

Los Glucocorticoides Desarticulan la Expresión de 20% del Genoma Humano

Los Mabs anti-CD20 no modifican el genoma, son eficaces y de bajo riesgo

Glucocorticoids dysregulate 20% of the human genome.

Mabs anti-CD20 do not modify the genome, are safer and efficient

Giuliani R A

Centro Hematológico Eritroferon

ragjuly@yahoo.com.ar

Fecha de recepción: 27/08/2014
Fecha de aprobación: 23/10/2014



ARTÍCULO DE REVISIÓN

HEMATOLOGÍA Volumen 18 n° 3: 250-256
Septiembre-Diciembre 2014

Resumen

Los Glucocorticoides (GCs) activan o reprimen miles de genes a través del Receptor de GC (GR). Mediante splicing alternativo de los exones terminales (9α o 9β) de su transcripto primario y diversas opciones de lectura a partir de 8 Codones de Iniciación diferentes, el Gen de GR da lugar a 16 isoformas. Cada una de ellas admite 16 combinaciones diméricas y con esto se llega a 256 versiones homodiméricas de GR. El Cortisol viaja en plasma ligado a Globulina Ligante de Cortisol (CBG) y esta modula su distribución y acceso a cada célula y tejido del organismo. Su biodisponibilidad en el citosol depende de la acción de enzimas 11β -HSD tipos 1 y 2. El nivel y concentración final de monómeros y dímeros de GR varía en función del programa de diferenciación de cada célula. La infusión de GCs semisintéticos desorganiza totalmente el fino equilibrio que ejerce el hipotálamo sobre casi 20% del Genoma Humano, por eso, su administración crónica resulta en más daño que beneficio. Los anticuerpos anti-CD20, anti-TNF o anti-BLyS reaccionan contra proteínas específicas de células B o T, son más eficaces y NO modifican la equilibrada expresión de miles de genes dependientes de Cortisol.

Palabras clave: GCs Glucocorticoides,
GR Receptor de Glucocorticoides,
CBG Cortisol Binding Globulin,
Mabs anti-CD20 Anticuerpos Monoclonales.

Abstract

Glucocorticoids (GCs) up or down-regulates the expression of thousands of genes by binding to Glucocorticoid Receptors (GRs). By alternative splicing of its terminal exons 9α or 9β in the primary transcript and readings through 8 different Start Codons, the GR gene develops 16 isoforms. Each one of them admits 16 dimeric combinations and 256 homodimeric versions of GR. Cortisol travels in plasma tied to Cortisol Binding Globulin (CBG), which modulates its distribution and access to every cell and tissue of the body. Its cytosol biodisponibility is determined by 11β -HSD types 1 and 2 enzymes. The level and final concentration of GR monomers and dimers changes according to the differentiation programme of each cell. The infusion of semisynthetic GCs totally disorganizes the delicate balance induced by the hypothalamus on almost 20% of the Human Genome. Because of it, chronic infusion of semisynthetic GCs results in more damage than benefit. Antibodies like anti-CD20, anti-TNF or Anti-BLyS, react against specific targets on B or T Cells, are more effective and do not modify the even expression of thousands of Cortisol's dependent genes.

Keywords: GCs Glucocorticoids,
GR Receptor de Glucocorticoides,
CBG Cortisol Binding Globulin,
Mabs anti-CD20 Monoclonal Antibodies.

Desarrollo

La Síntesis y Secreción de Gluco-Corticoides (GCs) es pulsátil, se realiza en la Corteza Suprarrenal y está controlada por el eje Hipotálamo-Pituitario, mediante liberación de Hormona Adreno-Cortico-Trófica (ACTH).

En condiciones normales los niveles plasmáticos de GCs varían en función del ciclo circadiano, alcanzando su máximo a la mañana y su nadir a medianoche, pero también responden a eventuales episodios de Stress^(1,2).

El Cortisol, que es el GC fisiológico, regula armónicamente la activación o represión de miles de genes, a través de alguna de las 256 versiones homodiméricas o 16 versiones monoméricas del Receptor de Glucocorticoides (GR)⁽³⁾.

También induce vía GR, rápidas respuestas celulares No genómicas, mediadas por kinasas PI3K, AKT, MAPKs y c-Srcs. Es de remarcar, que la Kinasa c-Src forma parte del complejo chaperon que mantiene al GR en el citoplasma, bajo forma inactiva y monomérica. El Cortisol disuelve este complejo, libera GR y c-Src, esta kinasa fosforila Anexina-1 y habilita su traslado a la membrana, donde inhibe a Fosfolipasa A2 y su rol en inflamación vía formación de prostaglandinas y leucotrienos^(4,5,6).

La irrupción de GCs semisintéticos activa miles de genes de manera NO fisiológica y desarticula la fina regulación que ejerce el hipotálamo sobre casi 20% del genoma humano.

El gen de GR codifica un Factor Transcripcional Dependiente de Ligante que pertenece a la superfamilia de Receptores Nucleares (NR3C1). En el caso del GR, el Ligante es Cortisol o alguna de sus versiones farmacológicas (GCs).

Este gen codifica una proteína compuesta por tres dominios críticos: 1) Dominio N-Terminal de transactivación (NTD), 2) Dominio central de unión (Binding) al DNA (DBD) y 3) Dominio C-terminal de unión (Binding) al Ligante (LBD). Los dominios DBD y LBD están unidos entre sí mediante una región flexible llamada Hinge (Bisagra)^(7,8).

La zona DBD de esta molécula contiene dos motivos Zinc Finger, que tienen afinidad específica por secuencias del DNA conocidas como "Elementos de Respuesta a Glucocorticoides" (GREs). Además cuenta con dos Señales de Localización Nuclear (NLS), una ubicada entre DBD y Hinge y otra en LBD^(9,10).

Para ingresar al núcleo el GR debe exhibir NLS en superficie y esto resulta de cambios conformacionales inducidos por Cortisol. La Importina- α reacciona con secuencias fosfolipídicas NLS, recluta Importina- β y esta moviliza el complejo al interior del núcleo. Allí el GR es liberado de las Importinas y puede reaccionar con GREs e iniciar la transcripción de genes dependientes de GCs⁽¹¹⁾.

El dominio NTD exhibe poderosa función activadora de la transcripción, por interacción con Co-reguladores y maquinaria basal de transcripción. Además constituye el sitio primario de modificaciones post-traduccionales inducidas por instalación de grupos Fosfato, Ubiquitina, SUMO o Acetilo.

El sitio LBD tiene un bolsillo hidrofóbico para interacción específica con GCs y un dominio AF2 para interacción con Co-reguladores⁽¹²⁾.

El gen de GR tiene 9 exones y luego de la transcripción, su RNA primario es sometido a splicing alternativo entre dos versiones de exón 9: alfa y beta, dando lugar a dos isoformas: GR alfa y GR beta.

Por otra parte, ambas versiones de RNA primario, GR alfa y GR beta, admiten al menos 8 lecturas diferentes, porque la RNA Polimerasa puede elegir entre 8 codones de iniciación diferentes y esto da lugar a 16 isoformas posibles. Además, entre los monómeros GR, alfa y beta, existe la potencialidad de armar, como decíamos más arriba, al menos 256 combinaciones homodiméricas. Y estos monómeros o dímeros de GR tienen a cargo la activación de genes específicos.

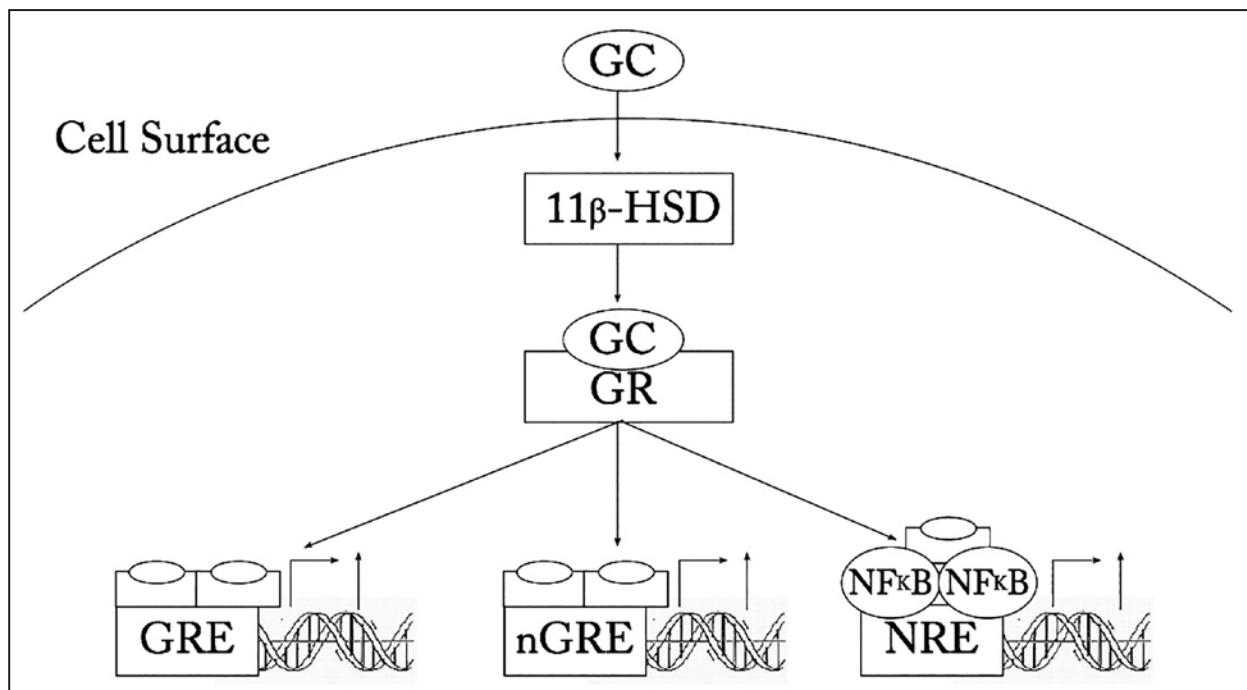
Cada célula, en cada tejido y en cada etapa de su ciclo celular, dispone de un panel específico de combinaciones homodiméricas y monoméricas de GRs. Eso depende de su programa genético de diferenciación, que además incluye la posibilidad de agregar más o menos Fosfato, Ubiquitina, SUMO o Acetilo a cada producto final. Y dichas moléculas modifican la estabilidad y vida media de los mencionados dímeros o monómeros de GR, agregando ulteriores factores de variabilidad funcional^(13,14).

Entonces, una simple hormona (Cortisol) puede abrir la expresión de uno o múltiples genes en un linfocito o cerrarlos en un miocito, todo dependerá de las variables fisiológicas o patológicas a que está sometida cada célula. Por ejemplo, es probable que el acceso de cortisol a linfocitos sea diferente en circulación, ganglio o placa de Peyer.

sería un c-GRE típico, activador o represor de la transcripción de genes específicos, donde cada sexámero reacciona con secuencias específicas de cada monómero del GR homodimérico. También hay Monómeros que no forman homodímeros y reaccionan con nGRE de secuencia CTCC(n)0-2GGAGA, de función exclusivamente represora de la transcrip-

ción^(22, 23). En ambos casos se trata de Palíndromos Incompletos, pero igual son Palíndromos.

La interacción del GR con factores transcripcionales como AP1 y NF- κ B, bloquea la activación de genes pro-inflamatorios y constituye uno de los mecanismos anti-inflamatorios más importantes de los GCs^(24, 25).



En la imagen vemos el ingreso de Glucocorticoide (GC) a la célula, su interacción con los Tipos 1 y 2 de 11β-Hidroxiteroide (ver más abajo), su interacción con GR y su ingreso al núcleo para interacción con cGREs, nGREs y NFκB.

Obviamente, este sigue siendo un campo de intensa investigación científica y falta resolver muchas incógnitas, pero, es claro que las versiones alfa y beta de GR tienen funciones biológicas dispares.

Es importante entonces remarcar que cada célula del organismo exhibe un panel y concentración de GRs, específicamente ajustado a la función biológica que desempeña. Por eso, los efectos del Cortisol, varían en cada tejido e incluso entre cada uno de los grupos celulares que lo componen.

Los GCs inducen apoptosis de Timocitos y Osteoblastos (linfo y osteopenia) y extienden la supervivencia de Hepatocitos y Cardiomiocitos. Además la sensibilidad a GCs varía entre individuos, incluso dentro de una misma célula, acorde con las diversas etapas del ciclo celular. Esto explica que los GCs reduzcan la masa tumoral en Linfomas y Leucemias de estirpe linfóide y sean ineficaces en otros tipos de tumores. El Cortisol coordina la expresión de múltiples ge-

nes, de manera muy específica, en cada célula, cada etapa del ciclo celular y cada tejido, acorde con requerimientos sistémicos del organismo.

Esta hormona funciona como director de orquesta, porque impone la partitura que se deberá tocar, indica el carácter maestoso o pianísimo del ritmo, ordena silencio o activación de cada instrumento, pero no ejecuta ninguno de ellos.

Los efectos del Cortisol serán totalmente diferentes en un Osteoblasto o un Fibroblasto, porque cada célula elabora un determinado panel de monómeros y dímeros de GRs, acorde con sus requerimientos específicos.

La aplicación farmacológica de GCs es eficaz como anti-inflamatoria en agudo, pero puede ser devastadora en pacientes crónicos^(26,27).

En ausencia de Cortisol (GC) el GR habita en el Citoplasma bajo versión monomérica, integrado a un complejo multiproteico compuesto por diversas

proteínas chaperonas: hsp90, hsp70, p23 y miembros de la familia FK506. En estas condiciones el GR permanece bajo conformación transcripcional inactiva, pero exhibe fuerte afinidad por el Cortisol o sus versiones semisintéticas⁽²⁸⁾.

La irrupción de su ligante (GC) induce dimerización de GR, exposición de los “Sitios de Localización Nuclear”, traslado al Núcleo e interacción con “Elementos de Respuesta a Glucocorticoides” (GRE) del DNA, para activación o represión genética dependiente de GCs.

El Cortisol regula gran cantidad de procesos fisiológicos, que incluyen metabolismo intermedio, crecimiento esquelético, función cardiovascular, reproducción y actividad cognitiva. Además, los GCs ejercen feedback negativo sobre Hipotálamo y Adenohipófisis e inhiben la producción y liberación de ACTH para modulación del nivel plasmático de Cortisol⁽²⁰⁾.

El Cortisol es transportado en plasma mediante Globulina Ligante de Cortisol (CBG), la cual, además de facilitar su distribución, regula su liberación a nivel tisular⁽²⁹⁾. Para ingresar a la célula debe ser liberado de su unión a la CBG y su biodisponibilidad en el Citosol regulada por enzimas 11 β -Hidroxisteroid Dehidrogenasa (11 β -HSD) Tipos 1 y 2. La enzima Tipo 1 convierte el metabolito inactivo Cortisona en su contrapartida activa, que es el Cortisol y la variante Tipo 2 ejerce el efecto inverso⁽³⁰⁾.

La sensibilidad a Cortisol de los GRs cambia en función del nivel de expresión y actividad de las mencionadas enzimas.

La mayoría de los derivados sintéticos del Cortisol (GCs) no se une a CBG, no responde a las enzimas arriba mencionadas y bloquea de manera sostenida, la liberación de ACTH releasing factor. Por eso desorganizan totalmente el extenso espectro de genes dependientes de Cortisol⁽³¹⁾.

Los anticuerpos Anti-CD20 reaccionan solamente contra CD20, que es una proteína ubicada en la superficie de un solo tipo de Célula llamada Linfocito B. En virtud de su especificidad anti-CD20 es posible inducir Depleción de Célula B en sangre, sin afectar Células T ni otros grupos celulares, ni alterar el 20% del Genoma Humano como ocurre con los GCs.

En mujeres embarazadas con algún tipo de enfermedad autoinmune dependiente de anticuerpos, como Anemia Hemolítica Autoinmune, Púrpura Trombocitopénica Idiopática, Neutropenia Autoinmune,

Artritis Reumatoidea, Lupus Eritematoso Sistémico, Guillain Barré, Esclerosis Múltiple y tantas otras, la depleción de Células B mediante algún anticuerpo anti-CD20, como Rituximab, Ofatumumab o versiones similares, constituye una alternativa terapéutica recomendable.

Optar por GCs implica habilitar el desequilibrio expresivo de 20% de sus respectivos genomas^(32, 33). Por cierto la infusión de Rituximab puede provocar depleción de Células B en el Feto, pero se trata de Células B Naïf y estas se recuperan en el curso de pocos meses.

El éxito terapéutico de Rituximab en diversas patologías inflamatorias autoreactivas provocadas por auto-anticuerpos, ha sido demostrado en diversos estudios clínicos. Debe remarcarse, que la base racional de todas estas expresiones autoinmunes es la misma, por consiguiente, lo que es válido para PTI o PTT lo es también para cualquier otra versión autoreactiva^(34, 35, 36, 37, 38, 39, 40).

En entidades autoinmunes NO dependientes de autoanticuerpos, como Enfermedad de Crohn o Colitis Ulcerosa, donde el fenómeno autoreactivo parece estar liderado exclusivamente por células T, la mejor respuesta terapéutica suele lograrse con anticuerpos anti-TNF y corticoides de bajo nivel absorbivo como Budesonide⁽⁴¹⁾.

La mayoría de los fenómenos autoinmunes ocurren por desarrollo de clones B autoreactivos, salvo Psoriasis, Colitis Ulcerosa o Ileitis regional (Crohn) que son patologías provocadas por Células T autoreactivas.

Por eso, la Depleción de Linfocitos B, mediante anti-CD20, constituye una alternativa terapéutica potencialmente superadora, que podría reemplazar a los corticoides, que dominaron la escena terapéutica desde 1948 en adelante⁽⁴³⁾.

Los corticoides persistirán como recurso útil para tratamientos anti-inflamatorios de corto tiempo. Pero el uso de estos fármacos en forma crónica, expone al paciente a severos efectos indeseables y brinda pobres resultados terapéuticos.

Declaración de conflictos de interés:

El autor declara no poseer conflictos de interés.

Bibliografía

1. Dickmeis T. (2009) Glucocorticoids and the circadian clock. *J Endocrinol.* 200(1):3-22

2. Giuliani RA, Martínez Aquino E (2011) Glucocorticoides. En *El Sistema Inmune*, pp 483-492.
3. Chrousos GP, Kino T (2005) Intracellular glucocorticoid signaling: a formerly simple system turns stochastic. *Sci STKE*. 2005(304): 48.
4. Wallner BP, Mattaliano RJ, Hession C et al (1986). "Cloning and expression of human lipocortin, a phospholipase A2 inhibitor with potential anti-inflammatory activity". *Nature* 320 (6057): 77-81.
5. Samarasinghe RA, Witchell SF, DeFranco DB (2012) Cooperativity and complementarity: synergies in non-classical and classical glucocorticoid signaling. *Cell Cycle* 11:2819-27.
6. Solito E, Mulla A, Morris JF et al (2003) Dexamethasone induces rapid serine-phosphorylation and membrane translocation of annexin 1 in a human folliculostellate cell line via a novel nongenomic mechanism involving the glucocorticoid receptor, protein kinase C, phosphatidylinositol 3-kinase, and mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology* 144:1164-74.
7. Kumar R, Thompson EB (2005) Gene regulation by the glucocorticoid receptor: structure: function relationship. *J Steroid Biochem Mol Biol* 94:383-94.
8. Bledsoe RK, Montana VG, Stanley TB et al (2002) Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition. *Cell* 110:93-105.
9. Truss M, Beato M (1993) Steroid hormone receptors: Interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocrine Reviews* 14 (4):459-79.
10. Freedman LP (1992) Anatomy of the steroid receptor zinc finger region. *Endocr Rev* 13:129-45.
11. Peters R (2006). "Introduction to nucleocytoplasmic transport: molecules and mechanisms". *Methods Mol Biol. Methods in Molecular Biology* 322: 235-58.
12. Bledsoe RK, Montana VG, Stanley TB et al (2002) Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition. *Cell* 110:93-105.
13. Robert H. Oakley and John A. Cidlowski (2011) Cellular Processing of the Glucocorticoid Receptor Gene and Protein: New Mechanisms for Generating Tissue-specific Actions of Glucocorticoids. *J Biol Chem*. 286(5): 3177-3184.
14. Viegas LR, Hoijman E, Beato M, Pecci A (2008) Mechanisms involved in tissue-specific apoptosis regulated by glucocorticoids. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 109(3-5):273-8.
15. Bamberger CM, Bamberger AM, de Castro M, Chrousos GP (1995) Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans. *J Clin Invest* 95:2435-41.
16. Oakley RH, Sar M, Cidlowski JA (1996) The human glucocorticoid receptor beta isoform. Expression, biochemical properties, and putative function. *J Biol Chem* 271:9550-9.
17. Kino T, Su YA, Chrousos GP (2009) Human glucocorticoid receptor isoform beta: recent understanding of its potential implications in physiology and pathophysiology. *Cell Mol Life Sci* 66:3435-48.
18. Lewis-Tuffin LJ, Cidlowski JA (2006) The physiology of human glucocorticoid receptor beta (hGRbeta) and glucocorticoid resistance. *Ann N Y Acad Sci* 1069:1-9.
19. Hauk PJ, Hamid QA, Chrousos GP, Leung DY (2000) Induction of corticosteroid insensitivity in human PBMCs by microbial superantigens. *J Allergy Clin Immunol* 105:782-7.
20. Beato M. (1989) Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56:335-44.
21. Freedman LP. Anatomy of the steroid receptor zinc finger region. *Endocr Rev* 13:129-45.
22. Surjit M, Ganti KP, Mukherji A et al (2011) Widespread negative response elements mediate direct repression by agonist-liganded glucocorticoid receptor. *Cell* 145:224-41.
23. Hudson WH, Youn C, Ortlund EA (2013) The structural basis of direct glucocorticoid mediated transrepression. *Nat Struct Mol Biol* 20:53-8.
24. Nissen RM, Yamamoto KR (2000) The glucocorticoid receptor inhibits NFkappaB by interfering with serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxyterminal domain. *Genes Dev* 14:2314-29.
25. Yang-Yen HF, Chambard JC, Sun YL et al (1990) Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* 62: 1205-15.
26. Gorovits R, Ben-Dror I, Fox LE, Westphal HM, Vardimon L. Developmental changes in the expression and compartmentalization of the glucocorticoid receptor in embryonic retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:4786-90.
27. 14. Hsu SC, DeFranco DB. Selectivity of cell cycle regulation of glucocorticoid receptor function. *J Biol Chem* 1995;270:3359-64.
28. Grad I, D Picard (2007) The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. *Mol Cell Endocrinol* 275:2-12.

29. Klieber MA, Underhill C, Hammond GL, Muller YA (2007) Corticosteroid-binding Globulin, a Structural Basis for Steroid Transport and Proteinase-triggered Release. *JBC* 282: 29594-29603.
30. Quinkler M, Oelkers W, Diederich S (2001) REVIEW: Clinical implications of glucocorticoid metabolism by 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases in target tissues. *European Journal of Endocrinology* 144: 87-97
31. Yang H, W Dou, J Lou et al (2008) Discovery of novel inhibitors of 11 β hydroxysteroid dehydrogenase type 1 by docking and pharmacophore modeling. *Bioorg Med Chem Lett* 18:1340-5.
32. Mahévas M, Patin P, Huetz F et al (2013) B cell depletion in immune thrombocytopenia reveals splenic long-lived plasma cells *J Clin Invest.* 123(1):432–442
33. van Laar JM (2010) B-cell Depletion with Rituximab: A Promising Treatment for Diffuse Cutaneous Systemic Sclerosis. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(2):R54
34. Hauser SL, Waubant E, Arnold DG et al (2008) B-Cell Depletion with Rituximab in Relapsing–Remitting Multiple Sclerosis. *NJEM* 358 (7) 676-688
35. Coca A, Sanz I (2009) B Cell Depletion in Lupus and Sjögren's Syndrome: An Update *Curr Opin Rheumatol.* 21(5):483-488.
36. Engel P, Gómez-Puerta JA, Ramos-Casals M et al (2011) Therapeutic Targeting of B Cells for Rheumatic Autoimmune Diseases *Pharmacol Rev* 63: 1127-156
37. Gregersen JW, Jayne DR (2012) B-cell depletion in the treatment of lupus nephritis. *Nat Rev Nephrol.* 8(9):505-14.
38. Emery P1, Fleischmann R, Filipowicz-Sosnowska A et al (2006) The efficacy and safety of rituximab in patients with active rheumatoid arthritis despite methotrexate treatment: results of a phase IIB randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trial. *Arthritis Rheum.* 54(5):1390-400.
39. Abud-Mendoza C, Moreno-Valdés R, Cuevas-Orta E et al (2009) Treating severe systemic lupus erythematosus with rituximab. An open study *Reumatol Clin.* 05:147-52.
40. Jónsdóttir T, Zickert A, Sundelin B et al (2013) Long-term follow-up in lupus nephritis patients treated with rituximab—clinical and histopathological response. *Rheumatology* 54: 299-308
41. Sandborn WJ, Hanauer SB et al (2002) Infliximab in the Treatment of Crohn's Disease: A User's Guide for Clinicians. *Am J Gastroent* 97(12) 2962-2972
42. Giuliani RA, Recombinación Genética para Receptores B y T. En *El Sistema Inmune*, pp 111-114.
43. Hench PS, Kendall EC, Slocumb CH, Polley HF. (1949) The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone: Compound E) and of pituitary adrenocorticotrophic hormone on rheumatoid arthritis. *Proc Staff Meet Mayo Clin* 24:181–97.