

# Mecanismos moleculares de acción de los corticoides

Molecular mechanisms of corticosteroids

Dr. Edgardo Jares<sup>1</sup>, Dr. Omar Pignataro<sup>2</sup>

Los glucocorticoides (GC) son producidos por la corteza suprarrenal regulada por la ACTH hipofisaria, con una modalidad pulsátil y ritmo circadiano. Sus principales funciones son mantener la glucemia y evitar la hipotensión arterial, así como modular la respuesta inmune e inflamatoria y los mecanismos de adaptación al stress. Son poderosos antiinflamatorios y su uso en el tratamiento del asma bronquial se remonta a cincuenta años. En los últimos veinte años, la síntesis de compuestos de gran potencia tópica y escaso efecto sistémico por rápida metabolización ha revolucionado el tratamiento de esta enfermedad, posicionándose como droga de primera elección en todas las etapas de la misma, excepto el asma leve intermitente (1).

La inflamación bronquial en el asma se caracteriza por el influjo de células inflamatorias al foco, dilatación vascular con aumento del flujo sanguíneo, aumento de la permeabilidad vascular, con exudación de proteínas plasmáticas, edema, proliferación del músculo liso bronquial y depósito de fibrillas de colágeno por debajo de la membrana basal, conformando el proceso denominado remodelación bronquial (Tabla 1).

Los GC actúan sobre la inflamación por diversos caminos. Por ejemplo, reducen el número y activación de eosinófilos, desencadenando la apoptosis de los mismos y disminuyendo algunos de sus factores quimiotácticos, que incluyen las IL-3, IL-5, GM-CSF, eotaxina y RANTES,

entre otros. También reducen la proliferación de linfocitos T e inducen la apoptosis de los mismos, al disminuir la acción de la IL-2, principal factor trófico de éstos. Bajan también la cantidad de monocitos (células presentadoras de antígeno), células dendríticas, mastocitos y otras células inflamatorias y por lo tanto inducen la disminución de la producción de citoquinas y mediadores por las células epiteliales y del músculo liso bronquial. Además, atenúan la permeabilidad capilar y la secreción de mucus. Estos efectos son producidos por diversos mecanismos, que incluyen la síntesis de proteínas con efecto antiinflamatorio y la inhibición de la síntesis de numerosos factores proinflamatorios y de crecimiento (2) (Tabla 2).

Estos efectos explican su acción benéfica en el tratamiento de las afecciones alérgicas; sin embargo, se han demostrado acciones que son difíciles de conciliar con estos efectos positivos.

¿Aumentan los GC la atopia y la producción de IgE?

En atopia hay una polarización del patrón de producción de citoquinas de los linfocitos de TH1 a TH2, con secreción predominante de IL-4 e IL-5. La IL-4, junto a la IL-13 son importantes para la producción de IgE por parte de las células B, característica de la atopia. Los GC inhiben la transcripción de genes de IL-4, IL-5, e IL-13, lo cual contribuye en forma importante a su acción antialérgica. Producen una polarización de los linfocitos T hacia TH2, probablemente por suprimir la producción de IFg,

**Tabla 1**

**Inflamación bronquial: hay aumento de expresión de múltiples mediadores.**

Clase	Molécula
Citoquinas	IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL4, IL5, IL13, GM-CSF
Moléculas de adhesión	ICAM-1, VCAM 1
Quemokinas	Eotaxina, RANTES MCP-3, MCP-4
Enzimas inflamatorias	INOS Cox2
Receptores	IL2-R, receptores de taquikininas NK1 y NK2

<sup>1</sup>Tesorero AAAeIC, Vicedirector Carrera Universitaria de Alergia e Inmunología, AAAeIC y UBA

<sup>2</sup>Químico, investigador IBYME

<b>Tabla 2 Relación causa-efecto provocada por los GC sobre la síntesis de factores proinflamatorios.</b>	
<b>Causa</b>	<b>Efecto</b>
<b>Inhiben síntesis</b>	<b>Disminuyen</b>
IL-1, IF g	Moléculas adhesión endoteliales Reclutamiento celular
IL3, IL5, GM-CSF	Migración de eosinófilos y basófilos Activación de eosinófilos Sobrevida de eosinófilos Hematopoyesis eosinófilos y basófilos Liberación de mediadores de eosinófilos y basófilos Citotoxicidad
IL-2	Respuesta linfocitaria
IL-4, IL-13	VCAM-1 endotelial Quimiotaxis de eosinófilos, basófilos y linfocitos
Quemoquinas: RANTES, IL-8, MCP-1, MCP-3, MCP-4, eotaxina	Quimiotaxis
Enzimas: Colagenasa, Elastasa, Activador plasminógeno Óxido nítrico sintetasa inducible Ciclooxigenasa inducible (COX2) Fosfolipasa A2 inducible	Inflamación Remodelación

que normalmente inhibe la diferenciación a TH2 en respuesta a IL-4 y a la supresión de los receptores de IL-12, que aumentan la diferenciación de las células TH1. También suprimen la producción de IL12, mientras que tienen poco efecto sobre la IL10, que tiene acciones antiinflamatorias. Estos efectos son contrarrestados por la acción inhibitoria de la secreción de IL-4, IL-5 e IL-13, así como el aumento de apoptosis de linfocitos T y eosinófilos (3). Otro efecto aparentemente negativo de los GC, es el aumento de IgE, que se encuentra en linfocitos B estimulados por IL-4, tratadas con hidrocortisona (4). En pacientes asmáticos tratados durante una semana con prednisona, se demuestra un aumento de IgE policlonal estadísticamente significativo (5). Este efecto está mediado por el aumento de producción del ligando de CD40 (CD40L) en estas células, que es una proteína transmembrana perteneciente a la familia del TNF, que se une al CD40 y es crítica para la síntesis de IgE inducida por IL-4 e IL-13 (6).

## Ingreso a las células

Los GC son moléculas liposolubles, por lo que son absorbidas fácilmente en cualquier superficie cutánea o mucosa. Circulan en sangre, en su mayor parte, unidos a proteínas y la fracción libre es la que difunde al interior de las células, ejerciendo su acción. Si bien el mecanismo de difusión simple a través de la bicapa lipídica de la membrana es el más aceptado, hay evidencias de que su ingreso a la célula está regulado a través de receptores de membrana distintos al receptor esteroideo (GR). Utilizarían como señales proteínas G y este mecanismo sería responsable de las acciones rápidas de estas hormonas, por ejemplo la inhibición de la secreción de ACTH hipofisaria (7).

## Receptores glucocorticoideos (GR). Su activación

En el citoplasma se unen a su receptor específico (GR).

Se dimerizan y pasan al núcleo donde ejercen su acción sobre el ADN, uniéndose a secuencias específicas de bases, denominadas elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE), actuando sobre el gen promotor, e induciendo la síntesis de ARN mensajero. El mismo sale al citoplasma y es traducido en los ribosomas, formándose proteínas, que secretadas o permaneciendo dentro de la misma célula, constituyen el brazo efector de la respuesta (8).

Los GR pertenecen a una superfamilia que incluye los receptores de hormona tiroidea, vitamina D, ácido retinoico y hormonas sexuales. Actúan como factores transcripcionales activados por ligando (la hormona o vitamina correspondiente), alterando, por diversos mecanismos, la transcripción génica. Se encuentran en todas las células nucleadas.

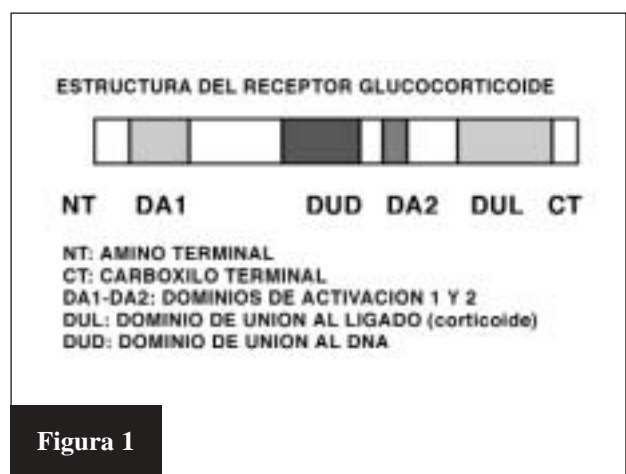
La forma  $\beta$  de GR está aumentada en asma crónico resistente y asma nocturna

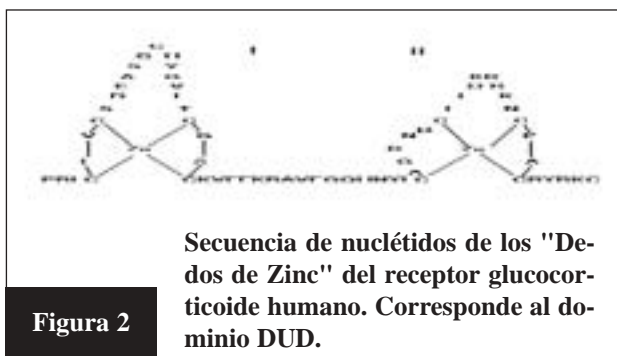
**GR $\beta$ :** Existe un solo gen de GR, si bien el truncamiento del preRNAm del mismo da origen a una forma de receptor denominada  $\beta$ , que tiene 50 aminoácidos menos en su extremo carboxilo terminal, reemplazados por una secuencia diferente de 13 aminoácidos que no puede modular la transcripción de genes, pero puede afectar otras acciones de los esteroides actuando como inhibidor competitivo, formando homodímeros  $\beta$  o heterodímeros  $\alpha$ - $\beta$ , que pueden ocupar los sitios del GRE e impedir la acción del GR $\alpha$ . Por ejemplo, inhibe la síntesis de ARNm dependiente del GR $\alpha$  y su inhibición del FNkB, pero no la acción sobre AP-1. Sin embargo, para que esta acción se concrete, es necesario que esta forma  $\beta$  sea la predominante, por lo que no está claro cuál es su acción biológica, pero podría ser importante en algunos pacientes con asma crónico resistente (9,10,11,12). Recientemente se ha demostrado en pacientes con asma bronquial nocturna, una disminución de la respuesta a GC de los macrófagos de las vías aéreas. Este fenómeno se acompaña de aumento de la expresión de IL-13 y GR $\beta$  durante la noche. Previamente los mismos autores habían demostrado que en el asma nocturna había una disminución de la afinidad del GR y de la respuesta a GC durante la noche de las células mononucleares periféricas, que puede ser consecuencia de la inflamación, ya que las citoquinas elevadas inducen disminución de la afinidad del GC con el GR. Las IL-2 e IL-4 actúan en este sentido en los linfocitos T, aumentando en estos también la forma  $\beta$  de GR, mientras que la IL-13 lo hace sobre los monocitos. La diferencia entre el asma nocturna y el asma resistente a GC es que en la primera la célula con aumento de GR $\beta$  es el macrófago alveolar, mientras que en la última, la célula con aumento de estos receptores e insensibilidad a los GC es el linfocito T (13,14).

## Estructura del GR (Figuras 1 y 2)

En la zona C-terminal del GR se localiza el dominio de unión del GC, así como zonas para la unión a las proteínas "heat shock", traslocación al núcleo y transactivación. En la región central de la molécula se ubica el dominio de unión al GRE (elemento de respuesta a glucocorticoide) del DNA, (DUD) formado por dos iones de zinc complejados con ocho residuos de cisteína, de la cadena peptídica del receptor, formando dos pliegues denominados "dedos de zinc", que interactúan con la doble hélice del DNA, en el surco mayor del mismo, para modular la transcripción de ciertos genes (15). En esta misma zona, un grupo de cinco aminoácidos forma una hélice, llamada zona D (de dimerización) que interacciona con la región similar de otro receptor para dimerizarse (16). Este mecanismo es común a todo el grupo de hormonas y vitaminas mencionadas. Por último, el extremo N-terminal del receptor tiene un dominio denominado de activación, con función en la transcripción de genes, una vez unido al DNA denominado dominio de función de activación transcripcional 1 (DA 1). La otra zona con capacidad de activación transcripcional del receptor esteroideo está, como ya mencionamos, en la región C terminal de la molécula y se denomina DA 2. Esta última está directamente controlada por la hormona, mientras que DA 1 puede actuar independientemente de la misma. Este sector también interacciona con otros factores transcripcionales, como veremos más adelante (16).

En el citoplasma, el receptor está formando un complejo multiproteico con proteínas denominada "heat shock", inmunofilinas, calreticulina y otras, que actúan impidiendo el pasaje al núcleo y la interacción con otros factores transcripcionales. Cuando el receptor se une a la hormona sufre un proceso denominado activación, con cambio conformacional e hiperfosforilación, se separan las pro-





teínas y a partir que el receptor queda "libre", quedan expuestas zonas de la molécula con afinidad para el DNA (DUD, Figura 1) y para el mismo u otros receptores (zona D) y puede formarse un homodímero, con otro monómero idéntico, o heterodímeros con distintos factores transcripcionales.

## Acción nuclear. Transactivación y transrepresión

El receptor activado y dimerizado, unido a la hormona se trasloca al núcleo donde se une al GRE de los genes que regula. En estudios con receptores mutantes que no tienen capacidad para dimerizarse y por consiguiente no pueden unirse al GRE del DNA, los corticoides mantienen la mayor parte de su actividad antiinflamatoria (17). Intervienen entonces otras moléculas llamadas co-activadores o co-represores, que estimulan (o a veces inhiben) el complejo transcripcional. Muchos de estos co-activadores tienen actividad enzimática de acetil-transferasa, acetilando histonas (18). De esta forma regulan la estructura de la cromatina y la activación de la maquinaria basal transcripcional. La mayor parte de estos factores no son específicos para un receptor determinado, regulando la actividad de múltiples receptores nucleares y factores transcripcionales.

La unión del homodímero al DNA, en el GRE, aumentando la expresión de genes, se denomina "transactivación transcripcional" y se denomina mecanismo de acción tipo I. La mayor parte de las acciones metabólicas de los corticoides y por consiguiente sus efectos secundarios se basan en este mecanismo. Los genes más conocidos con acción en la inflamación que poseen GRE (positivo), o sea que los GC aumentan su síntesis, son:

1) El de la lipocortina y la p11/calpactina, proteínas que inhibe la fosfolipasa A2, disminuyendo el aporte de ácido araquidónico para las vías de la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa (19).

2) El de los receptores  $\beta 2$  (20).

3) El inhibidor de la proteasa secretoria leucocitaria.

Otras proteínas cuyos genes son estimulados por los GC a través de este mecanismo son el CC-10 y el antagonista del receptor de IL-1 (21).

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

Los corticoides inhiben la síntesis de numerosas proteínas con acción en la inflamación. Cuando se localizaron en el DNA, los genes que codifican las mismas, en la mayor parte no pudo encontrarse GRE negativo o inhibidor. Estos se encuentran habitualmente en la zona 5' del DNA, cerca de la región promotora de algunos genes sensibles a inhibición por GC, por ejemplo el gen de la IL-6 y el de la queratina (16). En este último caso, la inhibición se efectiviza por unión de monómeros del GR con la hormona, a promotores del gen, en el DNA. Resulta evidente entonces, que la mayor parte de los mecanismos antiinflamatorios de los GC no dependen de esta acción.

La inhibición de la síntesis de proteínas actuando sobre los genes se denomina "tras-represión".

La actividad transcripcional del GR es regulada por coactivadores.

Son numerosos los coactivadores y corepresores que interactúan con el GR. En su mayoría no son específicos para un tipo de receptor. Muchos son componentes de complejos multiproteicos con sitios de unión para numerosos receptores nucleares y factores transcripcionales. Casi todos estos coactivadores interactúan con el dominio AF-2 del GR en presencia de la hormona. Los complejos coactivadores más estudiados con relación al GR son:

- a) BRG-1: (Brahma-related gen 1)
- b) P/CAF: (p-300-CBP associated factor)
- c) CBP/p-300
- d) P 160
- e) DRIP: (vitamin D3 receptor-interacting protein)

El complejo P/CAF es importante en la actividad transcripcional del GR y su capacidad de regular la estructura cromatínica depende de su actividad enzimática de acetil transferasa de histonas (HAT). Además, contiene factores asociados a la proteína de unión al TATA box del DNA, que facilitan el reclutamiento de la maquinaria basal de transcripción. Con el complejo BRG-1 tiene roles superpuestos o redundantes en la regulación transcripcional del AF-1 del GR y pueden compensarse unos a otros en ciertas condiciones. El complejo P/CAF también puede ser reclutado para actuar junto al CBP/p300 y a los coactivadores p160.

CBP y p300 tienen actividad enzimática HAT y pueden relacionarse en forma estable o transitoria con un gran número de factores transcripcionales, incluyendo el GR. Además, el CBP forma un complejo estable con la RNA

polimerasa II. La activación del CBP/p300 por el GR puede efectuarse directamente por el AF-1, o indirectamente, a través de otros coactivadores interactuando con el AF-2, por ejemplo la familia de coactivadores p160.

Familia de coactivadores p160:

- 1) SRC-1 (steroid receptor coactivador 1)
- 2) GRIP-1 (glucocorticoid receptor- interacting protein 1)
- 3) P/CIP (p300/CBP cointegrator associate protein)

Esta familia de coactivadores tiene actividad de HAT, al igual que las familias CBP/p300. Actúan junto a numerosos factores transcripcionales, receptores nucleares y otros coactivadores. El mecanismo de interacción, sin embargo, parece ser específico para cada receptor. Algunos de los miembros de esta familia toma contacto con la zona AF-1 del GR y parece estar comprometido en la coordinación de la actividad transcriptor de AF-1 y AF-2. Sin embargo, su sitio de interacción principal es el AF-2, donde reconoce superficies de interacción específicas hormono dependientes. Por ejemplo, la interacción del GR con el GRIP-1 requiere una región específica denominada NIDaux (dominio auxiliar de interacción de receptor nuclear).

DRIP: Del complejo DRIP forman parte el DRIP 150 y el DRIP 205. El primero actúa sobre el AF-1 del GR, mientras que el segundo se une al AF-2 del GR. Probablemente tengan un papel en la coordinación de la actividad de AF-1 y AF-2 (22,23).

## Desestabilización del ARNm

En los ARNm para numerosas citoquinas, como el GM-CSF, IL-1b, IL-2, IL-6, IL-8, factores transcripcionales y de crecimiento, se encuentran regiones del ARNm ricas en AU en la región 3' no traducida (aun no "leída" en los ribosomas) de la molécula. Estas zonas juegan un papel en la desestabilización de la molécula previa a la tra-

ducción. Los corticoides reducen la estabilidad del ARNm para varios de estos factores, como la IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , MCP-1 (24) y la IL-6, probablemente a través de aumento de síntesis de ribonucleasas que actúan en dicha zona. En el caso del MCP-1, la síntesis proteica no es necesaria para la inhibición (16,25,26).

Otro mecanismo probable de acción de los corticoides es la inhibición de la traducción del ARNm en los ribosomas. En este sentido, se ha demostrado la inhibición de síntesis de proteínas ribosomales y factores de iniciación de la traducción (27).

## Factores transcripcionales

Los factores transcripcionales (Tabla 3) son proteínas que se unen en secuencias regulatorias del DNA, habitualmente en regiones promotoras ubicadas hacia el extremo 5' de la cadena, de genes que son blanco de su acción, aumentando o a veces disminuyendo su tasa de transcripción. Esto puede aumentar o disminuir la producción de proteínas por la célula, alterando la función de la misma. Por consecuencia, el receptor esteroideo se ajusta a esta descripción y la familia de receptores con "dedos de zinc", es una de las cuatro clases de factores transcripcionales descriptos.

## ¿Qué debemos saber de los factores transcripcionales (FT) para entender la acción de los corticoides?

Son numerosos los FT comprometidos en la inflamación asmática. Diversas IL con acciones proinflamatorias, como la IL-2, actúan uniéndose a un receptor específico en la superficie celular (IL2r), producen un cambio

**Tabla 3**

Familia de factores transcripcionales	Ejemplos
Alfa hélice	Oct-1
Dedos de zinc	Receptor esteroideo Receptor hormona tiroidea Receptor ácido retinoico
Cremalleras de leucina	AP-1 NFkB CREB
Hoja plegada	HU



conformacional en el dominio citoplasmático del mismo y desencadenan la activación de kinasas, que llevan a la liberación de las formas activas de factores transcripcionales, por ejemplo el NF-AT (factor nuclear de células T activadas) o NFkB. Los mismos estimulan la síntesis de proteínas proinflamatorias. Diversas IL inducen la síntesis de diferentes FT, o de distintas relaciones entre las concentraciones de los mismos, lo que le da especificidad a la acción. Otros actúan específicamente sobre ciertas células, como el NF-AT, sobre los linfocitos T (28).

## Factores transcripcionales más importantes en asma

NFkB: se describió en la regulación de la síntesis de las cadenas livianas  $\kappa$  en células B murinas (29). Luego se comprobó que su distribución era ubicua. Está formada por dos cadenas iguales (homodímero) o diferentes (heterodímero) que pertenecen a la familia de proteínas REL. Las más comunes son p65, p50, c-REL, REL-B, p52, pero hay varias más. Tienen en común una zona de la molécula de alrededor de 300 aminoácidos que constituye la región de unión al DNA y de dimerización. El heterodímero p50-p65 es el más ubicuo y mejor estudiado. El homodímero p50 parece ser inhibidor competitivo. En el citoplasma está unido a una proteína inhibidora, denominada I $\kappa$ B, de la cual hay varios tipos. Al recibir la célula estímulos en su superficie, por ejemplo la activación de un receptor de interleuquina por unión de su ligando, es fosforilada por kinasas y degradada por el proteosoma. Algunas de éstas, como la MAP kinasa activada por stress, activa también a la JUN N kinasa, que activa al AP-1. Al mismo tiempo, la protein kinasa A (PKA) fosforila la cadena p65, aumentando su afinidad por el CBP (30,31). Al quedar p50-p65 libre se trasloca al núcleo. El FNkB con su cadena p65 fosforilada se une a moléculas coactivadoras, como el CBP, o su homólogo, el p300. En la expresión de genes por este factor interviene un segundo tipo de moléculas coactivadoras. Por ejemplo el SCR-1, que interacciona con la cadena p50 y potencia la transactivación mediada por el FNkB(32). Como ya vimos, este coactivador es miembro de la familia denominada p160, que incluye al TIF-2 y el p-CIP. Los coactivadores de esta familia potencian la actividad de receptores hormonales e interaccionan con el CBP (33,34,35).

El resultado de la acción nuclear de este factor es la activación de genes de numerosos factores proinflamatorios, como IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-8, MCP-1, RANTES,  $\beta$  interferón, GM-CSF, receptor de IL-2, ICAM-1, E-selectina, habitualmente actuando junto a otros factores, como el AP-1 o el C/EBP (36). También activa la síntesis de su propio inhibidor (30).

Los GC estimulan la síntesis de I- $\kappa$ B, por lo menos en linfocitos, inhibiendo la activación del NF-kB (37,38). Otro mecanismo demostrado es la unión con la cadena p-65, impidiendo la formación del NF-kB activo (39,40). Esta inhibición parece ser responsable de la drástica disminución del ICAM-1 en células epiteliales bronquiales y monocitos, estimuladas por TNF- $\alpha$ , cuando son tratadas con dexametasona (38). Sin embargo, la relevancia de estos hechos en la acción antiinflamatoria de los GC está cuestionada. Por un lado, la estimulación de diversas líneas celulares con citoquinas que actúan a través de este factor, como la IL-1 $\beta$ , o el TNF- $\alpha$ , produce la pérdida total del inhibidor (I $\kappa$ B) en pocos minutos, por lo que cualquier aumento en la producción del mismo tiene importancia relativa (38). En estudios en células epiteliales y endoteliales, incubando con dexametasona y TNF $\alpha$  o IL-1 $\beta$ , no se encuentra disminución de la unión NF-kB con el DNA en plazos cortos, menores a dos horas (41,42,43), pero sí con incubación más prolongada, más de seis horas. En consecuencia, estos mecanismos no explican totalmente la inhibición por los GC de la activación de genes inflamatorios por el NFkB y probablemente tengan importancia variable de acuerdo a las células involucradas. En un estudio in vivo con corticoides inhalados, no pudo demostrarse inhibición de la unión al DNA del FNkB (44). Sin embargo la inhibición de la acción de este factor si se produce, o sea que dicha inhibición es posterior a dicha unión con el DNA. El mecanismo más importante parece ser la interferencia con la acción de este factor sobre el aparato transcripcional, inhibiendo su acción estimuladora de la acetilación de histonas y aumentando la deacetilación de las mismas, como veremos más adelante.

AP-1: formado por dos cadenas denominadas C Jun y C Fos, unidas por cremalleras de leucina. El C Jun se activa por fosforilación por la Jun N terminal kinasa, mientras que el C Fos depende del aumento de transcripción para su activación. Muchos de los genes inmunes e inflamatorios aumentados en asma dependen de AP-1 y NFkB (20). Estos factores transcripcionales están aumentados en la mayor parte de las afecciones inflamatorias crónicas, como la artritis reumatoidea y la enfermedad inflamatoria intestinal.

El GR unido a su ligando interacciona directamente con la cadena C-Jun del AP-1, produciendo su mutua inhibición (45). Dicha interacción se efectúa en un sitio distinto de la molécula del GR del utilizado para relacionarse al NFkB (46). Este mecanismo parece ser importante en explicar la insensibilidad a GC que se encuentra en los pacientes con asma córtico-resistente, en los que la concentración de estos factores transcripcionales, sobre todo NFkB y AP-1, estaría muy aumentada, sobrepasando la capacidad de los GC para inhibir la acción de los mismos (21,45). También parece inhibir la síntesis de C-Fos. Sin embargo, no se encuentran cambios en la unión del AP-1

al DNA en células tratadas con GC (47,48). Otro mecanismo para explicar la inhibición es la unión del esteroide con moléculas coactivadoras, como el CBP o el SCR1, bloqueando la maquinaria de transcripción (26).

**STAT (Transductores de Señales y Activador de la Transcripción):** Numerosas citoquinas tienen en su dominio citoplasmático actividad de fosforilación de residuos de tirosina denominadas Janus kinasas. Estas actúan como sitio de anclaje para los factores transcripcionales STAT, que al fosforilarse se dimerizan, pasan al núcleo y aumentan la transcripción de ciertos genes. Existen varias Janus kinasas y varios STAT y la combinación de los mismos da la especificidad de acción de las citoquinas que actúan por este mecanismo (28). Esta vía de expresión es importante para la acción de los interferones IL-4 e IL-12 (18).

Los corticoides inhiben la acción de algunos STAT por interacción directa o antagonizando su actividad sobre moléculas coactivadoras como el CBP (49).

La estimulación con alérgeno específico en pacientes con rinitis alérgica produce una reacción tardía que se acompaña del influjo a la mucosa nasal de linfocitos T y eosinófilos, dentro de las 24 horas del desafío. Esta respuesta inflamatoria se acompaña de aumento local de la expresión de IL del grupo TH2, IL-4, IL-5 e IL-13 y que son suprimidas por tratamiento tópico con glucocorticoides. La IL-4 es esencial para la producción de IgE por los linfocitos B y para la generación de células del tipo TH2. El mecanismo intracelular efector de estas acciones parece ser la unión de la IL-4 con su receptor de superficie, compuesto de una cadena  $\alpha$ -común al receptor de IL-13 y una cadena común  $\gamma$ , compartida con otras IL. La unión de la IL-4 con su receptor estimula dos vías de traducción de señal que llevan a la expresión de genes específicos. Una de ellas, que parece ser la más importante en los procesos que nos ocupan, es la estimulación de la Janus quinasa 1 y 3 (proteína tirosinas kinasas) que fosforilan y activan el STAT-6. Los corticoides tópicos disminuyen esta acción, acompañando la disminución de la expresión de IL-4 en la mucosa nasal post desafío alérgico (50).

**CREB (proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico):** Cuando los  $\beta$  agonistas se unen a su receptor, estimulan una proteína Gs, que lleva a la activación de la adenilato ciclasa y al aumento de AMPc a partir de ATP. Además de producirse la contracción muscular, se estimula a la PKA (proteína quinasa A) que fosforila y activa al factor CREB (como en todos los factores que mencionamos, previa dimerización a través de las cremalleras de leucina). Este se une a una proteína coactivadora llamada CBP (proteína de unión al CREB). Regula la síntesis de receptores  $\beta$  y probablemente sea responsable de la disminución de los mismos tras un tratamiento prolongado con  $\beta$  agonistas (28). También regula la expresión de varios genes inmunes e inflamatorios, como la IL-5 y el

GM-CSF. Interacciona directamente con otros factores transcripcionales. Por ejemplo, inhibe la acción del AP-1 y del GR. Para esta última acción se requieren altas concentraciones de agonistas  $\beta$ , e inhibe la acción del corticoide unido a su receptor sobre el DNA, probablemente a través de moléculas coactivadoras (26).

**CBP (proteína de unión al CREB):** Como ya mencionamos, junto a p300 o la p-CAF (35), forma parte de las moléculas coactivadoras. Son grandes complejos moleculares que se sitúan cerca del sitio de comienzo de la transcripción génica en el DNA. Cuando los factores transcripcionales se unen a las mismas en sitios específicos para cada uno de ellos, activan su función enzimática de acetiltransferasa, produciendo la acetilación de residuos de lisina en la región N terminal de las histonas. El DNA se imbrica con las histonas, formando los nucleosomas, las fibras cromáticas y los cromosomas. En estado de reposo, dichos residuos están deacetilados, manteniendo una carga eléctrica positiva (recordar que la lisina tiene un grupo amino (-NH<sub>2</sub>) que se ioniza a ion amonio (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>). Esto determina el firme enrollamiento de la hélice del DNA alrededor del núcleo de histonas, impidiendo la acción de la RNA polimerasa II y la entrada de otros factores transcripcionales, permaneciendo el gen reprimido. Además, las histonas pueden modificarse por fosforilación, metilación, ribosilación por ADP o ubiquitinización de residuos de aminoácidos.

El CBP puede asociarse con el p/CAF (51). Este contiene dominios con importante actividad acetiladora de histonas. Otros factores transcripcionales también tienen esta actividad enzimática, como el GCN5, TAF II, ACTR. El factor SRC-1 también tiene en su región carboxilo terminal esta actividad, pero menos potente que los precedentes (52). Este factor interacciona directamente con el GR. Algunos factores transcripcionales utilizan la actividad acetiladora del CBP exclusivamente, por ejemplo el CREB (53). Otros, como el FNkB usan la actividad acetiladora del p/CAF, pero no del CBP (54), si bien para su acción requieren unirse al CBP en su porción N terminal, así como con otros co-activadores, como el SCR-1, que se une al CBP en su región C terminal.

## Importancia del patrón de acetilación de histonas

El patrón de acetilación de histonas difiere según el co-activador involucrado. Por ejemplo el p300 acetila preferentemente las lisinas 14 y 18 de la histona 3 y las lisinas 5 y 8 de la histona 4, mientras que el p/CAF acetila la lisina 14 de la histona 3 y en menor medida la 8 de la histona 4. Estos distintos patrones pueden contribuir a sus diferentes roles en la regulación de la transcripción (55).

En resumen, la acetilación de las histonas que acompañan al DNA en los cromosomas lleva al desenrollamiento de la molécula y permite su transcripción al RNA mensajero. Se ha demostrado que varios factores transcripcionales se unen en sitios específicos de esta molécula, directamente o a través de proteínas coactivadoras. El AP-1 y el NFkB activan la acetilasa, aumentando la transcripción de ARNm. Esta gran proteína (CBP) parece actuar como uno de los sitios donde compiten los distintos factores transcripcionales para actuar sobre el complejo basal de transcripción y ejercer su acción enzimática para estimular o inhibir la transcripción de genes (2,28).

En células epiteliales sometidas a estímulos inflamatorios, como IL1- $\beta$  se produce un aumento de la transcripción de GM-CSF proporcional a la concentración de la misma. Agregando dexametasona se inhibe este efecto con concentraciones 5 a 10 veces menores a las necesarias para activar la síntesis proteica del inhibidor de la proteasa leucocitaria (transactivación). La acción estimulante de la síntesis proteica, tanto de la dexametasona como de la IL1 $\beta$ , se lleva a cabo a través de acetilación de histonas en la zona promotora de los genes que estimulan. La IL  $\beta$  estimula la acetilación de las histonas situadas en las cadenas H4, lisinas 8 y 12 del promotor del gen del GM-CSF. La dexametasona inhibe esta acetilación y estimula deacetilasas. En concentraciones más elevadas, la dexametasona estimula la acetilación del promotor del gen del inhibidor de la proteasa leucocitaria, produciendo acetilación de las lisinas 5 y 16 de la cadena H4. El efector de esta acetilación parece ser el CBP y no el p300 o el p/CAF, pero se asociaría con otros coactivadores. El CBP tiene distintos dominios acetiladores de histonas, que pueden variar del promotor de un gen a otro, acetilando distintos residuos de lisina y dando especificidad a la acción (56).

El receptor esteroideo unido al glucocorticoide interactúa con esta proteína uniéndose a proteínas coactivadoras. Ya que los sitios de unión a esta molécula son limitados, se postuló que diversos factores transcripcionales podrían competir por los mismos, atenuando mutuamente sus acciones. En el modelo de expresión del gen de la IL-6, citoquina comprometida en numerosas afecciones inflamatorias y autoinmunes, los corticoides son poderosos represores de la expresión de la misma, mientras que el NFkB y el AP-1 son estimuladores. La represión por los corticoides no es revertida con el agregado de CBP, por lo que la hipótesis de la competencia por sitios específicos en esa molécula difícilmente puede sustentarse (57).

## Corepresores y deacetilación de histonas

En el caso de la IL1b, actúa el FNkB por medio de su

cadena p65, junto a un complejo corepresor con actividad deacetiladora de histonas (HDAC, histona deacetilasa C). El corticoide estimula esta acción deacetiladora y ello es responsable del 50% de la inhibición de la acción de la IL1b por el mismo. El otro 50% depende de su inhibición de la acción acetiladora de histonas del CBP estimulada por la cadena p65 del FNkB (56,57). La deacetilación es también un proceso activo, que requiere la unión del receptor hormonal a moléculas co represoras, como el receptor nuclear co represor(N-CoR), que forma un complejo con la molécula Sin-3 y una deacetilasa. Esta acción condensa el DNA y evita su copiado, reprimiendo la expresión de genes inflamatorios (58).

Factor Nur77: este factor activa la transcripción de genes involucrados en la acción de la CRH (hormona liberadora de corticotrofina), actuando sobre el DNA en una secuencia específica. Asimismo, este factor tiene acción en el sistema inmune, en la activación del receptor de células T. Los glucocorticoides inhiben estas acciones antagonizando su efecto sobre el elemento de respuesta específico del DNA y también atenuando la expresión del ARNm de este factor que se genera en respuesta a la estimulación por CRH. De esta manera podrían constituirse en sistemas antagónicos que regulen la transcripción en sistema inmune y endocrino (59,60).

## Apoptosis y proliferación celular

Los corticoides inducen la apoptosis (muerte celular programada) de eosinófilos y linfocitos T. Este es un proceso activo, en el cual el DNA es fragmentado por endonucleasas y que requiere síntesis proteica para llevarse a cabo (61). La apoptosis inducida por glucocorticoides puede servir para eliminar timocitos o células T que estén sufriendo una diferenciación inadecuada. Paradójicamente también promueven la supervivencia de los timocitos. Los cobayos con una reducción específica del GR en timo producen sólo el 10% del número normal de timocitos. Este efecto dual es similar al producido por el receptor de células T, que es esencial para la supervivencia de los timocitos, pero puede causar su apoptosis. Si la estimulación se produce en la periferia, el timocito prolifera, se diferencia en célula T efectora y de memoria. Si la estimulación del TCR se produce en células T maduras, puede producir apoptosis (muerte celular inducida por activación). Este proceso es inhibido por corticoides, que en este caso aumentan la supervivencia de estas células. El TCR y el GR inducen apoptosis por vías diferentes. El primero induce FAS ligando, que interactúa con FAS activando la CASPASA 8, mientras que el GR activa genes aun no determinados y lleva a la apoptosis por activación de la CASPASA 9. Los corticoides inhiben la apoptosis inducida por



TCR por represión de la transcripción del FAS ligando. La activación del TCR inhibe la apoptosis inducida por corticoides, a través de la activación del TCR-CD3, RAS (pequeñas GTPasas), MEK (kinasa estimulada por mitógenos) y ERK (kinasa regulada por señales extracelulares). En resumen, las funciones pro o anti apoptóticas de los corticoides dependen del contexto celular y de una estrecha relación inversa con el TCR. Probablemente el balance entre las señales del TCR y del GR desempeñen un rol homeostático en el desarrollo de las células T (62).

## Curva dosis-respuesta

La respuesta a los corticoides puede graficarse en una curva dosis-respuesta. Esta relaciona la concentración de la hormona con la acción biológica que se está midiendo. La concentración que produce el 50% del efecto máximo se denomina EC50. Distintos genes blanco de la acción de los corticoides tienen diferente posicionamiento de la curva, cuando más a la izquierda, menos concentración de corticoide es necesaria para lograr ese efecto. Por consiguiente se activarán menos genes cuyas curvas estén situadas más a la derecha y se producirán menos efectos secundarios. Han sido identificados tres elementos que modulan el posicionamiento de esta curva. El primero descrito fue el elemento modulador de glucocorticoides (GME), que corresponde a una secuencia de alrededor de 1000 bases en el DNA, cerca del GRE (63,64). Comprende la unión de dos proteínas, GME B 1 y 2. El segundo componente es la concentración del receptor esteroide (65,66). El tercero son las distintas concentraciones de co-activadores y co-represores. Por ejemplo, el aumento de la concentración de TIF2, SRC-1 y CBP desplazan la curva hacia la izquierda, mientras que el aumento del co-represor SMRT antagoniza esta acción. El receptor esteroide puede ser fosforilado por MAPK (proteínkinasa activada por mitógenos) y esta modificación parece afectar la capacidad regulatoria transcripcional (67,68).

## "Corticoides disociados"

La mayor parte de los efectos metabólicos de los corticoides dependen de la transactivación (efectos transcripcionales positivos), mientras que su actividad antiinflamatoria depende fundamentalmente de la transrepresión (inhibición de la transcripción). A partir de este concepto y trabajando con mutantes del receptor esteroide, se encontró que para la transactivación era necesario el dominio de unión al DNA, el de unión al esteroide (cerca del carboxilo terminal) y el dominio de activación, cerca del amino terminal. La capacidad de inhibir la transcripción de

genes dependiente de AP-1 está ligada al dominio de unión al DNA. La mutación en la zona D produce un receptor que no se dimeriza, no estimula el ERG del DNA, por lo que no activa la transcripción de genes estimulada directamente por corticoides (transactivación), pero aun puede transreprimir. Distintos mutantes mostraron capacidad para reprimir tanto el AP-1 como el FNkB. Desde un punto de vista clínico, sería importante lograr compuestos que mantengan la transrepresión, perdiendo la capacidad de transactivación. En este sentido se están desarrollando compuestos como el RU486, que reprime la síntesis de AP-1 en un 50-70% respecto a la dexametasona, un 30% para el FNkB, pero muy poco para la transactivación. Hay varios compuestos más en estudio en esta línea de investigación (11,48,69). Los estudios con estos compuestos parecen mostrar que retienen actividad antiinflamatoria sin dar signos de enfermedad de Cushing, pero sí presentan algunos efectos esteroideos, por ejemplo en el hueso, ya que la inhibición de la síntesis de osteocalcina parece depender de mecanismos transrepresivos ya que se ha encontrado un GRE negativo para el gen de dicha proteína (70). Por consiguiente, es necesario, mayor trabajo para que estas moléculas puedan ser utilizadas efectivamente en la clínica sin efectos secundarios. Un estudio reciente muestra que el compuesto RU 24858, que tiene importante capacidad inhibitoria sobre el AP-1 (transrepresión), pero escasa o nula actividad sobre la transactivación, tiene actividad antiinflamatoria in vitro similar a la budesonida. Los efectos sistémicos (involución del timo, pérdida de peso y osteopenia) fueron similares a los corticoides standard (71).

## Corticoides y $\beta$ agonistas

Como ya mencionamos, los  $\beta$  agonistas aumentan la concentración del factor transcripcional CREB, interfiriendo con la acción de los corticoides sobre el CBP. Esta acción se ha comprobado in vitro. En contraste, se ha demostrado la activación del GR por  $\beta$  agonistas en fibroblastos y células musculares pulmonares. Tras la incubación con salmeterol o salbutamol, el GR pasa al núcleo y se une al ERG del DNA, activando genes sensibles a los GC. Esta activación es inhibida por propranolol y depende del AMPc. El receptor de glucocorticoides se activa en el citoplasma al fosforilarse en siete dominios diferentes. La inhibición de la PKA activada por el  $\beta$  agonista, bloquearía dicho proceso (72). La subunidad  $\beta$  de la proteína G y la activación de la fosfoinositol 3 kinasa participan de dicho proceso en el SNC (73).

La administración concomitante de  $\beta$  agonistas y corticoides no parece tener efecto sobre las concentraciones de factores transcripcionales como el CREB, FNkB, ni

sobre la capacidad de unión del receptor esteroide al DNA (74).

## Conclusión

Los corticoides son sumamente efectivos en controlar la inflamación en las enfermedades alérgicas. Esto se debe a la multiplicidad de efectos celulares que poseen. En biopsias bronquiales y lavado bronquialveolar en pacientes con asma bronquial tratados con corticoides inhalados, hay reducción del número y activación de las células inflamatorias, restauración de la integridad del epitelio y reducción del depósito de fibras de colágeno por debajo de la membrana basal, aunque luego de diez años de tratamiento, ésta aún sigue engrosada. Los principales efectos son consecuencia de la supresión de la síntesis de citoquinas y moléculas de adhesión en células inflamatorias y estructurales.

Los mecanismos de acción de los corticoides están surgiendo a la luz en los últimos años. El mecanismo de unión al DNA y estimulación de la síntesis proteica, (transactivación), es responsable de algunas de las acciones antiinflamatorias a través de la síntesis de inhibidores de proteasas, inhibidores de prostaglandinas y leucotrienos (lipocortina) y  $\beta$  receptores, aunque estos efectos demoran 24 a 48 horas y sólo explican una parte de la acción antiinflamatoria de estas drogas, pero es el principal mecanismo de su acción metabólica. De modo que, de la transactivación depende la mayor parte de los efectos no deseados de estas drogas, como la hipertensión arterial, edemas, diabetes, hipokalemia y glaucoma. Para estas acciones el complejo receptor-hormona debe unirse a otro complejo similar formando un homodímero.

El complejo receptor-hormona en su forma monomérica tiene la capacidad de interactuar con otros factores transcripcionales (transrepresión) directamente (interacción proteína-proteína, por ejemplo, con la cadena p65 del NF $\kappa$ B, o la cadena C-Jun de AP-1), o a través de estimular la síntesis de inhibidores, como el I $\kappa$ B, que impide el pasaje del NF $\kappa$ B al núcleo. También inhibe los efectos de los mismos en el DNA al actuar, directamente o a través de proteínas coactivadoras sobre el CBP y otras moléculas como el p300, o el SRC-1 inhibiendo su capacidad acetiladora de histonas y disminuyendo la disponibilidad del DNA para ser transcrito por la polimerasa. Estimulan además la deacetilación activa de histonas. Los factores más importantes sujetos a esta inhibición son el NF $\kappa$ B y la AP-1, que estimulan la activación de muchos de los genes inflamatorios que reprimen los corticoides.

Una vez formado el ARNm, se ha demostrado que los corticoides pueden modular su degradación (acción post-transcripcional), o actuar en etapas posteriores, como la

traducción.

Los nuevos conocimientos acerca de los mecanismos de acción de estas drogas han estimulado la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos que mantengan los efectos antiinflamatorios (mediados esencialmente por transrepresión), con disminución de los efectos endocrinos y metabólicos (que dependen fundamentalmente de transactivación). Estos "corticoides disociados" están en un activo proceso de investigación y podrán incorporarse en un futuro cercano a nuestras herramientas terapéuticas.

## Bibliografía

1. Kemp JP Guidelines update: where do the new therapies fit in the management of asthma? NHLBI and WHO Global Initiative for Asthma Drugs 2000; 59 Suppl 1: 23-28.
2. Newton R. Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? Thorax 2000; 55: 603-613.
3. Barnes, P. J. (2001). Corticosteroids, IgE, and atopy. J. Clin. Investig. 107: 265-266.
4. Jabara, H.H., Ahern, D.J., Vercelli, D., and Geha, R.S. 1991. Hydrocortisone and IL-4 induce IgE isotype switching in human  $\beta$  cells. J. Immunol. 147: 1557-1560.
5. Zieg, G., Lack, G., Harbeck, R.J., Gelfand, E.W., and Leung, D.Y. 1994. In vivo effects of glucocorticoids on IgE production. J. Allergy Clin. Immunol. 94: 222-230.
6. Jabara, H.H., Brodeur, S.R., and Geha, R.S. 2001. Glucocorticoids upregulate CD40 ligand expression and induce CD40L-dependent immunoglobulin isotype switching. J. Clin. Invest. 107: 371-378.
7. Iwasaki Y, Aoki Y, Katahira M, Oiso Y, Saito H 1997 Non-genomic mechanisms of glucocorticoid inhibition of adrenocorticotropic secretion: possible involvement of GTP-binding protein. Biochem Biophys Res Commun 235: 295-299.
8. Munck A, Mendel D, Smith L y col. Glucocorticoid receptors and actions. Am Rev Respir Dis, 1990; 141: S2-S10.
9. Bamberger GM, Bamberger AM, de Castro M y col. Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans. J Clin Invest 1995; 95: 2435-41.
10. Oakley RH, Jewell CM, Judt MR y col. The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor beta isoform. Specificity and mechanisms of action. J Biol Chem, 1999; 274: 27857-66.
11. Leung D, Chrousos G. Is There a role for glucocorticoid receptor beta in glucocorticoid-dependent asthmatics?. Am J Respir Crit Care Med 2000; 162: 1-3 .
12. Sousa A, Lane S, Cidlowski J, Staynov D, Glucocorticoid resistance in asthma is associated with elevated in vivo expression of the glucocorticoid receptor  $\beta$  isoform. J Allergy Clin Immunol 2000; 105, 5:
13. Kraft M, Hamid Q, Chrousos G, Martin R, Leung D Decreased steroid responsiveness at night in nocturnal asthma. Is the macrophage responsible? Am. J. Respir. Crit. Care Med.,

163, 5, abril 2001, 1219-1225.

14. Kraft M, Vianna EO, Martin RJM, Leung DYM. Nocturnal asthma is associated with reduced glucocorticoid receptor binding affinity and decreased steroid responsiveness at night. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103: 66-71.

15. Tak H, LeBarnes P. Molecular mechanisms of steroid action in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 97: 159-68

16. Dahlman-Wright K, Wright A, Gustafsson JA, Carlstedt-Duke J. Interaction of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain with DNA as a dimer is mediated by a short segment of five amino acids. *J Biol Chem*. 1991 Feb 15; 266(5): 3107-12.

17. Reichardt, H.M. et al. DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. *Cell*. 1998. 93: 531-541.

18. Barnes P. Regulation of inflammatory gene expression in asthma. Comunicación Personal. Meeting American Academy of Allergy, Asthma, and Immunology, New Orleans, March 2001.

19. Yao XL, Cowan MJ, Gladwin MT y col. Dexamethasone alters arachidonate release from human epithelial cells by induction of p11 protein synthesis and inhibition of phospholipase A2 activity. *J Biol Chem*. 1999; 274: 17202-8.

20. Mak JC, Nishikawa M, Barnes PJ. Glucocorticosteroids increased beta 2 adrenergic receptor transcription in human lung. *Am J Physiol* 1995; 268: 1041-6.

21. Barnes P. Mechanism of action of glucocorticoids in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: S21-S27.

22. Bamberger C, Schulte H, Chrousos G. Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocrine Reviews* 1996, 17,3: 245-261.

23. Jenkins B, Pullen C, Darimont D. Novel glucocorticoid receptor coactivator effector mechanisms. *Trends Endocr Metab* 2001, 12; 3: 122-126.

24. Poon M, Liu B, Taubman M. Identification of a novel dexamethasone-sensitive RNA-destabilizing region on rat monocyte chemoattractant protein 1 mRNA. *Mol Cell Biol*. 1999 Oct; 19(10): 6471-8.

25. Kern J, Warnock L, McCafferty J. The 3' untranslated region of IL-1b regulates protein production. *J Immunol* 1997; 158: 1187-93

26. Anderson G. Interaction between corticosteroids and b-adrenergic agonists in asthma disease induction, progression, and exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: S188-S196.

27. Huang S, Hershey J. Translational initiation factor expression and ribosomal protein gene expression are repressed coordinately but by different mechanisms in murine lymphosarcoma cells treated with glucocorticoids. *Mol Cell Biol*. 1989 Sep; 9(9): 3679-84.

28. Barnes P, Adcock I. Transcription factors and asthma. *Eur Respir J* 1998; 12: 221-234.

29. Chen F, Castranova V, Shi X, Demers L. New Insights into the Role of Nuclear Factor-kB, a Ubiquitous Transcription Factor in the Initiation of Diseases *Clinical Chemistry*. 1999; 45: 7-17.

30. Zhong, H., H. SuYang, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and S. Gosh. 1997. The transcriptional activity of NF-

kB is regulated by the I $\kappa$ B-associated PKAc subunit through a cyclic AMP-independent mechanism. *Cell* 89: 413-424.

31. Zhong, H., R. E. Voll, and S. Ghosh. 1998. Phosphorylation of NF-kB p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the co-activator CBP/p300. *Mol. Cell* 1: 661-671.

32. Na, S.-Y., S.-K. Lee, S.-J. Han, H.-S. Choi, S.-Y. Im, and J. W. Lee. 1998. Steroid receptor co-activator-1 interacts with the p50 subunit and coactivates nuclear factor kB-mediated transactivation. *J. Biol. Chem.* 273: 10831-1083.

33. Heery, D. M., E. Kalkhoven, S. Hoare, and M. G. Parker. 1997. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to the nuclear receptors. *Nature* 387: 733-736.

34. McInerney, E. M., D. W. Rose, S. E. Flynn, S. Westin, T. M. Mullen, A. Krones, J. Inostroza, J. Torchia, R. T. Nolte, N. Assa-Munt, M. V. Milburn, C. K. Glass, and M. G. Rosenfeld. 1998. Determinants of co-activator LXXLL motif specificity in nuclear receptor transcriptional activation. *Genes Dev.* 12: 3357-3368.

35. Torchia, J., D. W. Rose, J. Inostroza y. Kamei, S. Westin, C. K. Glass, and M. G. Rosenfeld. 1997. The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature* 387: 677-684.

36. Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 1986; 46: 705-716.

37. Auphan N, Di Donato J, Rosette C y col. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science*. 1995 Oct 13; 270(5234): 286-90.

38. Newton R, Hart LA, Stevens DA. Effect of dexamethasone on interleukin-1beta-(IL-1beta)-induced nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) and kappaB-dependent transcription in epithelial cells. *Eur J Biochem*. 1998 May 15; 254(1): 81-9.

39. Scheinman RI, Gualberto A, Jewell CM y col. Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors. *Mol Cell Biol*. 1995 Feb; 15(2): 943-53.

40. Mukaida N, Morita M, Ishikawa Y y col. Novel mechanism of glucocorticoid mediated gene repression. Nuclear factor kappa B is target for glucocorticoid mediated interleukin 8 gene repression. *J Biol Chem* 1994; 269: 13289-95.

41. Van der Saag P, Caldenhoven E, van de Stolpe A. Molecular mechanisms of steroid action: a novel type of cross-talk between glucocorticoids and NF-kB transcription factors. *Eur Respir J* 1996; 9,suppl.22: S146-S153.

42. Vanden Berghe W, Francesconi E, De Bosscher K, Resche-Rigon M, Haegeman G. Dissociated glucocorticoids with anti-inflammatory potential repress interleukin-6 gene expression by a nuclear factor-kappaB-dependent mechanism. *Mol Pharmacol*. 1999 Oct; 56(4): 797-806.

43. Ray KP, Farrow S, Daly M, Talbot F, Searle N. Induction of the E-selectin promoter by interleukin 1 and tumour necrosis factor alpha, and inhibition by glucocorticoids. *Biochem J*. 1997 Dec 1; 328 ( Pt 2): 707-15.

44. Hart L, Lim S, Adcock I, Barnes P, Chung K. Effects of inhaled corticosteroid therapy on expression and DNA-binding activity of nuclear factor- $\kappa$ B in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 224-231.
45. Yang-Yen HF, Chambard JC, Sun YL, Smeal T, Schmidt TJ, Drouin J, Karin. Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell*. 1990 Sep 21; 62(6): 1205-15.
46. Tao Y, Williams-Skipp J. *Biol. Chem.*, Vol. 276, Issue 4, 2329-2332, January 26, 2001C, Scheinman R. Mapping of Glucocorticoid Receptor DNA Binding Domain Surfaces Contributing to Transrepression of NF- $\kappa$ B and Induction of Apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 276, 4, 2329-2332, 26, 2001.
47. Konig H, Ponta H, Rahmsdorf HJ, Herrlich P. Interference between pathway-specific transcription factors: glucocorticoids antagonize phorbol ester-induced AP-1 activity without altering AP-1 site occupation in vivo. *EMBO J*. 1992 Jun; 11(6): 2241-6.
48. Didonato J, Saatcioglu F, Karin M. Molecular mechanisms of immunosuppression and antiinflammatory activities by glucocorticoids. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: S11-15.
49. Stocklin E, Wissler M, Guoillex F y col. Functional interactions between Stats and the glucocorticoid receptor. *Nature* 1996; 383: 726-728.
50. Ghaffar O, Christodoulou P, Lamkhioed B, Wright E, Ihaku D, Nakamura Y, et al. In vivo expression of signal transducer and activator of transcription factor 6 (STAT6) in nasal mucosa from atopic allergic rhinitis: effect of topical corticosteroids. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 86-93.
51. Yang, X. J., V. V. Ogrzyzka, J. Nishikawa, B. H. Howard, and Y. Nakatani. 1996. A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* 382: 319-324.
52. Spencer, T. E., G. Jenster, M. M. Burcin, C. D. Assis, J. Zhou, C. A. Mizzen, N. J. McKenna, S. A. Onate, S. Y. Tsai, M. J. Tsai, and B. W. O'Malley. 1997. Steroid receptor co-activator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* 289: 194-198.
53. Korzus, E., J. Torchia, D. W. Rose, L. Xu, R. Kurokawa, E. M. McInerney, T. M. Mullen, C. K. Glass, and M. G. Rosenfeld. 1998. Transcription factor-specific recruitment of co-activators and their acetyltransferase functions. *Science* 279: 703-707.
54. Sheppard K, Rose D, Haque Z, Kurokawa R, McInerney E, Westin S, Thanos D, Michael G, Rosenfeld M, Christopher K., Glass C, Collins T. Transcriptional Activation by NF- $\kappa$ B Requires Multiple Coactivators. *Molecular and Cellular Biology*, 1999 19, 9: 6367-6378.
55. Schiltz L, Mizzen C, Vassilev A, Cook R, Allis D, Nakatani Y. Overlapping but Distinct Patterns of Histone Acetylation by the Human Coactivators p300 and PCAF within Nucleosomal Substrates. *J Biol Chem*, 274, 3: 1189-1192, 1999.
56. Ito K, Barnes P, Adcock I. Glucocorticoid Receptor Recruitment of Histone Deacetylase 2 Inhibits Interleukin-1 $\beta$ -Induced Histone H4 Acetylation on Lysines 8 and 12. *Molecular and Cellular Biology*, September 2000; 20,18: 6891-6903.
57. Wu, R. S., H. T. Panusz, C. L. Hatch, and W. M. Bonner. 1986. Histones and their modifications. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 20: 201-263.
58. De Bosscher K, Vanden Berghe W, Vermeulen L, Plaisance S, Boone E, Haegeman G. Glucocorticoids repress NF- $\kappa$ B-driven genes by disturbing the interaction of p65 with the basal transcription machinery, irrespective of coactivator levels in the cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 8: 3919-3924, 2000.
59. Drouin J, Maira M, Phillips A. Novel mechanism of action for Nur77 and antagonism by glucocorticoids: a convergent mechanism for CRH activation and glucocorticoid repression of POMC gene transcription. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1998; 65: 59-63.
60. Phillips A, Maira M, Mullick A, Chamberland M, Lesage S, Hugo P, et al. Antagonism between Nur77 and glucocorticoid receptor for control of transcription. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 5952-9.
61. Nieto MA, Gonzalez A, Gambon F, Diaz-Espada F, Lopez-Rivas A. Apoptosis in human thymocytes after treatment with glucocorticoids. *Clin Exp Immunol*. 1992 May; 88(2): 341-4.
62. Jamieson C, Yamamoto K. Crosstalk pathway for inhibition of glucocorticoid-induced apoptosis by T cell receptor signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97,13: 7319-7324, 2000.
63. Shiyu Chen, Nicholas J., and S. Stoney Simons Jr. Evidence for a Common Step in Three Different Processes for Modulating the Kinetic Properties of Glucocorticoid Receptor-induced Gene Transcription. *J. Biol. Chem.*, Vol. 275, Issue 39, 30106-30117, September 29, 2000.
64. Jackson, D. A., Collier, C. D., Oshima, H., and Simons, S. S., Jr. Modulation of TAT gene induction by glucocorticoids involves a neutralizing sequence (1998) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 66, 79-91.
65. Szapary, D., Xu, M., and Simons, S. S., Jr. Induction Properties of a Transiently Transfected Glucocorticoid-responsive Gene Vary with Glucocorticoid Receptor Concentration (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 30576-30582.
66. Szapary, D., Huang, Y., and Simons, S. S., Jr. Opposing effects of corepressor and coactivators in determining the dose-response curve of agonists, and residual agonist activity of antagonists, for glucocorticoid receptor-regulated gene expression. (1999) *Mol. Endocrinol.* 13, 2108-2121.
67. Krstic, M. D., Rogatsky, I., Yamamoto, K. R. & Garabedian, M. J. Mitogen-activated and cyclin-dependent protein kinases selectively and differentially modulate transcriptional enhancement by the glucocorticoid receptor (1997) *Mol. Cell Biol.* 17, 3947-3954.
68. Rogatsky, I., Logan, S. K. & Garabedian, M. J. Antagonism of glucocorticoid receptor transcriptional activation by the c-Jun N-terminal kinase. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 2050-2055
69. Vayssiere BM, Dupont S, Choquart A y col. Synthetic glucocorticoids that dissociate transactivation and AP-1 transrepression exhibit antiinflammatory activity in vivo. *Mol Endo-*

crinol 1997; 11: 1254-55

70. Meyer T, Carlstedt-Duke J, Meyer T y Starr D. A weak TA-TA box is a prerequisite for glucocorticoid dependent repression of the osteocalcin gene. *J Biol Chem*, 1997, 272: 30709-30714.

71. Belvisi M, Wicks S, Battram C, Bottoms S, Redford J y col. Therapeutic Benefit of a Dissociated Glucocorticoid and the Relevance of In Vitro Separation of Transrepression from Transactivation Activity. *Journal Immunology*, 2001, 166: 1975-1982.

72. Eickelberg O, Roth M, Lörx R, Bruce V, Rüdiger J, Johnson M y Lutz-Henning Block. Ligand-independent Activation of the Glucocorticoid Receptor by  $\beta$ 2-Adrenergic Receptor Ago-

nists in Primary Human Lung Fibroblasts and Vascular Smooth Muscle Cells. *J Biol Chem*, Vol. 274, Issue 2, 1005-1010, January 8, 1999.

73. Schmidt P, Holsboer F y Spengler D.  $\beta$ 2-Adrenergic Receptors Potentiate glucocorticoid Receptor Transactivation via G Protein  $\beta$ -Subunits and the Phosphoinositide 3-Kinase Pathway. *Molecular Endocrinology* 15 (4): 553-564. 2001.

74. Hancox R, Stevens D, Adcock I, Barnes P, Taylor R. Effects of inhaled  $\beta$  agonist and corticosteroid treatment on nuclear transcription factors in bronchial mucosa in asthma. *Thorax* 1999; 54: 488-492 (June).