro G, et al. FOXM1 regulates proliferation, senescence and oxidative stress in keratinocytes and cancer cells. *Aging (Albany NY)* 2016;8:1384–97.
- Tiganescu A, Hupé M, Uchida Y, Mauro T, Elias PM, Holleran WM. Topical 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibition corrects cutaneous features of systemic glucocorticoid excess in female mice. *Endocrinology* 2018;159:547–56.
- Tiganescu A, Tahrani AA, Morgan SA, Otranto M, Desmoulière A, Abrahams L, et al. 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase blockade prevents age-induced skin structure and function defects. *J Clin Invest* 2013;123:3051–60.
- Velarde MC, Demaria M. Targeting senescent cells: possible implications for delaying skin aging: a mini-review. *Gerontology* 2016;62:513–8.
- Wang QA, Tao C, Gupta RK, Scherer PE. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. *Nat Med* 2013a;19:1338–44.

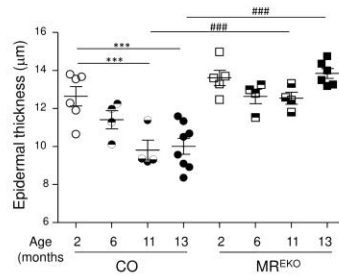
**J Bigas et al.**

## Epidermal Mineralocorticoid Receptor in Aged Skin

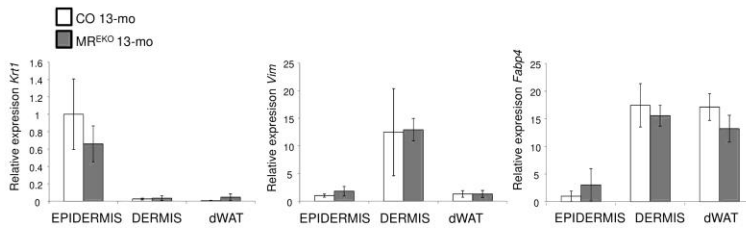
- Wang Y, Marshall KL, Baba Y, Gerling GJ, Lumpkin EA. Hyperelastic material properties of mouse skin under compression. *PLoS One* 2013;8:e67439.
- Yiallouris A, Tsioutis C, Agapidaki E, Zafeiri M, Agouridis AP, Ntourakis D, et al. Adrenal aging and its implications on stress responsiveness in humans. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2019;10:54.
- Zebisch K, Voigt V, Wabitsch M, Brandsch M. Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. *Anal Biochem* 2012;425:88–90.
- Zhang JJ, Chen SX, Guerrero-Juarez CF, Li F, Tong Y, Liang Y, et al. Age-related loss of innate immune antimicrobial function of dermal fat is mediated by transforming growth factor beta. *Immunity* 2019;50:121–136.e5.
- Zhang W, Ge Y, Cheng Q, Zhang Q, Fang L, Zheng J. Decorin is a pivotal effector in the extracellular matrix and tumour microenvironment. *Oncotarget* 2018;9:5480–91.
- Zhuang Y, Lyga J. Inflammaging in skin and other tissues - the roles of complement system and macrophage. *Inflam Allergy Drug Targets* 2014;13:153–61.
- Zwick RK, Guerrero-Juarez CF, Horsley V, Plikus MV. Anatomical, physiological, and functional diversity of adipose tissue. *Cell Metab* 2018;27:68–83.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

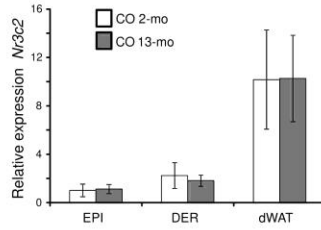


**Fig S1. Quantitation of epidermal thickness in CO and MR<sup>EKO</sup> mice during chronological aging.** Epidermal thickness was quantitated in control (CO) and MR<sup>EKO</sup> mice at the indicated ages. Averages  $\pm$  SD are shown. Statistical significance was determined using ANOVA and the post hoc Tukey test. Asterisks: differences between mice of the same genotype; pound signs: differences between genotypes of the same age; \*\*\*, ###p<0.001; n $\geq$ 4 per experimental group.

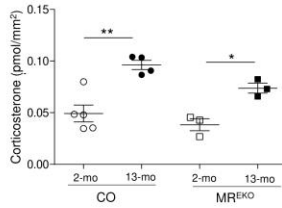


**Fig S2. Quality control for purity of separated epidermis, dermis and dWAT.** RT-QPCR to assess gene expression of markers of epidermis (*Krt1*, left), dermis (*Vim*, middle) and dWAT (*Fabp4*, right) in respective compartments isolated from CO and MR<sup>EKO</sup> mice. Note that while *Fabp4* also is detected in dermis, *Vim* is unique to dermis and not present in dWAT, validating the purity of separation. n $\geq$ 3 per experimental group.

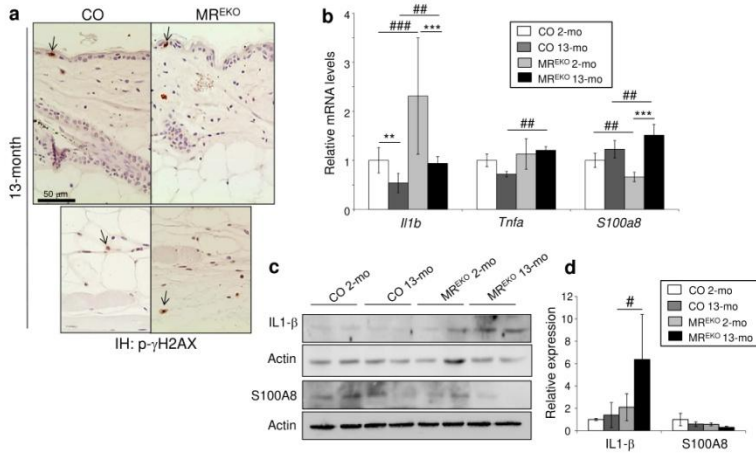




**Fig. S3. Relative expression of *Nr3c2* in the skin compartments of 2-month and 13-month CO mice.** The expression of *Nr3c2* was assessed in epidermis, dermis, and dWAT of 2- and 13-month CO mice. Averages  $\pm$  SD are shown; epidermis, dermis,  $n \geq 3$ ; dWAT  $n=6$ .

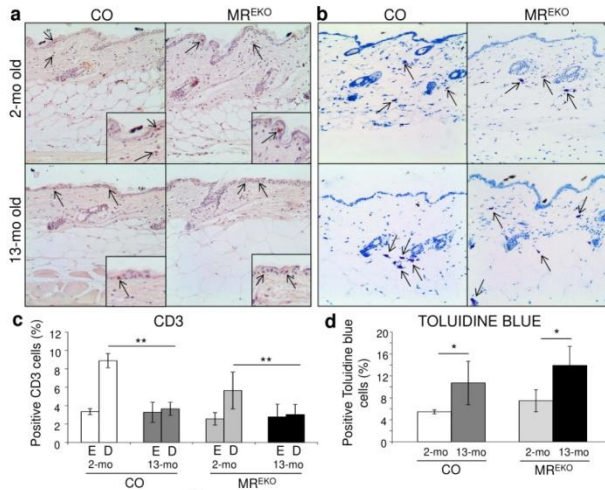


**Fig. S4. Corticosterone levels in skin explants from CO and MR<sup>EKO</sup> mice.** Corticosterone levels in skin explants from CO and MR<sup>EKO</sup> mice. Measure of corticosterone levels (pmol/mm<sup>2</sup>) in skin explants of CO and MR<sup>EKO</sup> 2-month and 13-month old. Averages  $\pm$  standard deviations are shown. Statistical significance was determined using ANOVA and post hoc Tukey test. Asterisks indicate differences between young and aged mice of the same genotype; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ,  $n \geq 3$  per experimental group.



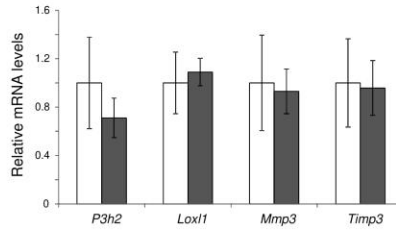
**Fig S5. Assessment of markers of senescence and inflammation in CO and MR<sup>EKO</sup> mice.**

(a) Immunostaining for phosphorylated  $\gamma$ H2AX in 13-month old skin sections. Arrows indicate positive nuclei,  $n \geq 4$  per experimental group. Scale bar 50  $\mu$ m. (b) RT-PCR and (c) immunoblotting to assess expression of genes/proteins associated with inflammation in skin from 2-month and 13-month old CO and MR<sup>EKO</sup> mice. (d) Quantitation of protein levels in c. Averages  $\pm$  SD are shown, and data shown are relative to 2-month old CO mice. Statistical significance was determined using ANOVA and the post hoc Tukey test. Asterisks: differences between 2-month and 13-month mice of the same genotype; pound signs: differences between genotypes of the same age; \*\*,  $p < 0.01$ , \*\*\*,  $p < 0.001$ ; #, #, #  $p < 0.05$ ; n=3-6; per experimental group.

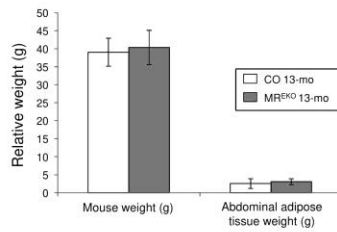


**Fig. S6. Immune infiltrates in CO and MR<sup>EKO</sup> mice.**

Representative images of immunostaining using anti-CD3 antibody (a; T cells) and toluidine blue staining (b; mast cells and macrophages) of skin sections from 2-month and 13-month old CO and MR<sup>EKO</sup> mice. Arrows indicate positive staining. (c) Percentage of CD3 positive cells in epidermis (E) and dermis (D) and (d) percentage mast cells and macrophages (toluidine blue-stained) in whole skin relative to total nuclei. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$ ,  $n \geq 5$  per experimental group.



**Fig. S7. Relative expression of dermal extracellular matrix components in CO and MR<sup>EKO</sup> mice.** The expression of *P3h2*, *Loxl1*, *Mmp3*, and *Timp3* was assessed in dermis of 13-month CO and MR<sup>EKO</sup> mice. Averages  $\pm$  SD are shown, and statistical significance was determined using the Student's t-test,  $n \geq 3$ .



**Fig. S8. Other adipose depots in CO and MR<sup>EKO</sup> mice are unchanged.** The overall weights of 13-mo CO and MR<sup>EKO</sup> mice as well as the abdominal adipose tissue weight were determined, and no significant changes were found among genotypes.  $n=3$  per experimental group.

**Primers used for RT-QPCR**

Gene	Forward	Reverse	Product size (bp)
<i>Adipoq</i>	CACACCAGGCCGTGATGGCA	GAAGCCCCGTGGCCCTTCAG	130
<i>Camp</i>	CAAGGAACAGGGGGTGG	TCTGGCTGAGGTACAAGTTT	228
<i>Dcn</i>	TTCGCATCTCAGACCAAC	ATGAGGAACATTGGCCAGAC	197
<i>Ddit4</i>	GGGCCGGAGGAAGACTCCTCATA	CTGTATGCCAGGCGCAGGAGTTC	218
<i>Fabp4</i>	AATCACCGCAGACGACAGG	AACTCTTGTTGGAAGTCACGC	166
<i>Fkbp51</i>	CTTGACCACGCTATGGTTT	AACGACTCTGAGGCTTTGGA	290
<i>Foxm1</i>	CACCTGGATTGAGGACCACTT	GTCGTTTCTGCTGTGATTCC	245
<i>Hprt1</i>	TCAGTCAACGGGGGACATAAA	GGGGCTGTACTGCTTAACCAG	142
<i>Hsd11b1</i>	GGAGCCGCACTTATCTGAA	GACCTGGCAGTCAATACCA	253
<i>I11b</i>	GCAACTGTTCTGAACTCAACT	ATCTTTTGGGGTCCGCTCAACT	89
<i>Klf9</i>	CAGTGGCTGTGGAAAGTCT	GAGCGCGAGAACTTTTAAGG	120
<i>Krt1</i>	TGGGAGATTTTCAGGAGGAGG	GCCACACTCTGGAGATGCTC	105
<i>Lox1</i>	AAGGCACAGCGGACTTTCTC	GAACTCGTCATGCTGTGGTAA	89
<i>Mmp3</i>	CCAGGTGTTGACTCAAGGGTGGGA	ACACAGGATGCCTTCTTGATCTC	172
<i>Nr3c1</i>	TGCTATGCTTTGCTCCTGATCTG	TGTCAGTTGATAAAAACCGCTGCC	299
<i>Nr3c2</i>	GTGGACAGTCTTTCCTACCG	TGACACCCAGAAAGCCTCATCTC	286
<i>P3h2</i>	TGCTAAAACCGTGACTGCCT	TTACGCCATGAGGGTTCTC	87
<i>Pparg</i>	AAGAAGCGGTGAACCACTGA	GGAATGCGAGTGGTCTTCCA	154
<i>S100a8</i>	GGAGTTCCTTGCATGGTGAT	TCTGCTACTCTTGTGGCTGTCT	68
<i>Spr2d</i>	TGTAICTCAAGGCCGAGA	TTTGTCTGATGACTGCTGAAGAC	336
<i>Timp3</i>	CTTCTGCAACTCCGACATCGT	GGGGCATCTTACTGAAGCCTC	131
<i>Tnfa</i>	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT	GCTACGACGTGGGCTACAG	61
<i>Vim</i>	GAAATTGCAGGAGGATGTC	TCCACTTTCCGTTCAAGTGC	114

**Primers used for genotyping**

MRfloxed and MREKO	MR_F MR_RA MR_RB	CTGGAGATCTGAACTCCAGGCT TAGAAACACTTCGTAAGTAGAGCT CCTAGAGTTCTGAGCTGCTGA	
	<b>Product size WT</b>	<b>Product size MRfloxed</b>	<b>Product size MREKO</b>
	285	335	390

## SUPPLEMENTARY METHODS

### Mouse generation, breeding, and genotyping

Mice with the third exon of *Nr3c2* flanked by loxP sites (MRloxP/loxP) (Berger et al. 2006) were crossed with those expressing Cre under the control of the keratin 5 promoter (K5-Cre) (Ramirez et al. 2004) to generate K5-cre//MRloxP/loxP or MREKO mice that lack expression of MR in the epidermis and its appendages or 0-Cre//MRloxP/loxP mice that were used as littermate controls (CO) (Boix et al. 2016). Mouse colonies were maintained by interbreeding MR<sup>EKO</sup> males with CO females on a B6D2/JRj (Janvier Laboratories, Le Genest-Saint-Isle, France) genetic background. Genotyping was performed using primers in Table S1.

### Phenotypic, histochemical and morphometric analyses

Skin phenotype of CO and MR<sup>EKO</sup> mice was assessed macroscopically and histologically at 2 (8 CO, 7 MR<sup>EKO</sup>), 5 (5 CO, 5 MR<sup>EKO</sup>), 11 (5 CO, 4 MR<sup>EKO</sup>) and 13-months of age (8 CO, 6 MR<sup>EKO</sup>). Dorsal skin was fixed in 4% PFA or 70% EtOH, dehydrated and paraffin-embedded. Following dewaxing and rehydration, 4 µm-thick sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) for histopathological analysis. To assess collagen deposition, sections were stained with Masson's Trichrome (Merck, Darmstadt, Germany). Mast cells and macrophages were detected using 0.1% toluidine blue for 3 min. The overall mouse weights as well as the weight of the intra-abdominal adipose depots (including the perigonadal, retroperitoneal, perirenal, and mesenteric fat pads) were determined in 13-month CO and MR<sup>EKO</sup> mice (n=3 per experimental group).

For quantitative analysis, at least four photomicrographs were taken of each H&E stained section using a Leica DM1000 microscope, a Leica EC3 camera and Leica LAS EZ software (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Next, at least five measurements were taken from each image using IMAGE J software (NIH, Bethesda, Maryland, USA), following a method of semi-randomization, which excluded altered zones. To measure the thickness of skin and its individual compartments an  $n \geq 4$  animals/experimental group was used. To quantitate dermal cellularity, all hematoxylin stained dermal nuclei were counted in each photomicrograph at 20x ( $n \geq 4$  animals/ experimental group). For quantification of adipocyte number and size ( $n=5$  animals/experimental group), photomicrographs at 10x including the region from the reticular dermis to the *panniculus carnosus* were used. Following morphometry, adipocytes were categorized into two size groups, either greater or less than  $<3000 \mu\text{m}^2$ . To quantitate collagen deposition ( $n \geq 3$  animals/experimental group), each photomicrograph was transformed to greyscale and manually segmented to select the area occupied specifically by collagen. Then the

integrated density of collagen fibers (product of area occupied by collagen and mean collagen intensity) was determined. Collagen was quantitated in the dermis excluding the dWAT.

For immunohistochemistry (n≥4 animals/experimental group), and after blocking the endogenous peroxidase activity with methanol: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (29:1), paraffin sections were blocked following manufacturers' indications for antibodies. Following incubation with the primary antibody overnight at 4°C (H2AX, 20E3, Cell Signaling, Danvers, MA, USA, 1/50; pSMAD2/3, sc11769-R Santa Cruz, Dallas, Texas, USA, 1/100; CD3, 0452, Dako, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA, 1/200) and incubation with biotin-conjugated secondary anti-rabbit antibody (Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, UK, 1/1000), immunoreactivity was visualized with VECTASTAIN® Elite® ABC HRP Kit and DAB Peroxidase (HRP) Substrate Kit (Vector Labs, Burlingame, California, USA). Samples were counterstained with hematoxylin, mounted and analyzed using a Leica DM1000 microscope, Leica EC3 camera and LAS EZ software (Leica Microsystems).

To assess skin cell proliferation mice were injected with BrdU 1 hour before sacrifice (130 µg/g of body weight, Sigma, Missouri, USA). Quantification of BrdU-positive basal, interfollicular keratinocytes was performed by counting groups of 100 hematoxylin-stained nuclei; with 4-5 groups of nuclei being counted per section. Data were expressed as percentages of BrdU-positive relative to total number of hematoxylin-stained nuclei (n≥4 animals per experimental group). For quantification of pSMAD2/3 immunohistochemistry each positive dermal cell was counted in four (20x) photomicrographs/animal. The percentage of SMAD2/3 positive cells relative to the total number of hematoxylin-dermal stained nuclei was calculated (n≥5 animals per experimental group). To quantitate T cells (CD3) or mast cells and macrophages (toluidine blue-stained), the total numbers of positive cells in the whole skin were counted in four (20x) photomicrographs/animal (n≥5 animals per experimental group).

### **Immunoblotting**

Lysates from whole skin, epidermal, dermal and dWAT as well as nuclear and cytoplasmic fractions of cultured cells were prepared as previously described (Bigas et al. 2018) using buffers supplemented with Complete™ protease and phosphatase inhibitor cocktails (Merck). Protein concentrations were measured using Bradford reagent (BioRad, Hercules, California, USA) and 20-30 µg of protein/sample was boiled in Laemmli buffer, separated on SDS-PAGE, and transferred to Hybond ECL nitrocellulose (GE Healthcare, Illinois, USA). The membranes were stained with Ponceau S (Merck) to verify equal protein loading and transfer. Membranes were blocked in and incubated with specific primary antibodies for p-GR Ser<sup>211</sup>, 4161S, Cell Signaling Technology (Danvers, Massachusetts, USA), 1/2000; GR, sc1004, Santa Cruz

Biotechnology (Dallas, Texas, USA), 1/2000; IL-1 $\beta$ , sc7884, Santa Cruz Biotechnology, 1/500; S100A8, AF3059, R&D Systems (Minneapolis, MN, USA), 1/500;  $\beta$ -catenin, sc7199, Santa Cruz Biotechnology, 1/2000; actin, A2066, Sigma, 1/4000; laminA, sc6214, Santa Cruz Biotechnology, 1/250; and tubulin, T6199, Sigma, 1/4000, followed by peroxidase-conjugated anti-rabbit (NA934, GE Healthcare), anti-mouse (NXA931, GE Healthcare), or anti-goat (805-035-180, Jackson ImmunoResearch, Ely, UK) antibodies. Immunoreactive signal was detected with Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate (ThermoFisher) and the ImageQuant 4000 Biomolecular Imager (GE Healthcare). Band intensities were quantitated using Image J software and were normalized to the loading controls, actin, lamin A or tubulin.

#### **RNA isolation and quantitative RT-PCR**

To isolate RNA, mouse tissues were homogenized in Trizol (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) with a polytron (PT1600E, Kinematica, Luzern, Switzerland). cDNA was generated using RevertAid H Minus Reverse Transcriptase kit (ThermoFisher). RT-qPCR was performed in the Quant Studio 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) using specific oligonucleotides (0.3  $\mu$ M each) and FastStart Universal SYBR Green Master ROX (Merck). *Hprt1* was used as housekeeping gene. Oligonucleotide sequences can be found in Table S1. Technical triplicates were used; and 3-6 biological replicates per experimental group were assessed to calculate the mean value  $\pm$  SD.

#### **Corticosterone measurement**

Dorsal skin of CO and MREKO mice was collected, minced and incubated with Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium (ThermoFisher) for 5 hours at 37 °C. Next, corticosterone in medium was measured using the DetectX Corticosterone Immunoassay kit (Arbor Assays, Ann Arbor, Michigan, USA) and a Wallac 1420 Victor2 Microplate Reader (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA). The results are relative to the skin explant area.

#### **Culture of primary and immortalized mouse keratinocytes**

Spontaneously immortalized keratinocytes from CO and MR<sup>EKO</sup> have been described (Boix et al. 2016) and were maintained in the same culture conditions as primary keratinocytes. Primary keratinocytes were isolated from dorsal skin of 14-week old female CO or MR<sup>EKO</sup> mice by floating the skin overnight at 4°C on 2.5% trypsin (MP Biomedicals, Santa Ana, California, USA) in DPBS (Biowest, Riverside, Missouri, USA). The following day the epidermis was separated from the dermis, and keratinocytes were collected and plated at a density of 500,000 cells onto mitomycin C-treated mitotically inactivated J2-3T3 feeders in type I collagen-coated T25 flasks in DMEM-Ham's F12 (3:1) medium (ThermoFisher) supplemented with

1.8 × 10<sup>-4</sup> mol/L adenine (Sigma), 0.35 mM calcium (Sigma), 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<sup>-10</sup>M cholera toxin (Sigma), and 10 ng/ml EGF (Peprotech, London, UK). Keratinocytes were grown to confluence and conditioned medium was collected following 24 h incubation with confluent cells and filtered through a 0.2 µm filter.

### **3T3-L1 adipocyte differentiation assays**

3T3-L1 pre-adipocytes were maintained at subconfluence in basal medium: DMEM (Biowest) with 10% FCS and 8 ng/mL biotin (Sigma), 100 U/ml penicillin/100 µg/ml streptomycin, 0.25 µg/ml amphotericin B. Cells were plated in 24-well plates and once confluent were incubated for 3 days with CO or MR<sup>EXO</sup> keratinocyte-conditioned media along with the differentiation cocktail: 0.5 mM IBMX (Sigma), 1 µg/mL insulin and 250nM dexamethasone (Sigma) (Zebisch et al. 2012). On the third day, cells were incubated with basal medium with 1 µg/mL insulin until day 7, with media changes every other day. On day 7 cells were washed in DPBS, fixed in 10% formalin for 45 minutes, washed with dH<sub>2</sub>O and incubated for 5 minutes with 60% isopropanol prior to staining with Oil Red O working solution (Sigma) for 10 minutes. The working solution was prepared by mixing 3 parts Oil Red O stock (3mg/mL in 100% isopropanol) with 2 parts dH<sub>2</sub>O, incubating for 20 minutes and filtering through a 0.2 µm filter. Following staining, cells were washed with dH<sub>2</sub>O and photographed with a Leica DMIL LED inverted microscope, a Leica DMC4500 camera and Leica LAS EZ software. To quantify Oil Red O staining cells were washed with 60% isopropanol for 5 minutes and then dye was extracted with 100% isopropanol and absorbance at 490nm was read on a Wallac 1420 Victor<sup>2</sup> Microplate Reader (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA).

### **Luciferase assays**

Immortalized keratinocyte cell lines at 90% confluence were transfected with TOPFLASH (containing 3 TCF/LEF binding sites) or FOPFLASH (containing mutated TCF/LEF binding sites) plasmids and the internal control pRLSV40Renilla (Promega) using Lipofectamine 2000 Reagent (ThermoFisher). Cells were harvested 30 hours later and luciferase activity was measured using the Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System (Promega) and the Wallac 1420 Victor<sup>2</sup> Microplate Reader (Perkin Elmer). Firefly-luciferase levels were normalized to those of Renilla luciferase.



**Supplementary References**

Berger S, Wolfèr 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.

Ramirez 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.

