

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**RESPUESTA CRUZADA ENTRE LA ACTIVIDAD
DEL RECEPTOR A GLUCOCORTICOIDES
Y LA SEÑALIZACIÓN
DEL RECEPTOR H₁ A HISTAMINA**

Farm. Bi oq. Carlos Daniel Zappia

DIRECTOR PROF. DR. FEDERICO MONCZOR

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
FARMACOLÓGICAS (ININFA)

2016

LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA DE RECEPTORES
CÁTEDRA DE QUÍMICA MEDICINAL

A mis viejos, Carlos y Adelaida

AGRADECIMIENTOS

A mi director **Federico Monczor** por iniciarme en este camino y por acompañarme en él, por tu guía y por tus consejos, dentro y fuera del laboratorio pero por sobre todas las cosas por tu amistad.

A **Natalia Fernández** por trasmitirme tu experiencia, por tu generosidad y tu predisposición, por tu cariño, por tus valores y tu forma de ver el mundo y por hacer de mí una mejor persona cada día.

A **Maia Cabrera** por tu inmensa generosidad, por dar mucho sin esperar nada, por las posiciones opuestas, por tu dulzura, tu sinceridad y por los años compartidos.

A **Alejandro Carozzo** por haber caminado juntos a lo largo de estos años, por ser cómplice y amigo, por las infinitas charlas, las visiones de la vida y por coincidir aburridamente en todo.

A **Gina Granja-Galeano** por ser como sos, por ser parte del mismo equipo, por sumar y por ponerle una sonrisa a todos los días.

A **Emiliana Echeverría** por tu sinceridad y por tu carácter, por estar presente y por no juzgar, por ser un faro que ilumina.

A **Nato Gómez** por tu inmensa predisposición, por tu buena onda, por dejar lo que no tenés si alguien necesita, por los almuerzos de las 3 PM y por los buenos discos escuchados.

A **Agustín Yaneff** y **Nicolás Di Siervi** porque en el poco tiempo que compartimos siento que están hechos de buena madera y porque no creo que vaya a equivocarme.

A **Carlos Davio** por abrirme las puertas de tu laboratorio, las de tu oficina y las de tu casa, por tu infinita generosidad y tu enorme sensibilidad y por compartir todo lo que te rodea.

A todos ellos por hacer del laboratorio el mejor lugar para trabajar, por el compañerismo, por la calidad científica y porque, sin exagerar, no hubo día en que no tuviera ganas de ir.

A **Carina Shayo** por tu generosidad, por abrirme las puertas de tu laboratorio, porque siempre tenés tiempo para los demás y porque nunca me dejaste de a pie.

A **Antonella Nebreda** y **Angie Rodríguez** por ser muy buenas personas y por estar siempre del otro lado del teléfono recibiendo los mangazos.

A **Albertina Moglioni** por abrirme las puertas de la Cátedra de Química Medicinal, por permitirme desarrollarme como docente y por confiarme las clases, por la libertad para trabajar y por las soluciones siempre que lo necesité.

A **Liliana Finkielstein**, **Guido Noguera** y **Cristina Soraires** por la buena onda.

A **Matías Gómez** y **Gabriel Jasinski** por su sentido del humor y por su visión aguda las cosas.

A **Lucas Fabián** por tu inmensa cabeza y tu gran corazón, por tus reflexiones ácidas y tus gestos desinteresados, por tu infinita predisposición.

A **Anita Salazar**, **Paula Domínguez Rubio**, **Vicky Bariani**, **Juli Aisemberg**, **Manu Wolfson** y **Ana Franchi** por tantos momentos lindos, por la confianza y por hacerme sentir uno más del laboratorio.

A **Julia Guil**, **Luis Cassinotti**, **Vanina Morales** y **Marcelo Vatta** por la buena onda, por la calidez y por la buena predisposición.

A **Rodrigo González** por tu buena onda y por atenderme y ofrecerme soluciones siempre que tuve una necesidad.

A **Carlos Fitzsimons** del SILS-UVA por tu presencia en los primeros momentos y por la ayuda y el asesoramiento y tu mirada crítica en todo momento.

A **Betina González, Sara Sanz-Blasco, María Clara Gravielle, Roxana Peroni, Stella Maris Celuch, Gaby Acosta, Fernanda De Fino, Verónica Visagno, Juan Ferrario** y demás compañeros del ININFA por abrirme las puertas del Instituto con todo lo que eso implica.

A **Alejandra Goldman** y **Ariadna Soto** por la buena onda, por la ayuda brindada y por abrirnos las puertas de su laboratorio.

Al **IBYME, CEFYBO, ININFA** y el **CESyMA** por brindarme sus instalaciones y ayuda cada vez que lo necesité.

A las Cátedras de **Física, Virología y Biotecnología** de la FFyB por los servicios prestados y por atenderme bien siempre.

A la Cátedra de **Química Medicinal** por ser el lugar donde me desarrollo como investigador y docente.

Al **CONICET** por brindarme los recursos necesarios para realizar mi doctorado a través de sus becas, institutos y financiación.

A la **UBA** por mi formación de grado y de posgrado y por permitirme desarrollarme como docente.

A mi hermana **Gabriela**, a mi tía **Conce**, a mis padrinos **Norberto** y **Teresita**, a mis tíos **Inés** y **Roberto** y a mi ahijado **Martin** por su afecto y su cariño en los distintos momentos de mi vida.

A **Ornella Pirraglia** y **Nicolás Pandre** por su cariño incondicional, por el largo camino que llevamos recorrido y por lo mucho que queda por venir.

A **Pablo Nakagawa** por las incansables e incontables charlas, por los buenos momentos y por tu amistad.

A **Matías Micucci** por tu amistad, por los recitales y por la música y porque sos de fierro.

A mis amigos **Diego Chirico, David Eichenbronner, Agustín Zeoli, Ariel Benavento, Sebastián Novas** y **Nicolás González Eiras** por el cariño y por la amistad, por su sentido del humor, por la inmensa cantidad de momentos compartidos y por haberse cruzado en mi vida.

A mis padres **Carlos** y **Adelaida** por su amor incondicional, por estar siempre y por ser el sostén permanente.



“La paciencia es un árbol de raíz amarga pero de frutos muy dulces”

Proverbio persa

PUBLICACIONES

Parte de los resultados presentados en este trabajo de tesis se encuentran en la siguiente publicación:

Zappia, C. D., G. Granja-Galeano, N. Fernández, C. Shayo, C. Davio, C. P. Fitzsimons and F. Monczor (2015). "Effects of histamine H1 receptor signaling on glucocorticoid receptor activity. Role of canonical and non-canonical pathways." *Sci Rep* **5**: 17476.

Durante el desarrollo de mi carrera de doctorado he colaborado con diversos proyectos de investigación, parte de los cuales han dado lugar a la siguiente publicación:

Alonso, N., **Zappia C. D.**, Cabrera M., Davio C. A., Shayo C., Monczor F. and Fernandez N. C. (2015). "Physiological implications of biased signaling at histamine H2 receptors." *Front Pharmacol* **6**: 45.

RESUMEN

La histamina es un mediador implicado en numerosos procesos. A través de su unión al receptor H1 (H1R), un receptor acoplado a la proteína G α q, ejerce un papel preponderante en los procesos inflamatorios y en la respuesta inmune. Los antihistamínicos, actuando como agonistas inversos del H1R, interfieren en los procesos de tipo alérgico-inflamatorio, siendo su principal uso clínico como antialérgicos. Por su parte, los glucocorticoides (GC), poseen una potente actividad inmunosupresora y antiinflamatoria que los convierte en medios irremplazables para el tratamiento de numerosas patologías. Los GC ejercen sus efectos antiinflamatorios principalmente a través de la unión a su receptor nuclear, el GR, y la consecuente modulación de la expresión génica. Muchos estudios muestran que su actividad puede ser modulada por diferentes vías de señalización, sin embargo, no existen estudios que documenten la modulación entre la actividad del GR y la señalización del H1R.

El GR y el H1R son los blancos farmacológicos con mayor número de drogas aprobadas. Más aun, existen numerosas situaciones donde un corticoide es coadministrado con un antihistamínico para el tratamiento de síntomas o enfermedades inflamatorias aunque esta asociación no posee una base racional, sino que surge de la práctica clínica. Dada su relevancia terapéutica, nos propusimos estudiar la regulación de la actividad del GR por parte de los ligandos del H1R ahondando en los mecanismos moleculares de interacción. La profundización de este conocimiento permitirá aportar la base racional para las terapias actuales en las que se usan ligandos de ambos sistemas, permitiendo también, diseñar nuevas estrategias para tratar enfermedades inflamatorias, en las cuales se justifique el cotratamiento.

Hipotetizamos que ligandos del sistema histaminérgico, actuando a través del receptor H1 a histamina, son capaces de modular la actividad del receptor a glucocorticoides. El estudio de este proceso fue el objetivo del presente proyecto.

Nuestros resultados muestran que la histamina, actuando a través del H1R, incrementa la actividad del GR inducida por dexametasona en los procesos de

transactivación. Este efecto es el resultado de un efecto inhibitorio mediado por la vía $G\alpha_q$ -PLC-Rac, y un efecto estimulador mediado por la vía $G\beta\gamma$ -JNK, prevaleciendo este último por sobre el primero. Por su parte, los antihistamínicos mepiramina y triprolidina también aumentan la actividad del GR, pero en este caso, disminuyendo la actividad de la vía inhibitoria del H1R. A su vez, los antihistamínicos mepiramina, triprolidina, cetirizina, clorfeniramina y difenhidramina, también aumentan la eficacia de la transrepresión por parte del GR inducida dexametasona sobre un sistema de gen reportero frente a la activación de NF- κ B por parte de TNF- α .

A su vez evaluamos la modulación de estos antihistamínicos sobre la actividad del GR en líneas celulares representativas de modelos fisiológicos evaluando la modulación de genes endógenos. Utilizando las células A549, como modelo de inflamación pulmonar y las células U937, precursoras de monocitos y macrófagos, como modelo de sensibilización cutánea evaluamos la expresión de los genes antiinflamatorios GILZ y MKP1 y los genes proinflamatorios IL8, COX2 y GM-CSF. El análisis de los resultados revela una concordancia en el efecto de los antihistamínicos sobre la actividad transcripcional del GR inducida por dexametasona, puesto que la mayoría de estos ligandos, aunque con distintas eficacias incrementa los efectos de la dexametasona sobre la expresión de los genes evaluados.

En vista de esto decidimos evaluar el cotratamiento de un corticoide y un antihistamínico en un modelo animal donde es posible estudiar el desarrollo completo de una determinada patología y la efectividad del cotratamiento sobre la misma. Sobre un modelo de asma murino evaluamos la administración conjunta de dexametasona y el antihistamínico azelastina. Los resultados obtenidos muestran que ambos ligandos poseen un efecto sinérgico, y que el cotratamiento resulta eficaz para mejorar los marcadores patológicos, sugiriendo que el agregado de un antihistamínico permitiría reducir las dosis de dexametasona para normalizar parámetros alérgicos asociados al asma. Nuestros resultados resultan sumamente alentadores ya que, por un lado, permiten esbozar una potencial aplicación terapéutica fruto de las investigaciones precedentes, y por el otro, marcan el comienzo de un proceso para el desarrollo de

alternativas terapéuticas para el tratamiento del asma ofreciendo al médico y al paciente nuevas estrategias eficaces.

En el presente trabajo tratamos de responder, a nivel molecular, las consecuencias del cotratamiento con antihistamínicos y corticoides. La evidencia molecular presentada acerca de la modulación de la actividad del GR por la señalización del H1R, así como también los resultados obtenidos en el modelo de asma murino resultan sumamente estimulantes, abren numerosas puertas e invitan a profundizar el estudio esbozando potenciales aplicaciones terapéuticas para cotratamiento. Nuestros resultados sugieren que el agregado de un antihistamínico, en una terapia combinada junto con dosis bajas de un corticoide, permitiría reducir las dosis del corticoide, disminuyendo de este modo los efectos adversos.

Considerando el uso difundido de la asociación de estos fármacos para el tratamiento de diversas situaciones patológicas, los resultados de este trabajo pretenden aportar racionalidad al cotratamiento dado que los efectos de su interacción deben ser necesariamente tenidos en cuenta. En este contexto, la modulación descrita, podría resultar en un efecto sinérgico útil que justifique racionalmente la combinación de un antihistamínico y un corticoide.

TABLA DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN

LA COMUNICACIÓN CELULAR	2
RECEPTORES.....	3
RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEINA G.....	4
RECEPTORES NUCLEARES.....	7
LIGANDOS	9
HISTAMINA.....	12
RECEPTOR H1 A HISTAMINA	14
ANTIHISTAMINICOS	16
GLUCOCORTICOIDES	18
EL RECEPTOR A GLUCOCORTICOIDES	19
TRASLOCACIÓN NUCLEAR DEL GR	22
REGULACION GENICA: DIRECTA.....	22
REGULACION GENICA: INTERACCION CON OTROS FACTORES	24
MODIFICACIONES POST TRADUCCIONALES.....	26
INFLAMACIÓN Y GLUCOCORTICOIDES.....	28
EL PROCESO INFLAMATORIO	29
EL GR Y LA INFLAMACIÓN	30
TRANSACTIVACIÓN VS. TRANSREPRESIÓN	33
RESPUESTA CRUZADA	36
INFLAMACIÓN Y COTRATAMIENTO	37
HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	40
OBJETIVOS.....	40
MATERIALES Y MÉTODOS	
LÍNEAS CELULARES	2
PREPARACIÓN DE PLÁSMIDOS.....	2
TRANSFECCIONES TRANSIENTES.....	6
ENSAYO DE GEN REPORTERO DE LUCIFERASA	6
CUANTIFICACIÓN DE ARN MENSAJERO MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL (QPCR).....	7

MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA DE CÉLULAS FIJADAS	14
MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA DE CÉLULAS VIVAS.....	15
MEDICIÓN DE CALCIO INTRACELULAR	16
DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT	16
ANIMALES.....	18
SENSIBILIZACIÓN Y EXPOSICIÓN A LAS DROGAS.....	18
ANÁLISIS PATOLÓGICO.....	20
ANÁLISIS DE INMUNOGLOBULINAS EN SUERO.....	21
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	21
MATERIALES	22
RESULTADOS	
PARTE I: MECANISMO MOLECULAR EN SISTEMAS HETERÓLOGOS	2
PUESTA A PUNTO DEL SISTEMA EXPERIMENTAL	2
TRANSACTIVACIÓN.....	8
EFECTO DE HISTAMINA SOBRE EL RECEPTOR A GLUCOCORTICOIDES.....	8
ESTUDIO DE LA VIA DE SUBUNIDADES G β γ	12
PAPEL DE LAS KINASAS: PI3K.....	15
PAPEL DE LAS KINASAS: JUN-KINASA	16
ESTUDIO DE LA VÍA CANÓNICA DEL H1R.....	21
EFECTO DE LOS AGONISTAS INVERSOS PARA EL H1R	23
TRANSREPRESIÓN	26
PUESTA A PUNTO DEL SISTEMA EXPERIMENTAL	27
MODULACION POR MEPIRAMINA	29
EFECTO DE DIVERSOS ANTIHISTAMINICOS	31
PARTE II: RELEVANCIA FISIOPATOLÓGICA SOBRE LA EXPRESIÓN ENDÓGENA DE GENES	33
MODULACION DE LA EXPRESIÓN DE GENES ENDÓGENOS	33
MODULACION DE LA EXPRESION DE GENES ENDOGENOS ANTIINFLAMATORIOS.....	36
MODULACION DE LA EXPRESION DE GENES ENDOGENOS PROINFLAMATORIOS.....	38
PARTE III: RELEVANCIA CLÍNICA SOBRE UN MODELO DE ASMA MURINO.....	46
DISCUSIÓN	
CONCLUSIONES PRINCIPALES	2
LA HISTAMINA MODULA LA ACTIVIDAD DEL GR A TRAVÉS DEL H1R.....	2
EL PAPEL DE JNK EN LA MODULACIÓN HISTAMINÉRGICA.....	5

IMPORTANCIA DE LOS ELEMENTOS DE RESPUESTA Y LOS COFACTORES.....	7
ANTI-HISTAMINICOS Y MODULACION DE GENES ENDOGENOS	9
EFFECTOS ADVERSOS.....	13
RELEVANCIA CLINICA	15
ASMA.....	17
MODELO MURINO DE ASMA Y PERSPECTIVAS FUTURAS	20
CONCLUSIÓN FINAL	23
BIBLIOGRAFÍA	Error! Bookmark not defined.
ABREVIATURAS	Error! Bookmark not defined.

INTRODUCCIÓN

LA COMUNICACIÓN CELULAR

La comunicación se define como la transmisión de señales mediante un código común al emisor y al receptor. Etimológicamente, la palabra deriva del latín *communicatĭo, -ōnis*, que conceptualmente significa “compartir algo o poner en común”. Existen diversos modelos que describen el proceso de comunicación. Uno de los primeros y más influyentes trabajos fue el de Claude E. Shannon, del año 1948, en el cual se identifican sus elementos básicos: una fuente, que produce un mensaje, que es transformado por un transmisor para crear una señal, que es enviada por un canal, para luego ser captada por un receptor, que la transforma en el mensaje que finalmente llega a un destinatario.

La comunicación celular es el proceso mediante el cual una célula es capaz de intercambiar información con otra. Esta característica es importante para los organismos unicelulares y resulta esencial para los organismos multicelulares. En organismos superiores el diálogo celular ocurre a través de señales eléctricas o químicas. Las primeras se encuentran principalmente en el corazón y el cerebro, son muy rápidas y requieren de una unión estrecha entre las células. Las últimas son la forma principal de comunicación celular, en la cual ocurre lo descrito en la definición de comunicación. Una célula emisora (la fuente) produce un mensaje y mediante rutas biosintéticas lo transforma en moléculas de señalización. Éstas a su vez son secretadas por la célula, recorren grandes distancias o actúan localmente (el canal de comunicación), y finalmente se unen a un receptor presente en la célula blanco, quien transduce la señal transformándola en una respuesta (Raff et al., 2002).

RECEPTORES

Los receptores y la farmacología moderna son dos conceptos íntimamente asociados. El receptor es la razón de ser de la farmacología moderna. Rudolf Buchheim y su estudiante Oswald Schmiedeberg estudiaron, entre mediados y fines del siglo XIX, la relación entre la estructura química y la actividad biológica de diferentes compuestos, sentando las bases de lo que hoy se entiende por Química Medicinal o Química Farmacéutica. John Langley y Paul Ehrlich, desde diferentes lugares y en la misma época, hipotetizaron que “sustancias receptoras” dentro de las células podrían mediar la respuesta frente a un estímulo exógeno. Estas visiones revolucionaron la forma de pensar los sistemas biológicos y su interacción con el entorno, dado que por primera vez se pensaba que para que una sustancia tenga efecto, resulta necesaria la existencia de “algo” preexistente en el organismo, sin lo cual el compuesto no tendría efecto. De esta forma se comenzó a entender las enfermedades en una nueva forma, al pensar que su causa podría estar dada por una falla en el funcionamiento normal de estos sistemas, y en consecuencia corregirlos. Los nuevos descubrimientos que se sucedieron llevaron al desarrollo de nuevas terapias y aportaron los principios básicos para el descubrimiento de fármacos en la actualidad. Tan espectacular fue este desarrollo que hoy, 150 años después, más del 80% de los fármacos aprobados por la FDA actúa sobre aquellas “sustancias receptoras” (hoy receptores, enzimas, etc.), la gran mayoría perfectamente identificadas (Overington et al., 2006; Rask-Andersen et al., 2011; Arey, 2014).

Un receptor es una proteína capaz de unirse a una molécula señalizadora, o ligando, e iniciar una respuesta en la célula blanco. Los ligandos son moléculas que generalmente actúan a muy baja concentración (típicamente $\leq 10^{-8}$ M), mientras que los receptores que los reconocen, se unen con alta afinidad (constante de afinidad, $K_a \geq 10^8$ M⁻¹). Los receptores pueden ser de dos tipos, de membrana e intracelulares de acuerdo a su ubicación, ya sea atravesando la membrana plasmática o en el interior celular respectivamente. Aquellos ligandos incapaces de atravesar la membrana, por su

tamaño o hidrosolubilidad, se unirán a los primeros, mientras que, los que sí puedan hacerlo se unirán a los segundos.

Los receptores de membrana están constituidos por tres dominios: un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio citosólico. La unión del ligando al dominio extracelular produce la activación del receptor lo que desencadena una cascada de señales en el interior celular que culmina en la respuesta biológica. De forma análoga a lo que ocurre con un transductor, la señal química, es transformada en una respuesta biológica. Es por ello que al proceso desencadenado por la activación del receptor se lo conoce como “transducción de la señal”. De acuerdo al mecanismo de transducción de señales, los receptores de membrana se subdividen en:

- a) Receptores asociados a canales iónicos: son complejos multiméricos en donde la unión del ligando altera la conformación del canal-receptor y modifica el flujo de iones que circulan a través de este, modificando la permeabilidad iónica de la membrana y en consecuencia, la excitabilidad de la célula diana.
- b) Receptores con actividad catalítica o asociados a enzimas: son receptores en donde la unión del ligando desencadena su actividad enzimática o posibilita la activación de enzimas asociadas a él. Los primeros incluyen receptores guanilato ciclasa, receptores quinasas de tirosina, receptores quinasas de serina-treonina y receptores fosfatasa, y los receptores asociados a enzimas quinasas de tirosina.
- c) Receptores acoplados a proteínas G: se explicarán con mayor detalle a continuación.

RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEINA G

Los receptores acoplados a proteína G, o GPCRs por su sigla en inglés, son los receptores más versátiles conocidos, dado que un número acotado de receptores es capaz de modular una gran cantidad de vías de señalización, lo que se traduce en

funciones particulares en los distintos tipos celulares. Es por esto que en mamíferos, participan en la regulación de prácticamente todos los procesos fisiológicos. Dentro de sus ligandos se encuentran aminas biógenas (histamina, catecolaminas, acetil colina), aminoácidos (glutamato, ácido γ -amino butírico), péptidos (opioides, calcitonina, vasopresina), iones (calcio, protones), lípidos (anandamida, eicosanoides, ácidos grasos), purinas (ADP, ATP), feromonas, moléculas odoríferas e incluso fotones (Wettschureck et al., 2005).

Estructuralmente son proteínas compuestas por una única cadena polipeptídica la cual atraviesa siete veces la membrana plasmática. Es por esto que también se los conoce como “receptores de 7 pasos transmembrana”. Paradigmáticamente, la unión su ligando agonista al dominio extracelular del receptor conduce a la activación de la proteína G que se encuentran en el interior celular. Las proteínas G son un grupo de proteínas heterotriméricas, compuestas por tres subunidades, alfa (α), beta (β) y gamma (γ), las cuales a su vez, en estado inactivo, se encuentran unidas al nucleótido guanosín difosfato (GDP). La activación del receptor se traduce en el intercambio de GDP por GTP en la proteína G acoplada, provocando la separación de la subunidad $G\alpha$ del dímero $G\beta\gamma$. Tanto la subunidad $G\alpha$ como el dímero $G\beta\gamma$ tienen efectores río abajo a los cuales se unen y modulan. La unión al receptor del primer mensajero, el ligando, se traduce en la variación en los niveles de distintos mediadores intracelulares, los segundos mensajeros (AMP cíclico, calcio, etc.), y estos a su vez también poseen efectores a los que modulan, con lo cual se forman verdaderas vías de señalización que conducen a una determinada respuesta celular. La actividad GTP-asa de la subunidad $G\alpha$ es responsable de la hidrólisis de GTP a GDP, y una vez que esto ocurre, la misma vuelve a unirse al dímero $G\beta\gamma$ reiniciándose el ciclo (Fig. 1.1) (Arey, 2014).

Hasta el momento, en el humano se encontraron 16 genes y 11 variantes por empalme alternativo (*splicing* alternativo) que dan cuenta de 27 isoformas de $G\alpha$, mientras que para las subunidades $G\beta$ y $G\gamma$ son 5 y 12 los genes identificados. Las subunidades $G\alpha$ se clasifican en cuatro familias: Gs, Gi/o, Gq, y G12/13, basado en la similaridad estructural y funcional, mientras que las 5 subunidades $G\beta$ y las 12 $G\gamma$,

incapaces de señalizar en su forma monomérica, se combinan para formar dímeros funcionales. Aunque no se conoce con exactitud el mecanismo por el cual se forman las combinaciones, se observó que no todas las combinaciones son posibles y la asociación no es al azar. Si bien todas las células expresan las tres subunidades $G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$, no todas expresan todas las isoformas. En este contexto, el patrón de proteínas G expresadas y activadas por el receptor es lo que determina la respuesta celular y biológica (Wettschureck y Offermanns, 2005; Betke et al., 2012).

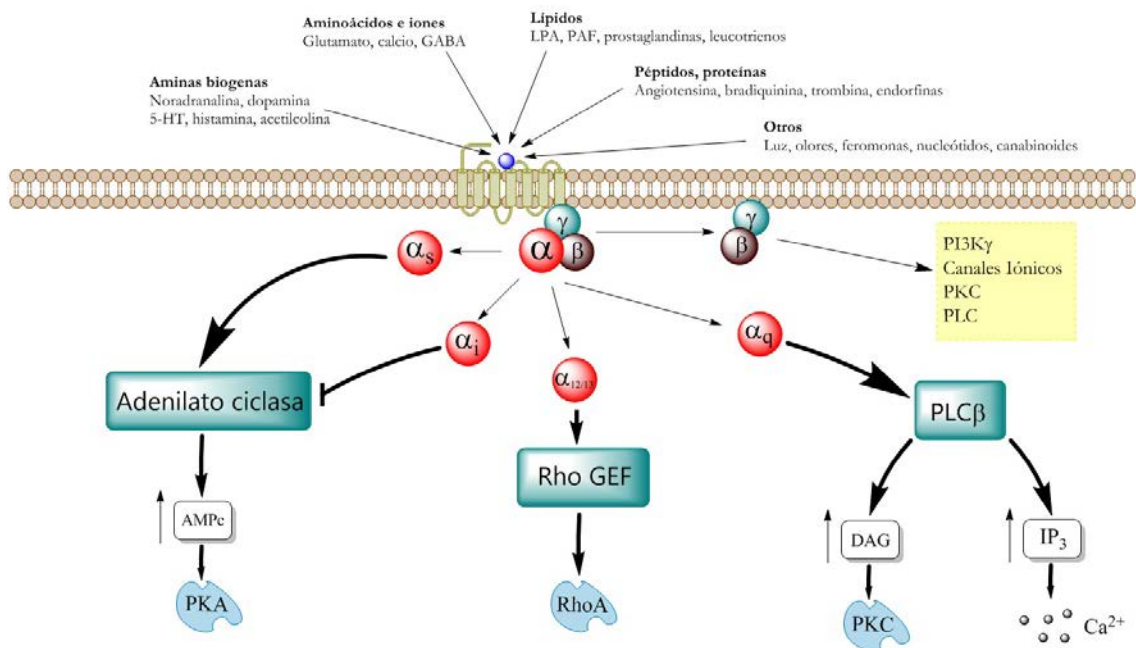


Figura 1.1: Los receptores acoplados a proteínas G y sus principales vías de señalización (adaptado de Ritter y Hall, 2009).

Los GPCRs han sido sumamente prolíficos para el descubrimiento de fármacos. Compuestos importantes como antihistamínicos, β -bloqueantes, anticolinérgicos, analgésicos opioides y neurolépticos eran utilizados desde mucho antes que se conozca la estructura de su receptor. Hoy en día han sido identificados más de 800 genes que los codifican, y tan sólo cerca de 200 poseen ligandos son conocidos. Estos últimos representan el blanco más importante de los fármacos actuales, puesto que más del 30% de estos actúa sobre GPCRs. La historia de los GPCRs acompaña a la farmacología

desde un principio, cuando se usaban modelos animales, órganos aislados y tejidos para estudiar dependencia de la actividad biológica con respecto a la dosis de fármaco utilizada. Así se descubrieron y establecieron conceptos esenciales como sitio de unión, teoría de receptores, agonista, antagonista, afinidad, eficacia, y segundos mensajeros llegando a la purificación del primer GPCR, el receptor β 2-adrenérgico, en 1979 (Caron et al., 1979), su clonado en 1986 (Dixon et al., 1986), y la resolución de la primer estructura cristalina de alta resolución de la rodopsina bovina en el año 2000 (Palczewski et al., 2000). Actualmente la investigación de la señalización, desensibilización, internalización, tráfico y reciclado de los GPCRs permite descubrir numerosas proteínas que interactúan con estos, lo cual se orienta a la búsqueda de nuevos compuestos que modulen su actividad y que resulte en mejores o en nuevas terapias (Jacoby et al., 2006).

RECEPTORES NUCLEARES

Los receptores nucleares comprenden una superfamilia de factores de transcripción que participan de numerosos procesos, tales como el desarrollo embrionario, la inmunidad, la reproducción, la diferenciación celular y la homeostasis. A su vez, también están implicados en diversas patologías, como por ejemplo, el asma, el cáncer, la diabetes, la artritis reumatoidea y los síndromes de resistencia hormonal. Entre sus ligandos se encuentran las hormonas esteroideas (glucocorticoides, mineralocorticoides, hormonas sexuales), las hormonas tiroideas, el ácido retinoico y la vitamina D (Mannhold et al., 2008) .

Estructuralmente se componen de tres dominios principales: un dominio N-terminal de activación independiente del ligando (NTD), un dominio central de unión al ADN (DBD) y un dominio C-terminal de unión al ligando (LBD). La unión del ligando al dominio LBD activa el receptor y en consecuencia, este se une a secuencias específicas presentes en las regiones promotoras de los genes blanco, a través de su dominio DBD, para inducir o reprimir la expresión de los mismos. Al igual que ocurre con los

receptores de membrana, los receptores nucleares interactúan con otras proteínas que regulan su actividad transcripcional. Estas proteínas pueden actuar como coactivadores o como correpresores, promoviendo la inducción o represión de genes, respectivamente (Fig. 1.2). El repertorio particular de estas proteínas es específico para cada tipo celular. Farmacológicamente esto resulta muy importante, dado que permite la búsqueda y diseño de ligandos que actúen de manera específica a nivel celular o tisular, evitando acciones no deseadas sobre otros tejidos. Algunos ejemplos de fármacos que actúan de este modo incluyen al tamoxifeno, al raloxifeno, la rosiglitazona y el fenofibrato (Arey, 2014).

(A)



(B)

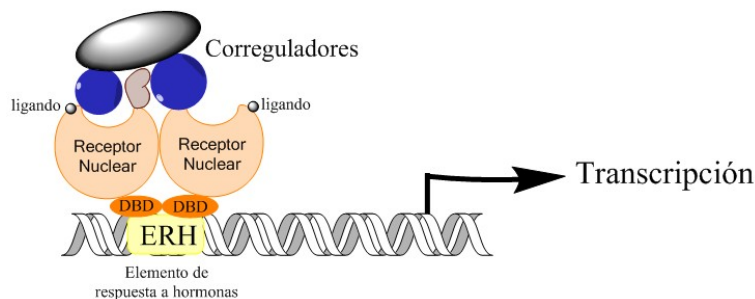


Figura 1.2: Los receptores nucleares. (A) Estructura general de los dominios de los receptores nucleares. (B) Mecanismo de acción general para homodímeros (adaptado de Huss y Kelly, 2004).

Los receptores nucleares tienen un papel muy importante en numerosos procesos, tanto fisiológicos como patológicos. A nivel terapéutico, tienen una larga historia dentro del campo del descubrimiento de fármacos, hecho que se deriva de la diversidad de funciones biológicamente importantes reguladas por un único receptor. El uso de sus ligandos como drogas fue muy anterior al conocimiento detallado de sus

receptores. Los receptores nucleares son un campo de intensa investigación. La complejidad de sus funciones y de sus vías de señalización motiva una profundización en su comprensión que se traduzca en una mayor selectividad a nivel tisular de sus efectos que permita el desarrollo de drogas más seguras con menores efectos adversos (Moore et al., 2006).

LIGANDOS

Un ligando se define como aquella molécula capaz de unirse a un receptor de manera directa, específica y con alta afinidad. De acuerdo a su eficacia, los ligandos pueden ser clasificados como agonistas, antagonistas o agonistas inversos.

El concepto de eficacia tiene sus antecedentes en los postulados de Alfred Clark, quien en 1933, utilizó la ecuación de Hill para desarrollar su teoría de ocupación de receptores, en la cual se considera el efecto biológico. En esta teoría, se asume que el efecto biológico es proporcional a la fracción de receptores ocupados por el ligando y que el efecto máximo resulta cuando todos los receptores han sido ocupados. Fruto de las discrepancias entre esta asunción y los resultados experimentales, Robert Stephenson, en 1956, propuso que la ocupación del receptor no necesariamente debía relacionarse linealmente con su respuesta. Esto lo llevo a proponer que la respuesta de un tejido es función del estímulo, siendo el estímulo directamente proporcional a la eficacia y a la fracción de los receptores ocupada por el ligando. La eficacia se define entonces como una propiedad del ligando que representa el grado en que el mismo es capaz de inducir una respuesta biológica al unirse al receptor.

*Para una revisión más extensa del tema consultar el capítulo "An Historical Introduction to Biased Signaling" del libro *Biased Signaling in Physiology, Pharmacology and Therapeutics*, 2014 (Arey, 2014).*

Por otra parte, la potencia se define como la concentración de un ligando necesaria para obtener un determinado efecto biológico. La potencia se encuentra en relación inversa con dicha concentración, siendo un ligando más potente, aquel del que se requiera menor concentración para alcanzar determinado efecto. Normalmente, como medida de la potencia se utiliza la Concentración Efectiva 50 (CE_{50}), que es la concentración de ligando que produce un 50% de la respuesta máxima alcanzable por el mismo. Cuando no es posible conocer la concentración absoluta de ligando que alcanza al receptor (por ejemplo en ensayos *in vivo*, perfusión de tejidos, ensayos clínicos, etc.) resulta más adecuado referirse a la dosis de ligando en lugar de su concentración (Dosis Efectiva 50 o DE_{50}).

Resulta también importante introducir el concepto de afinidad, dado que es un parámetro utilizado para caracterizar a los ligandos. La afinidad farmacológica deriva del concepto de afinidad química, que se define como la propiedad electrónica por la cual dos especies química disímiles son capaces de formar compuestos. La idea de una “fuerza” que causa las reacciones químicas data del año 1250. Fue Archibald Hill, en 1909, quien tomó el concepto químico y lo llevó a la farmacología. Propuso que ambas especies, ligando y receptor, se encuentran en equilibrio químico. De este modelo derivó una constante que sirvió para definir la afinidad, representada por el parámetro K_A , que es la concentración a la cual la mitad de los receptores se encuentran ocupados. Este parámetro, que posteriormente se llamó constante de disociación microscópica, y que frecuentemente se escribe como K_D , es el que sirve como medida de la afinidad del ligando por el receptor: cuanto menor sea su valor, mayor será dicha afinidad.

CLASIFICACIÓN DE LIGANDOS

De acuerdo a la definición de eficacia, un agonista será aquel ligando cuya eficacia sea igual a 1, un antagonista aquel cuya eficacia sea igual a 0 y un agonista inverso igual a -1. Considerando que el receptor puede existir en al menos dos conformaciones, activa e inactiva, ambas en equilibrio, existe una actividad basal o

constitutiva para el receptor, vale decir que el mismo, en ausencia de ligando, es capaz de generar una respuesta biológica basal. Al considerar el ligando, un agonista será aquel ligando que posea mayor afinidad por la conformación activa que por la inactiva, desplazando el equilibrio hacia la forma activa, y por lo tanto, estabilizando esta conformación y desencadenando una respuesta biológica, mientras que un antagonista será aquel que se una con igual afinidad a ambas conformaciones, sin alterar su equilibrio basal y por lo tanto no tenga efecto. Por su parte, un agonista inverso será aquel ligando que tenga una afinidad preferencial por el estado inactivo, produciendo un efecto contrario a aquél de los agonistas e inhibiendo la actividad basal del receptor en ausencia de estos.

Un ligando sólo puede comportarse como agonista inverso cuando el receptor posee algún grado de actividad constitutiva. Sin embargo, si el equilibrio preexistente se encuentra muy desplazado hacia la forma inactiva del receptor, el agonismo inverso resultará muy difícil de observar y de distinguir de un simple antagonismo competitivo. Esta dificultad se vio reflejada en la clasificación de muchos agonistas inversos como antagonistas y posteriormente ha conducido a la reclasificación de estos como agonistas inversos (Kenakin, 2004).

Para una revisión más extensa de receptores y ligandos consultar el capítulo "An Historical Introduction to Biased Signaling" del libro Biased Signaling in Physiology, Pharmacology and Therapeutics, 2014 (Arey, 2014).

HISTAMINA

La histamina (4-(2-aminoetil)-1,3-diazol) es una amina biógena, sintetizada a partir del aminoácido L-histidina por la enzima L-histidina decarboxilasa, almacenada en altas concentraciones en gránulos de células presentes en pulmones, piel, tracto gastrointestinal y sistema nervioso central principalmente, así como también en mastocitos y basófilos.

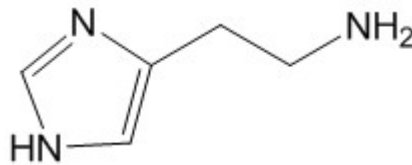


Figura 1.3: Estructura química de la histamina.

Una vez liberada, la histamina puede actuar como mediador local o bien como neurotransmisor. A nivel fisiológico y patológico, la histamina se encuentra implicada en numerosos procesos, como por ejemplo la proliferación y la diferenciación celular, la hematopoyesis, el desarrollo embrionario, la regeneración y la cicatrización. Interviene en procesos de memoria y cognición, regulación de los ciclos de sueño/vigilia y la homeostasis. Asimismo favorece la secreción ácida gástrica. Al ser liberada de mastocitos y basófilos, desencadena efectos rápidos sobre el endotelio vascular y bronquial y sobre el músculo liso. Sus principales efectos incluyen contracción del músculo liso, y efectos pro-inflamatorios sobre macrófagos, células dendríticas, linfocitos T y B, células epiteliales y endoteliales, tales como vasodilatación, quimiotaxis y aumento en la producción de citoquinas. Esto se traduce en el desarrollo de síntomas como rinitis aguda o broncoespasmo característicos de la respuesta alérgica temprana. Para una extensa revisión consultar el trabajo de Jutel & col., 2005 (Jutel et al., 2005).

Al presente se han descrito cuatro subtipos de receptores a histamina: H1R, H2R, H3R y H4R, todos ellos receptores acoplados a proteína G. La clasificación de los mismos es histórica, nombrados de esta forma a medida que fueron descubiertos. La base de los descubrimientos fue farmacológica para los dos primeros receptores y la posterior identificación de nuevos genes así como también la elucidación de cuatro secuencias polipeptídicas diferentes para todos ellos, permitió establecer los cuatro subtipos de receptores anteriormente mencionados. De los cuatro, los dos primeros receptores han sido objeto del desarrollo de una amplia cantidad de medicamentos mientras que los dos últimos representan actualmente promesas terapéuticas (Panula et al., 2015). La tabla 1.1 recoge sus principales características.

	H1R	H2R	H3R	H4R
Descrito	1966	1972	1983	1994
Clonado	1991	1991	1999	2000
Proteína G	G _{q/11}	G _s	G _{i/o}	G _{i/o}
Segundo Mensajero	IP ₃ / DAG / Ca ²⁺	AMP _c (+)	AMP _c (-)	AMP _c (-)
Expresión	Ubicua (SNC, vías aéreas y vasos sanguíneos)	Ubicua (estómago, corazón y SNC)	Neuronas (SNC y SNP)	Médula ósea y células hematopoyéticas
Función general	Broncoconstricción, vasodilatación, apetito, sueño/vigilia	Secreción ácida gástrica	Modula liberación de neurotransmisores	Inmunidad
Fisiopatología	Alergia, emesis, trastornos del sueño	Úlceras gástricas	Daño cognitivo, esquizofrenia, epilepsia	Enfermedades inflamatorias
Ligandos de uso clínico	Difenhidramina, cetirizina	Cimetidina, ranitidina	En evaluación clínica avanzada	En evaluación clínica

Tabla 1.1: Características generales de los receptores a histamina.

RECEPTOR H1 A HISTAMINA

El receptor H1 a histamina representa el primer receptor caracterizado farmacológicamente. La aparición de los primeros compuestos con actividad antihistamínica, en 1937, permitió llevar adelante experimentos farmacológicos, los cuales condujeron a que, en 1948, Björn Folkow sugiriera la presencia de dos tipos de receptores a histamina, de los cuales sólo en uno se produciría el antagonismo por antihistamínicos (Folkow et al., 1948). Casi 20 años después, Heinz Schild descubre diferencias en el valor de pA_2 ($-\log K_B$) de los antihistamínicos al considerar diferentes efectos de la histamina que lo llevan a nombrar, en 1966, al receptor H1, como aquel cuyo valor de pA_2 es similar al de los primeros antihistamínicos descubiertos.

La aparición del antihistamínico radiomarcado [3H]-mepiramina en 1977, permitió la detección de este subtipo de receptor en diferentes tejidos (Hill et al., 1997). Hoy se sabe que este receptor se distribuye ubicuamente en todo el organismo, incluyendo el sistema nervioso central, y que se expresa en la musculatura lisa vascular y aérea, en células endoteliales, dendríticas, monocitos, neutrófilos, linfocitos T y B, hepatocitos y condrocitos (Panula et al., 2015). Los efectos de la histamina actuando sobre el receptor H1 incluyen la contracción del músculo liso vascular y de las vías aéreas, el aumento en la permeabilidad vascular por contracción de las células endoteliales, la síntesis de prostaciclina y del factor activador de plaquetas y la liberación del factor de Von Willebrand, de óxido nítrico y de catecolaminas en la medula adrenal. La histamina también posee efectos inotrópicos negativos sobre el miocardio e interviene en la modulación de la actividad neuronal en diferentes áreas del cerebro y la regulación de los procesos de sueño/vigilia. Su papel como mediador en la inflamación aguda y en la respuesta de hipersensibilidad inmediata es indiscutible, a lo cual se debe sumar su participación en la inflamación crónica y la respuesta inmune (Jutel et al., 2005).

La concomitante caracterización del receptor, su posterior clonado (Yamashita et al., 1991) y su reciente cristalización (Shimamura et al., 2011) permitieron definir al

receptor como una proteína de membrana de 491 aminoácidos, con un peso molecular de 56KDa, que presenta siete pasos transmembrana y sitios de glicosilación en su dominio N-terminal. La unión de la histamina se produce a través del tercer y el quinto dominio transmembrana (TM3 y TM5).

A nivel molecular, el mismo se encuentra acoplado principalmente a la proteína $G_{q/11}$, cuya activación desencadena la activación de la fosfolipasa C, quien a su vez, cataliza la hidrólisis del 4,5-bifosfato produciendo 1,2-diacilglicerol e inositol-1,4,5-trifosfato, responsables de la activación de la protein kinasa C y del aumento del Ca^{2+} intracelular (Tabla 1.1). Los tejidos y sistemas celulares en los cuales se describieron tales efectos han sido analizados en forma integral, detallada y exhaustiva (Donaldson et al., 1986; Hill, 1990; Leurs et al., 1995). Otros mecanismos incluyen la producción de ácido araquidónico, óxido nítrico y GMP_c . A nivel endotelial, el H1R es responsable del aumento en la producción de óxido nítrico (NO), el cual media sus efectos vasodilatadores. En cerebro, glándula adrenal y células CHO (ovario de hámster chino) es capaz de estimular la adenilato ciclasa y el consecuente aumento de AMP_c , efecto mediado por las subunidades $G\beta\gamma$ en los dos últimos casos. A nivel de la proliferación celular, es modulador mediante la activación de las proteínas G pequeñas RhoA y Rac (Notcovich et al., 2010; Panula et al., 2015).

El H1R presenta actividad constitutiva, ya que, en ausencia de agonista conserva su actividad, verificado en ensayos de producción de inosítoles o genes reporteros. Esto condujo al estudio y posteriormente a la reclasificación de todos los antihistamínicos clásicos, como agonistas inversos (Bakker et al., 2000). Por otra parte, la desensibilización del H1R fue bien estudiada y se sabe que ocurre a través de vías dependientes e independientes de PKC (Smit et al., 1992; McCreath et al., 1994). La quinasa de GPCR 2 (GRK2) es la principal enzima que media la desensibilización inducida por sus agonistas (Ikawa et al., 2005).

ANTIISTAMINICOS

Los primeros antihistamínicos surgieron a través del hallazgo de los efectos antihistamínicos asociados al piperoxano por Daniel Bovet y Anne-Marie Staub, en 1937 (Bovet et al., 1937). Sin embargo, Sir Henry Dale demostró, más de 20 años antes, los efectos de la histamina en el musculo liso estomacal y tracto respiratorio, así como también, sus efectos vasopresores y de shock al ser inyectada en animales (Dale et al., 1910; Dale et al., 1919). Los años posteriores vieron la aparición de diversos reportes que llevaron a establecer su papel en los procesos alérgicos y anafilácticos. Estos hallazgos dispararon la búsqueda de antagonistas que fueran capaces de prevenir los efectos patológicos de la histamina, en el instituto Pasteur donde Bovet trabajaba. Basándose en características comunes entre la histamina, la acetilcolina y la adrenalina, se comienzan a explorar compuestos relacionados, lo cual llevaría, en 1937, a la aparición del piperoxano y de compuestos relacionados capaces de prevenir los efectos letales inducidos por histamina en cobayos (Parsons et al., 2006).

Considerando que el primer antihistamínico fue aprobado en 1942 para su uso en humanos, los antihistamínicos representan actualmente el grupo más extenso de medicamentos utilizado en desordenes alérgicos, existiendo más de 45 antihistamínicos de uso clínico a nivel mundial. Inicialmente clasificados como antagonistas, hoy han sido reclasificados como agonistas inversos, capaces de estabilizar la forma inactiva del H1R. A través de este mecanismo de acción y de antagonizar la histamina, estos fármacos interfieren en los procesos de tipo alérgico-inflamatorio, siendo los antihistamínicos de segunda generación, aquellos de elección en pacientes con rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica y urticaria (Simons et al., 2011).

Estructuralmente, los antihistamínicos pueden definirse como dos anillos aromáticos unidos por un puente de tres eslabones a una función amino terciaria (Fig. 1.4). Su estructura química determina el perfil de efectos adversos y permite clasificarlos en dos grupos principales: antihistamínicos de primera y de segunda generación. Mientras que los fármacos de primera generación son capaces de atravesar la barrera hemato-encefálica, causando sedación y/o efectos anticolinérgicos, los de

segunda generación, en cambio, tienen escasa penetración a nivel del SNC, lo cual mejora considerablemente su perfil terapéutico. No obstante, muchos de los fármacos de primera generación siguen utilizándose en la práctica clínica (Panula et al., 2015).

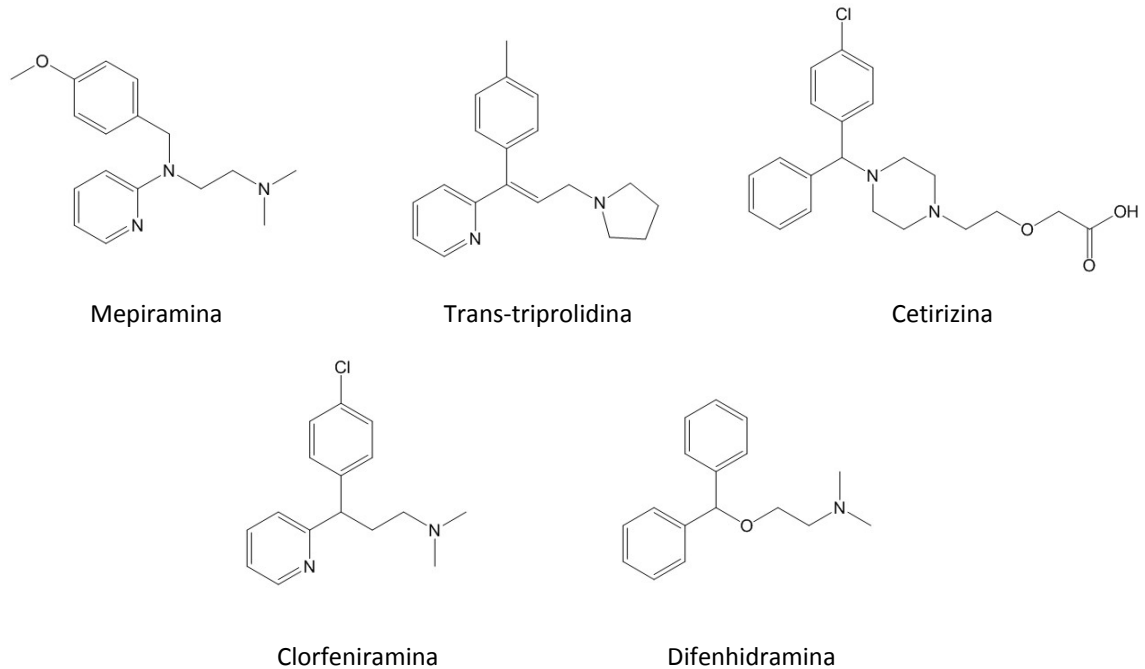


Figura 1.4: Estructura química de los principales antihistamínicos.

Los antihistamínicos también se utilizan en desórdenes en los que no existe una fuerte evidencia clínica respecto a su eficacia. Algunos ejemplos incluyen dermatitis atópica, anafilaxis, angioedema no-alérgico, otitis media, sinusitis, insomnio, ansiedad, migraña y otros desordenes vestibulares. También son usados por pacientes con rinitis alérgica con asma concomitante, aunque no son la medicación de elección en pacientes asmáticos (Bartho et al., 2013).

GLUCOCORTICOIDES

Los glucocorticoides (GC) son importantes hormonas sin las cuales la mayoría de los organismos morirían. Quien relacionó por primera vez la enfermedad suprarrenal con la muerte fue Thomas Addison, en Londres, en 1855. Décadas después, observaciones en pacientes con las glándulas suprarrenales fuertemente dañadas (Enfermedad de Addison), animales adrenalectomizados y el uso de extractos adrenales, permitieron asociar los glucocorticoides a funciones vitales como el metabolismo de carbohidratos y el mantenimiento del balance electrolítico. Recién en el año 1947, la identificación de dos hormonas diferentes en extractos de corteza adrenal permitió asociar individualmente su función y darles nombre: glucocorticoides y mineralocorticoides, respectivamente.

Los GCs pertenecen a la familia de hormonas esteroideas, sintetizados en la zona fascicular de la corteza suprarrenal, cuya función primordial es mantener la homeostasis del organismo. Etimológicamente su nombre surge de combinar las palabras glucosa, corteza y esteroide, reflejando uno de sus principales efectos, el origen de su síntesis y la naturaleza química de su estructura. En los seres humanos los más importantes son el cortisol y la corticosterona (Fig. 1.5), siendo el cortisol el más abundante (Ashwell et al., 2000).

La síntesis y secreción de los GCs se encuentra regulada por la hormona ACTH, la cual a su vez es regulada por la CRH en lo que se conoce como el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HHA). Este eje, que involucra al hipotálamo, a la glándula hipófisis y a la corteza adrenal junto con el sistema simpático, conecta el cerebro con la periferia. En el hipotálamo, las neuronas hipofisiotrópicas reciben inervación central y en respuesta liberan CRH a la circulación portal-hipofisaria, la cual al unirse a sus receptores en las células corticotrópicas de la hipófisis anterior, estimula la síntesis y

liberación de ACTH por parte de las mismas. El eje se completa con la secreción de glucocorticoides en respuesta a la liberación de ACTH.

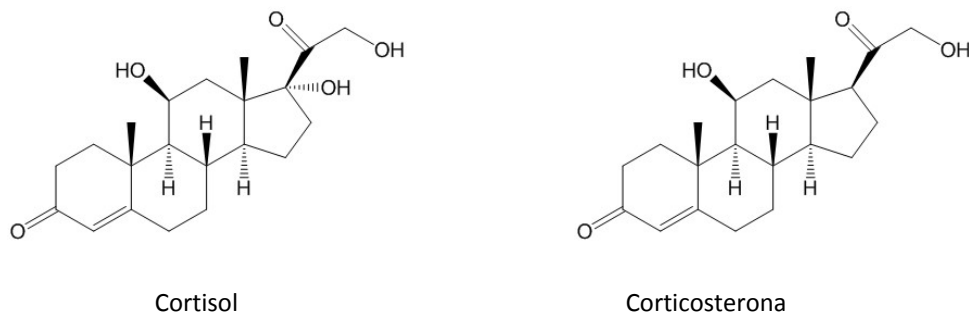


Figura 1.5: Estructura química de los principales glucocorticoides endógenos.

Los experimentos que se iniciaron con el Dr. Bernardo Houssay en el año 1931 y que culminaron con la identificación de la CRH en 1981, permitieron asociar el estrés al aumento de glucocorticoides a través del eje HHA (Houssay et al., 1931). En el año 1946 Hans Selye definió por primera vez el síndrome general de adaptación, y relacionó en este marco los estímulos estresantes con los glucocorticoides (Selye, 1946). Desde entonces, la secreción de glucocorticoides se conoce como una respuesta endocrina clásica del organismo frente al estrés. El eje HHA es activado principalmente en respuesta a estímulos estresantes, e inhibido por los niveles circulantes de glucocorticoides mediante retroalimentación negativa (*feedback*) sobre la hipófisis, el hipotálamo y el hipocampo. La liberación pulsátil de la ACTH, dada por el control circadiano generado en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo sobre la liberación de CRH, produce una liberación igualmente pulsátil de glucocorticoides, encargados de mantener la homeostasis y preparar el cuerpo para responder ante un estímulo estresante (Papadimitriou et al., 2009).

EL RECEPTOR A GLUCOCORTICOIDES

En la década del '50 se sabía que el hígado y el timo eran potenciales blancos para los GCs pero no fue sino hasta la década posterior donde se realizaron experimentos sobre sistemas aislados con concentraciones fisiológicas de GCs. En el

año 1957, Allan Munck publica su primer trabajo relacionado con los GCs. Diez años después, mediante experimentos de unión utilizando suspensiones concentradas de timocitos y esteroides radioactivos, se publica aparece el primer reporte del receptor a glucocorticoides (Munck et al., 1967).

El GR pertenece a la superfamilia de receptores nucleares, más específicamente, a la familia de receptores de esteroides, los cuales actúan como factores de transcripción una vez unidos a sus ligandos. Dentro de los receptores nucleares también es conocido como NR3C1, sigla que deriva de su nombre en inglés “nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1”. Codificado en el cromosoma 5, *locus* 5q31.3, su gen da origen a dos isoformas principales por empalme alternativo (Encio et al., 1991). El GR α , de 97KDa, es el clásico factor de transcripción activado por ligando mientras que el GR β , de 94KDa, se localiza en el núcleo, no se une a GCs y ejerce un efecto dominante negativo sobre la actividad transcripcional del GR α . Se cree que podría estar implicado en los fenómenos de resistencia a GCs (Oakley et al., 1997; Hamid et al., 1999; Oakley et al., 1999; Sousa et al., 2000). Adicionalmente, para el GR α se han descrito ocho isoformas acorde a ocho diferentes sitios de iniciación de la traducción (Lu et al., 2005). Aunque no fueron descritas para el GR β , se piensa que podrían existir puesto que ambos comparten los mismos sitios de iniciación alternativos (Chrousos et al., 2005). Otras isoformas menores incluyen GR γ , GR-A y GR-P (Oakley et al., 2013).

El GR α estructuralmente posee los tres dominios principales descritos para los receptores nucleares: el dominio N-terminal (NTD), el dominio central de unión al ADN (DBD) y el dominio C-terminal de unión al ligando (LBD). El dominio NTD contiene la región de activación de la transcripción (AF-1), importante en la interacción con moléculas necesarias para la iniciación de la transcripción (cofactores, coactivadores, moduladores, etc.) (Chrousos, 2004; Zhou et al., 2005; Duma et al., 2006). El dominio DBD, que contiene dos grupos de cuatro cisteínas, cada una de las cuales coordina un átomo de Zn²⁺. A través de este dominio, el GR se une a secuencias específicas del ADN denominadas elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE) (Zhou y Cidlowski, 2005; Duma et al., 2006). El dominio LBD contiene tres regiones principales: el bolsillo de hidrofóbico de unión al ligando, una segunda función de activación (AF-2) que

interactúa con correguladores y es dependiente de ligando, y la región de dimerización (Bledsoe et al., 2002; Zhou y Cidlowski, 2005; Duma et al., 2006). Entre el DBD y el LBD, el GR presenta una región bisagra (HR) flexible y entre esta y el DBD, se encuentran dos señales de localización nuclear (NL1 y NL2) importantes para la translocación nuclear (Fig. 1.6) (Picard et al., 1987; Savory et al., 1999).

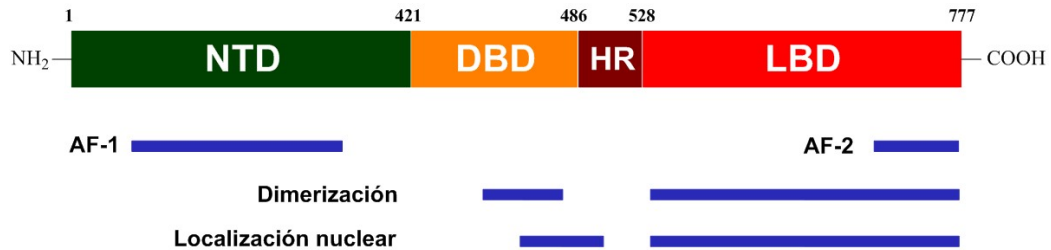


Figura 1.6: Estructura y dominios funcionales del GR (adaptado de Beck y col., 2009).

El GR ejerce sus efectos, principalmente, a través de la regulación génica. Los mecanismos genómicos dan cuenta de las acciones llevadas a cabo por los GCs que ocurren desde minutos hasta horas. Existen otros mecanismos no genómicos, por los cuales los GCs pueden ejercer efectos rápidos, en cuestión de segundos a minutos, y que no involucran la expresión de genes (Groeneweg et al., 2012; Samarasinghe et al., 2012). Aunque poco se sabe, en comparación con los efectos genómicos, los mecanismos no genómicos agregan complejidad y diversidad a los efectos de los GCs y su estudio contribuye a la comprensión global de sus efectos fisiológicos y farmacológicos (Hafezi-Moghadam et al., 2002; Karst et al., 2005; Olijslagers et al., 2008).

TRASLOCACIÓN NUCLEAR DEL GR

En ausencia de ligando el GR se encuentra predominantemente en el citoplasma, formando un complejo con múltiples proteínas. Entre estas destacan las chaperonas Hsp90, Hsp50 y Hsp70 y las inmunofilinas FKBP51 y FKBP52. En particular Hsp90 participa tanto en la unión del GR a su ligando como en la retención citoplasmática, al exponer el dominio LBD y enmascarar las señales de localización nuclear. Dada su naturaleza lipofílica, los GCs pueden atravesar la membrana plasmática, y en consecuencia, unirse a su receptor. La unión del GR a su ligando provoca un cambio conformacional en el mismo que conlleva a su disociación del complejo multiproteico, exponiendo las señales de localización nuclear y translocando rápidamente al núcleo en un proceso mediado por importinas (Brown et al., 1970; Pratt, 1993; Denny et al., 2000; Davies et al., 2002; Freedman et al., 2004; Terry et al., 2007). Una vez dentro del núcleo, el GR puede modular positiva o negativamente la transcripción génica. La finalización de la respuesta del GR comienza con la disociación de su ligando, lo cual disminuye su afinidad por el ADN. Sin embargo, el GR permanece en el núcleo por largo tiempo, sostenido por una señal de retención nuclear (NRS) para luego ser exportado. Tanto en el núcleo como en el citoplasma, el GR puede ser reciclado o bien degradado (Liu et al., 2000; Black et al., 2001; Holaska et al., 2002; Carrigan et al., 2007).

REGULACION GENICA: DIRECTA

El mecanismo de acción clásico a través del cual los GCs ejercen su actividad transcripcional es a través de la unión del GR al ADN, más específicamente, a elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE). Los GRE pueden ser simples, donde sólo se une el GR, o compuestos, donde se une el GR y uno o más cofactores u otros factores de transcripción. Las secuencias consenso son palíndromos imperfectos, hexaméricos e invertidos (5'-GGAACAnnnTGTCT-3') reconocidas por el GR como homodímero, en donde cada monómero se une a uno de los dos palíndromos (Schena et al., 1989; La

Baer et al., 1994; Rhen et al., 2005). Los GRE pueden diferir en los distintos promotores en secuencia, número de copias y localización relativa, afectando la especificidad y magnitud de la respuesta, lo cual permite una regulación diferencial de la expresión de sus genes (Lefstin et al., 1994; Lefstin et al., 1998).

La unión del GR a los sitios GRE produce cambios conformacionales en el receptor, lo que conduce al reclutamiento de correguladores y complejos remodelantes de cromatina, quienes modulan la actividad de la ARN polimerasa II y en consecuencia la transcripción génica. Entre estos se encuentran los coactivadores SRC 1-3, las histona-acetil transferasas CBP/p300 y otras como p/CAF, CARM1 o los complejos multiproteicos SWI/SNF o DRIP/TRAP, por nombrar algunos. Tanto la naturaleza del ligando como la secuencia GRE reconocida impactan en la unión de los cofactores. Como resultado de esto se produce la descondensación de la cromatina y se facilita la formación del complejo de iniciación de la transcripción (Beato et al., 1996; McKenna et al., 1999; McKenna et al., 1999; Auboeuf et al., 2002; McKenna et al., 2002; Meijssing et al., 2009; Ronacher et al., 2009).

La unión del GR al ADN no implica necesariamente un aumento en la transcripción génica. Por un lado existen reportes acerca de que la ocupación de GREs puede conducir a la represión génica, lo cual sugiere que el sentido de la transcripción estaría influenciado más por los factores, reguladores epigenéticos y moduladores de la cromatina que por la secuencia en sí misma (Uhlenhaut et al., 2013). Por otro lado, existen secuencias GRE negativas (nGRE) en cuyo caso la unión del GR media la represión de la transcripción. La secuencia nGRE consenso 5'-CTCC(n)₀₋₂GGAGA-3' difiere del GRE en que el espaciador va de 0 a 2 nucleótidos, lo cual impide la homodimerización del GR, uniéndose entonces a cada palíndromo como monómeros. Si bien abundan en el genoma, poco se sabe de la relevancia de los nGRE a la hora de reprimir genes (Surjit et al., 2011; Hudson et al., 2013).

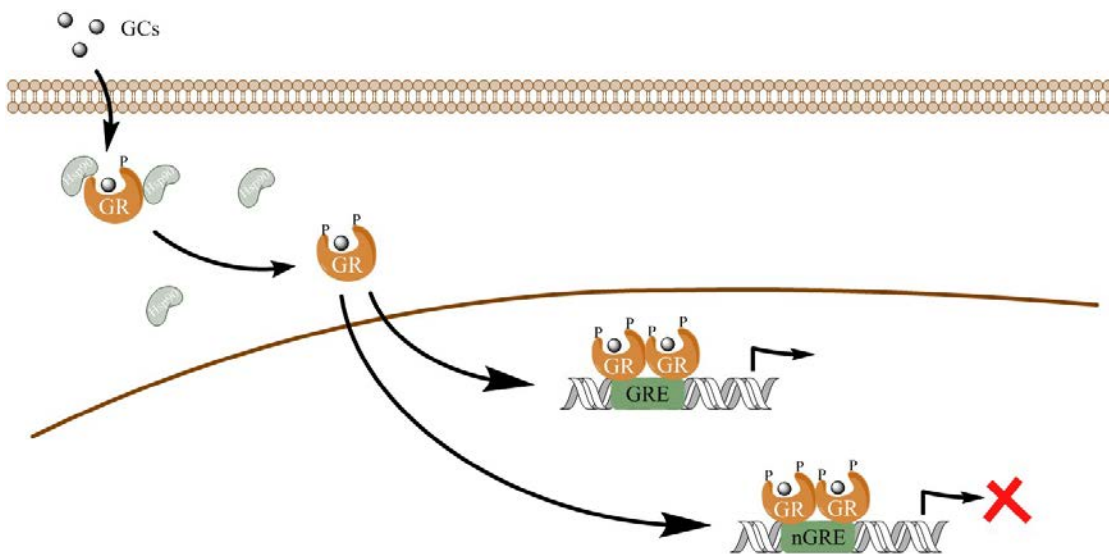


Figura 1.7: Regulación génica directa mediada por el GR (adaptado de Smoak y Cidlowski, 2004).

REGULACION GENICA: INTERACCION CON OTROS FACTORES

Además de interactuar directamente con el ADN, el GR puede modular la transcripción génica mediante interacciones con otros factores de transcripción. Estas interacciones pueden estar acompañadas (mecanismo compuesto) o no de la unión al ADN y pueden modular positiva o negativamente la transcripción (Fig. 1.8).

Para aquellas modulaciones donde hay un aumento en la transcripción de genes, se cree que el GR actuaría como un coactivador del factor de transcripción (Kassel et al., 2007). En cambio, en los casos de represión génica, el GR puede interactuar con diferentes moléculas que participen de este efecto, como por ejemplo, coactivadores que medien su modulación negativa, (Rogatsky et al., 2002; He et al., 2007), correpresores (Rogatsky et al., 2001), factores de remodelación de la cromatina (Burkhardt et al., 2005; Bilodeau et al., 2006) e histona deacetilasas (HDACs) (Ito et al., 2000; Ito et al., 2001; Islam et al., 2008), a lo cual se debe sumar el secuestro de coactivadores (Ogawa et al., 2005).

El ejemplo clásico de interacción entre el GR y factores de transcripción lo representa la represión de los factores pro-inflamatorios AP1 y NF- κ B, principalmente por un mecanismo compuesto y en menor medida independiente del ADN, que resulta el principal mecanismo del efecto anti-inflamatorio e inmunosupresor de los GCs (Necela et al., 2004; Newton et al., 2007). Otros ejemplos incluyen a los miembros de la familia STAT, en cuyo caso la asociación del GR con estos factores en conjunto con el ADN e independiente de este, resulta en un aumento de su actividad transcripcional y otros como CREB, NFAT, IRF3 o GATA-3, en el cual la interferencia es negativa (Rogatsky et al., 2006; De Bosscher et al., 2009). En todos los casos, tanto el sentido de la modulación como el mecanismo pueden depender del tipo y del contexto celular (Kassel y Herrlich, 2007).

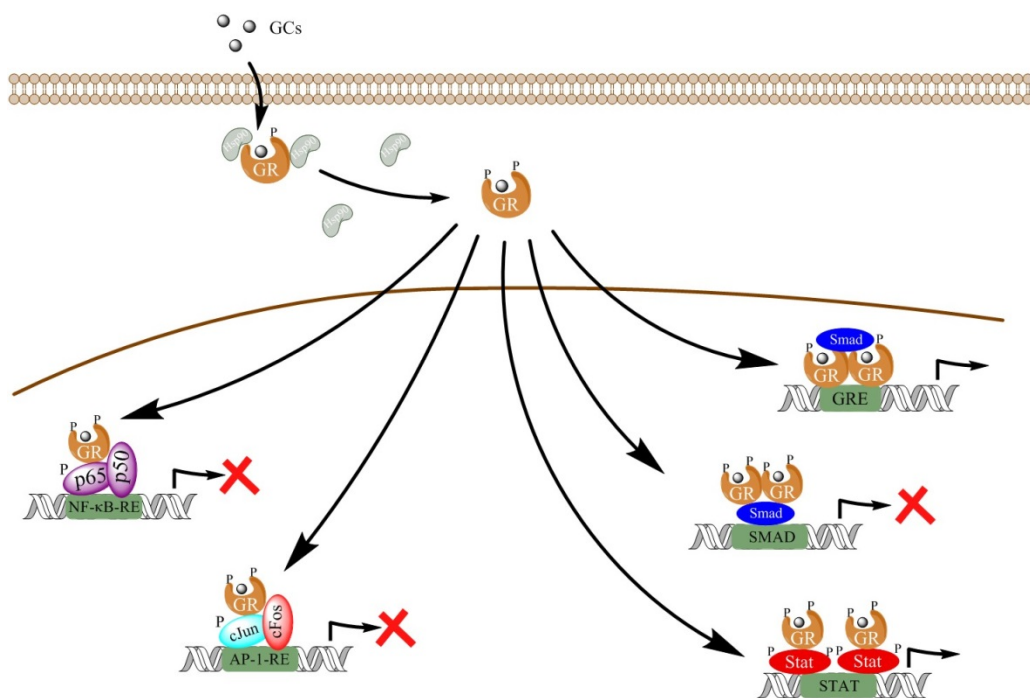


Figura 1.8: Regulación génica mediada por el GR a través de la interacción con otros factores de transcripción (adaptado de Smoak y Cidlowski, 2004).

MODIFICACIONES POST TRADUCCIONALES

Existen múltiples mecanismos mediante los cuales la célula puede afectar la sensibilidad y especificidad de respuesta a los GCs. Las modificaciones post traduccionales del GR representan una de las formas más importantes para modular su actividad, permitiendo expandir el repertorio de respuestas, afectando su estabilidad, su localización intracelular, y sus interacciones con otras proteínas, dando cuenta de la complejidad de su señalización. El GR puede sufrir procesos de fosforilación, sumoilación, ubiquitinación, acetilación y metilación principalmente (Duma et al., 2006).

La fosforilación del GR puede ocurrir en numerosos sitios de su dominio NTD. En el humano existen descritas seis serinas blanco de dicha modificación: S113, S141, S203, S211, S226 y S404. Mediante la fosforilación se puede afectar su estabilidad y metabolismo, su distribución intracelular, su interacción con otras proteínas, su especificidad por promotores en el ADN, su interacción con cofactores nucleares, así como también, la magnitud y duración de una respuesta (Orti et al., 1993; Ismaili et al., 2004). Numerosos reportes muestran la selectividad diferencial que presenta el GR fosforilado hacia diferentes promotores (Webster et al., 1997; Chen et al., 2008; Galliher-Beckley et al., 2008). Un ejemplo que documenta esto es el caso de los promotores regulados por sitios GRE, de los genes GILZ (glucocorticoid-induced leucine zipper) y TAT (tirosina aminotransferasa), en donde se ha observado un mayor reclutamiento hacia el ADN en las formas del GR fosforiladas en S211 o S226 (Blind et al., 2008). A su vez, la fosforilación del GR puede afectar otras modificaciones post traduccionales incluyendo fosforilaciones en otros sitios, sumoilación y ubiquitinación (Arango-Lievano et al., 2015).

Las principales kinasas capaces de fosforilar al GR incluyen a p34CDC28, p38 (MAPK), CDK5, GSK-3 β y JNK (Nicolaidis et al., 2010). Particularmente para JNK se ha descrito que la fosforilación del GR murino ocurre en el residuo S246 (que es equivalente al S226 humano) produciendo en consecuencia una disminución en su

actividad transcripcional (Rogatsky et al., 1998). Por otra parte se ha observado un aumento en la exportación nuclear dependiente de JNK que podría justificar tales observaciones (Itoh et al., 2002). Finalmente, podemos decir que la fosforilación del GR es un proceso dinámico, que incluye quinasas y fosfatasas, que puede depender o no de la unión a ligando pero que en última instancia depende del estado fisiológico de la célula (Zhou y Cidlowski, 2005).

INFLAMACIÓN Y GLUCOCORTICOIDES

Los efectos antiinflamatorios de los GCs fueron descritos por primera vez en el año 1949. Philip Hench y Edward Kendall inyectaron GCs a pacientes con artritis reumatoidea severa para probar los efectos benéficos de los mismos sobre la inflamación (Hench et al., 1949). Al año siguiente obtuvieron, junto con Tadeus Riechstein, el premio Nobel en medicina y fisiología. Este espectacular descubrimiento se tradujo en la obtención de cortisona en grandes cantidades, con el fin de satisfacer las demandas clínicas, y a lo largo de la década siguiente realizando modificaciones químicas se sintetizaron numerosos análogos de GC que hasta el día de hoy continúan teniendo utilidad terapéutica: prednisolona, triamcinolona, dexametasona, entre otras (Katz et al., 2008).

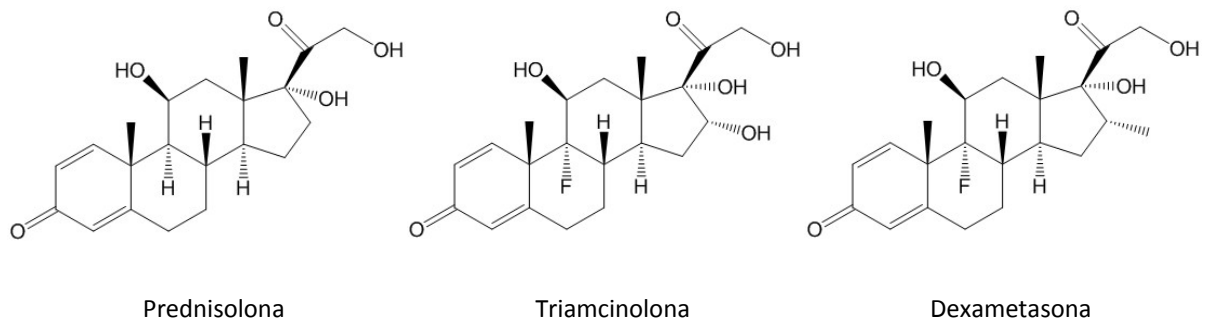


Figura 1.9: Estructura química de los principales glucocorticoides sintéticos utilizados en la clínica.

Según un reporte de la Organización Mundial de la Salud (Ficha Técnica N° 307, 2007), se estima que cerca de 300 millones de personas sufren de asma y 210 millones de Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), lo cual transforma a la inflamación y las enfermedades relacionadas en uno de los mayores desafíos que enfrenta la medicina actual. Desde su descubrimiento, los GCs fueron el principal tratamiento para diversos desordenes de tipo inflamatorio: artritis reumatoidea, asma,

esclerosis múltiple, y muchas otras, y aun, hoy en día, su utilidad como antiinflamatorios e inmunosupresores los transforma en fármacos irremplazables. Sin embargo, numerosos efectos adversos, reconocidos desde un principio, acompañan los efectos benéficos, limitando su uso y motorizando la optimización y la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas para combatir estas enfermedades (De Bosscher y Haegeman, 2009).

EL PROCESO INFLAMATORIO

La inflamación es un proceso inicialmente benéfico, que se produce en respuesta a una noxa o a un daño intracelular, cuya función es remover la injuria y restaurar la estructura y función tisular. Numerosos agentes o situaciones pueden desencadenar respuestas inflamatorias, por ejemplo, injurias físicas, daño tisular, infecciones o reacciones autoinmunes. En respuesta se sintetizan y liberan numerosos mediadores inflamatorios que disparan y sostienen el proceso actuando sobre la vasculatura promoviendo vasodilatación, aumento en la permeabilidad capilar, extravasación de plasma y finalmente, infiltración y activación de leucocitos en el tejido inflamado. La remoción de la agresión y los mecanismos homeostáticos antiinflamatorios desencadenados permiten la limitación y resolución de la respuesta inflamatoria (Rhen y Cidlowski, 2005).

A nivel molecular, numerosos mediadores son responsables de la propagación y el progreso de la inflamación. Entre estos se encuentran citoquinas, como TNF α , IL-6 o GM-CSF, quemoquinas, como IL-8 o RANTES, enzimas, como iNOS, COX-2 o fosfolipasa A₂, y moléculas de adhesión, como ICAM-1, VCAM-1, Selectina E o Selectina P. La síntesis y liberación de estas moléculas se produce en respuesta a estímulos inflamatorios, entre los cuales se encuentran el lipopolisacárido bacteriano (LPS), los factores virales o las citoquinas TNF- α o IL-1 β . La unión de estas moléculas a sus receptores produce la activación de factores de transcripción, principalmente, NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) y AP-

1 (proteína activadora 1) quienes estimulan la expresión de los mediadores proinflamatorios mencionados, propagando la inflamación (Beck et al., 2009).

NF- κ B es un factor de transcripción cuya familia se compone de cinco miembros: p65 (RelA), RelB, c-Rel, NF- κ B1 (p50/p105) y NF- κ B2 (p52/p100). Todos pueden formar homo- o heterodímeros. En la vía canónica de activación de NF- κ B, la unión del TNF- α a su receptor desencadena la activación del dímero p65-p50, el cual se libera de su inhibidor citoplasmático I- κ B y transloca al núcleo mediado por su señal de localización nuclear. La unión y el reconocimiento de promotores específicos se traducen en un aumento en la expresión de genes inflamatorios (Barnes et al., 1998; Hayden et al., 2008).

EL GR Y LA INFLAMACIÓN

Los GCs ejercen sus efectos antiinflamatorios principalmente a través de la unión al GR y la modulación de la expresión génica. Una vez activado, el GR puede regular positivamente la expresión de genes antiinflamatorios (transactivación), o bien, regular negativamente los genes proinflamatorios (transrepresión). Trabajos recientes sugieren efectos rápidos sobre la inflamación, que no estarían mediados por cambios en la expresión de genes. Sin embargo, queda mucho por dilucidar en relación al papel de estos mecanismos en su acción antiinflamatoria (Rhen y Cidlowski, 2005).

La transactivación de genes antiinflamatorios resulta necesaria para ejecutar una respuesta antiinflamatoria completa (Tuckermann et al., 1999; Tuckermann et al., 2007; Kleiman et al., 2012; Vandevyver et al., 2012). Numerosos genes son los inducidos por los GCs en este sentido, entre los cuales se encuentran I- κ B, GILZ, DUSP-1, Anexina-1, SLPI, IL-10, Dexras1, DOK-1, SLAP, CC10 y TTP (Clark, 2007; Newton y Holden, 2007). La MAPK fosfatasa 1 (MKP-1 o DUSP-1) es una de las proteínas antiinflamatorias más potentes inducidas por el GR, cuya importancia radica en la defosforilación de MAPKs, las cuales intervienen en la activación de factores proinflamatorios, tales como NF- κ B y

AP-1. GILZ (glucocorticoid-induced leucine zipper) es un gen con importantes propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras y cuya inducción se relaciona con los efectos de los GCs sobre las cascadas de activación de las MAPKs y sobre la activación de NF- κ B y AP-1. Una gran cantidad de publicaciones científicas muestran la importancia particular de los genes MKP-1 y GILZ en relación a los efectos antiinflamatorios del GR y dos trabajos recientemente publicados recogen sus conclusiones y analizan su función (Ayroldi et al., 2012; Vandevyver et al., 2013).

La transrepresión de genes proinflamatorios ocurre a través de la interferencia del GR con factores de transcripción proinflamatorios, como ser NF- κ B, AP-1, CREB, Tbt-1, GATA-3, e IRF-3, entre otros, conduciendo a una reducción en la síntesis de numerosos mediadores proinflamatorios: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, COX-2, Selectina E, iNOS, IFN γ , TNF α , ICAM, MCP-1, VCAM, etc. (Smoak et al., 2004; Ogawa et al., 2005; Reily et al., 2006). El éxito clínico de los GCs como antiinflamatorios se relaciona históricamente con su capacidad para inhibir estos factores, principalmente NF- κ B y AP-1 (Rhen y Cidlowski, 2005; Barnes, 2006; Newton y Holden, 2007). Tal es así que la regulación negativa se ha transformado en un paradigma para estudiar los efectos antiinflamatorios del GR y dentro de ella, los mecanismos de interferencia más estudiados son los del GR con NF- κ B y AP-1 (Schacke et al., 2005; Newton et al., 2007; De Bosscher et al., 2010; Glass et al., 2010).

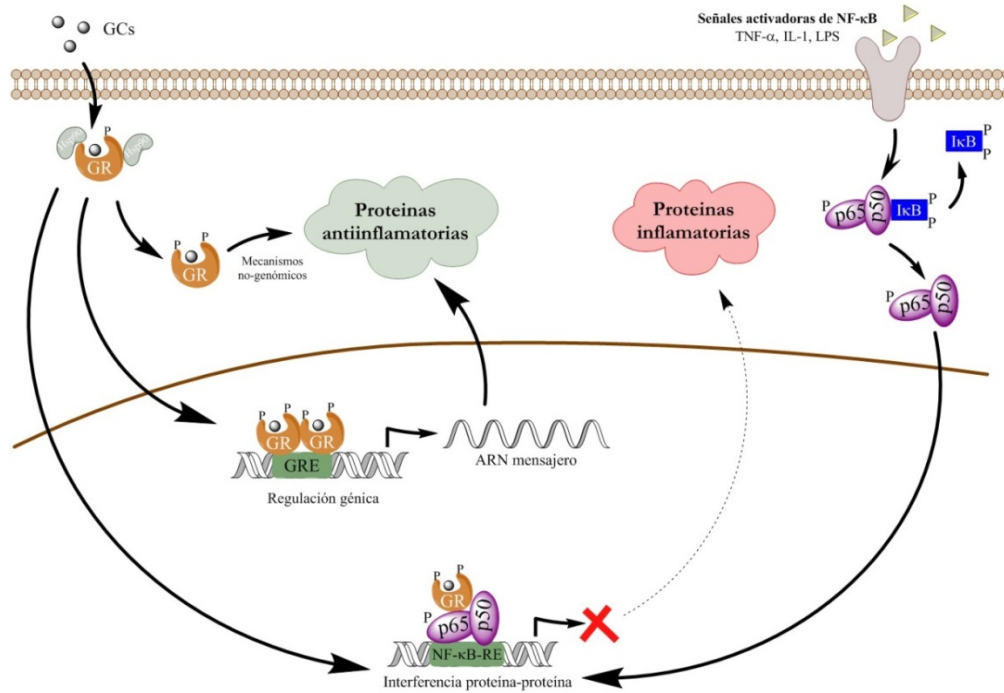


Figura 1.10: Mecanismo de acción antiinflamatorio de los glucocorticoides (adaptado de Rhen y Cidlowski, 2005).

En particular, el antagonismo del GR sobre NF-κB se puede producir de cuatro formas distintas: por interacción física, por inducción de su inhibidor I-κB, por interferencia con la maquinaria basal de la transcripción, o bien, a través de modificaciones de histonas o remodelado de la cromatina (Fig. 1.2). Entre los genes reprimidos por el GR de esta forma se encuentran la interleuquina 8 (IL-8), una quemoquina humana prototipo, cuyos niveles aumentan rápidamente frente a TNFα o IL-1β, LPS y productos virales y en cuya activación intervienen NF-κB y las MAPKs (Hoffmann et al., 2002); la ciclooxygenasa 2 (COX-2), una enzima inducible frente a estímulos inflamatorios diversos, esencial en la producción de prostaglandinas, las cuales tienen un papel central en la inflamación (Tanabe et al., 2002; Bos et al., 2004); y el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), una glicoproteína que promueve la producción de neutrófilos, eosinófilos, basófilos y monocitos a partir de sus precursores inmaduros, cuyo gen es reprimido por el GR mediante la desacetilación de histonas (Ito et al., 2000).

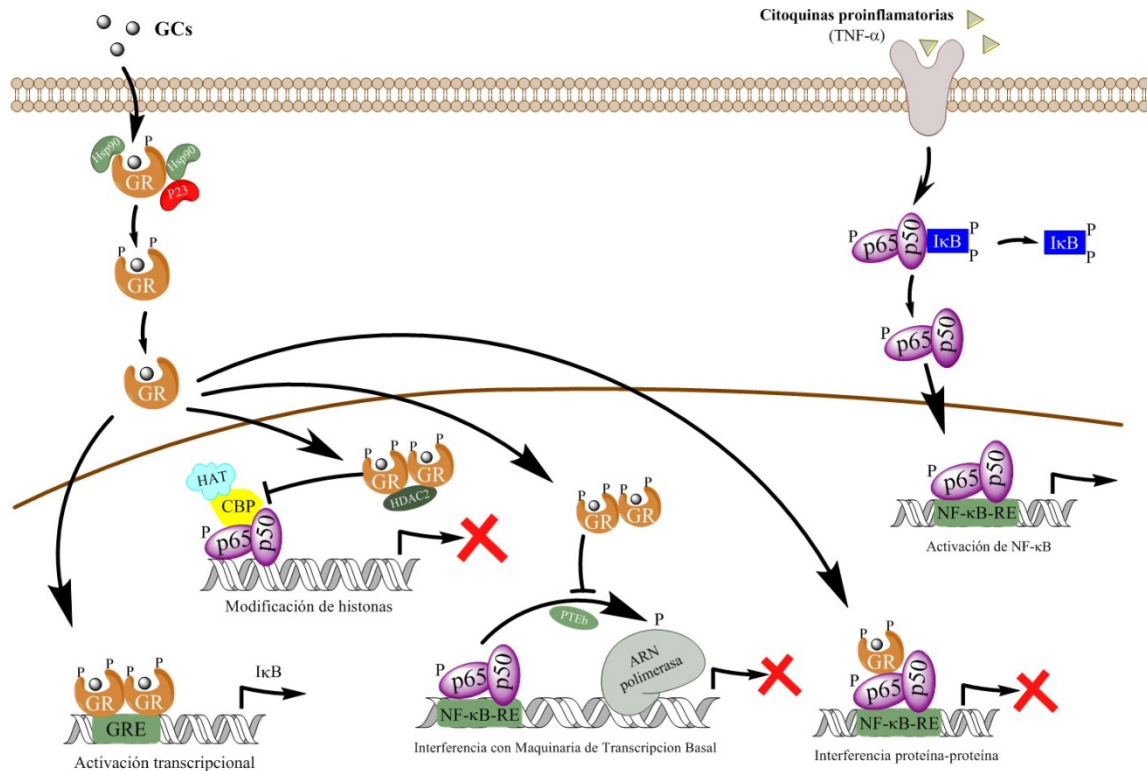


Figura 1.11: Represión sobre la señalización de NF-κB mediada por el GR (adaptado de Smoak y Cidlowski, 2004).

TRANSACTIVACIÓN VS. TRANSREPRESIÓN

Existe una hipótesis generalizada por la cual el efecto antiinflamatorio de los glucocorticoides está principalmente determinado por la transrepresión del GR sobre factores de transcripción, mientras que sus efectos adversos tienen su origen en la transactivación de genes. Esto se deriva del hecho de que diversas enzimas involucradas en el metabolismo de la glucosa, entre ellas la TAT (tirosina aminotransferasa) y PEPCK (fosfoenolpiruvato carboxikinasa) son moduladas por el GR a través de la transactivación de sus genes, lo cual da cuenta de los efectos diabotogénicos de los GCs (Clark, 2007). Por otro lado, experimentos con ratones *knock in* para una variante del GR mutada en la alanina 458 por treonina (GR^{dim}) mostraron que la dexametasona induce pobremente los genes de TAT y PEPCK pero conserva su capacidad de

transreprimir genes inflamatorios clásicos (Reichardt et al., 1998; Tuckermann et al., 1999; Reichardt et al., 2001) . En este marco, las investigaciones se orientaron hacia la búsqueda de la disociación de los efectos de transactivación y transrepresión de los GCs, lo cual condujo a la identificación de los GCs “disociados”.

Desafortunadamente, el desarrollo de compuestos inicialmente promisorios se vio frenado por la aparición de efectos adversos a nivel óseo y sólo dos compuestos se han evaluado en ensayos clínicos para aplicaciones tópicas (Baschant et al., 2012). Esto probablemente se deba a la importancia de los procesos de transactivación de genes en la resolución de la inflamación. La continua identificación de nuevos genes dependientes de sitios GRE con propiedades antiinflamatorias, da cuenta de la importancia de la transactivación de genes en estos procesos. La inducción por los GCs de los genes MKP1 y GILZ interfieren con vías de señalización proinflamatorias, la inducción de I- κ B y GILZ tienen efecto inhibitorio sobre NF- κ B, la inducción de MKP1 contribuye a la inhibición de AP-1, a lo cual debe sumarse la inducción de numerosos mediadores antiinflamatorios. Por su parte, los ratones *knock in* para el GR^{dim} aún sufren ciertos efectos adversos de los GCs (presentan formación ósea y diferenciación de osteoblastos reducida y atrofia muscular), lo cual evidencia que también a través de la transrepresión ocurren importantes efectos adversos. En relación a esto, existen numerosas y crecientes evidencias que muestran que los procesos de transactivación y transrepresión de genes involucran tanto a los efectos antiinflamatorios como a los indeseados (Vandevyver et al., 2013).

La aparición del tamoxifeno, un esteroide sintético con selectividad tisular (antiestrogénica en la mama y estrogénica en el útero), abrió las puertas hacia la búsqueda de ligandos capaces de modular selectivamente la actividad de los receptores nucleares. En particular para el GR, la búsqueda de este tipo de ligandos, los moduladores selectivos del receptor a glucocorticoides (SEGRMs), se orienta hacia compuestos que modulen selectivamente genes relacionados con la inflamación y que afecten en menor medida aquellos relacionados con los efectos adversos, lo cual representa actualmente un campo de intensa investigación (Sundahl et al., 2015).

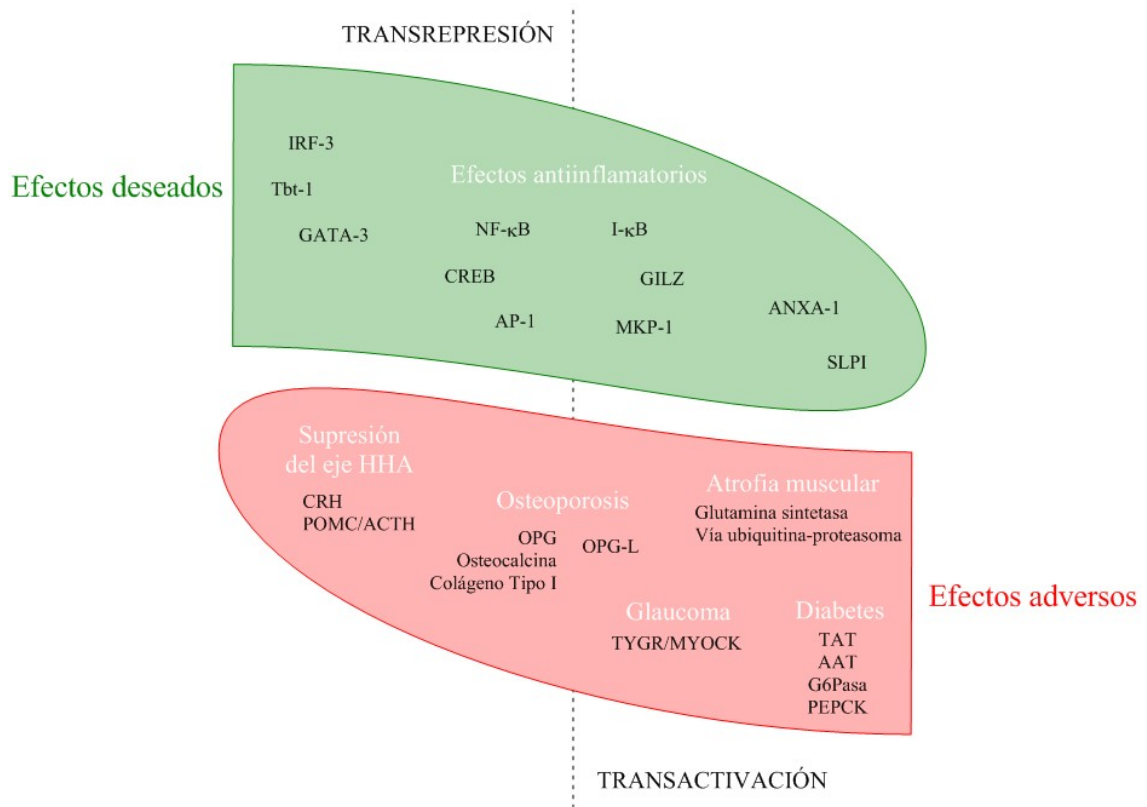


Figura 1.12: La transactivación y la transrepresión de genes como mecanismos moleculares de los efectos deseados y adversos de los glucocorticoides.

RESPUESTA CRUZADA

La habilidad de una célula para responder a estímulos externos e internos es una propiedad vital. Continuamente, cada célula de un organismo multicelular recibe una vasta cantidad de mensajes, los cuales son integrados a través de un número limitado de vías de señalización para producir respuestas celulares complejas. Estas vías no transmiten simplemente los mensajes, sino que los procesan y codifican. Esto refleja la sorprendente capacidad de los sistemas biológicos para detectar estímulos y adaptar su maquinaria bioquímica frente a un amplio espectro de situaciones con el objeto de mantener la homeostasis. Dicha característica obliga a concebir la comunicación celular como una red compleja de interacciones a partir de sus componentes simples (Bernabo et al., 2014).

La imagen clásica de vías de señalización lineales y discretas ha sido reemplazada por una que implica una gran cantidad de redes interconectadas, dando lugar a una concepción de la comunicación celular holística en lugar de reduccionista. Sin embargo, no todas las interacciones poseen relevancia biológica, y mucho menos clínica. En este sentido, desde un punto de vista farmacológico, es deseable investigar la respuesta cruzada entre vías de señalización que den lugar a nuevas formas de entender las patologías y las terapias (Yoshikawa et al., 2013).

Una amplia cantidad de trabajos documentan la respuesta cruzada entre diversas vías de señalización y receptores a esteroides. Una de las primeras evidencias surgió de los efectos de análogos del AMP cíclico sobre el receptor de progesterona (Beyer et al., 1981). En lo que concierne al GR, muchos estudios muestran que su actividad puede ser modulada por diferentes vías de señalización, sin embargo, existen en comparación pocos estudios que reporten a nivel molecular la interacción del GR con la señalización de GPCRs. En relación a esto se ha descrito la modulación cruzada del GR con el receptor β 2-adrenérgico, el receptor a somatostatina y el receptor a

melatonina. Se observó que la adrenalina y nor-adrenalina, actuando sobre el receptor β_2 -adrenérgico, aumentan la actividad del GR a través de un mecanismo independiente de su efector clásico PKA, pero dependiente de las subunidades $G\beta\gamma$, de PI3K y de PKB (Schmidt et al., 2001). Por su parte, la somatostatina suprime la actividad del GR a través del dímero $G\beta\gamma$, siendo la subunidad $G\beta$ capaz de unirse al GR, translocar al núcleo con él y suprimir su actividad transcripcional (Kino et al., 2005). Finalmente, se ha descrito que la melatonina suprime la actividad transcripcional del GR a través de la subunidad $G\alpha_i$ acoplada a su receptor MT1 (Kiefer et al., 2005), inhibe la síntesis de su ARN mensajero (Sainz et al., 1999), previene la apoptosis inducida por glucocorticoides (Hojman et al., 2004), impide su translocación nuclear bloqueando la disociación de este con la chaperona Hsp-90 (Presman et al., 2006), y afecta su interacción con el coactivador TIF-2 inhibiendo la inducción de genes reporteros (Presman et al., 2012). También se ha descrito que los GPCR huérfanos, GPR30 y GPR50, modulan la actividad del GR, el primero inhibiendo la expresión del coactivador TIF-2 y el segundo interactuando con el coactivador TIP-60 (Ylikomi et al., 2004; Li et al., 2011).

En lo que respecta al H1R y al GR, se ha descrito que la dexametasona inhibe la producción de inosítoles inducida por histamina (Hardy et al., 1996), y que regula negativamente la expresión del H1R (Karlstedt et al., 1999). Sorprendentemente, aunque ambos receptores se encuentran involucrados en procesos comunes importantes (como la inflamación o la alergia), más allá de estos dos reportes no existen estudios que documenten la modulación entre la actividad del GR y la señalización del receptor H1 a histamina.

INFLAMACIÓN Y COTRATAMIENTO

Existen numerosas situaciones donde un corticoide es coadministrado con un antihistamínico para el tratamiento de síntomas o enfermedades inflamatorias, lo cual se sustenta más bien en la práctica clínica que en evidencias racionales o mecánicas. Actualmente existen formulaciones comerciales que presentan la asociación de ambas

drogas, como por ejemplo dexametasona + clorfeniramina (Dexalergin[®]), betametasona + loratadina (Histamino Corteroid L[®]) y fluticasona + azelastina (Dymista[®]). Un caso típico lo representa la rinitis alérgica, cuyo tratamiento consiste en la combinación de corticoides con antihistamínicos cuando no hay una progresión favorable de la patología o cuando no se logra controlar los síntomas (Bousquet et al., 2008; Scadding et al., 2008). No obstante, un estudio de 2011 muestra que dicha combinación resulta la opción más utilizada en la práctica clínica para tratar todos los tipos de rinitis alérgica (Navarro et al., 2011). Consecuentemente, tres asociaciones han sido recientemente patentadas conteniendo el antihistamínico azelastina y los corticoides mometasona, ciclesonida o fluticasona (Wolthers, 2013).

Por otra parte, la dermatitis atópica, una enfermedad cutánea inflamatoria crónica, se trata ampliamente con corticoides de administración tópica, los cuales poseen efectos adversos que motivan la búsqueda de nuevas estrategias. En este sentido, los antihistamínicos se han usado en conjunto con corticoides para tratar la dermatitis atópica aunque poco se sabe de su utilidad y/o de su potencial interacción (Hoare et al., 2000). En relación a esto, los efectos sinérgicos de ambos ligandos han sido evaluados en un modelo animal en el que se concluyó que la combinación resulta muy útil para su tratamiento aunque no se investigó el mecanismo molecular subyacente (Kagawa et al., 2010).

La profundización del conocimiento de la interacción entre el GR y la señalización del H1R permitirá aportar la base racional para las terapias actuales en las que se usan ligandos de ambos sistemas, permitiendo también, diseñar nuevas estrategias para tratar enfermedades inflamatorias para las cuales se justifique el cotratamiento. En este sentido, el asma es una enfermedad de tipo inflamatoria, para la cual los corticoides representan la terapia más efectiva (Barnes, 2006). Sin embargo, la existencia de efectos adversos importantes así como de poblaciones asmáticas incapaces de controlar sus síntomas lleva a la necesidad y a la búsqueda permanente de nuevas estrategias terapéuticas (Olin et al., 2014). Por su parte, los antihistamínicos representan un enigma para los investigadores respecto al tratamiento del asma. Por

un lado la histamina se encuentra indudablemente relacionada al desarrollo de la enfermedad, desde su identificación en 1910 como un potente agente constrictor del musculo liso de las vías aéreas. La histamina incrementa la permeabilidad vascular, es quemoattractante de eosinófilos y neutrófilos y moduladora inmunológica y resulta un mediador clave en la relación entre un alérgeno, la inmunoglobulina E, los mastocitos y el asma, encontrándose aumentada en las vías aéreas de pacientes asmáticos (Casale et al., 1987; Broide et al., 1991; Brightling et al., 2002; Ashikaga et al., 2006). Sin embargo, pese a la abundancia de información preclínica que avala el papel de la histamina en el asma, existe una falta de eficacia por parte de los antihistamínicos para controlar sus síntomas. Numerosos estudios clínicos muestran que los antihistamínicos no permiten controlar el asma en adultos (Van Ganse et al., 1997), independientemente de que en algunos se alcance una mejora, aunque a dosis mucho mayores que las convencionales (Nelson, 2003).

En vista de esto, nos propusimos estudiar la regulación de la actividad del sistema glucocorticoide por parte de los ligandos de los receptores H1 ahondando en los mecanismos moleculares de interacción entre ambos sistemas. Considerando el uso difundido de la asociación de estos fármacos para el tratamiento de diversas situaciones patológicas, los resultados de este trabajo pretenden aportar racionalidad al cotratamiento, dado que los efectos de su interacción deben ser necesariamente tenidos en cuenta. En este contexto, la modulación descrita podría resultar en un efecto sinérgico útil que justifique racionalmente la combinación de un antihistamínico y un corticoide. En este caso particular, los fenómenos de sinergismo podrían conllevar una ventaja terapéutica al reforzar la acción de la droga, y en situaciones donde el tratamiento con corticoides presenta numerosos efectos adversos, permitir reducir las dosis del mismo y minimizar tales efectos sin comprometer la eficacia del tratamiento.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Teniendo en cuenta los antecedentes descriptos puede hipotetizarse que los **ligandos del sistema histaminérgico, actuando a través del receptor H1 a histamina, son capaces de modular la actividad del receptor a glucocorticoides**. El estudio de este proceso es el objetivo del presente proyecto.

OBJETIVOS

- **OBJETIVO 1:** Evaluar la modulación de la actividad del receptor a glucocorticoides por parte de los ligandos del receptor H1 a histamina, estudiando los procesos de transactivación, sobre un promotor artificial, y de transrepresión, midiendo la actividad de NF- κ B.
- **OBJETIVO 2:** Estudiar a que nivel de las diferentes vías de transducción activadas por los ligandos del receptor H1 se da la modulación de la actividad transcripcional del GR.
- **OBJETIVO 3:** Evaluar la modulación de la actividad del receptor a glucocorticoides por parte del receptor H1 a histamina, en sistemas fisiológica y/o fisiopatológicamente relevantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

LÍNEAS CELULARES

CÉLULAS HEK-293T, HeLa y A549

Las células HEK-293T (derivadas de riñón embrionario humano, ATCC # CRL-1573), HeLa (derivadas de cáncer cérvico-uterino humano, ATCC # CCL-2) y A549 (derivadas de epitelio pulmonar humano, ATCC # CCL-185) fueron crecidas adheridas en estufa con atmósfera humidificada, conteniendo 5% CO₂, a 37°C, en medio DMEM (Dulbeco's modified Eagle's medium) suplementado con 10% de SFB y 50µg/ml de gentamicina. Las células fueron subcultivadas mediante el agregado de una solución 0,05% de tripsina y 0,3mM de EDTA.

CÉLULAS U937

Las células U937 (derivadas de un linfoma histiocítico humano, ATCC # CRL-1593.2) fueron crecidas en suspensión en estufa con atmósfera humidificada con 5% CO₂, a 37°C, en medio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium) suplementado con 10% de SFB y 50µg/ml de gentamicina y mantenidas a una densidad de 2.10^5 - $1,5.10^6$ células/ml.

PREPARACIÓN DE PLÁSMIDOS

OBTENCIÓN DE PLÁSMIDOS

Para la obtención de plásmidos con los distintos insertos, bacterias *E. Coli* XL1-Blue transformadas con las distintas construcciones fueron crecidas durante toda la noche (ON) a 37°C en 30ml de medio LB (bacto-triptona 5g/l, extracto de levadura 10 g/l, NaCl 10g/l) suplementado con ampicilina (todos los vectores utilizados contienen el gen de resistencia a este antibiótico). Las bacterias se recolectaron por centrifugación a 4000 rpm durante 15 min y se resuspendieron en 4ml de buffer P1 (Tris-HCl 50mM, pH 8; EDTA 10mM; 100µg/ml de RNasa A). Las bacterias fueron lisadas por agregado de 4ml

de buffer P2 (NaOH 200mM; 1% SDS) y la preparación fue mezclada por inversión. Se incubó 5 min a temperatura ambiente, agregándose posteriormente 4ml de buffer P3 (acetato de potasio 3M, pH 5,5). Luego de incubar 15 min a 0°C, se centrifugó a 10000rpm durante 30 min a 4°C y el sobrenadante conteniendo los plásmidos fue sembrado en una columna de QUIAGEN-TIP previamente equilibrada con 4 ml de buffer QBT (NaCl 750mM; MOPS 50mM, pH 7; 15% isopropanol; 0,15% Triton X-100). La columna fue lavada dos veces con 10 ml de buffer QC (NaCl 1 M; MOPS 50 mM, pH 7; 15% isopropanol) y el ADN plasmídico fue eluído con 5ml de buffer QF (NaCl 1,25 M; Tris-HCl 50 mM, pH 8,5; 15% isopropanol). Luego, fue precipitado por adición de 0,7 volúmenes de isopropanol a temperatura ambiente y posterior centrifugación a 13000 g durante 30 min a 4°C. El precipitado se lavó con 70% de etanol y se resuspendió en 50µl de buffer TE (Tris-HCl 10mM, pH 8; EDTA 1mM).

Los plásmidos así obtenidos fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 0,8% en buffer TAE (Tris-acetato 0,4M, pH 8; EDTA 1mM) y teñidos con una solución de bromuro de etidio 1µg/ml para su posterior visualización por fluorescencia a la luz U.V. (300nm).

Para el análisis de los clones positivos luego de cada ensayo de ligación, los plásmidos fueron purificados en forma parcial, realizando las siguientes modificaciones al protocolo descrito anteriormente: las bacterias fueron crecidas ON en 1ml de LB con ampicilina, y luego de la incubación con el buffer P3, la solución fue centrifugada en las mismas condiciones, y el ADN plasmídico del sobrenadante fue precipitado mediante el agregado de 0,7 volúmenes de isopropanol.

CONSTRUCCIONES UTILIZADAS

Para la realización del proyecto se utilizarán plásmidos actualmente en nuestro poder con sus insertos previamente clonados por nosotros o donados por otros laboratorios.

Plásmido	Origen
TAT3-Luc	Dr. C.P. Fitzsimons Faculteit der Natuurwetenschappen, Wiskunde en Informatics SILS, Amsterdam, The Netherlands.
MMTV-Luc	Dr. Adalí Pecci, IFIBYNE, CONICET, UBA.
pRSV-GR	Dr. Adalí Pecci, IFIBYNE, CONICET, UBA.
pCDNA3-HA-GR-S246A	Dr. Marija Krstic-Demonacos. Molecular Medicine. University of Salford, Manchester, UK.
pCEFL-H1R	Clonado en nuestro laboratorio.
pCEFL-G α transducina	Dr. JS Gutkind. Oral and Pharyngeal Cancer Branch, NIH/NIDCR, Bethesda Md, USA.
p(IL6 κ B)350hu.IL6P- luc+	Prof. dr. Karolien De Bosscher. VIB Department of Medical Protein Research, University of Gent, Belgium.
(wt)3-Kb-Luc+	Dr. Adalí Pecci, IFIBYNE, CONICET, UBA.
pCEFL-RelA	Dr. Adalí Pecci, IFIBYNE, CONICET, UBA.
pCMV-Bsd-Gbeta1	Dr. Tomoshige Kino. DeCherney Lab - Section on Implantation and Oocyte Physiology. NIH. Bethesda Md, USA.

pCDNA4-HisMax-Gbeta2	Dr. Tomoshige Kino. DeCherney Lab - Section on Implantation and Oocyte Physiology. NIH. Bethesda Md, USA.
pEGFP-C1-Ggamma2	Dr. Tomoshige Kino. DeCherney Lab - Section on Implantation and Oocyte Physiology. NIH. Bethesda Maryland, USA.
pENTRY-YFP-Ggamma5	Dr. N Gautam, Anesthesiology and Genetics Dpt, Washington University School of Medicine St. Louis, MO, USA.
pcDNA3-1-YFP-Ggamma11	Dr. N Gautam, Anesthesiology and Genetics Dpt, Washington University School of Medicine St. Louis, MO, USA.
pCDNA3-C3	Dr. Omar Coso, IFIBYNE, CONICET, UBA.
pCDNA3-GFP- β 2-chimerina	Dr. M Kazanietz. University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, PA, USA.
pcDNA3-RacN17	Dr. Heidi Welch, Babraham Institute, Cambridge, UK.
pcDNA3-p115	Dr. M Kazanietz. University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, PA, USA.
PCDNA3-RGS2	Dr. M Kazanietz. University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, PA, USA.
pCMV-Myc-P-Rex1	Dr. M Kazanietz. University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, PA, USA.

TRANSFECCIONES TRANSIENTES

Las células HEK-293T fueron transfectadas utilizando el reactivo *LipofectAmine 2000* (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones. Las células HEK-293T fueron plaqueadas el día anterior a la transfección en medio DMEM suplementado con 10% de SFB a una densidad de $2,5 \times 10^5$ células para las placas de 24 pocillos (2cm^2 de área/cada uno) o cantidades proporcionales según el área del pocillo. Se utilizaron $0,5\mu\text{g}$ de ADN total. El ADN se disolvió en $50\mu\text{l}$ de medio DMEM base. Se utilizaron $2\mu\text{l}$ de *LipofectAmine 2000* por pocillo, disueltos en $50\mu\text{l}$ de medio DMEM base y se procedió de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las células fueron repicadas 4 horas después en placas de 96 pocillos resuspendiendo cada pocillo de 2mm (p24) transfectado en 2ml de DMEM con 10% SFB y antibiótico y replaqueando $200\mu\text{l}$ por cada pocillo de 0,7mm (p96). Los ensayos se llevaron a cabo a las 48hs luego de la transfección.

ENSAYO DE GEN REPORTERO DE LUCIFERASA

Las células HEK-293T o HeLa fueron sembradas en placas de 24 pocillos y se transfectaron utilizando el reactivo *LipofectAmine 2000* con los plásmidos correspondientes mediante el protocolo descrito anteriormente. En algunos experimentos, las células fueron también cotransfectadas con alguno de los plásmidos previamente mencionados o con un vector vacío para mantener la cantidad total de ADN igual. Después de 4hs, las células se sembraron en placas de 96 pocillos y luego de 24hs fueron hambreadas durante la noche reemplazando el medio por DMEM base con antibiótico. Los estímulos se agregaron 48hs después de la transfección y la actividad de luciferasa fue medida acorde a la duración de los mismos con el kit de luciferasa *Steady-Glo* (Promega Biosciences Inc, CA, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, utilizando el lector de microplacas FlexStation3 (Molecular Devices, LLC).

CUANTIFICACIÓN DE ARN MENSAJERO MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL (QPCR)

OBTENCION DE MUESTRAS

CELULAS A549:

Se plaquearon $5 \cdot 10^5$ células A549 en placas de 12 pocillos. Al día siguiente fueron hambreadas ON reemplazando el medio por DMEM base con antibiótico. Los estímulos fueron agregados 48 horas luego del plaqueo y al tiempo correspondiente se aspiró el sobrenadante y sobre la monocapa de células se agregó 0,5ml del reactivo Quick-Zol (Kalium Technologies) a fin de realizar una lisis celular activa. Los tubos conteniendo el lisado celular fueron inmediatamente llevados a un freezer de -80°C donde se conservaron hasta el momento de la purificación del ARN.

CELULAS U937:

Se plaquearon $2 \cdot 10^6$ células U937 en medio RPMI+antibiótico en placas de 6 pocillos. A las 2 horas se agregaron los estímulos correspondientes. Al tiempo indicado se centrifugaron las células y sobre el pellet se agregó 0,75ml del reactivo Quick-Zol (Kalium Technologies) a fin de realizar una lisis celular activa. Los tubos conteniendo el lisado celular fueron inmediatamente llevados a un freezer de -80°C donde se conservaron hasta el momento de la purificación del ARN.

CELULAS U937 DIFERENCIADAS CON PMA:

Se plaquearon células U937 en cantidad equivalente a $3 \cdot 10^6$ por punto experimental en medio RPMI+10%SFB+antibiótico en frascos de 75cm^2 de área (T75) y se les agregó PMA (forbol-12-miristato-13-acetato) 100nM como factor diferenciante. A las 48 horas las células diferenciadas sufren cambios morfológicos, dejan de proliferar y se encuentran adheridas. Las células se levantaron mecánicamente y se resuspendieron en RPMI+antibiótico y luego se plaquearon en placas de 6 pocillos. 24 horas después se les agregaron los estímulos correspondientes. Al tiempo indicado se centrifugaron y sobre el pellet se agregó 0,75ml del reactivo Quick-Zol (Kalium Technologies) a fin de realizar

una lisis celular activa. Los tubos conteniendo el lisado celular fueron inmediatamente llevados a un freezer de -80°C donde se conservaron hasta el momento de la purificación del ARN.

PULMON DE RATONES:

Para cada animal sacrificado se extirpó un pulmón y se lo recolectó en 1ml de Quick-Zol (Kalium Technologies). Los mismos fueron homogeneizados mecánicamente con un homogeneizador de Teflón y luego centrifugado a 12.000g por 10 minutos a 4°C . El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo. Los tubos conteniendo el lisado tisular fueron inmediatamente llevados a un freezer de -80°C donde se conservaron hasta el momento de la purificación del ARN.

PURIFICACIÓN DEL ARN

Los tubos conteniendo el lisado celular fueron retirados de los -80°C e incubados a temperatura ambiente por 5 min. Luego de dicha incubación se agregó 200 μl de cloroformo a cada tubo, se los agitó vigorosamente de manera manual por 15seg y se los incubó a temperatura ambiente por 5min. Inmediatamente después de esta segunda incubación se los centrifugó por 15min a 12000g en centrífuga refrigerada (4°C). Mediante dicha centrifugación se logró la separación de las fases acuosa y orgánica (superior e inferior, respectivamente). La fase acuosa conteniendo el ARN fue transferida a otro tubo de centrífuga y la fase orgánica descartada. Luego el ARN fue precipitado por agregado de 0,5ml de isopropanol a la fase acuosa, incubación a temperatura ambiente durante 10 min e inmediata centrifugación a 12000g por 10min en centrífuga refrigerada. El precipitado fue lavado con 500 μl de etanol 75%, centrifugado a 7000g por 5min en centrífuga refrigerada, secado a temperatura ambiente por 10min y resuspendido en 17 μl de agua libre de nucleasas. El ARN así resuspendido fue incubado durante 7 min a 57°C para facilitar su disolución y posteriormente conservado a -80°C hasta el momento de ser utilizado. En todos los pasos de este procedimiento se utilizaron materiales y reactivos libres de nucleasas.

TRATAMIENTO CON DNasa

Con el fin de eliminar las posibles contaminaciones con ADN de las muestras a cuantificar por PCR se trataron las mismas con DNasas. Luego de descongelar en hielo cada muestra de ARN se agregaron 2 μ L de solución BaseLine Zero y 1 μ L de DNasa a cada tubo. Esta mezcla se incubó 20 minutos a 37°C. Luego del agregado de 2 μ L de Stop Solution, las mismas se incubaron nuevamente 10 min a 65°C y posteriormente se conservaron a -80°C.

La calidad del ARN obtenido fue analizada por electroforesis en geles de agarosa 2% conteniendo bromuro de etidio (BrEtd), 0,1mg/ml en buffer TAE 1X (50X: 242g Tris-Base; 47,1ml ácido; 100ml EDTA 0,5 mM; agua cantidad suficiente para 1000ml; ajustar el pH a 8,0 con KOH). Se sembró 500ng de muestra, previamente diluida con xilencianol. La corrida electroforética se realizó a 100V durante 30 min en buffer TAE. Una vez finalizada la electroforesis el gel fue visualizado por emisión de la fluorescencia del bromuro de etidio intercalado al absorber luz ultravioleta (300nm).

SÍNTESIS DEL ADN COPIA (ADNc)

Cada muestra de ARN fue descongelada en hielo, su contenido de ARN fue cuantificado por absorbancia a 260nm y la ausencia de contaminación proteica fue verificada por cuantificación de la relación de absorbancias a 260nm/280nm (relaciones inferiores a 1,7 indican contaminación con proteínas). Para la síntesis de ADNc se partió de 1 μ g de ARN y se le agregó 2 μ l de primers hexaméricos al azar (0,5 μ g/ μ l) y cantidad suficiente de agua libre de nucleasas para alcanzar un volumen final de 10 μ l. Esta mezcla se incubó 5 min a 65°C e inmediatamente después se colocó la muestra en hielo y se procedió a la síntesis del ADNc por agregado de 2 μ l de buffer RT Buffer (5X - Promega); 1 μ l de transcriptasa reversa M-MLV 200U/ μ l (Promega); 0,8 μ l de DNTPs 25mM (Invitrogen); 0,5 μ l de inhibidor de RNasa 25U/ μ l (Invitrogen) y 6,2 μ l de agua libre de nucleasas. La mezcla de reacción así preparada fue homogeneizada y sometida, en termocicladora, a un ciclo de:

1) 10 min a 25°C

2) 90 min a 42°C

3) 15 min a 70°C

4) 4°C ∞

PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (QPCR)

Para la cuantificación relativa del ARNm se utilizaron los siguientes pares de primers específicos:

Nombre	Especie	Orientación	Secuencia de oligonucleótidos	T _m (°C)
GILZ	humano	sentido	5'-AATGCGGCCACGGATG-3'	54
		antisentido	5'-GGACTTCACGTTTCAGTGGACA-3'	55
THBD	humano	sentido	5'-GACCTTCCTCAATGCCAGT-3'	58
		antisentido	5'-CCGTTTCAGTAGCAAGGAAATG-3'	60
SLC19A2	humano	sentido	5'-TTCTCTGCTGGTCTGTGTGG-3'	61
		antisentido	5'-AGCGAGAAGGCATCACTTTC-3'	60
β-ACTIN	humano	sentido	5'-GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3'	61
		antisentido	5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'	61
COX-2	humano	sentido	5'-TTCAAATGAGATTGTGGGAAAATTGCT-3'	56
		antisentido	5'-AGATCATCTCTGCCTGAGTATCTT-3'	56

IL-8	humano	sentido	5'-CTGCGCCAACACAGAAATTA-3'	56
		antisentido	5'-ATTGCATCTGGCAACCCTAC-3'	58
MKP1	humano	sentido	5'-CTGCCTTGATCAACGTCTCA-3'	58
		antisentido	5'-ACCCTTCCTCCAGCATTCTT-3'	58
GMCSF	humano	sentido	5'-CATGTGAATGCCATCCAGGA-3'	58
		antisentido	5'-GGAGGTCAAACATTTCTGAGATGA-3'	62
IL-8	ratón	sentido	5'-GGCCCAATTACTAACAGGTTCTAC-3'	58
		antisentido	5'-GTCTCCCAAATGAAAGATATAGAGGC-3'	57
CICLO-B	ratón	sentido	5'-GTGGCAAGATCGAAGTGGAGAAAC-3'	65
		antisentido	5'-TAAAAATCAGGCCTGTGGAATGTG-3'	62

Es importante mencionar que tanto los primers como la secuencia blanco pueden afectar la eficiencia de la qPCR. Es por ello que los primers utilizados fueron elegidos debido a que reúnen las condiciones que se describen el manual de Biorad (Real-Time PCR Applications Guide) entre las que se destacan:

- ❖ La secuencia blanco debe ser de 75-200 pb
- ❖ Los primers deben tener un contenido de GC de 50-60%
- ❖ La temperatura de meeting (T_m) de los primers debe ser de 50-65°C

La cuantificación fue realizada utilizando como sistema de detección Rotor-Gene Q (QIAGEN). Cada muestra de ARN fue cuantificada por triplicado, en una mezcla de reacción preparada de la siguiente forma:

- ❖ 0,25µl de primer sentido 10 µM
- ❖ 0,25µl de primer antisentido 10 µM

- ❖ 4 μ l de HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (Solis BioDyne)
- ❖ 13,5 μ l de agua libre de nucleasas
- ❖ 2 μ l de ADNc (previamente diluido 1/10).

Las mezclas de reacción así preparadas fueron procesadas de acuerdo al siguiente protocolo:

Desnaturalización inicial	15 min a 95°C	} 40 ciclos
Desnaturalización	15s a 95°C	
Hibridización	30s a 60°C	
Elongación	30s a 72°C	

La especificidad de cada par de cebadores fue chequeada por el análisis de la curva de disociación realizada mediante una rampa de temperatura de 72 a 95°C aumentando 1°C en cada 5 segundos.

En cada tanda de cuantificación se incluyeron controles de contaminación con ADN genómico (procesando para ello muestras de ARN tratadas como se indica pero reemplazando el volumen de enzima retrotranscriptasa por agua libre de nucleasas) y blancos de reacción (colocando agua libre de nucleasas en lugar del volumen de muestra).

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE QPCR

La cantidad relativa del ARNm fue calculada utilizando el método de $\Delta\Delta Ct$ (Livak et al., 2001) normalizado por β -Actina como gen de referencia para los experimentos con líneas celulares. En el caso de las muestras de ratón, la expresión de β -Actina se modula en las poblaciones asmáticas (Glare et al., 2002), utilizamos Ciclofilina B (CICLO-B) como gen de referencia dado que no se modula en los diferentes grupos.

En una primera instancia se realizó una curva de calibración para determinar la eficacia de cada par de cebadores. Se realizaron mezclas en partes iguales de las muestras de ADNc que se deseaba comparar (dilución 1). Luego se realizaron 5 diluciones seriadas al tercio (dilución 2, 3, 4, 5 y 6) y se siguiendo el mismo protocolo que el indicado para las muestras en el punto anterior, se determinó el valor de Ct tanto para el gen de interés (X) como para el gen de referencia (Actina). Estos valores se graficaron en función del logaritmo de cada dilución, obteniéndose una función lineal con su correspondiente ecuación ($y=m.x+b$). De esta forma, se obtuvieron dos gráficos: uno para MRP4 ($y_1=m_1.x+b_1$) y el otro para Actina ($y_2=m_2.x+b_2$). Finalmente, la eficiencia (E) fue calculada utilizando la siguiente ecuación:

$$E = 10^{-1/m} \quad \text{donde E debe ser cercana a 2}$$

Una vez conocido el valor de eficiencia para cada cebador, la cuantificación relativa de una muestra incógnita se calcula con la siguiente ecuación:

$$R2/1 = \frac{E_X^{\Delta CtX}}{E_{Actina}^{\Delta CtActina}} \quad \text{donde,}$$

R2/1 es la expresión de X normalizada a Actina de la muestra 2 relativa a la muestra 1,

$$\Delta CtX = Ct(X \text{ muestra 2}) - Ct(X \text{ muestra 1})$$

$$\Delta CtACTINA = Ct(Actina \text{ muestra 2}) - Ct(Actina \text{ muestra 1})$$

(Para una revisión más exhaustiva de este análisis de datos se recomienda la lectura de la guía de aplicaciones de Bio-Rad – “Real-Time PCR Applications Guide”).

MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA DE CÉLULAS FIJADAS

PLAQUEO DE CÉLULAS

Las células HEK-293T fueron plaqueadas en placas de 24 pocillos y transfectadas según se explicó anteriormente con los plásmidos indicados. 4 horas después las mismas fueron resuspendidas en 2ml de DMEM+10%SFB+antibiótico por pocillo y se sembraron 150µl en cubreobjetos recubiertos previamente con poli-L-lisina por 1 hora a 37°C y lavados con solución fisiológica, en placas de 12 pocillos. Una vez pegadas las células (1-2 horas después) se completó el volumen del pocillo con DMEM+10%SFB+antibiótico. 24 horas después las células fueron hambreadas ON reemplazando el medio con DMEM+antibiótico. 48 horas después de la transfección las células fueron estimuladas con los ligandos correspondientes.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Una vez finalizados los estímulos las células fueron lavadas 2 veces con PBS y fijadas con paraformaldehído (PFA) 4% en PBS por 15 min. Se lavaron 2 veces con PBS y se les agregó Hoechst 1µg/ml en PBS por 10 minutos al abrigo de la luz. Se lavaron 2 veces con PBS y se agregó 7-9 µl de una mezcla 50% glicerol: 50%PBS en un portaobjetos. Se levantó el cubreobjetos conteniendo la monocapa de células y se lo soltó sobre la gota de glicerol/PBS con la monocapa mirando hacia abajo. Se lo dejó secar por 24 horas y se selló el borde del cubreobjetos con esmalte para uñas.

OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE IMÁGENES

Las imágenes de microscopía de fluorescencia fueron captadas digitalmente utilizando un microscopio Nikon Eclipse E400 (Nikon, Tokyo, Japan; illumination: 6 V halogen lamp, 20 W, equipped with a stabilized light source) y una cámara Sony SSC-DC50.

MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA DE CÉLULAS VIVAS

PLAQUEO DE CÉLULAS

Las células HEK-293T fueron plaqueadas en placas de 24 pocillos y transfectadas según se explicó anteriormente con los plásmidos indicados. A las 4 horas las células fueron replaqueadas en cámaras adaptadas para este propósito. Brevemente se perforaron placas p60 y se les pegó un cubre objetos por debajo con Fastix®. Las células fueron resuspendidas en 1ml de DMEM+10%SF+antibiótico y se plaquearon 200µl sobre el cubreobjetos de la cámara recubierta previamente con poli-L-lisina por 1 hora a 37°C y lavados con solución fisiológica. Sobre esto se agregaron 200µl de medio completo. 2 horas después se completó el volumen de la cámara con medio completo. Para los experimentos de cinética de entrada nuclear del GR, al día siguiente las células fueron lavadas 2 veces con DMEM sin color y sobre las células en este medio se realizaron los estímulos correspondientes. Para los experimentos de cinética de salida nuclear del GR, al día siguiente se reemplazó el medio con DMEM sin color y las células fueron estimuladas con dexametasona por 1 hora. Se realizaron 2 lavados con SF, 1 lavado con SF por 2 minutos y 1 lavado con DMEM sin color por 5 minutos. Luego se dejaron las células en la cámara de incubación del microscopio (Incubator XL S Examiner Z1) con atmósfera humidificada a 37°C y 5% CO₂ en el siguiente medio: DMEM sin color, HEPES 25mM, glucosa agregada 3,5mg/ml, pH 7,33, antibiótico.

OBTENCION Y PROCESAMIENTO DE IMAGENES

Las imágenes de microscopía de fluorescencia fueron captadas digitalmente utilizando un microscopio Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Germany; Objetivo LCI Plan-Neofluar 63x/1,30 Imm Korr DIC M27; Optovar 1x Tubelens; Reflector 60 HE CFP/YFP/Hc Red; Divisor de haz 460, 520, 605; Longitud de onda Ex. 508; Longitud de onda Em. 524; Filtro Ex. 432-457, 502-517, 574-601; Filtro Em. 469, 491-530, 560-615, 4095) y una cámara AxioCam HRm3 S/N 631 (adaptador 0,63x; tiempo de exposición 500-900ms; profundidad de foco 0,86 µm).

Las imágenes obtenidas fueron analizadas utilizando el programa ImageJ (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Para cada imagen se trazó una línea para el núcleo y otra para el citoplasma y se midió la intensidad de fluorescencia, para todos los tiempos evaluados. Se analizaron 5 células por experimento.

MEDICIÓN DE CALCIO INTRACELULAR

Las células HEK-293T fueron plaqueadas en placas de 96 pocillos 24 horas antes de experimento. Para el experimento se preparó una solución salina tamponada (BSS) la cual contiene: 140mM NaCl, 3.9mM KCl, 0.7mM KH_2PO_4 , 0.5mM Na_2HPO_4 , $\text{Al}_2\text{H}_2\text{O}$, 1mM CaCl_2 , 0.5mM MgCl_2 , y 20mM HEPES, 10mM glucosa, y 0.1% BSA, pH=7.5. Las células fueron inubadas con FURA 2-AM 2mM en BSS por 30 min a 37°C. Luego fueron lavadas dos veces con BSS e incubadas con los ligandos correspondientes. La fluorescencia fue medida en un equipo FlexStation3 (MolDev) con el termostato ajustado en 37°C. Los niveles de calcio intracelular fueron registrados cada dos segundos por exposición alternando las excitaciones a 340nm y a 380nm. La emisión de fluorescencia fue medida a 505nm. De este modo se registraron dichas intensidades y su relación (F340/F380). Los ligandos fueron pipeteados en cada pocillo sin interrumpir la lectura.

DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las células fueron lisadas en buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 8; EDTA 5mM; 1% Tritón, 0,1% DTT, PMSF 1mM, aprotinina 5 μM ; leupeptina 10 μM ; pepstatina 5 μM , vanadato de sodio 1mM). Luego las muestras fueron incubadas durante tres ciclos de 2 min en nitrógeno líquido y 3 min en baño a 37°C agitando vigorosamente al finalizar

cada ciclo para completar la lisis y disgregación de la estructura celular. La cantidad de proteínas fue determinada por el método de Bradford (Bradford, 1976). A las muestras se les agregó sample buffer 5X (Tris-HCl 250mM, pH 6,8; 2-mercaptoetanol 500mM; 10% SDS; 50% glicerol y 0,25% azul de bromofenol) y agua en cantidad suficiente para que todas las muestras posean una concentración final de proteínas de 2 µg/µl. Las muestras fueron hervidas durante 5 min.

Antes de realizar los ensayos de western blot con los anticuerpos correspondientes para cada ensayo, validamos la cuantificación de proteínas en las muestras corriendo 12µl de cada muestra en un gel de SDS-poliacrilamida y revelando el western blot con anticuerpos dirigidos contra actina.

Los extractos proteicos fueron analizados en geles de poliactilamida al 10% o 12%, en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

El buffer de electroforesis utilizado consistió en Tris 25mM; glicina 192mM; 0,1% SDS, pH 8,3. La electroforesis se desarrolló en minigeles a corriente constante de 30mA (BioRad).

Al finalizar el fraccionamiento, el gel fue equilibrado en buffer de transferencia (Tris-HCl 25mM, pH 8,3, glicina 150mM; 20% metanol) durante 15 min y transferido a membranas de nitrocelulosa a 100 V, durante 1 h a 4°C. Las proteínas transferidas a las membranas fueron teñidas en una solución 0,2% Ponceau; 0,5% ácido acético, para visualizar las proteínas totales y constatar la eficacia de la transferencia en todos los carriles. Posteriormente, las membranas fueron lavadas en PBS hasta la desaparición de la tinción.

REVELADO DE PROTEÍNAS ESPECÍFICAS

Luego de tratar las membranas con solución de bloqueo (5% leche en PBS-0,05% Tween) durante toda la noche, fueron incubadas durante 1 hora con 1µg/ml del anticuerpo correspondiente, anti-GRα, anti-pJNK y anti-GAPDH de conejo (Santa Cruz

Biotechnology) o anti-pERK de ratón (Santa Cruz Biotechnology). La detección se llevó a cabo incubando con 0,2µg/ml de segundo anticuerpo anti-conejo o anti-ratón conjugado a peroxidasa durante 1 hora, seguido de una exposición a una solución sustrato de la peroxidasa y amplificadora de la quimioluminiscencia (Amersham Life Science). El resultado se visualizó utilizando el equipo ImageQuant 350 (GE Healthcare).

ANIMALES

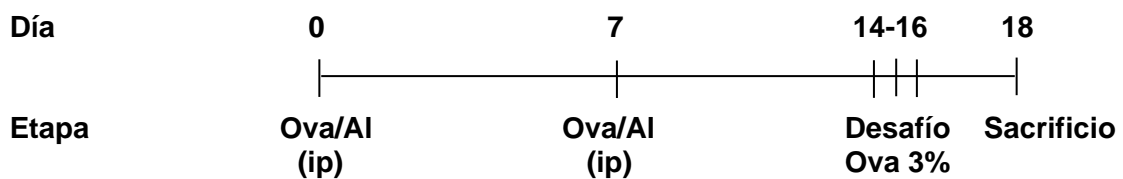
Ratones hembra BALB/c de 6-8 semanas de edad fueron provistos por el bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires (UBA) y mantenidos en el bioterio del Instituto de Investigaciones Farmacológicas (ININFA), Universidad de Buenos Aires. Los animales fueron alojados acorde a las guía *NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, con agua de bebida y comida para que sean ingeridas *ad libitum*, un ambiente controlado (20-22°C de temperatura, 45-55% de humedad y ciclos de 12hs luz/oscuridad). El mismo se encuentra al cuidado de un profesional idóneo.

SENSIBILIZACIÓN Y EXPOSICIÓN A LAS DROGAS

Los animales con un peso aproximado de 20 gr, fueron separados en 2 grupos experimentales. Un grupo, que fue sensibilizado con dos inoculaciones de ovoalbúmina de pollo (grado III; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (20µg) (OVA) como alérgeno y con hidróxido de aluminio (2mg) como adyuvante en 0,2ml de PBS por vía intraperitoneal (ip); y otro grupo al que se le administró sólo el vehículo que permaneció como control (Grupo naïve).

Una semana luego de la última inoculación se desafiaron por vía aérea con 5ml de una solución de OVA 3% p/v durante 10 minutos por tres días consecutivos. La exposición al aerosol se realizó utilizando una cámara de acrílico con ocho compartimentos, cada uno de los cuales puede albergar cómodamente a un ratón. En dicha cámara se nebulizó la

solución de OVA utilizando un nebulizador ultrasónico (San-Up, Argentina; flujo de solución de OVA 0,33 ml/min en un flujo aéreo de 6-8 l/min). Luego de establecida la respuesta alérgica, se trataron los ratones por vía intranasal (in) inmovilizándolos y colocándoles en las narinas 3µl de una solución con las distintas drogas, una hora después de la última nebulización. 48 horas después los animales fueron sacrificados por dislocación cervical para su análisis. El esquema de protocolo experimental se detalla a continuación:



Se establecieron 6 grupos experimentales:

1. Grupo naïve: control negativo del modelo. Animales que no fueron sensibilizados con OVA. Sólo se les inyectó PBS.

2. Grupo asmático: control positivo del modelo. Animales que fueron sensibilizados con OVA y se les administró PBS como tratamiento.

3. Grupo Dex óptima: control positivo del tratamiento. Animales sensibilizados a los que se les administró por vía IN una solución de dexametasona en dosis óptima (1 mg/kg).

4. Grupo Dex subóptima: control negativo del tratamiento. Animales sensibilizados a los que se les administró por vía IN una solución de dexametasona en dosis subóptima (0,1 mg/kg).

5. Grupo azelastina: control negativo del tratamiento. Animales sensibilizados a los que se les administró por vía IN una solución de azelastina a las dosis equivalentes a las utilizadas normalmente en la clínica (0,5 mg/kg).

6. Grupo Dex subóptima + azelastina: grupo experimental. Animales sensibilizados a los que se les administró por vía IN una solución que combina una dosis de dexametasona subóptima (0,1 mg/kg) y de azelastina en dosis clínica equivalente (0,5 mg/kg).

El protocolo detallado fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA, de acuerdo al expediente N° 40903/15.

ANALISIS PATOLÓGICO

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Se les abrió la pared del pecho y luego se los exanguinó por punción cardíaca. El suero fue preparado y almacenado a -20°C. Se canuló la tráquea luego de la recolección de sangre. Se realizó el lavado broncoalveolar (LBA) 4 veces con 1ml de PBS estéril, instilando y recolectando suavemente. Se colectó el fluido del lavado y se lo centrifugó a 300g por 10 min y se resuspendió el pellet en 0,5ml de PBS. Se realizó un conteo celular total y un conteo celular diferencial en portaobjetos para citocentrífuga los cuales fueron preparados centrifugando las muestras a 80g por 5 min (Cytospin 4; Shandon, Pittsburg, PA, USA). Estos portaobjetos fueron fijados y teñidos con una tinción modificada de Wright-Giemsa (Tinción 15; Biopur SRL, Rosario, Argentina) y se contaron un total de 200 células por cada muestra en un microscopio. Se cuantificaron los macrófagos, linfocitos, neutrófilos y eosinófilos. Luego del lavado se extirpó un pulmón y se lo recolectó en 1ml del reactivo Quick-Zol para proseguir al análisis por PCR cuantitativa. El otro pulmón fue instilado con 10% de formalina en buffer, se removieron y se fijaron en la misma solución.

ANÁLISIS DE INMUNOGLOBULINAS EN SUERO

Se midieron las inmunoglobulinas IgE específicas para ovoalbúmina (OVA) utilizando la técnica de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Se recubrieron placas microtituladoras de 96 wells (Nunc, Boston, MA, USA) con 0,2 µg de anticuerpo de rata monoclonal anti-IgE de ratón (BD PharMingen, San Diego, CA, USA) diluidos en 0,1M de buffer carbonato (pH=9,5). Las placas fueron incubadas durante la noche a temperatura ambiente y luego lavadas con Tween al 0,05% en PBS y bloqueadas con albumina de suero bovino en PBS (5% p/v, pH=7,4) por 1 hora y finalmente se les agregó el suero de las muestras. Se incubaron *overnight* a temperatura ambiente y luego se lavaron y se les agregó OVA biotinilada (1 mg/ml). Se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente y luego se lavaron. Se las incubó luego con peroxidasa de rábano-estreptavidina (HRP) (Zymed, San Francisco, CA, USA; 1/4000) y se desarrolló la reacción con el sustrato trimetilbencidina (TMB One-Step; Dako, Carpintería, CA, USA). Las placas fueron leídas en un lector de placas Softmax (Molecular Devices, Menlo Park, CA, USA) a 655 nm. Para la curva estándar se usó anticuerpo monoclonal IgE anti-OVA (2C6). El ELISA para IgE puede detectar concentraciones de 50ng/ml de estos anticuerpos cuando se usan como control estándar. Las titulaciones se hicieron por duplicado para cada suero de las muestras y se definieron como las diluciones que resultan en un valor de densidad óptica (DO) mayor a 0,1. Los controles negativos incluidos en el ensayo tuvieron valores menores a 0,1.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todas las curvas fueron analizadas y sus parámetros ajustados utilizando el programa GraphPad Prism versión 4.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA, www.graphpad.com).

Las comparaciones entre los parámetros ajustados en las curvas fueron llevadas a cabo utilizando un test t de dos colas para datos no apareados realizado con el programa

GraphPad Prism versión 4.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com). Un valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo.

La comparación entre ecuaciones para hallar la que mejor ajustara a los datos experimentales fue llevada a cabo utilizando un test ANOVA para datos no apareados, o se realizó de acuerdo al Criterio de Información de Akaike (AIC) con el programa GraphPad Prism versión 4.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com). Un valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo.

Las diferencias estadísticas entre dos grupos fueron determinadas utilizando el test t de dos colas. Las diferencias estadísticas entre tres o más grupos fueron determinadas utilizando el test de ANOVA para comparación de multigrupos seguido del test de Bonferroni o de Dunnet para comparación de datos no apareados utilizando el programa GraphPad InStat versión 3.01 para Windows, (GraphPad Software, San Diego, California, USA, www.graphpad.com). Un valor de $p < 0,05$ fue adoptado para definir diferencias estadísticas significativas.

MATERIALES

DMEM, RPMI 1640, gentamicina, Buffer fosfato salino (PBS), Histamina (clorhidrato), 2,3 TFMFH, cetirizina, clorfeniramina, difenhidramina, azelastina, dexametasona, mifepristona, wortmanina, SP600125, U73122 fueron obtenidas de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). LY294002 mepiramina (maleato), trans-triprolidina y GF109203X fueron obtenidas de Tocris Cookson Inc. (Ballwin, MO). Suero fetal bovino (SFB) fue obtenido de Natocor (Argentina). El resto de los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

RESULTADOS

PARTE I: MECANISMO MOLECULAR EN SISTEMAS HETERÓLOGOS

PUESTA A PUNTO DEL SISTEMA EXPERIMENTAL

La primera actividad consistió en la puesta a punto de un sistema celular adecuado para medir la actividad del GR. Se eligió la línea celular humana derivada de riñón HEK-293T, por ser una línea que se cultivan fácilmente en el laboratorio, por su versatilidad para ser transfectadas en forma transiente con protocolos de rutina y porque no expresan endógenamente ni el GR ni el H1R (Bladh et al., 2005; Beermann et al., 2014). De este modo, la expresión de dichos receptores no se encuentra sujeta a los mecanismos de regulación celular y resulta posible variar las cantidades expresadas de los receptores variando las condiciones de la transfección. Para verificar la ausencia de GR endógeno, realizamos ensayos de Western Blot sobre células sin transfectar o transfectadas con el GR. En las células sin transfectar, el GR endógeno no fue detectado, mientras que en su contraparte transfectada con el GR, se verificó su correcta expresión (Fig. 3.1).

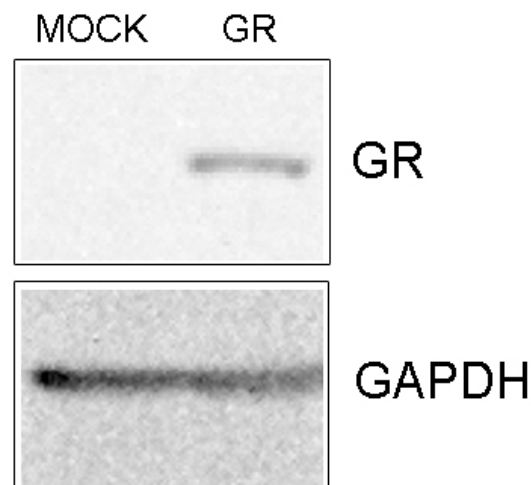
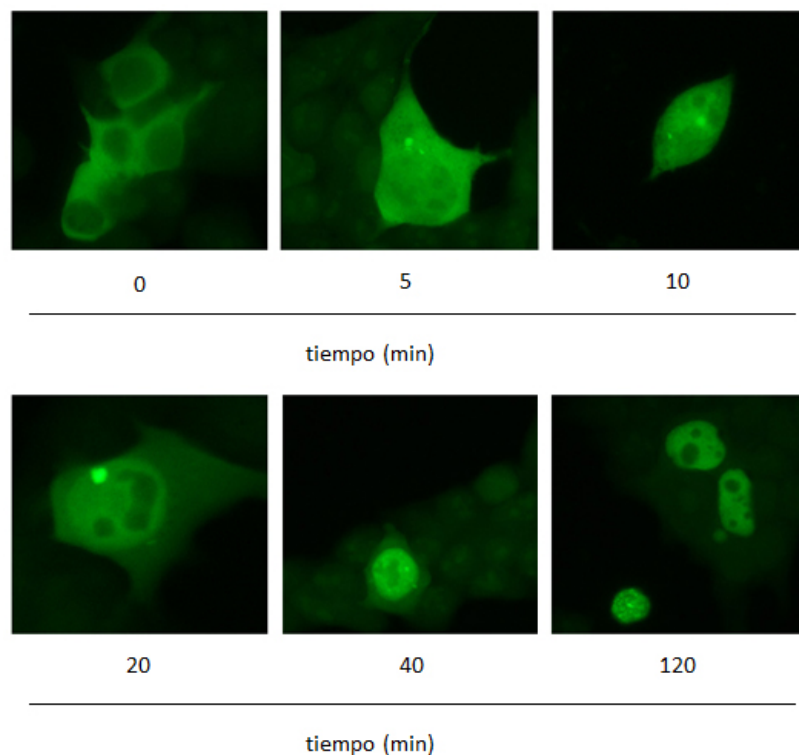


Figura 3.1: Determinación de GR en células HEK-293T por Western Blot. Las células fueron transfectadas con un plásmido que codifica para el GR o con un plásmido vacío como control (MOCK). Se muestra una sección de la membrana entre 80 y 120 KDa para el GR y entre 40 y 60 KDa para GAPDH, perteneciente a un experimento representativo.

Como se describió en la Introducción, los mecanismos de regulación génica mediados por el GR requieren que el mismo sea importado desde el citoplasma hacia el núcleo, y luego exportado nuevamente hacia el citosol. Para evaluar los procesos de importación y exportación nuclear, se transfectaron células HEK-293T con el GR conjugado a la proteína fluorescente YFP (YFP-GR). Mediante ensayos de microscopía de fluorescencia pudo determinarse que, efectivamente, frente a un tratamiento con el agonista dexametasona, el GR se transloca al núcleo celular y que luego de retirar el estímulo es exportado siguiendo una cinética como la clásicamente descrita (Figs. 3.2 y 3.3) (Echeverría et al., 2009).

(A)



(B)

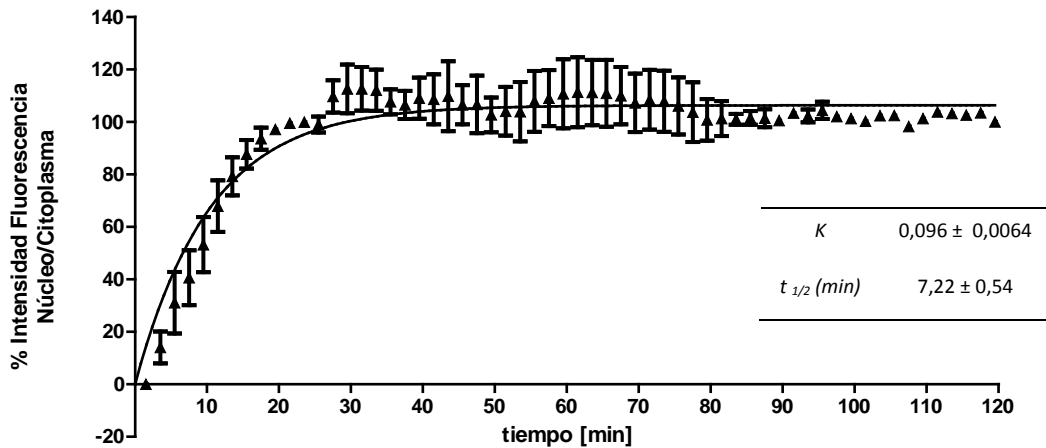
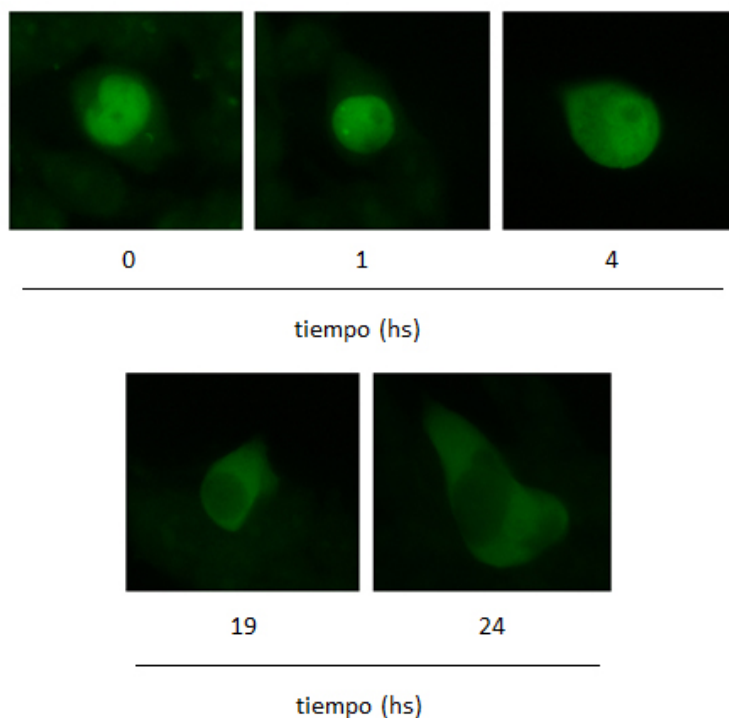


Figura 3.2: Cinética de importación nuclear del GR. Células HEK-293T fueron transfectadas con un plásmido que codifica para el YFP-GR y tratadas con dexametasona 10nM por 1 hora y privadas del ligando por el tiempo indicado. (A) Imágenes representativas obtenidas por microscopia de fluorescencia de células fijadas en vidrios a los tiempos indicados. (B) Cinética de translocación nuclear medida como % Intensidad de fluorescencia del núcleo respecto del citoplasma de células vivas. La obtención de las imágenes y el procesamiento de las mismas fueron realizados según se describe en Materiales y Métodos utilizando el programa ImageJ. Los resultados representan la media +/- ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

(A)



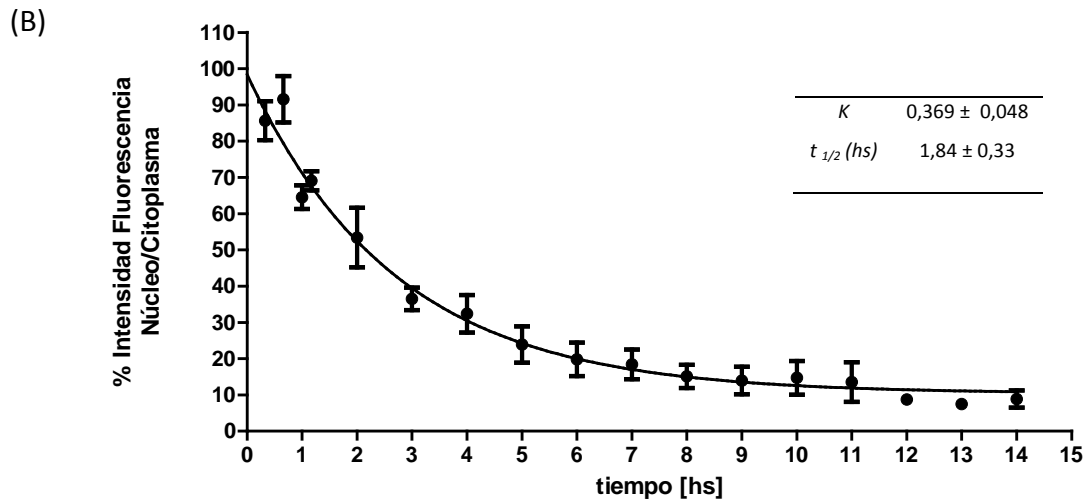


Figura 3.3: Cinética de exportación nuclear del GR. Células HEK-293T transfectadas con un plásmido que codifica para el YFP-GR y tratadas con dexametasona 10nM por 1 hora y privadas del ligando por el tiempo indicado. (A) Imágenes representativas obtenidas por microscopía de fluorescencia a los tiempos indicados de células fijadas en vidrios. (B) Cinética de translocación nuclear medida como % Intensidad de fluorescencia del núcleo respecto del citoplasma de células vivas. La obtención de las imágenes y el procesamiento de las mismas fueron realizados según se describe en Materiales y Métodos utilizando el programa ImageJ. Los resultados representan la media \pm ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Una vez que el GR se encuentra dentro del núcleo, es capaz de modular la expresión de genes blanco. Para verificar la funcionalidad del GR transfectado, se utilizó un sistema gen-reportero TAT3-Luc que codifica para la enzima luciferasa bajo el control de un promotor regulado por el GR. En células HEK-293T cotransfectadas con el GR y TAT3-Luc, el tratamiento por 24 horas con dexametasona incrementó la actividad de luciferasa, mientras que no lo hizo en células que no fueron transfectadas con el GR (Fig. 3.4A). Dicho incremento fue específicamente bloqueado por el antagonista RU486 (Fig. 3.4B). Utilizando, un sistema reportero que codifica para la luciferasa de Renilla bajo el control del promotor CMV, no regulado por el GR, descartamos posibles diferencias en la actividad de luciferasa debidas a efectos inespecíficos, tales como los niveles de transfección (Fig. 3.4C).

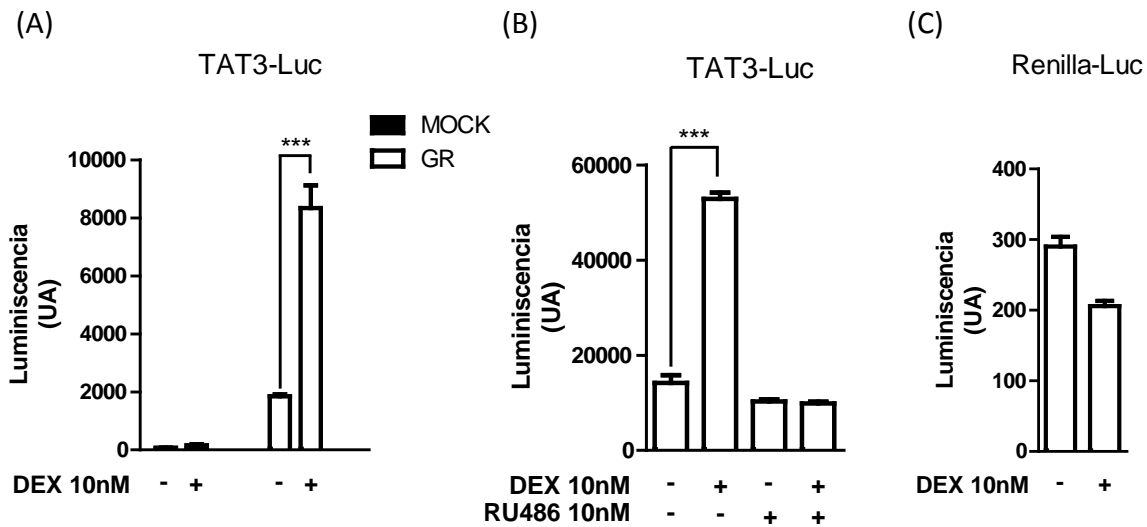


Figura 3.4: Actividad de luciferasa producto de la transfección con el GR. Células HEK-293T cotransfectadas con plásmidos que codifican para el GR y con (A) TAT3-Luc o con un plásmido vacío como control (MOCK), (B) TAT3-Luc, (C) CMV-Luc, fueron tratadas con dexametasona 10nM por 24 horas y/o pretratadas con RU486 10nM por 90 minutos, como se indica. La actividad de luciferasa fue determinada como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media \pm ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. *** $p < 0,001$.

Finalmente, para terminar de caracterizar la respuesta del GR transfectado, se cotransfectaron las células HEK-293T con el plásmido que codifica para el GR y con TAT3-Luc, y luego se las trató con distintas concentraciones de dexametasona. En este sistema, la dexametasona incrementó la actividad de luciferasa siguiendo una dependencia con su concentración (Fig. 3.5).

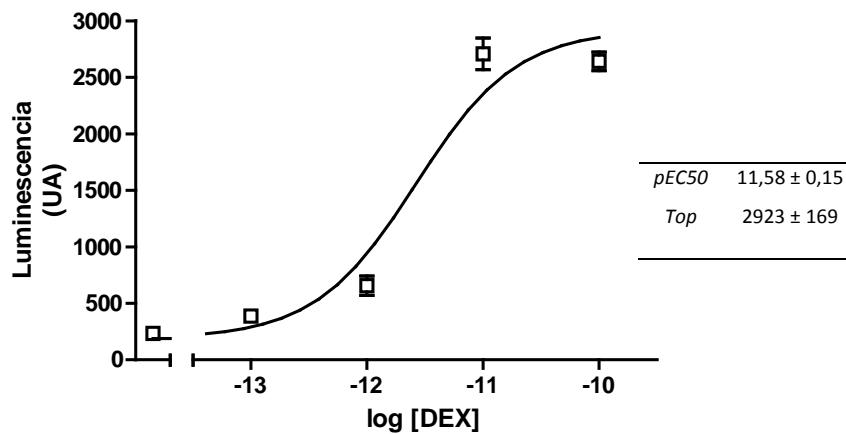


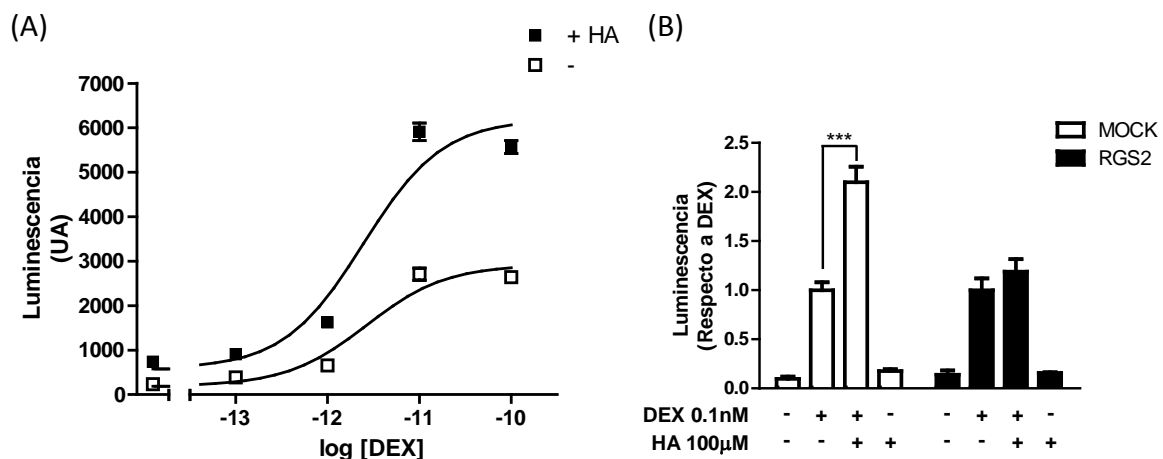
Figura 3.5: La actividad de luciferasa como medida de la actividad del GR. Células HEK-293T cotransfectadas con plásmidos que codifican para el GR y TAT3-Luc fueron tratadas con dexametasona en la concentración indicada por 24 horas. La actividad de luciferasa fue determinada como se describe en Materiales y Métodos. Los parámetros de ajuste de la curva se detallan en la tabla. Los resultados representan la media \pm ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. *** $p < 0,001$.

Los resultados hasta el momento muestran que las células HEK-293T no expresan endógenamente el GR, lo cual permite manipular su expresión en forma heteróloga verificando que el GR transfectado se comporta de la forma esperada. Una vez puesto a punto el sistema para evaluar la actividad del GR, nos enfocamos en la modulación de la misma por parte de histamina, primero sobre los procesos de transactivación y luego sobre los procesos de transrepresión.

TRANSACTIVACIÓN

EFFECTO DE HISTAMINA SOBRE EL RECEPTOR A GLUCOCORTICOIDES

Dado que nuestro objetivo principal consiste en estudiar la modulación por parte de histamina sobre la actividad del GR, cotransfectamos las células HEK-293T con sendos plásmidos que codifican para el GR, el receptor H1 a histamina (H1R), y el sistema reportero TAT3-Luc. En este sistema, la histamina produce un incremento en la actividad del GR frente a dexametasona (2923 ± 169 vs. 6201 ± 344 en UA), sin modificar su potencia (pEC_{50} : 11.58 ± 0.15 vs. 11.61 ± 0.15). Al cotransfectar las células con la proteína RGS2 (regulador de señalización de proteínas G), clásicamente descrita y utilizada como promotora de la actividad GTPasa de las proteínas $G\alpha_q$ (Druey et al., 1996), el efecto mediado por histamina se pierde. Este resultado indica que el efecto potenciador de la histamina sobre la actividad del GR depende de la vía de señalización disparada por la proteína $G\alpha_q$ acoplada al receptor H1, descartando cualquier otra vía de señalización independiente de proteína-G (Fig. 3.6).



	-	+HA
pEC_{50}	$11,58 \pm 0,15$	$11,61 \pm 0,15$
<i>Top</i>	2923 ± 169	5625 ± 344

Figura 3.6: Efecto de histamina sobre la actividad del GR inducida por dexametasona. (A) Células HEK-293T cotransfectadas con plásmidos que codifican para el GR, H1R y TAT3-Luc, tratadas con dexametasona en la concentración indicada por 24 horas y pretratadas o no con histamina 100µM por 10 minutos. Los parámetros de ajuste de la curva se detallan en la tabla. (B) Células HEK293T cotransfectadas con plásmidos que codifican para el GR, H1R y TAT3-Luc, con o sin RGS2, tratadas con dexametasona por 24 horas y pretratadas con histamina 100µM por 10 minutos. La actividad de luciferasa fue determinada como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media +/- ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Las barras de error representan la ESM. ***p<0,001.

Este incremento en la actividad del GR mediado por la histamina resulta dependiente de la concentración de la misma (pEC50 de 5.4 ± 0.2), y es bloqueado en forma específica, parcial y concentración dependiente, por los antihistamínicos mepiramina y trans-triprolidina. Estos resultados confirman farmacológicamente la especificidad de su acción a través del receptor H1 (Fig. 3.7).

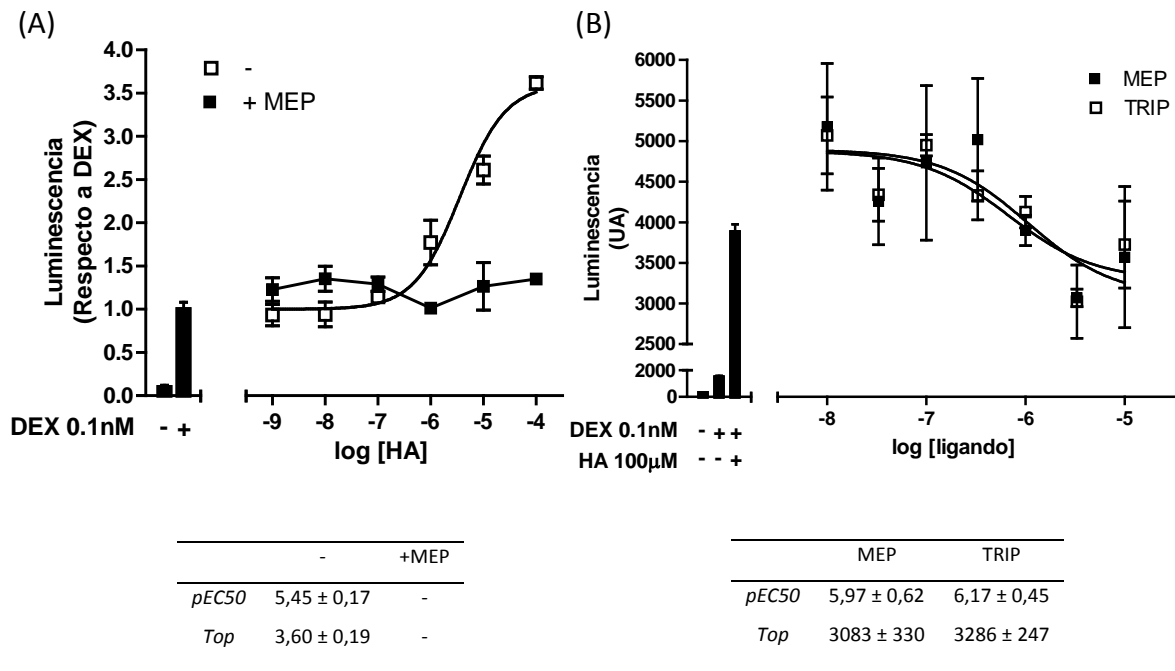


Figura 3.7: Caracterización farmacológica del efecto mediado por la histamina. Células HEK-293T cotransfectadas con plásmidos que codifican para el GR, H1R y TAT3-Luc y tratadas con (A) dexametasona 0,1nM por 24 horas, incubadas previamente mepiramina (MEP) 10µM por 10

minutos y luego con histamina en la concentración indicada por 10 minutos, o (B) dexametasona 0,1nM por 24 horas, incubadas previamente mepiramina (MEP) o trans-triprolidina (TRIP) en la concentración indicada por 10 minutos y luego con histamina 100µM por 10 minutos. La actividad de luciferasa fue determinada como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media +/- ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Los parámetros de ajuste de la curva se detallan en la tabla.

La modulación ejercida por la histamina también se observó midiendo la inducción de la actividad del GR por su ligando fisiológico, corticosterona, indicando que dicho efecto ocurre cuando la actividad del GR es inducida por agonistas naturales o sintéticos (Fig. 3.8). Dado que el objetivo de nuestro trabajo es estudiar la interacción en escenarios relevantes desde un punto de vista terapéutico, continuamos el resto de los experimentos utilizando dexametasona.

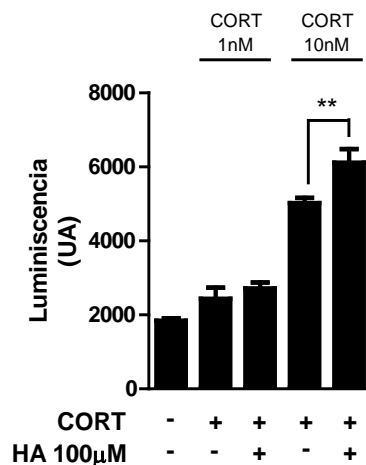


Figura 3.8: Efecto de la histamina sobre la actividad del GR inducida por corticosterona. Células HEK-293T cotransfectadas con plásmidos que codifican para el GR, H1R y TAT3-Luc, tratadas con corticosterona (CORT) 1nM o 10nM por 24 horas, pretratadas por 10 minutos con histamina 100µM. La actividad de luciferasa fue determinada como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media +/- ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. **p<0,01.

Dado que el incremento en la actividad del GR por parte de la histamina podría deberse a una modificación en los niveles de expresión del mismo, decidimos evaluar los niveles de ARN mensajero por PCR en tiempo real frente al tratamiento con dexametasona e histamina. En células HEK-293T, ni la dexametasona ni la histamina modificaron los niveles de ARN mensajero del GR, lo cual permite descartar que los efectos observados por parte de histamina sobre la actividad transcripcional del GR se deban a una modulación en su expresión (Fig. 3.9).

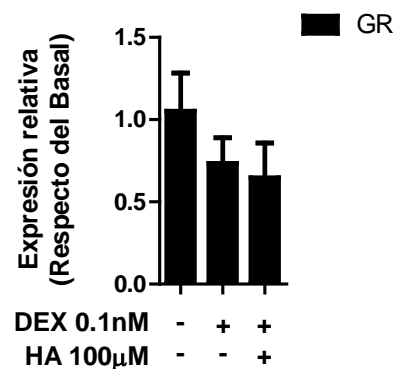


Figura 3.9: Efecto de la histamina sobre los niveles de expresión del GR. Análisis de expresión por PCR cuantitativa del gen del GR en células HEK-293T transfectadas con plásmidos que codifican para el GR y el H1R, respecto de la expresión de Beta-Actina. Las células fueron tratadas con dexametasona 0,1nM por 24 horas y pretratadas o no con histamina 100μM por 10 minutos. Los niveles de ARN mensajero fueron cuantificados como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media \pm ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Como se detalló en la Introducción, la unión de histamina al receptor H1 desencadena la activación de las proteínas G acopladas, disociándose la subunidad $G\alpha_q$ del dímero $G\beta\gamma$, modulando de este modo la actividad de numerosos efectores. A continuación ahondamos en el mecanismo molecular mediante el cual la histamina potencia la actividad transcripcional del GR, estudiando la participación de ambas vías de señalización.

ESTUDIO DE LA VIA DE SUBUNIDADES G β γ

Dado que las subunidades G β γ han sido descritas como responsables en la modulación del GR por parte de otros GPCRs (ver Introducción), nos abocamos a estudiar su papel en el efecto mediado por histamina. Para ello, decidimos utilizar como herramienta la subunidad alfa de la proteína G transducina (G α t), cuya sobreexpresión es ampliamente utilizada como herramienta para secuestrar subunidades G β γ (Federman et al., 1992). Para evaluar la transfección y expresión apropiadas de G α t, estudiamos como control sus efectos ya descritos sobre los niveles de p-ERK inducidos por carbacol. Se ha descrito que en células HEK293T, el carbacol actuando sobre receptores M1 muscarínicos es capaz de modular los niveles de pERK mediante la activación del dímero G β γ (Crespo et al., 1994). Por ello cotransfectamos las células HEK293T con un plásmido que codifica para el receptor M1 muscarínico y con G α t o un plásmido vacío. En este sistema, el estímulo con carbacol 10 μ M aumentó los niveles de pERK y dicho aumento fue bloqueado por la sobreexpresión de G α t, corroborando funcionalmente su adecuada expresión (Fig. 3.10).

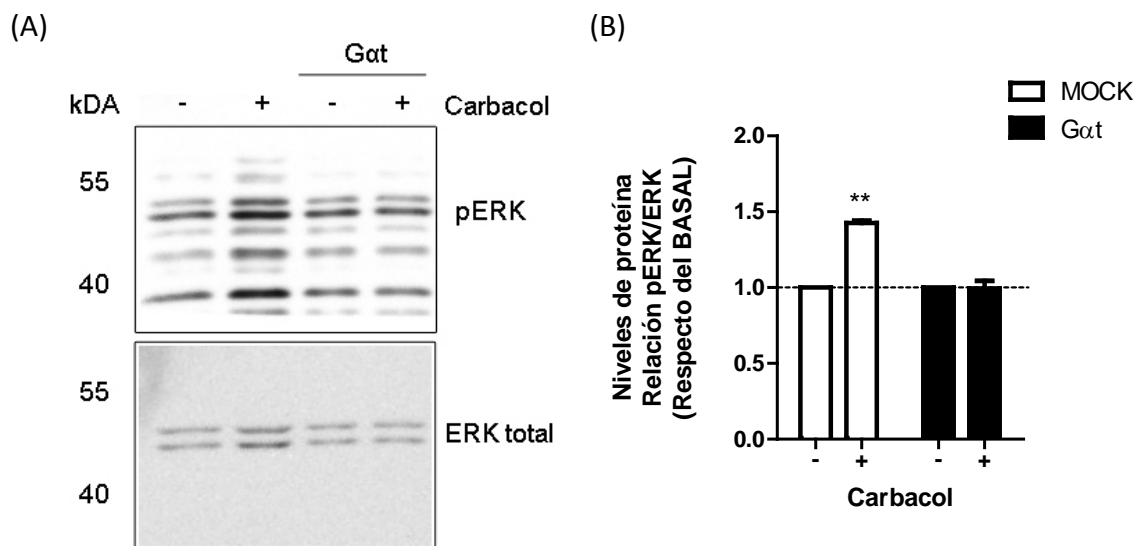


Figura 3.10: Efecto de la cotransfección con G α t sobre la respuesta inducida por carbacol. Células HEK293T cotransfectadas con plásmidos que codifican para el M1R, y G α t transducina o un plásmido vacío como control (MOCK) fueron tratadas con carbacol 10 μ M por 10 minutos. (A)

Sección de la membrana entre 40 y 60 KDa de un experimento representativo. (B)

Densitometría de la membrana realizada utilizando el programa ImageJ como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media \pm ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. $**p < 0,01$.

Utilizando esta herramienta en nuestro sistema de interés, cotransfectamos las células HEK-293T con $G\alpha t$, y bajo estas condiciones, el aumento en la actividad del GR por parte de histamina fue transformado en una inhibición. Este resultado sugiere que el efecto estimulador de histamina sobre la actividad del GR estaría mediado por las subunidades $G\beta\gamma$ y que cuando dichas subunidades son secuestradas se pone de manifiesto un efecto inhibitorio. Dicho efecto inhibitorio también presenta una dependencia con la concentración de histamina (Fig. 3.11A). Cabe aclarar que la inhibición observada es dependiente de la cantidad de plásmido transfectedo, sugiriendo que el efecto es específico de la transfección con $G\alpha t$ (Fig. 3.11B).

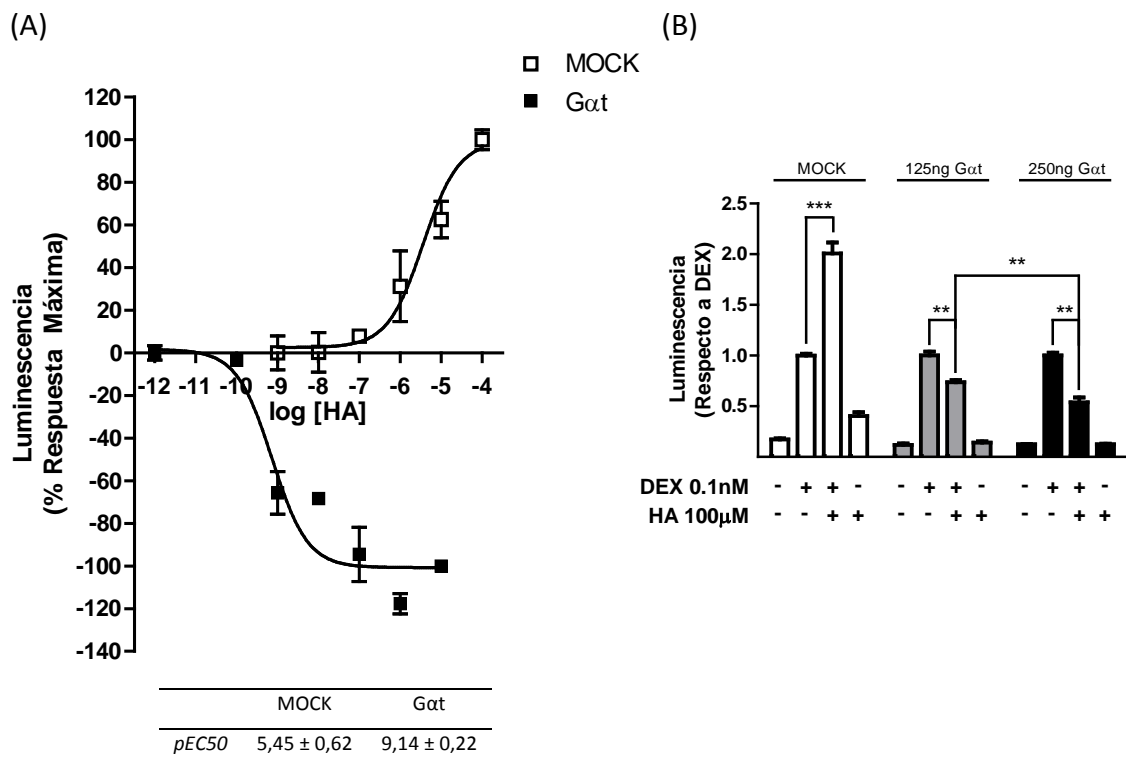
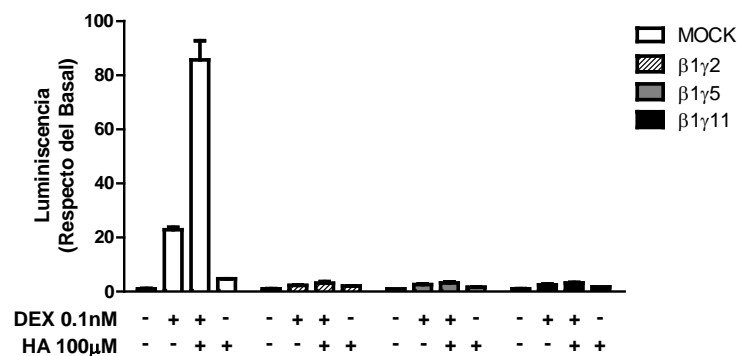


Figura 3.11: Efecto del secuestro de las subunidades G $\beta\gamma$. Células HEK293T cotransfectadas con plásmidos que codifican para el GR, H1R y TAT3-Luc fueron transfectadas con (A) G α transducina y tratadas con dexametasona 0.1nM por 24 horas y preincubadas 10 minutos con histamina a las concentraciones indicadas o (B) diferentes cantidades de G α transducina y tratadas con dexametasona 0,1nM por 24 horas e histamina 100 μ M. La actividad de luciferasa fue determinada como se describe en Materiales y Métodos. Los parámetros de ajuste de la curva se detallan en la tabla. Los resultados representan la media \pm ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. **p<0,01; ***p<0,001.

Este resultado pone de manifiesto que la histamina, actuando sobre el H1R, posee un efecto dual sobre la actividad transcripcional del GR inducida por dexametasona, estimulador en presencia de las subunidades G $\beta\gamma$ e inhibitorio cuando las mismas son secuestradas. Para estudiar el papel de distintas subunidades G $\beta\gamma$ en el efecto potenciador de la histamina, cotransfectamos las células con las subunidades G β 1 y G β 2 y diferentes subunidades G γ a fin de establecer las posibles combinaciones responsables del efecto observado. En este sistema encontramos que al sobreexpresar las combinaciones G β 1 γ 2, G β 1 γ 5 y G β 1 γ 11 se observa una reducción en la actividad transcripcional del GR, mientras que la sobreexpresión de G β 2 γ 5 y G β 2 γ 11, pero no de G β 2 γ 2, resulta en un incremento en el efecto mediado por histamina (Figs. 3.12A y 3.12B). Estos resultados indican que las subunidades G β 2 γ 5 y G β 2 γ 11 podrían ser las responsables del incremento que ejerce la histamina sobre la actividad del GR.

(A)



(B)

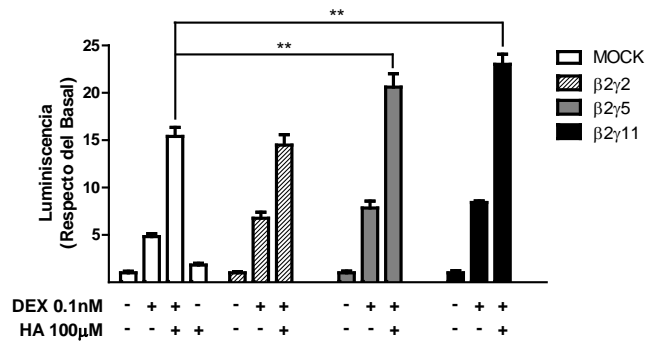


Figura 3.12: Sobreexpresión de subunidades Gβγ. Células HEK293T cotransfectadas con plásmidos que codifican para el GR, H1R y TAT3-Luc y transfectadas con (A) diferentes combinaciones de Gβ1 y Gγ2, Gγ5 o Gγ11, o con (B) Gβ2 y Gγ2, Gγ5 o Gγ11 fueron tratadas con dexametasona 0,1nM por 24 horas e histamina 100μM. La actividad de luciferasa fue determinada como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media +/- ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. *p<0,05; **p<0,01.

PAPEL DE LAS KINASAS: PI3K

Numerosos efectores han sido descritos río abajo de las subunidades Gβγ. La familia de PI3K constituye un gran grupo de proteínas kinasas de serina/treonina, quienes tienen un importante papel en la señalización mediada por las subunidades Gβγ. A su vez, en lo que concierne al GR, PI3K ha sido descrita como moduladora de su actividad, potenciándola cuando es activada al estimular el receptor β2-adrenergico a través del dímero Gβγ acoplado (Schmidt et al., 2001). Para estudiar su papel en la modulación del GR por parte de la histamina utilizamos dos inhibidores farmacológicos de PI3K, LY294002 y wortmanina. En nuestro sistema, la inhibición de PI3K mediada por ambos compuestos, no tuvo efecto sobre la modulación del GR por parte de histamina, sugiriendo que dicha kinasa no participa en la regulación observada (Fig. 3.13).

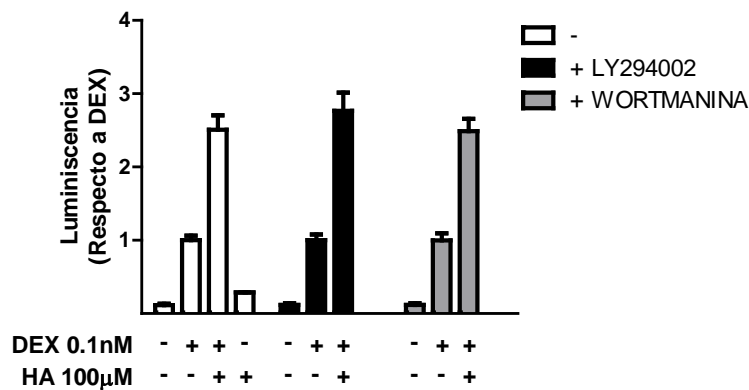


Figura 3.13: Efecto de dos inhibidores farmacológicos de PI3K. Células HEK293T cotransfectadas con plásmidos que codifican para el GR, H1R y TAT3-Luc fueron tratadas con dexametasona 0,1nM por 24 horas, pretratadas por 10 minutos con histamina 100µM, y pretratadas por 30 minutos con LY2940022 2µM o wortmanina 50nM. La actividad de luciferasa fue determinada como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media +/- ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

PAPEL DE LAS KINASAS: JUN-KINASA

Otra kinasa descrita como moduladora de la actividad del GR, y a su vez como efectora de las subunidades Gβγ, es la kinasa c-Jun N-terminal (JNK). Dicha kinasa pertenece a la familia de proteína kinasas activadas por mitógenos (MAPK), quienes están implicadas en numerosos procesos celulares como la apoptosis, la diferenciación celular, la proliferación, y los procesos inflamatorios (Coso et al., 1996; Rogatsky et al., 1998). Para estudiar su papel en la modulación de la actividad del GR por parte de la histamina utilizamos dos estrategias diferentes. Por un lado, utilizamos el inhibidor farmacológico de JNK, SP600125, y por otro lado utilizamos una variante del receptor a glucocorticoides insensible a la fosforilación por JNK, mutado en la posición 246, el cual presenta reemplazada la serina original por una alanina (Rogatsky et al., 1998). El tratamiento con el inhibidor SP600125 mostró que el incremento mediado por la histamina sobre la actividad del GR se pierde al inhibir JNK, mientras que al utilizar la versión mutante, GRS246A, dicho efecto no sólo se pierde sino que se transforma en

inhibitorio (Fig. 3.14). Estos resultados indican que JNK participa en el efecto estimulador del GR por parte de histamina.

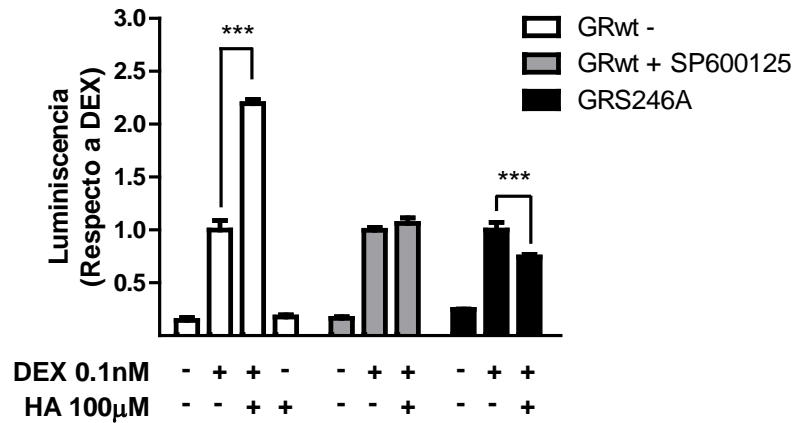


Figura 3.14: Estudio del papel de JNK. Células HEK293T cotransfectadas con plásmidos que codifican para el GR salvaje (GRWT), el H1R y TAT3-Luc, fueron tratadas con dexametasona 0,1nM por 24 horas, pretratadas con histamina 100µM durante 10 minutos, y pretratadas o no SP600125 por 30 minutos. Las barras negras representan células cotransfectadas con plásmidos que codifican para la versión mutada del GR GRS246A, el H1R y TAT3-Lu. La actividad de luciferasa fue determinada como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media +/- ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. ***p<0,001.

En nuestro laboratorio ha sido descrito, en células CHO, que la histamina actuando a través del H1R es capaz de activar JNK (Notcovich et al., 2010). Dado que el resultado obtenido con la mutante GRS246A es similar al que se obtiene al secuestrar las subunidades Gβγ hipotetizamos que en nuestro sistema JNK podría ser activada por estas mismas subunidades. Para confirmar si la histamina, actuando a través del H1R, es capaz de activar JNK a través de las subunidades Gβγ, decidimos estudiar la activación de JNK mediante ensayos de Western Blot. El resultado de estos ensayos muestra que en nuestro sistema, la histamina activa a JNK y que este efecto se pierde al secuestrar las subunidades Gβγ sobreexpresando Gαt (Fig. 3.15).

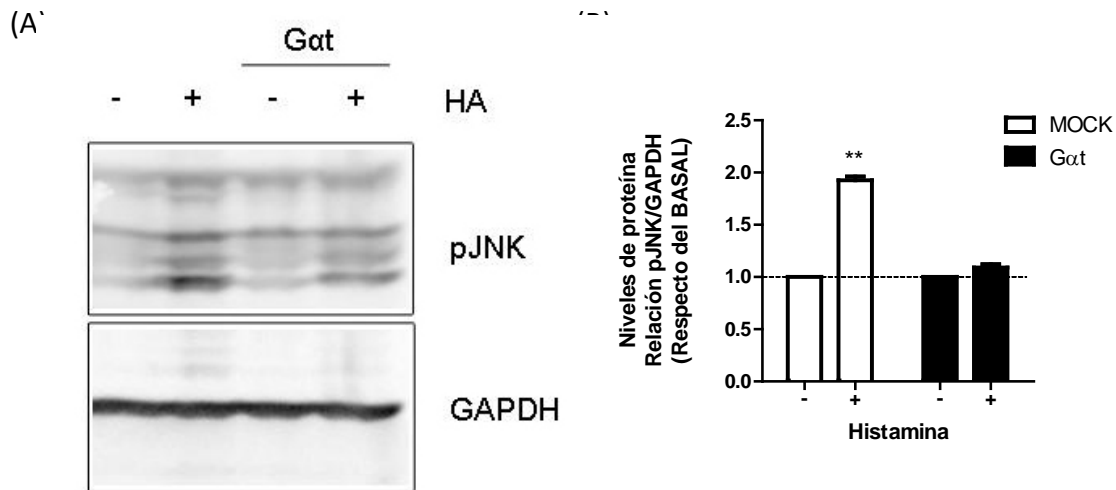


Figura 3.15: Determinación de pJNK por Western Blot. Células HEK293T transfectadas con un plásmido que codifica para el H1R y cotransfectadas con Gat o con un plásmido vacío (MOCK) fueron tratadas con histamina 100 μ M por 10 minutos. (A) Sección de la membrana entre 40 y 60 KDa de un experimento representativo. (B) Densitometría de la membrana realizada con el programa ImageJ como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media \pm ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. ** $p < 0,01$.

El papel de JNK en el incremento de la actividad del GR mediado por la histamina plantea una controversia frente a lo clásicamente descrito para su papel en la modulación del GR. La fosforilación del GR por parte de JNK ha sido asociada a una inhibición de su actividad transcripcional (Rogatsky et al., 1998; Szatmary et al., 2004; Davies et al., 2008), mientras que en nuestro caso el papel de JNK sobre el GR resulta activador. Esta discrepancia podría deberse a distintos factores: por un lado, la estrategia adoptada para activar JNK y revelar su efecto y por otro lado, las diferencias debidas a los promotores y al contexto celular en que estos son activados.

En lo referido al primer punto, en los trabajos citados, la activación de JNK se consigue mediante el uso de herramientas moleculares, ya sea sobreexpresando JNK y su activador racQ61L (una mutante constitutivamente activa de Rac), o bien sobreexpresando su activador MKK7 o MLK3. Por el contrario, en nuestro caso activamos JNK de manera farmacológica, utilizando la histamina como ligando del H1R y

desencadenando su activación. Cabe hipotetizar que la diferencia en los efectos de JNK sobre el GR pueda deberse a la metodología utilizada para su activación.

En relación al segundo punto, en nuestro caso evaluamos el papel de JNK sobre la actividad del GR midiendo la actividad del gen reportero TAT3-Luc en células HEK-293T, mientras que en los casos citados se evaluó utilizando genes reporteros con otros promotores y en otros tipos celulares (el sistema reportero Δ GTCO-CAT en las líneas celulares HeLa y U2-OS, el sistema reportero MMTV-Luc en células HeLa o el sistema reportero Gal4-Luc en la línea celular COS7). Estas diferencias resultan muy importantes para la actividad transcripcional del GR, dado que se ha demostrado que los efectos de la activación de JNK resultan específicos para el promotor, aumentando la actividad del GR sobre TAT3 y disminuyéndola sobre en MMTV (Szatmary et al., 2012).

En consecuencia, decidimos evaluar el efecto de histamina sobre la actividad transcripcional del GR inducida por dexametasona utilizando el promotor MMTV-Luc, a fin de verificar si los efectos observados por histamina utilizando el sistema TAT3 eran reproducidos al utilizar otros sistemas reporteros. Para ello cotransfectamos células HEK293-T con plásmidos que codifican para el GR, el H1R y el reportero MMTV-Luc. En este sistema la histamina también incrementó la activación del GR inducida por dexametasona, efecto que nuevamente se transformó en una inhibición al utilizar la versión mutada del GR (GRS246A) incapaz de ser fosforilada por JNK (Fig. 3.16A), replicando completamente los resultados obtenidos utilizando el sistema TAT3.

Asimismo, para evaluar la posible influencia del contexto celular, estudiamos el efecto de histamina sobre la actividad del GR para ambos genes reporteros en células HeLa, las cuales se utilizaron originalmente para caracterizar el efecto de JNK y sobre las cuales se describieron efectos opuestos sobre la actividad del GR para los reporteros TAT3 y MMTV. En estas células, la histamina nuevamente incrementó la actividad del GR inducida por dexametasona utilizando ambos sistemas reporteros (Fig. 3.16B).

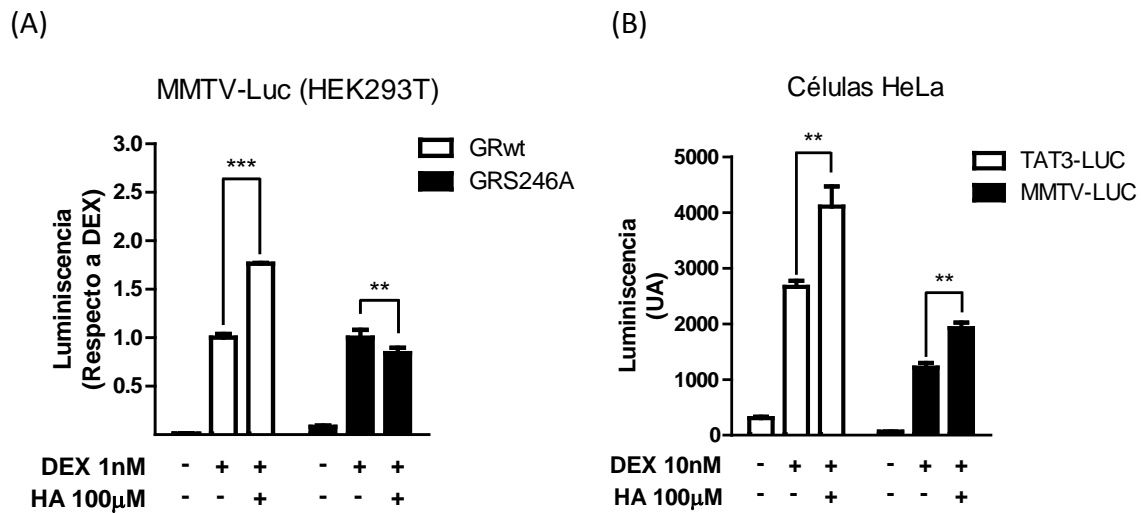


Figura 3.16: Estudio del papel de JNK. (A) Células HEK293T cotransfectadas con plásmidos que codifican para el GR salvaje (wt) o mutado (S246A), el H1R y MMTV-Luc fueron tratadas con dexametasona 1nM por 24 horas y pretratadas con histamina 100µM durante 10 minutos. (B) Células HeLa cotransfectadas con plásmidos que codifican para el GR, H1R y los genes reporteros TAT3-Luc o MMTV-Luc fueron tratadas con dexametasona 10nM por 24 horas y pretratadas con histamina 100µM. La actividad de luciferasa fue determinada como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media \pm ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Los resultados muestran que la histamina, actuando sobre el H1R y a través de la activación de JNK, aumenta la eficacia de la transactivación de TAT3-Luc y MMTV-Luc mediada por el GR. Vale decir que utilizando el mismo sistema celular y el mismo sistema reportero que en el trabajo donde se caracterizó originalmente el efecto inhibitorio de JNK sobre la actividad del GR, en nuestras manos dicha kinasa posee un efecto estimulador. Con estos resultados, nos atrevemos a especular que la diferencia observada radica en activar JNK mediante herramientas moleculares sobreexpresando sus activadores, o mediante herramientas farmacológicas utilizando histamina. A pesar de no formar parte de nuestros objetivos, consideramos que esta hipótesis merece ser estudiada en un futuro cercano, dadas las profundas implicancias que posee tanto en el diseño experimental como en la interpretación de resultados.

ESTUDIO DE LA VÍA CANÓNICA DEL H1R

Como se puntualizó anteriormente, la unión de la histamina al receptor H1 desencadena la disociación de la proteína G acoplada al receptor, y la activación de dos vías de señalización principales: la vía canónica, mediada por la subunidad $G\alpha_q$, y una no-canónica mediada por el dímero $G\beta\gamma$. Clásicamente la subunidad $G\alpha_q$ es capaz de activar la fosfolipasa-C (PLC), quien participa en el metabolismo del fosfatidil-inositol bifosfato (PIP2), cuyos productos de hidrólisis son el inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y el diacilglicerol (DAG), ambos segundos mensajeros del proceso de transducción de señales mediado por el H1R. En particular el DAG es capaz de activar la proteína quinasa C (PKC). En nuestro sistema, el tratamiento de las células con el inhibidor de PLC, U73122, mostró que el efecto de histamina sobre la actividad del GR resulta mayor al inhibir PLC, sugiriendo su papel en la inhibición de la actividad del GR por parte de la histamina. Por su parte, la falta de efecto observada con el inhibidor de PKC, GF109203X, sugiere que dicha quinasa no participa de la modulación histaminérgica (Fig. 3.17).

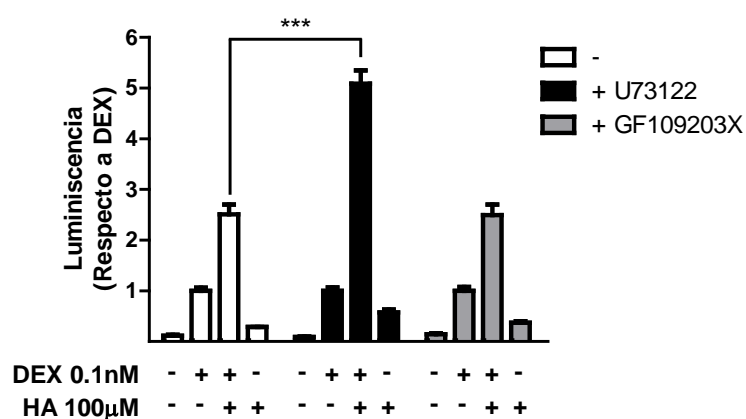


Figura 3.17: Efecto de diversos inhibidores farmacológicos sobre la modulación de la actividad del GR por parte de la histamina. Células HEK293T cotransfectadas con plásmidos que codifican para el GR, el H1R y TAT3-Luc fueron tratadas con dexametasona 0,1nM por 24 horas y pretratadas con histamina 100µM por 10 minutos y con U73122 10µM (inhibidor de PLC) o GF109203X 10µM (inhibidor de PKC) por 30 minutos. La actividad de luciferasa fue determinada

como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media +/- ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. ***p<0,001.

Posteriormente, decidimos estudiar el papel de las proteínas G pequeñas, Rac1 y RhoA, dado que en nuestro laboratorio se ha descrito que la histamina, actuando a través del H1R, activa ambas proteínas mediante la activación de PLC (Notcovich et al., 2010). En este caso, utilizando PREX1, un activador de Rac que actúa como factor intercambiador de nucleótido de guanina (GEF), y la dominante negativa Rac1N17, encontramos que la sobreexpresión de PREX1 reduce el efecto de la histamina sobre la actividad del GR, y que consistentemente la sobreexpresión de Rac1N17 aumenta dicho efecto (Fig. 3.18A). Por el contrario, ni la sobreexpresión p115 Rho-GEF, activador de RhoA, ni la de su inhibidor, la exoenzima C3, modificaron el efecto de histamina sobre la actividad del GR (Fig. 3.18B). Estos resultados en su conjunto sugieren que Rac1, pero no RhoA, participaría de los efectos inhibitorios que la histamina posee sobre la actividad del GR.

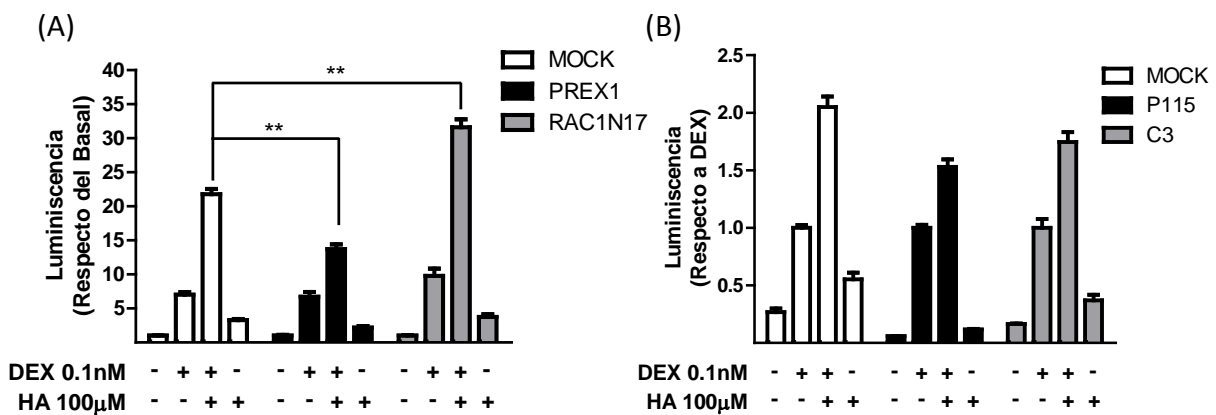


Figura 3.18: Papel de las proteínas G pequeñas Rac 1 y RhoA. Células HEK293T cotransfectadas con plásmidos que codifican para el GR, el H1R y TAT3-Luc y con (A) PREX1 (activador de Rac) o RACN17 (dominante negativa de Rac), o (B) p115 (activador de RhoA) o C3 (inhibidor de RhoA) fueron tratadas con dexametasona 0,1nM por 24 horas y pretratadas con histamina 100µM durante 10 minutos. La actividad de luciferasa fue determinada como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media +/- ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. **p<0,01.

EFFECTO DE LOS AGONISTAS INVERSOS PARA EL H1R

Para evaluar las posibles implicancias de nuestras observaciones en el contexto de un posible escenario clínico que involucre la asociación farmacológica de un glucocorticoide y de un antihistamínico, decidimos estudiar el efecto de dos agonistas inversos para el H1R, mepiramina y trans-triprolidina, sobre la actividad del GR inducida por dexametasona. Sorprendentemente encontramos que, al igual que la histamina, ambos antihistamínicos incrementan la actividad del GR en forma concentración-dependiente (de 11935 ± 1068 y a 18317 ± 561 para mepiramina y 16806 ± 632 para trans-triprolidina, en Unidades Arbitrarias de Luminiscencia) (Fig. 3.19).

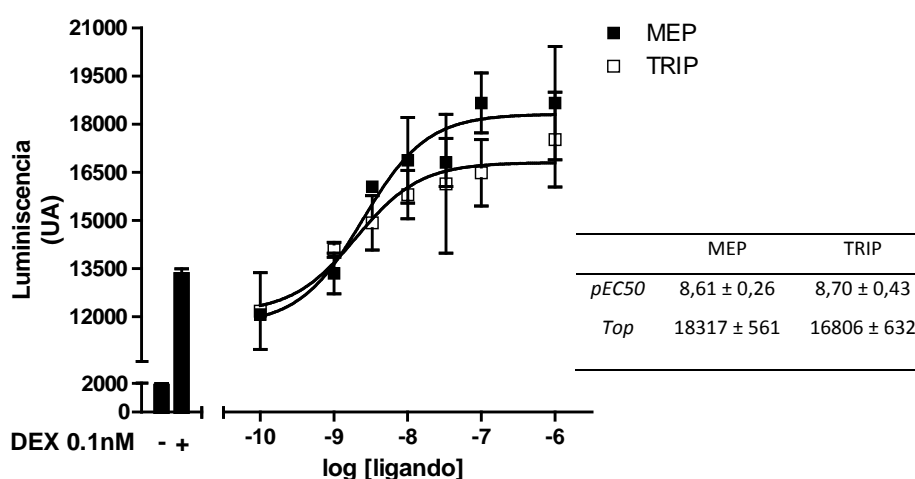


Figura 3.19: Efecto de agonistas inversos para el receptor H1 a histamina sobre la actividad del GR. Células HEK293T cotransfectadas con plásmidos que codifican para el GR, el H1R y TAT3-Luc fueron tratadas con dexametasona 0,1nM por 24 horas y pretratadas con mepiramina 10 μ M o trans-triprolidina por 10 minutos a las concentraciones indicadas. La actividad de luciferasa fue determinada como se describe en Materiales y Métodos. Los parámetros de ajuste de la curva se detallan en la tabla. Los resultados representan la media \pm ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Es interesante observar esta aparente paradoja, en la que tanto la histamina como los antihistamínicos, teniendo efectos contrarios sobre la activación del H1R, poseen el mismo efecto sobre la actividad del GR incrementando su actividad frente a

dexametasona. Hemos demostrado que la histamina posee un efecto dual sobre la actividad del GR, inhibitorio mediado por la activación de Gαq-PLC-Rac1, y estimulador mediado por las subunidades Gβγ -JNK, primando este último. Considerando lo antedicho, la potenciación ejercida por los antihistamínicos podría deberse a su probada inhibición de la vía mediada por Gαq (Fitzsimons et al., 2004), aunque no puede descartarse un incremento en la disponibilidad del dímero Gβγ asociado al H1R.

Para establecer el papel de las subunidades Gβγ en el incremento en la actividad del GR ejercido por los antihistamínicos decidimos evaluar su efecto secuestrando las subunidades Gβγ sobreexpresando la subunidad Gαt. En este sistema, tanto mepiramina como trans-triprolidina también incrementaron la actividad del GR, descartando el papel de las subunidades Gβγ en la modulación ejercida por dichos agonistas inversos (Fig. 3.20).

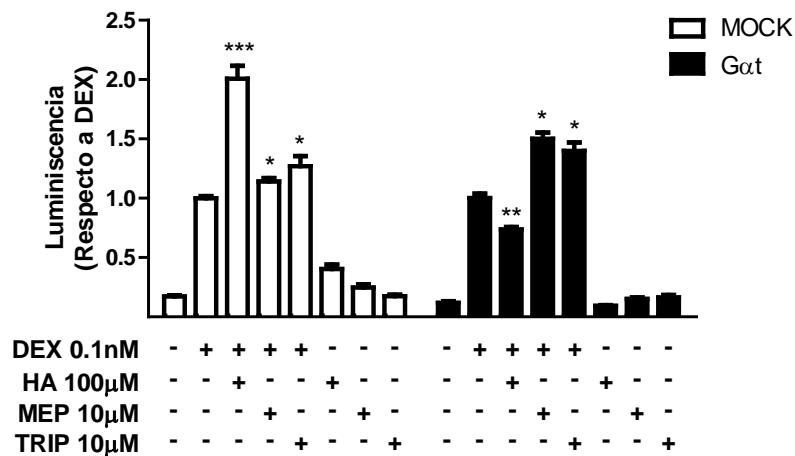


Figura 3.20: Efecto del secuestro de las subunidades Gβγ sobre la modulación de los antihistamínicos sobre la actividad del GR. Células HEK293T cotransfectadas con plásmidos que codifican para el GR, el H1R y TAT3-Luc fueron transfectadas, o no, con Gαt transducina, tratadas con dexametasona 0,1nM por 24 horas, y pretratadas con histamina 100µM, mepiramina 10µM o trans-triprolidina 10µM por 10 minutos. La actividad de luciferasa fue determinada como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media +/- ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 respecto a DEX.

En conclusión, nuestros resultados muestran que la histamina, actuando a través del H1R, incrementa la actividad del GR en los procesos de transactivación. Este efecto es el resultado combinado de ambas vías de señalización del H1R, observándose un efecto inhibitorio mediado por la vía $G\alpha_q$ -PLC-Rac, y un efecto estimulador mediado por la vía $G\beta\gamma$ -JNK, prevaleciendo este último sobre el primero. Los antihistamínicos ensayados también aumentan la actividad del GR, pero en este caso, a través de un efecto inhibitorio sobre la vía inhibitoria del H1R. Siendo la coadministración de un corticoide y un antihistamínico el contexto de interés clínico, y habiendo establecido su efecto a nivel de la transactivación, decidimos continuar con este estudio sobre la actividad del GR en los procesos de transrepresión, por ser este mecanismo fundamental para los efectos antiinflamatorios de los glucocorticoides.

TRANSREPRESIÓN

Hasta ahora hemos estudiado la modulación de la actividad del GR por parte de la histamina, midiendo los procesos de transactivación del GR. Sin embargo, la represión de la expresión de genes es una parte fundamental del espectro de acción del GR a nivel nuclear. Es por ello que en esta segunda parte nos proponemos estudiar si la modulación observada también se produce a este nivel.

Como se mencionó en la Introducción, el GR puede reprimir la expresión de genes a través de tres mecanismos principales: por interacción directa con el ADN, a través de sitios nGRE; por interacción con factores de transcripción a los cuales inhibe, o bien por un mecanismo combinado. De los tres, el más importante es la interacción con factores de transcripción, principalmente con NF- κ B, uno de los factores más estudiados a nivel de la transrepresión de genes. Dicho factor de transcripción se encuentra implicado en numerosos procesos celulares incluyendo la diferenciación, la proliferación, la apoptosis, y participa en la regulación de la expresión de numerosos e importantes genes proinflamatorios. Tal es así, que la transrepresión de genes inducidos por dicho factor, constituye uno de los mecanismos principales a través del cual los corticoides actúan como antiinflamatorios e inmunosupresores. En vista de esto nos propusimos estudiar la modulación histaminérgica sobre la actividad del GR, a nivel de la transrepresión de genes mediados por NF- κ B.

PUESTA A PUNTO DEL SISTEMA EXPERIMENTAL

Para llevar a cabo este objetivo decidimos utilizar el mismo modelo celular que para el estudio de la transactivación, utilizando en este caso dos sistemas de gen reportero, κ B-LUC e IL6-LUC, quienes codifican para la enzima luciferasa y cuyos promotores responden a NF- κ B. Cuando se desea evaluar la inhibición de la expresión de un gen, resulta necesario incrementarla con el fin de medir la posterior disminución de la señal. Con este propósito sobreexpresamos una de las subunidades del dímero NF- κ B, RelA, lo que produjo un incremento en la actividad de luciferasa que nos permitió evaluar el efecto de la dexametasona (Fig. 3.21).

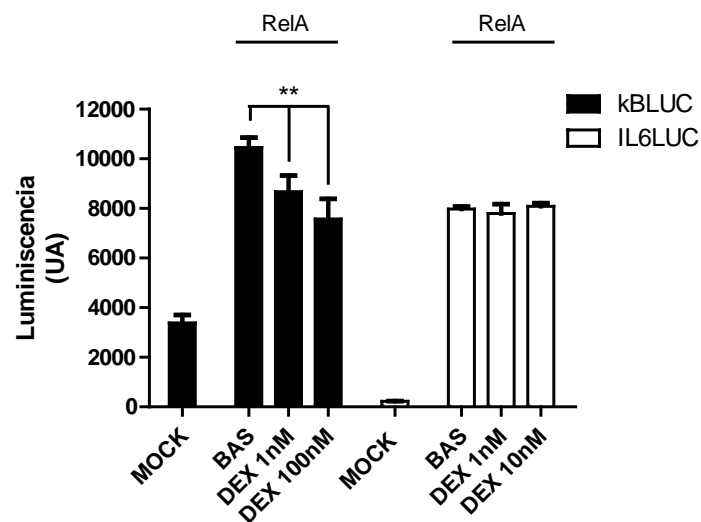


Figura 3.21: Actividad de NF- κ B por sobreexpresión de RelA. Células HEK293T cotransfectadas con plásmidos que codifican para el GR, para la subunidad RelA, y con κ B-LUC o IL6-LUC, fueron tratadas con dexametasona por 24 horas. La actividad de luciferasa fue determinada como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media \pm ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. ** $p < 0,01$.

En dicho sistema celular se logró incrementar la actividad del gen reportero sobreexpresando la subunidad RelA, aunque la actividad represora de dexametasona sólo fue puesta en evidencia cuando se utilizó la construcción que posee el promotor artificial κ B.

Hipotetizamos que la falta de respuesta observada frente al tratamiento con dexametasona al utilizar la construcción IL6 se debió al excesivo estímulo alcanzado mediante la sobreexpresión de la subunidad RelA (unas 36 veces), cuyo efecto el corticoide resultaría incapaz de revertir. En función de esto, decidimos activar NF- κ B tratando a las células con TNF- α , el cual es una citoquina proinflamatoria ampliamente utilizada como activadora de la vía de NF- κ B. El agregado de TNF- α produjo un incremento menor y concentración-dependiente en la actividad de ambos reporteros (de 4 a 6 veces), que sí pudo ser inhibido mediante el agregado de dexametasona (Fig. 3.22).

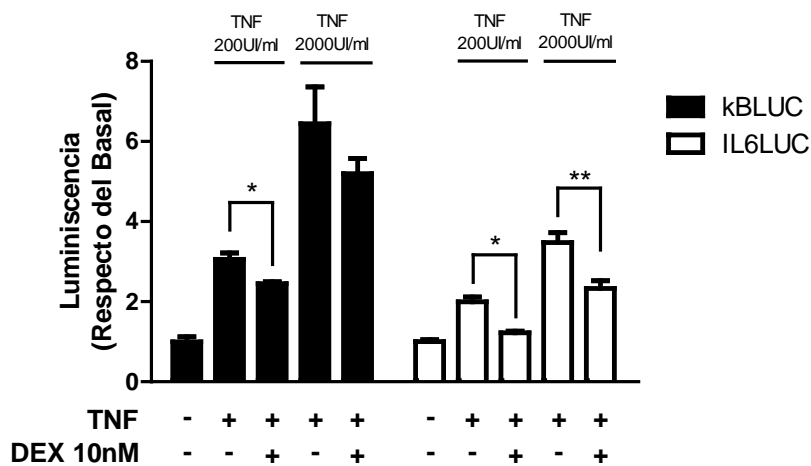


Figura 3.22: Actividad de NF- κ B inducida por TNF- α . Células HEK293T cotransfectadas con plásmidos que codifican para el GR, el H1R, y con κ B-LUC o IL6-LUC fueron tratadas con TNF- α por 6 horas y pretratadas con dexametasona 10nM por 1 hora. La actividad de luciferasa fue determinada como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media \pm ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Frente a este resultado, decidimos continuar nuestros estudios utilizando la construcción IL6-Luc por tratarse de una construcción que posee un promotor natural, siendo más representativa de los efectos fisiológicos de la actividad de NF- κ B. Una vez puesto a punto el sistema, nos abocamos al estudio de la modulación histaminérgica sobre el mismo.

MODULACION POR MEPIRAMINA

Como se dijo anteriormente, la transrepresión de genes es el mecanismo antiinflamatorio más importante de los GCs, y el proceso inflamatorio es el contexto clínico más relevante para el estudio de la modulación histaminérgica sobre la actividad del GR. Por lo tanto, decidimos evaluar tal modulación utilizando antihistamínicos, por tratarse de los ligandos de interés clínico. En nuestro sistema, el agregado de dexametasona o mepiramina reduce en un 30% y 25% respectivamente la actividad de NF-κB inducida por TNF-α. Por su parte, el cotratamiento con ambos ligandos produce un incremento de la inhibición mediada por la dexametasona, el cual resulta en una reducción del 75% de la señal luminiscente (Fig. 3.23).

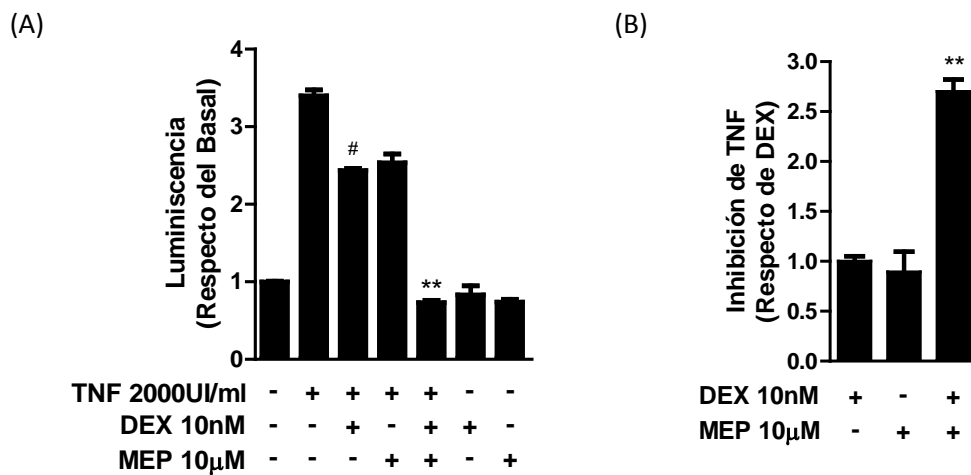


Figura 3.23: Efecto de mepiramina sobre la inhibición de NF-κB inducida por dexametasona. Células HEK293T cotransfectadas con plásmidos que codifican para el GR, el H1R, e IL6-LUC fueron incubadas con mepiramina 10μM por 10 minutos, luego dexametasona 10nM por 1 hora y finalmente TNF-α por 6 horas de acuerdo a lo indicado. Resultados expresados (A) respecto de la señal basal obtenida en ausencia de estímulo o (B) respecto de la inhibición de la señal inducida por TNF-α producida por dexametasona. La actividad de luciferasa fue determinada como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media +/- ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. # p<0,01 respecto de TNF; **p<0,01 respecto de TNF+DEX.

El efecto observado es el resultado de un aumento de más de un orden de magnitud en la potencia de la dexametasona para inhibir la señal producida por TNF- α , observándose un corrimiento hacia la izquierda de su curva concentración-respuesta, provocando un aumento en la pEC50 desde $8,26 \pm 0,24$ hasta $9,86 \pm 0,23$ (Fig. 3.24).

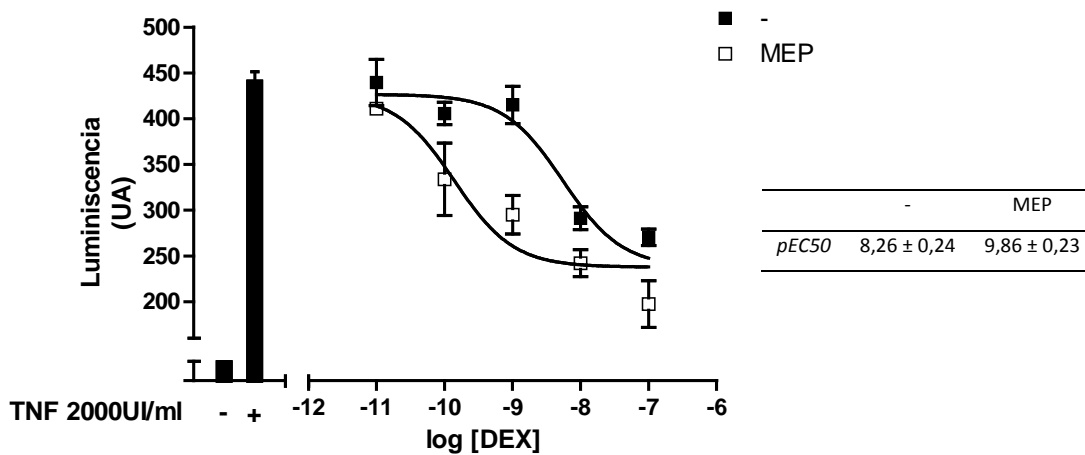


Figura 3.24: Incremento en la potencia de dexametasona por parte de mepiramina. Células HEK293T cotransfectadas con plásmidos que codifican para el GR, el H1R, e IL6-LUC fueron incubadas con mepiramina 10 μ M por 10 minutos, luego dexametasona por 1 hora a las concentraciones indicadas y finalmente TNF- α por 6 horas, como se indica. La actividad de luciferasa fue determinada como se describe en Materiales y Métodos. Los parámetros de ajuste de la curva se detallan en la tabla. Los resultados representan la media +/- ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Los resultados obtenidos hasta el momento muestran que los antihistamínicos ensayados incrementan la eficacia de la dexametasona sobre la actividad del GR, tanto a nivel de la transactivación como de la transrepresión de genes. Esto resulta muy importante a nivel terapéutico, dado que podría obtenerse un efecto terapéutico benéfico al asociar un antihistamínico a una menor dosis de corticoide. Considerando esto último decidimos evaluar el efecto de otros antihistamínicos de interés clínico.

EFFECTO DE DIVERSOS ANTIHISTAMINICOS

Para extender el estudio del efecto observado utilizando mepiramina, usamos el mismo modelo celular para estudiar el efecto de los antihistamínicos trans-triprolidina, cetirizina, clorfeniramina o difenhidramina. El agregado de todos estos ligandos incrementó la inhibición producida por dexametasona sobre la actividad de NF-κB inducida por TNF-α. Cabe destacar que, para tres de los cuatro ligandos ensayados (trans-triprolidina, cetirizina y difenhidramina), este efecto resulta muy significativo incrementando la inhibición producida por dexametasona entre tres y cuatro veces (Fig. 3.25).

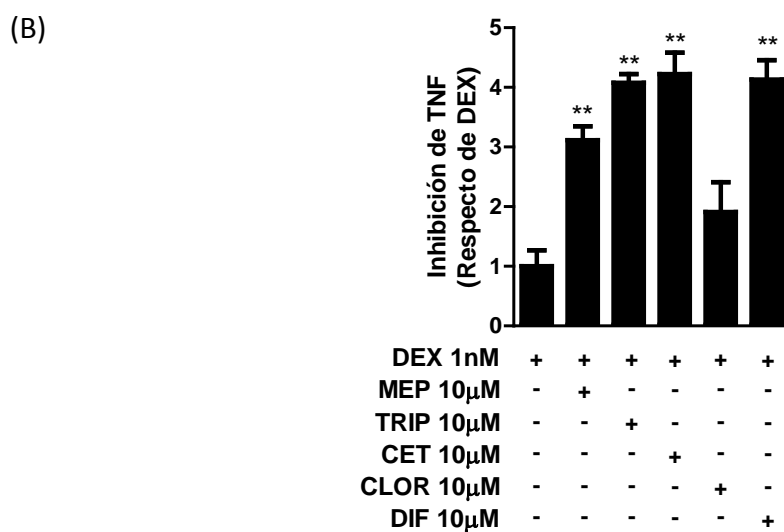
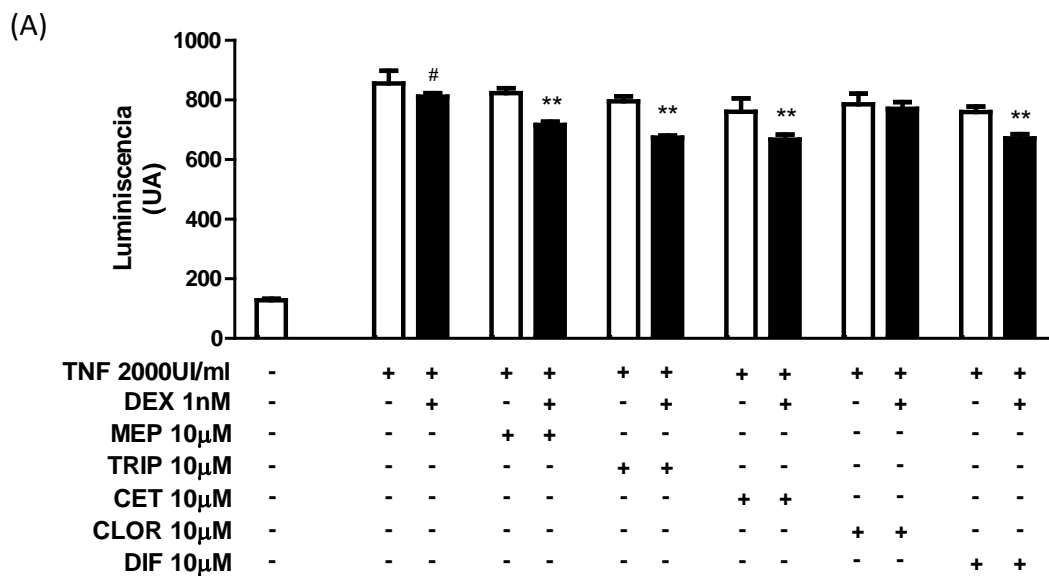


Figura 3.25: Efecto de diversos antihistamínicos sobre la inhibición de NF- κ B por dexametasona. Células HEK293T cotransfectadas con plásmidos que codifican para el GR, el H1R, e IL6-LUC fueron incubadas con mepiramina (MEP), trans-triprolidina (TRIP), cetirizina (CET), clorfeniramina (CLOR) o difenhidramina (DIF) 10 μ M por 10 minutos, luego dexametasona 1nM por 1 hora y finalmente TNF- α por 6 horas. Resultados expresados (A) respecto del basal o (B) respecto de la inhibición por parte de dexametasona sobre el efecto de TNF- α . La actividad de luciferasa fue determinada como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media \pm ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. # $p < 0,01$ respecto de TNF; ** $p < 0,01$ respecto de TNF+DEX.

Habiendo estudiado la modulación por parte de histamina y de diversos antihistamínicos sobre la actividad del GR, nos propusimos evaluar si lo observado en modelos celulares de expresión heteróloga puede ser replicado sobre líneas celulares representativas de modelos fisiológicos evaluando la modulación de genes. Para esto elegimos dos modelos celulares diferentes. Las células epiteliales alveolares A549, ampliamente utilizadas como modelo de inflamación pulmonar para estudiar la reactividad alveolar frente a diversos estímulos (Richter et al., 2003; Erlemann et al., 2007) y las células U937, precursoras de monocitos y macrófagos, como modelo de sensibilización cutánea (Ashikaga et al., 2006; Python et al., 2007).

PARTE II: RELEVANCIA FISIOPATOLÓGICA SOBRE LA EXPRESIÓN ENDÓGENA DE GENES

MODULACION DE LA EXPRESIÓN DE GENES ENDÓGENOS

En nuestro laboratorio, y en otros, se ha descrito la presencia del H1R en células U937 (Driver et al., 1989; Fernandez et al., 2002), sin embargo, no pudimos encontrar reportes acerca de la presencia de dicho receptor en células A549. Por ello, en primera instancia, nos propusimos demostrar la presencia funcional del H1R midiendo la modulación intracelular de calcio en respuesta al estímulo con histamina. En estas células, el agregado de histamina produjo un pico de calcio intracelular que resultó específicamente bloqueado por el antihistamínico mepiramina, demostrando funcionalmente la presencia del H1R (Fig. 3.26).

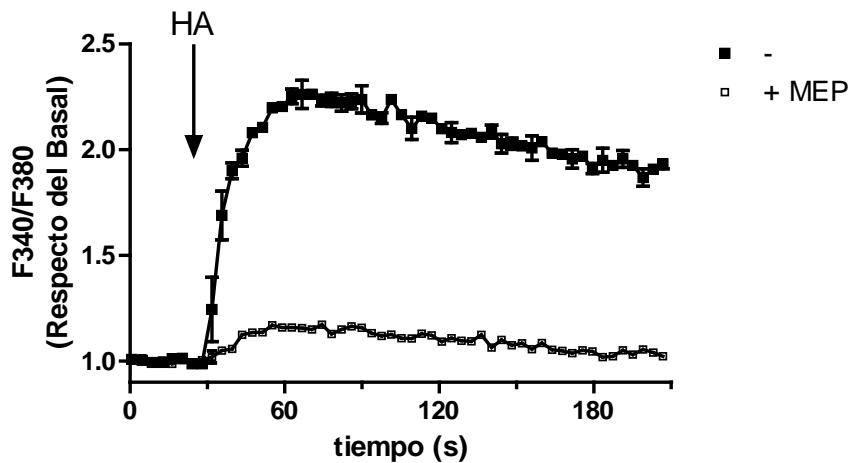


Figura 3.26: Modulación de calcio intracelular en células A549. Las células fueron incubadas con Fura-2AM y luego lavadas, pretratadas o no con mepiramina 10 μ M (MEP) y estimuladas con histamina 100 μ M (HA). La medición de calcio intracelular fue realizada como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Utilizando los sistemas celulares descriptos evaluamos la modulación de tres genes endógenos típicamente transactivados por el GR: GILZ (glucocorticoid induced leucine zipper), THBD (thrombomodulin) y SLC19A2 (thiamine transporter 1; solute carrier family 19 member 2) (Wang et al., 2004). El estudio de la expresión de estos genes lo realizamos mediante PCR cuantitativa. En las células A549, el tratamiento con dexametasona indujo la expresión de los tres genes pero sólo en el caso de THBD, el agregado de histamina incrementó dicho efecto (Fig. 3.27A). Por su parte, en las células U937, la dexametasona indujo solamente la expresión de GILZ y en este caso la histamina también incrementó dicho efecto (Fig. 3.27B).

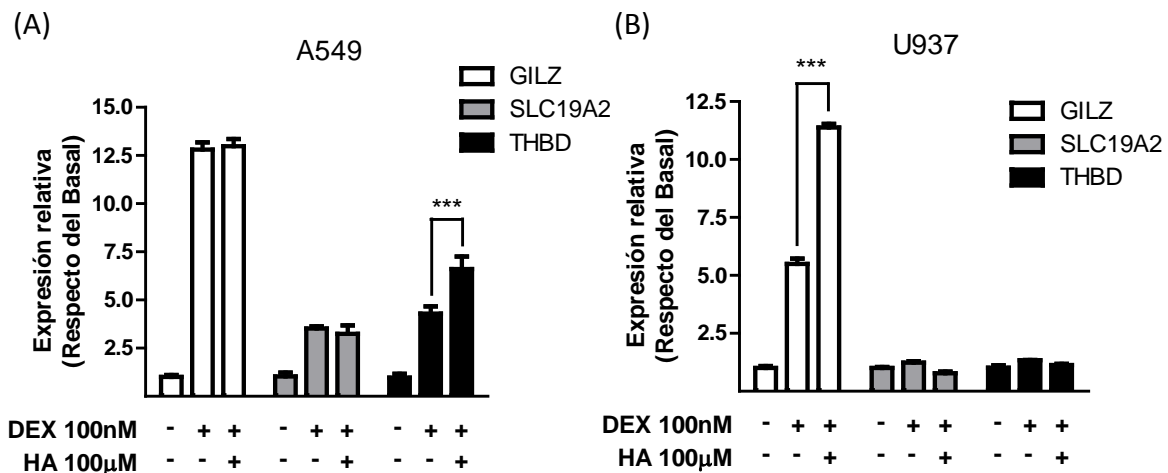


Figura 3.27: Expresión de genes endógenos regulados por el GR. Análisis de expresión por PCR cuantitativa de los genes GILZ, SLC19A2 y THBD respecto de la expresión de Beta-Actina, (A) en células A549, o (B) en células U937, incubadas con histamina (HA) 100µM por 10 minutos y luego tratadas con dexametasona (DEX) 100 nM por 3 horas. Los niveles de ARN mensajero fueron cuantificados como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media +/- ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. ***p<0,001.

Estos resultados sugieren que los efectos sobre el GR dependen del contexto celular y de los genes estudiados, lo cual se condice con lo descrito en la literatura para este receptor (Simons, 2008). Por lo tanto podemos concluir que las

modificaciones inducidas por la histamina sobre la actividad del GR lo afectan diferencialmente de acuerdo al tipo celular y al gen estudiado. Esta especificidad en sus efectos indica que los resultados obtenidos en ensayos utilizando genes reporteros no pueden ser extrapolados en forma general al estudiar la expresión de genes endógenos regulados por el GR.

Para comprobar que la modulación por histamina sobre genes endógenos es replicada cuando las células son tratadas con antihistamínicos, se trataron las células con los antihistamínicos mepiramina, trans-triprolidina, cetirizina, clorfeniramina o difenhidramina. El análisis de la inducción de genes muestra que, aunque con distinta eficacia, todos los antihistamínicos ensayados producen un aumento sobre la inducción de los genes THBD y GILZ mediada por dexametasona, en las respectivas líneas celulares (Fig. 3.28).

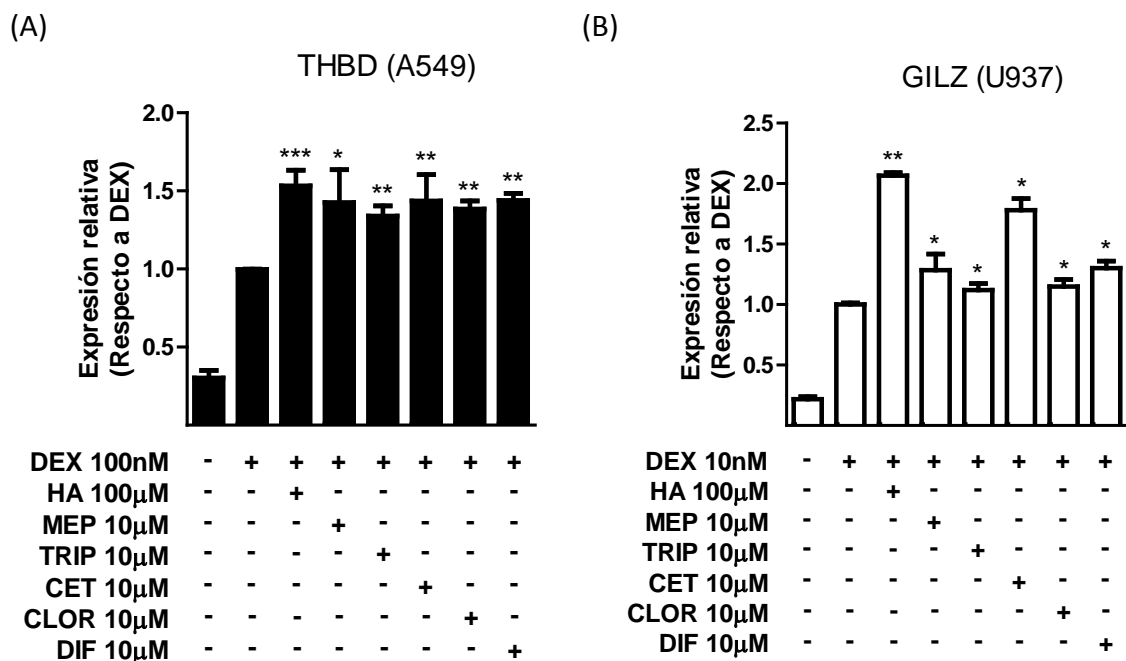


Figura 3.28: Efecto de antihistamínicos sobre la expresión de genes endógenos regulados por el GR. Análisis de expresión por PCR cuantitativa del gen (A) THBD en células A549 o (B) GILZ en células U937, respecto de la expresión de Beta-Actina. Las células fueron incubadas con histamina (HA), mepiramina (MEP), trans-triprolidina (TRIP), cetirizina (CET), clorfeniramina

(CLOR) o difenhidramina (DIF) por 10 minutos y luego tratadas con dexametasona (DEX) por 3 horas. Los niveles de ARN mensajero fueron cuantificados como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media \pm ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Los resultados obtenidos para la modulación de tres genes, en conjunto, permiten realizar dos observaciones. Por un lado, la modulación por parte de histamina y los antihistamínicos sobre la expresión de GILZ y THBD inducida por dexametasona en células A549 y U937, nos permite confirmar los resultados obtenidos con el sistema reportero en células HEK293T, descartando que la modulación observada utilizando el sistema TAT3-Luc sea producto de la manipulación y sobreexpresión génica. Pero por otro lado, la ausencia de un efecto detectable por parte de histamina sobre la regulación de la expresión de los genes GILZ y SLC en células A549 inducidos por dexametasona, demuestra que no es posible la extrapolación directa y generalizada de lo observado en los ensayos utilizando sistemas de gen reportero. Teniendo en cuenta esto decidimos estudiar la modulación de genes que estuvieran directamente implicados en procesos inflamatorios, por ser estos clínicamente relevantes considerando el cotratamiento de antihistamínicos y corticoides.

MODULACION DE LA EXPRESION DE GENES ENDOGENOS ANTIINFLAMATORIOS

Como se detalla en la Introducción, dado que la inflamación es el contexto ideal para pensar una aplicación clínica que resulte de la combinación de un antihistamínico y un corticoide nos propusimos estudiar la modulación de genes antiinflamatorios en modelos celulares de interés clínico. Numerosos genes antiinflamatorios son transactivados por el GR como parte esencial de su mecanismo antiinflamatorio. Entre ellos, los genes GILZ y MKP1, tienen particular importancia, como lo demuestra la numerosa cantidad de reportes al respecto (ver Introducción).

En consecuencia decidimos evaluar la modulación de los ligandos antihistamínicos previamente utilizados sobre la expresión de MKP1 inducida por dexametasona, en células A549 y U937. En las células A549, el tratamiento con trans-triprolidina, cetirizina y clorfeniramina incrementó la expresión de MKP1, mientras que en las células U937, sólo difenhidramina mostró tal efecto (Fig. 3.29).

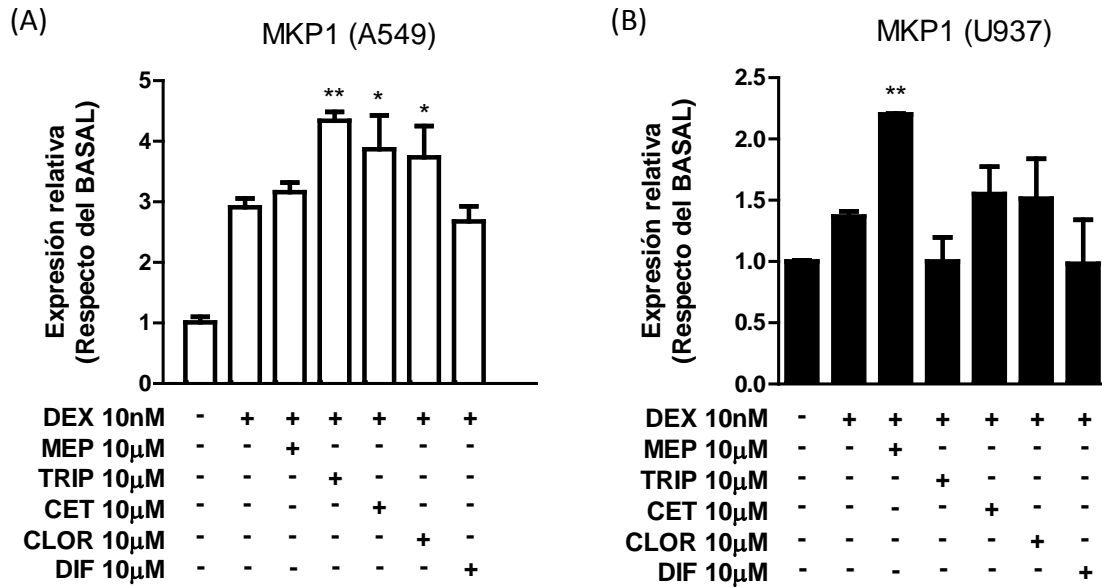


Figura 3.29: Efecto de antihistamínicos sobre la transactivación de genes antiinflamatorios regulados por el GR. Análisis de expresión por PCR cuantitativa del gen MKP1 en células A549 (A) o en células U937 (B) respecto de la expresión de Beta-Actina. Las células fueron incubadas con mepiramina (MEP), trans-triprolidina (TRIP), cetirizina (CET), clorfeniramina (CLOR) o difenhidramina (DIF) por 10 minutos y luego tratadas con dexametasona (DEX) por 3 horas. Los niveles de ARN mensajero fueron cuantificados como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media +/- ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. *p<0,05; **p<0,01.

El análisis de la expresión de los genes GILZ y MKP1 inducidos por dexametasona y su modulación por diferentes antihistamínicos, muestra que existe una diversidad para sus efectos respecto del tipo celular, el gen estudiado y el ligando ensayado. Mientras que para mepiramina, cetirizina y clorfeniramina, el efecto sobre la inducción

de MKP1 en células A549 resulta estimulador, en células U937 resulta inhibitorio. Por otra parte, a pesar de que todos los antihistamínicos incrementan la inducción de GILZ en células U937, la histamina no tiene efecto sobre su expresión en células A549. Estas observaciones impiden generalizar los efectos y revelan la gran complejidad del fenómeno estudiado lo cual será discutido en los siguientes capítulos.

MODULACION DE LA EXPRESION DE GENES ENDOGENOS PROINFLAMATORIOS

La transrepresión de genes proinflamatorios es el mecanismo principal por el cual los corticoides ejercen sus efectos antiinflamatorios. Para evaluar la modulación histaminérgica observada utilizando sistemas reporteros, en contextos fisiológica o fisiopatológicamente relevantes, decidimos estudiar la modulación de genes endógenos activados por NF- κ B y transreprimidos por el GR, utilizando nuevamente las líneas celulares A549 y U937. En ambos sistemas se evaluó la inducción de los siguientes genes: interleuquina-8 (IL8), como representante de quemoquinas inducidas por NF- κ B e implicada en numerosas enfermedades pulmonares; ciclooxigenasa-2 como representante de las enzimas inducidas por NF- κ B, y a su vez blanco farmacológico de los antiinflamatorios no-esteroides; y el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) como representante de citoquinas inducidas por NF- κ B y asociado a los efectos de transrepresión de genes mediados por corticoides como resultado de la acetilación de histonas.

En una primera aproximación empleamos las células A549 para evaluar el efecto de la dexametasona sobre la expresión basal de los genes IL8 y COX2, y su modulación por el antihistamínico mepiramina. En dichas células, la dexametasona inhibió la expresión basal de ambos genes y el efecto resultó dependiente de la concentración de corticoide utilizada. Para la concentración más baja, el agregado de mepiramina incrementó dicha inhibición, aunque no se observó ningún efecto para la concentración más alta de corticoide (Fig. 3.30). Esto podría deberse a que la concentración de

dexametasona utilizada resulto tan elevada que alcanzó el máximo efecto, y en consecuencia la mepiramina fue incapaz de incrementarlo.

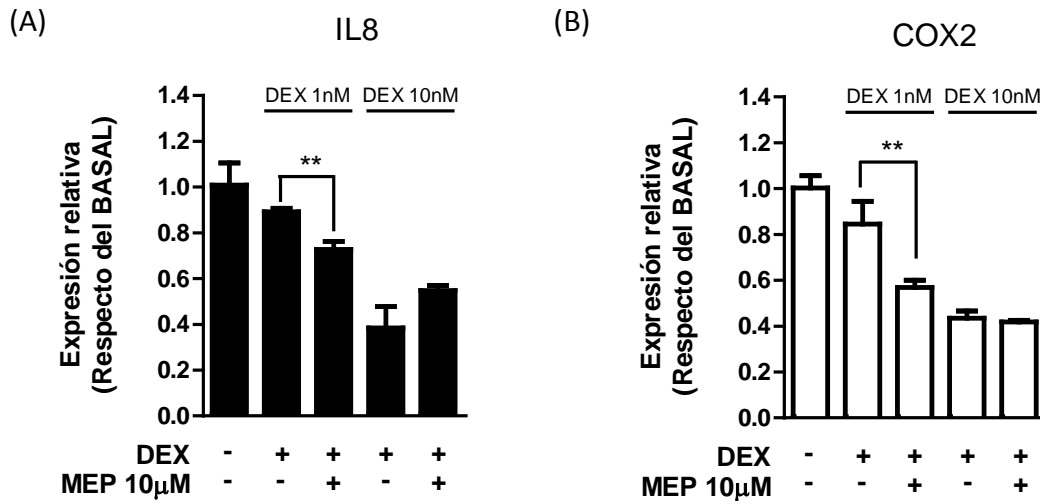


Figura 3.30: Efecto de mepiramina sobre la transrepresión de genes proinflamatorios en células A549. Análisis de expresión por PCR cuantitativa del gen (A) IL8, o (B) COX2, en células A549 respecto de la expresión de Beta-Actina. Las células fueron incubadas con mepiramina 10µM por 10 minutos y luego tratadas con dexametasona por 24 horas a las concentraciones indicadas. Los niveles de ARN mensajero fueron cuantificados como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media +/- ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. **p<0,01.

Dado que el factor de necrosis tumoral TNF- α , es una citoquina proinflamatoria ampliamente utilizada para activar NF- κ B, y que ya fue utilizada en los ensayos de transrepresión en los sistemas con genes reporteros, decidimos evaluar la modulación de los antihistamínicos sobre la inducción de los genes mencionados activando al factor NF- κ B con dicha citoquina. Para ello, tratamos las células A549 con TNF- α , quien indujo la expresión de los tres genes estudiados (IL8, COX2 y GMCSF), y cuya expresión resultó inhibida por el agregado de dexametasona en consonancia con lo descrito en diversos trabajos (Kwon et al., 1994; Uings et al., 2005). En este sistema, evaluamos el efecto del cotratamiento con los antihistamínicos mepiramina, trans-triprolidina, cetirizina, clorfeniramina y difenhidramina sobre la inhibición mencionada. Para la expresión de

IL8, trans-triprolidina y cetirizina aumentan el efecto inhibitorio de la dexametasona, mientras que clorfeniramina y difenhidramina lo revierten y mepiramina no tiene efecto. En el mismo sentido, para la expresión de COX2, trans-triprolidina y cetirizina aumentan el efecto inhibitorio de la dexametasona, mientras que clorfeniramina y difenhidramina no lo modifican y mepiramina lo revierte. Para la expresión de GMCSF, trans-triprolidina, cetirizina y clorfeniramina incrementan el efecto inhibitorio de la dexametasona (Fig. 3.31).

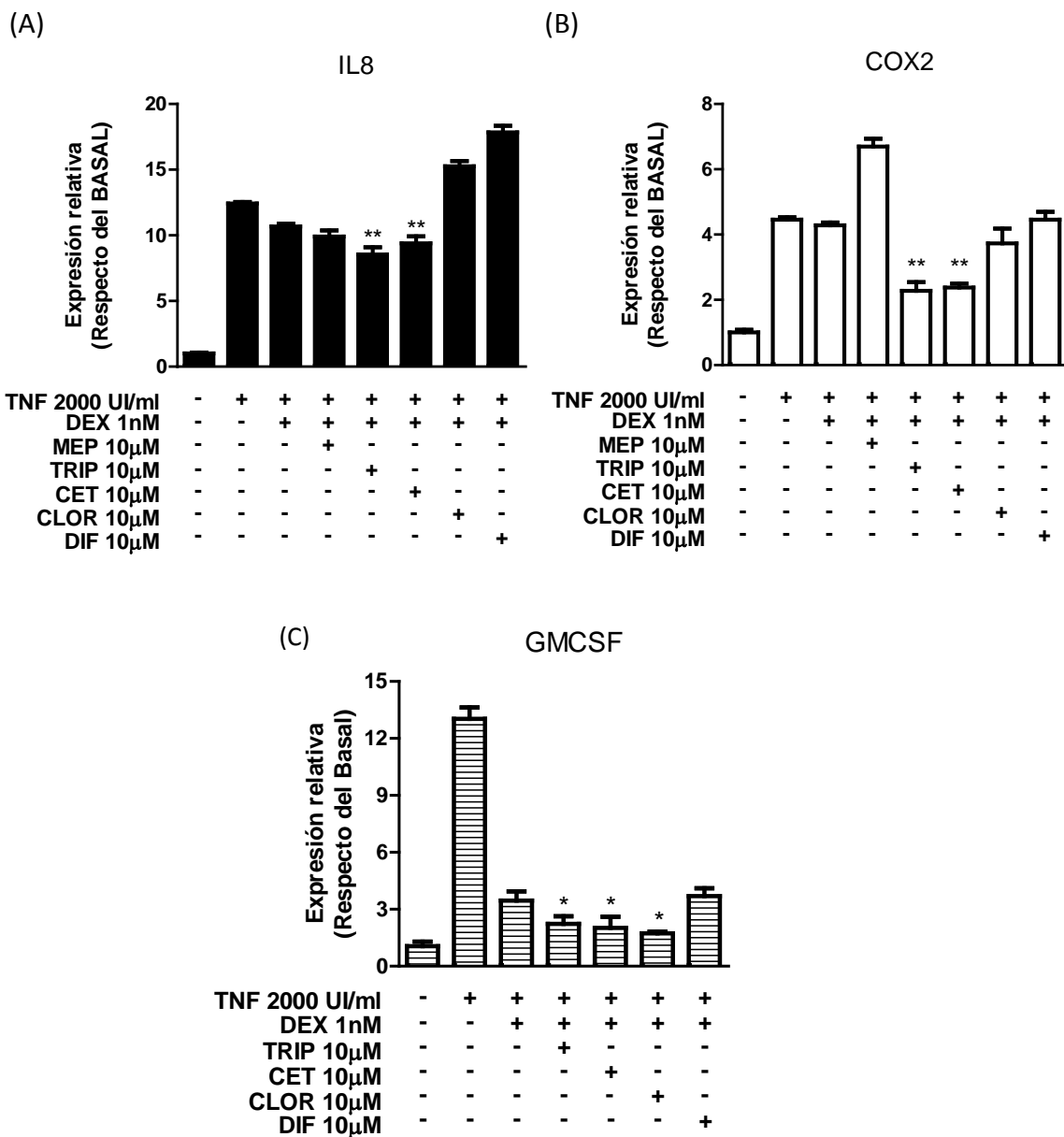


Figura 3.31: Antihistamínicos sobre la transrepresión de genes proinflamatorios en células A549. Análisis de expresión por PCR cuantitativa del gen (A) IL8, (B) COX2, o (C) GMCSF, en células A549, respecto de la expresión de Beta-Actina. Las células fueron incubadas con trans-triprolidina (TRIP), cetirizina (CET), clorfeniramina (CLOR) o difenhidramina (DIF) por 10 minutos, luego tratadas con dexametasona por 18 horas y finalmente con TNF- α por 6 horas. Los niveles de ARN mensajero fueron cuantificados como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media \pm ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ respecto de DEX 1nM.

En el caso de la línea celular U937, decidimos también inducir la expresión de los genes evaluados utilizando TNF- α . El tratamiento con TNF- α en células U937 produjo una fuerte inducción sobre la expresión de IL8, la cual resultó completamente inhibida por el agregado de dexametasona, pero produjo una muy pequeña inducción de la expresión de COX2 y, como mucho, moderada en el caso de GMCSF (Fig. 3.32).

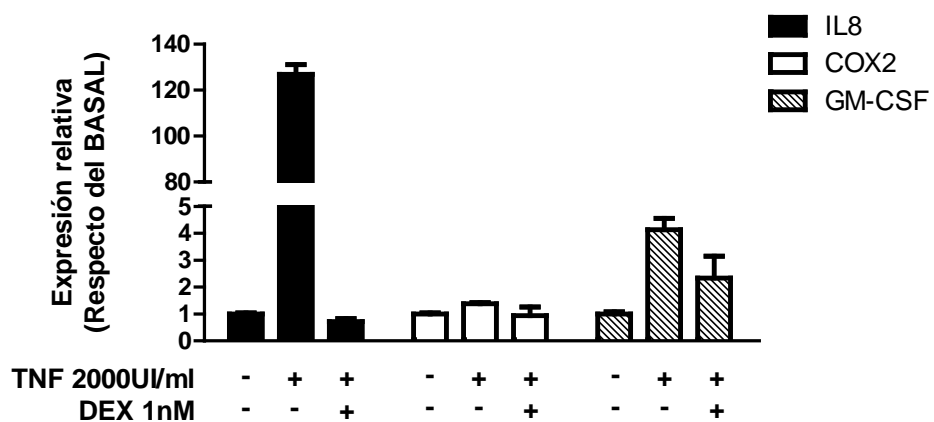
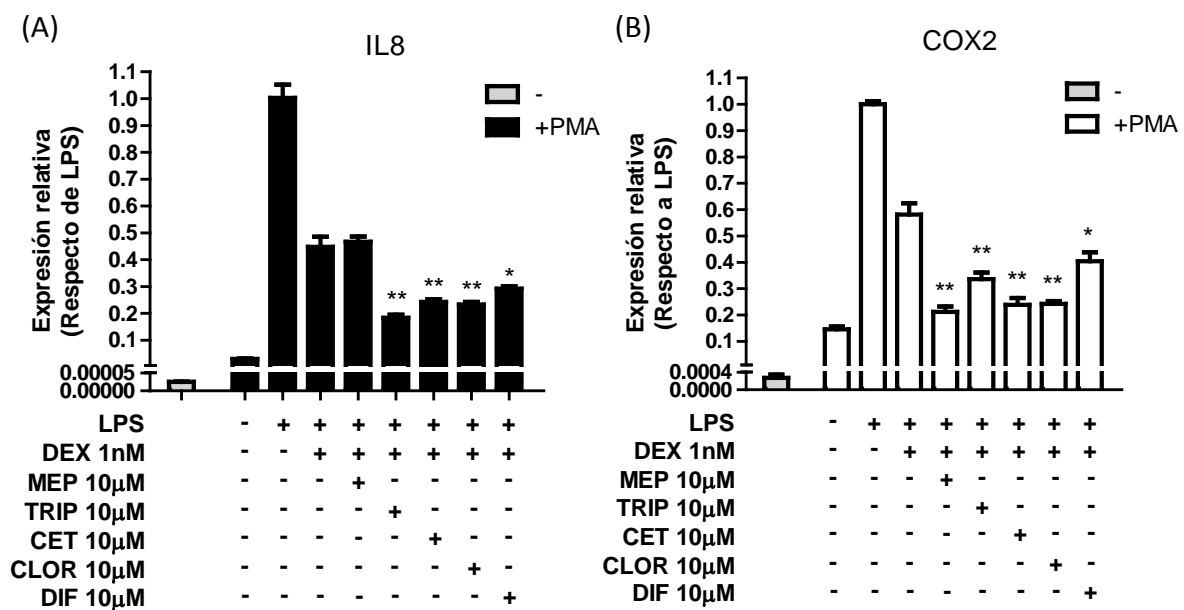


Figura 3.32: Inducción y transrepresión de genes proinflamatorios en células U937. Análisis de expresión por PCR cuantitativa de los genes IL8, COX2, y GMCSF, en células U937, respecto de la expresión de Beta-Actina. Las células fueron incubadas con dexametasona por 18 horas y luego con TNF- α por 6 horas. Los niveles de ARN mensajero fueron cuantificados como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media \pm ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Se ha descrito que las células U937, precursoras de monocitos/macrófagos, pueden ser diferenciadas a macrófagos utilizando PMA (forbol 12-miristato 14-acetato) como factor diferenciante para luego inducir la expresión de diversos genes proinflamatorios con lipopolisacárido bacteriano (LPS), una endotoxina presente en la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Este modelo celular resulta apropiado y es ampliamente utilizado para evaluar la expresión de genes proinflamatorios (Nishida et al., 1988; Grkovich et al., 2006; Schreiber et al., 2006; Sharif et al., 2007; Ghosh et al., 2010). Por lo tanto, decidimos estudiar la transrepresión mediada por dexametasona sobre la expresión inducida con LPS en células U937 diferenciadas con PMA.

Como se muestra en la Figura 3.33, las células U937 poseen una muy baja expresión basal de los genes IL8, COX2 y GMCSF, que se ve aumentada por el proceso de diferenciación con PMA, y más aún ante la incubación con LPS. Sobre este sistema evaluamos el efecto de la dexametasona y de los antihistamínicos previamente ensayados y observamos que para IL8 todos ellos excepto mepiramina, incrementan la inhibición inducida por dexametasona, mientras que para COX2 y GMCSF, todos los antihistamínicos evaluados aumentan el efecto del corticoide (Fig. 3.33).



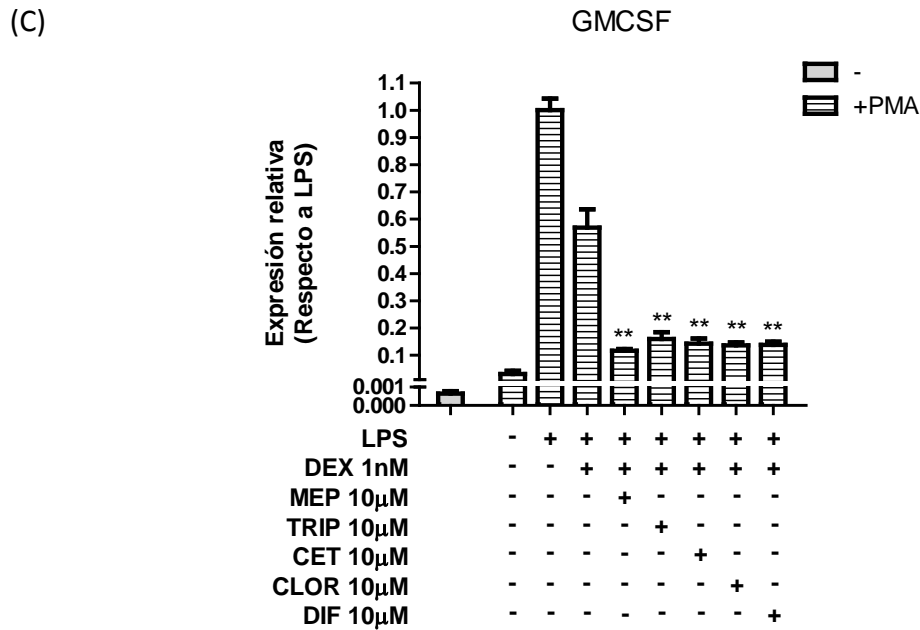


Figura 3.33: Antihistamínicos sobre la transrepresión de genes proinflamatorios en células U937. Análisis de expresión por PCR cuantitativa del gen (A) IL8, (B) COX2, o (C) GMCSF, en células U937, respecto de la expresión de Beta-Actina. Las células fueron diferenciadas con PMA 100nM por 48hs y luego incubadas con mepiramina (MEP), trans-triprolidina (TRIP), cetirizina (CET), clorfeniramina (CLOR) o difenhidramina (DIF) por 10 minutos, luego tratadas con dexametasona 1nM por 18 horas y finalmente con LPS 1µG/µL por 4 horas. Los niveles de ARN mensajero fueron cuantificados como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media +/- ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. *p<0,05; **p<0,01 respecto de DEX 1nM.

El análisis de la expresión de los genes pro y antiinflamatorios evaluados, ya sea en células A549 y en células U937 diferenciadas con PMA, revela una concordancia en el efecto de los antihistamínicos sobre la actividad transcripcional inducida por dexametasona, que en cierta medida depende del ligando estudiado, el gen analizado y el tipo celular utilizado. En células U937 los antihistamínicos trans-triprolidina, cetirizina, clorfeniramina y difenhidramina incrementan el efecto de la dexametasona sobre la inducción de GILZ y la represión de IL8, COX2 y GMCSF, aunque lo hacen con distinta eficacia. En células A549, solo trans-triprolidina y cetirizina muestran este efecto tanto sobre la inducción de MKP1 como sobre la represión de COX2 y GMCSF. Sin

embargo, en estas mismas células, trans-triprolidina y mepiramina inhiben la transrepresión de IL8 y COX2 respectivamente, y trans-triprolidina y difenhidramina inhiben la transactivación de MKP1 en células U937. Estos resultados se encuentran resumidos en la tabla 3.1.

	A549				U937				
	MKP1	IL-8	COX-2	GMCSF	GILZ	MKP1	IL-8	COX-2	GMCSF
Mepiramina	=	=	-	N/D	+	+	=	+	+
Trans-triprolidina	+	+	+	+	+	=	+	+	+
Cetirizina	+	+	+	+	+	=	+	+	+
Clorfeniramina	+	-	=	+	+	=	+	+	+
Difenhidramina	=	-	=	=	+	=	+	+	+

(+) Estimula, (-) inhibe, (=) no cambia.

Tabla 3.1: Modulación sobre genes endógenos regulados por el GR. Efecto de los antihistamínicos mepiramina, trans-triprolidina, cetirizina, clorfeniramina o difenhidramina sobre la inducción de los genes GILZ y MKP1 o la represión de los genes IL-8, COX-2 y GM-CSF, por dexametasona en células A549 o U937.

El análisis de la expresión de genes endógenos en su totalidad muestra que los resultados obtenidos utilizando sistemas de gen reportero en sistemas de expresión heteróloga encuentran una cierta correlación al evaluar sus efectos en líneas celulares representativas de modelos fisiológicos. La mayoría de los antihistamínicos, aunque con distintas eficacias, incrementa los efectos de la dexametasona sobre la expresión de los genes pro y antiinflamatorios evaluados. Si bien, a medida que el modelo de estudio se vuelve menos artificial se pone de manifiesto la dificultad de obtener una conclusión general acerca del proceso estudiado, la correlación mencionada da sustento a los hallazgos y sus implicancias terapéuticas y nos alientan a evaluar el cotratamiento de un corticoide y un antihistamínico en modelos que se ajusten mejor al contexto en el que se pretende utilizarlos. En consecuencia decidimos continuar los estudios en modelos

animales donde es posible estudiar el desarrollo completo de una determinada patología y la efectividad del cotratamiento sobre el curso de la misma.

PARTE III: RELEVANCIA CLÍNICA SOBRE UN MODELO DE ASMA MURINO

Como se detalla en la Introducción, el asma es una patología inflamatoria crónica, para cuyo tratamiento los corticoides representan la terapia más efectiva aunque los antihistamínicos muestran una falta completa de eficacia para controlar sus síntomas. Dado que el animal de experimentación más comúnmente utilizado para investigar esta patología es el ratón, decidimos estudiar la administración conjunta de un antihistamínico y un corticoide en un modelo murino de asma.

Existen numerosos modelos murinos de asma que pueden clasificarse según la naturaleza del estímulo que desencadena la patología (alergeno, agentes infecciosos u otros), o según su duración (agudo o crónico). Elegimos el modelo agudo inducido por un alergen, la ovoalbúmina, por ser un modelo estándar, ampliamente utilizado, y por representar la forma más prevalente del asma, el asma alérgico. Por supuesto, dicho modelo resulta ser ideal para evaluar el cotratamiento de un corticoide con un antialérgico. Es importante mencionar, como limitación del modelo, que no se desarrolla la patología en forma integral, pero sin embargo se reproducen los cambios patológicos observados en el asma bronquial, es decir, altos niveles de anticuerpos IgE específicos para el alergen, inflamación alérgica pulmonar con predominio de eosinófilos y aumento de células productoras de mucus, y desarrollo de hiperreactividad *in vivo* de las vías aéreas dependiente de la producción de citoquinas de tipo Th2 y Th1 (Fenoy et al., 2009; Shin et al., 2009; Fenoy et al., 2012; Mullane et al., 2014). Sobre este modelo evaluamos la administración conjunta de dexametasona y el antihistamínico azelastina, el cual fue elegido por ser un fármaco de última generación, eficaz para tratar la rinitis alérgica y con mínimos efectos adversos. Cabe destacar que recientemente se patentaron tres formulaciones conteniendo una combinación de azelastina con diferentes corticoides para el tratamiento de la rinitis alérgica, lo que sugiere la efectividad de la terapia combinada (McNeely et al., 1998; Kaliner, 2009;

Wolthers, 2013). Por otra parte, en un ensayo clínico efectuado en pacientes con asma bronquial crónica se ha observado que la azelastina permite reducir la frecuencia de uso de corticoides inhalados sin pérdida de la función pulmonar (Busse et al., 1996).

Dado que azelastina no fue ensayada por nosotros en los sistemas experimentales *in vitro*, en primera instancia decidimos evaluar sus efectos sobre la actividad transcripcional del GR inducida por dexametasona realizando una caracterización acotada de los mismos. Utilizando el mismo modelo celular usado para evaluar la transactivación del gen reportero TAT3-Luc mediada por el GR, encontramos que el agregado de azelastina potencia la respuesta inducida por dexametasona, al igual que ocurría con los antihistamínicos mepiramina y trans-triprolidina (Fig. 3.34).

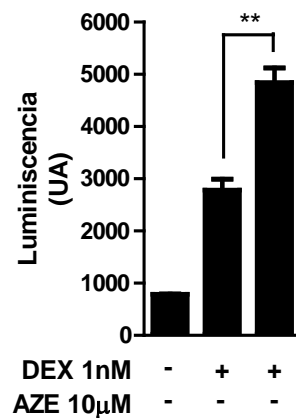


Figura 3.34: Efecto de azelastina sobre la actividad del GR inducida por dexametasona. Células HEK293T cotransfectadas con plásmidos que codifican para el GR, el H1R y TAT3-Luc fueron tratadas con dexametasona por 24 horas y pretratadas, o no, con azelastina 10µM por 10 minutos. La actividad de luciferasa fue determinada como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media \pm ESM de cuatro experimentos independientes realizados por triplicado.

Luego evaluamos el efecto de azelastina sobre la transrepresión del gen reportero IL6-Luc mediada por el GR. Nuevamente encontramos que azelastina potencia la inhibición inducida por dexametasona sobre la actividad de NF- κ B producida por TNF- α (Fig. 3.35).

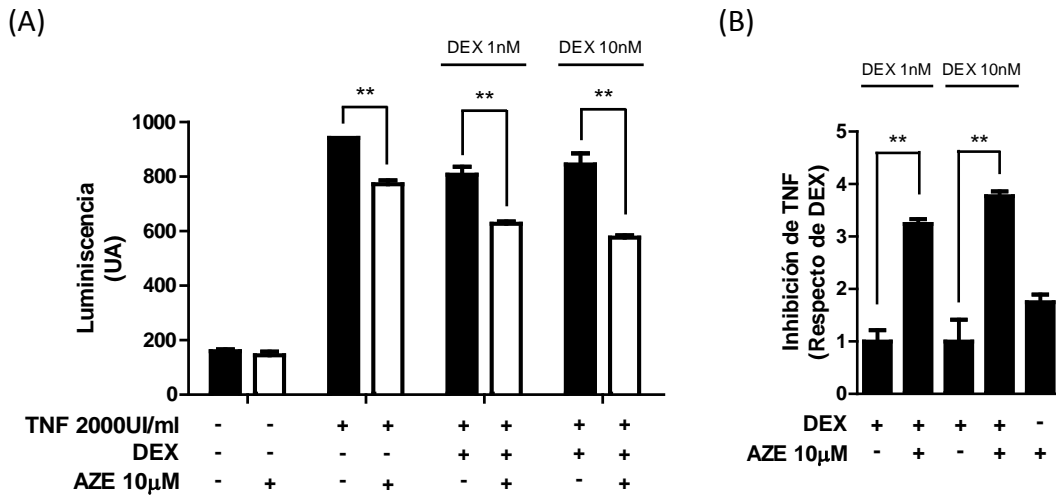


Figura 3.35: Efecto de azelastina sobre la inhibición de NF-κB por dexametasona. Células HEK293T cotransfectadas con plásmidos que codifican para el GR, el H1R, e IL6-LUC fueron incubadas con azelastina 10µM por 10 minutos, luego dexametasona por 1 hora y finalmente TNF-α por 6 horas, como se indica. Resultados expresados (A) respecto del basal o (B) respecto de la inhibición por parte de dexametasona sobre el efecto de TNF-α. La actividad de luciferasa fue determinada como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media +/- ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. **p<0,01.

Para finalizar la caracterización *in vitro* de azelastina evaluamos su efecto sobre la transactivación de MKP1, en células A549 y la transrepresión de IL8, COX2 y GMCSF en células U937 diferenciadas con PMA y tratadas con LPS por ser estos los sistemas en los que se observó los efectos esperados. En todos los casos, azelastina potenció los efectos de dexametasona sobre la expresión de los genes (Fig. 3.36).

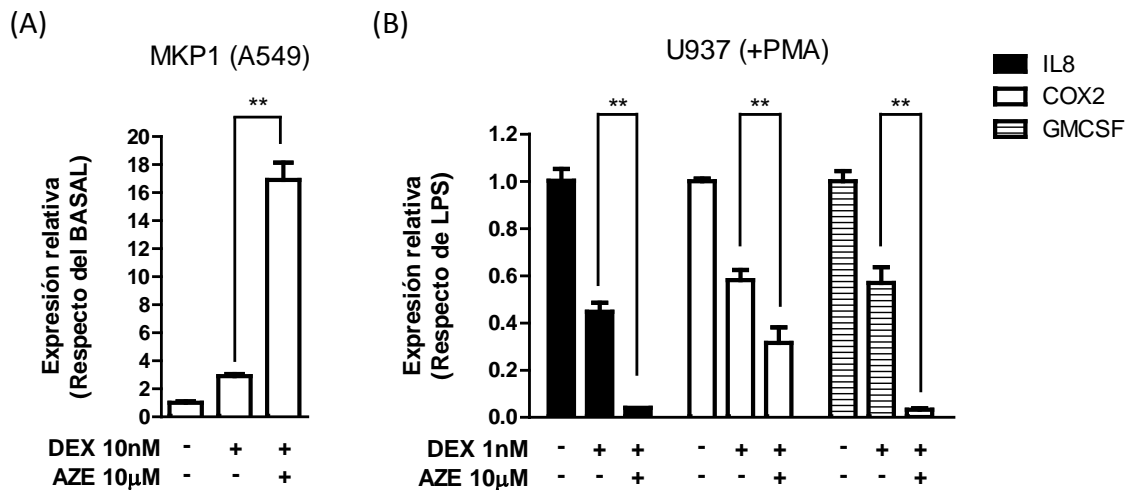


Figura 3.36: Efectos de azelastina sobre la modulación de genes por parte del GR. Análisis de expresión por PCR cuantitativa del gen (A) MKP1 en células A549, (B) IL8 y COX2 en células U937 diferenciadas con PMA, respecto de la expresión de Beta-Actina. Las células A549 fueron incubadas con azelastina por 10 minutos y luego tratadas con dexametasona por 3 horas. Las células U937 fueron diferenciadas con PMA 100nM por 48hs y luego incubadas con azelastina por 10 minutos, tratadas con dexametasona 1nM por 18 horas y finalmente con LPS 1µg/µl por 4 horas. Los niveles de ARN mensajero fueron cuantificados como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados representan la media +/- ESM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. **p<0,01.

Considerando los resultados en conjunto, donde se observó una potenciación por parte de azelastina sobre los efectos de dexametasona, tanto en ensayos sobre genes reporteros como sobre la modulación de genes endógenos relacionados con la inflamación, decidimos evaluar el cotratamiento de ambos ligandos en el modelo de asma murino previamente mencionado.

Se sensibilizaron ratones BALB/c utilizando ovoalbúmina e hidróxido de aluminio, a quienes, una vez establecida la respuesta alérgica, se les administró las distintas drogas a los grupos experimentales correspondientes: dexametasona en dosis óptima (1mg/kg), la cual representa el control positivo del tratamiento, dexametasona en dosis subóptima (0,1mg/kg), que representa una dosis no efectiva del tratamiento, azelastina en dosis equivalente a la utilizada normalmente en la clínica (0,5mg/kg),

cotratamiento administrando azelastina + dexametasona en concentración subóptima, tratamiento al que se le desea evaluar la eficacia, y vehículo, el cual representa el control negativo de los tratamientos. Por otra parte, como representativo de un animal sano se estableció un grupo naive, el cual no fue sensibilizado pero sí tratado con el vehículo en lugar de ovoalbúmina. 48 horas después del tratamiento los animales fueron sacrificados y se evaluaron los distintos parámetros mencionados a continuación.

La acumulación de eosinófilos en los alveolos es característica del asma bronquial y la inflamación de las vías aéreas mediadas por estas células es característica de este modelo. Es por ello que realizamos un conteo diferencial en lavado broncoalveolar (LBA) de los diferentes animales. El análisis de los diferentes LBA mostró que en los ratones sensibilizados con OVA existe un incremento en el porcentaje de eosinófilos, lo que es característico del asma bronquial y confirma el desarrollo del cuadro patológico. Como era de esperar, el tratamiento con dexametasona en dosis óptima disminuyó la eosinofilia en un 43%, mientras que la aplicación del corticoide en dosis subóptima (10 veces menor) no tuvo efecto, resultó ineficaz. Por su parte, mientras que el tratamiento con azelastina tampoco tuvo efecto, el cotratamiento de la dosis ineficaz de dexametasona junto con azelastina mostró una reducción del 34% en el porcentaje de eosinófilos (Fig. 3.37). Estos resultados indican que tanto la dosis más alta de dexametasona, como el cotratamiento del corticoide a bajas dosis junto con azelastina, fueron efectivos para la eosinofilia de las vías aéreas. La administración de ambos por separado, no tuvo efecto, evidenciando y poniendo de relieve la efectividad del tratamiento combinado, permitiendo utilizar dosis bajas de corticoide que de otro modo resultarían ineficaces.

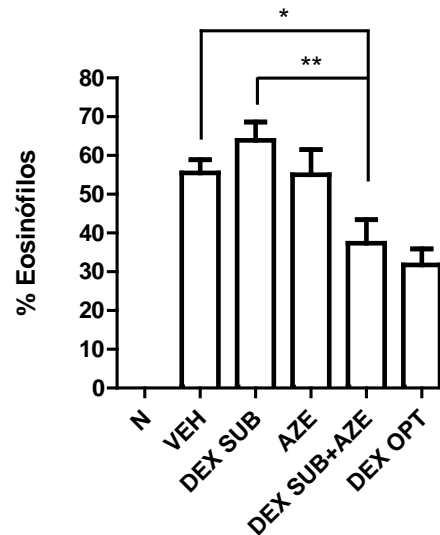


Figura 3.37: Porcentaje de eosinofilia en lavado broncoalveolar (LBA). Conteo diferencial de eosinófilos en ratones naïve (N) o sensibilizados con ovoalbúmina (VEH), y tratados con azelastina 0,5mg/kg (AZE), dexametasona en dosis subóptima 0,1mg/kg (DEX SUB), dexametasona en dosis optima 1mg/kg (DEX OPT), o dexametasona en dosis subóptima 0,1mg/kg y azelastina 0,5mg/kg (DEX SUB+AZE), 1 hora antes de la última nebulización. El LBA fue realizado 48 horas luego de la última exposición a OVA. Los extendidos fueron realizados como se describe en Materiales y Métodos. ** $p < 0,01$; ** $p < 0,01$.

Como se mencionó, el asma atópico o alérgico es el más prevalente, y se caracteriza por presentar reacciones de hipersensibilidad mediadas por anticuerpos de tipo IgE específicos para el alérgeno. La atopía es un mecanismo inmunitario subyacente en el fenotipo del modelo animal utilizado, el cual se caracteriza por un incremento en los niveles de las inmunoglobulinas IgE e IgG específicas para el alérgeno (Shin et al., 2009). En consecuencia analizamos los efectos del cotratamiento sobre los niveles de IgE específicas contra OVA en el suero de los diferentes grupos experimentales. El análisis muestra que los ratones sensibilizados con OVA presentaron un aumento en el título de IgE específica, que se vio reducido significativamente frente al cotratamiento con dexametasona en dosis subóptima junto con azelastina. Sin embargo, al igual que lo observado para la eosinofilia, ni azelastina ni la dexametasona en dosis subóptima redujeron los niveles de IgE en forma significativa. Esto nuevamente sugiere que el agregado de azelastina a la dosis baja de dexametasona podría potenciar

el efecto del corticoide, alcanzando una eficacia superior o equivalente a la obtenida utilizando la dosis más concentrada del mismo (Fig. 3.38).

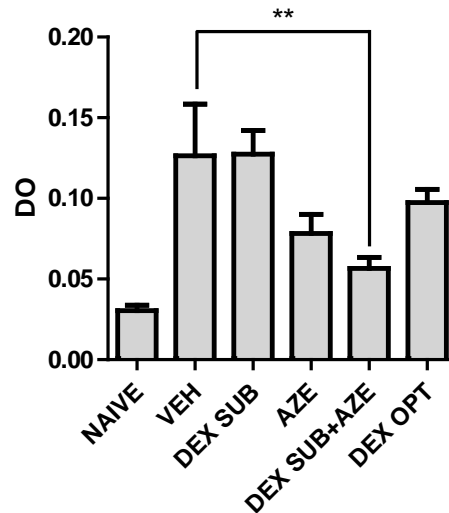


Figura 3.38: Niveles séricos de IgE específica para ovoalbúmina. Valores de densidad óptica (DO) correspondiente a la determinación de IgE de los sueros de ratones naïve (N) o sensibilizados con ovoalbúmina (VEH), y tratados con azelastina 0,5mg/kg (AZE), dexametasona en dosis subóptima 0,1mg/kg (DEX SUB), dexametasona en dosis óptima 1mg/kg (DEX OPT), o dexametasona en dosis subóptima 0,1mg/kg y azelastina 0,5mg/kg (DEX SUB+AZE), 1 hora antes de la última nebulización. La determinación de IgE se realizó por ELISA según se describe en Materiales y Métodos. ** $p < 0,01$.

Por su parte, la interleuquina 8 (IL-8) es un importante quemoattractante de neutrófilos, responsable de la inflamación mediada por estos, cuya expresión se encuentra aumentada en el musculo liso de las vías aéreas de pacientes con asma severa. Recientemente se ha sugerido que los neutrófilos estimulados por IL-8 pueden conducir a la acumulación de eosinófilos en las vías aéreas de pacientes asmáticos (Nakagome et al., 2012). Es por esto que decidimos evaluar la expresión de esta quemoquina en los pulmones de los animales sometidos a los diferentes tratamientos. El análisis mostró una inducción la expresión de IL-8 en los animales sensibilizados con OVA, aunque el tratamiento con dexametasona, tanto en dosis óptima como subóptima, redujo su expresión a los niveles basales (Fig. 3.39). Este resultado no

permite evaluar el efecto del agregado de azelastina y revela la necesidad de optimizar las dosis de dexametasona a fin de que su efecto no sea tan pronunciado y así poder evaluar la eficacia del cotratamiento.

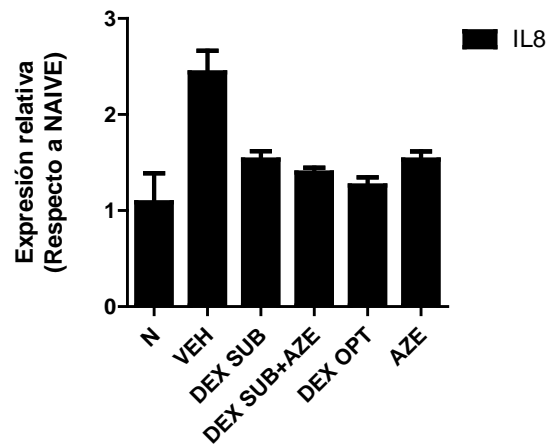


Figura 3.39: Modulación de la expresión de IL8. Cuantificación por PCR cuantitativa del gen IL-8 respecto de la expresión de Ciclofilina B, de los pulmones extirpados luego del lavado de ratones naïve (N) o sensibilizados con ovoalbúmina (VEH), y tratados con azelastina 0,5mg/kg (AZE), dexametasona en dosis subóptima 0,1mg/kg (DEX SUB), dexametasona en dosis optima 1mg/kg (DEX OPT), o dexametasona en dosis subóptima 0,1mg/kg y azelastina 0,5mg/kg (DEX SUB+AZE), 1 hora antes de la última nebulización. Los niveles de ARN mensajero fueron cuantificados como se describe en Materiales y Métodos.

Los resultados preliminares obtenidos en el modelo de asma murino evaluando la efectividad del cotratamiento con azelastina y dexametasona permiten concluir que el cotratamiento resultaría eficaz para mejorar los parámetros medidos, sugiriendo que el agregado de un antihistamínico permitiría reducir las dosis de dexametasona para normalizar parámetros alérgicos asociados al asma. Aunque se trata de una conclusión muy preliminar, nuestros resultados son sumamente alentadores ya que, por un lado, permiten esbozar una potencial aplicación terapéutica fruto de las investigaciones precedentes, y por el otro, pueden significar el comienzo de un proceso que permita desarrollar una alternativa terapéutica para el tratamiento del asma, ofreciendo al médico y al paciente nuevas estrategias eficaces para su tratamiento.

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES PRINCIPALES

De los resultados de la presente tesis pueden extraerse dos conclusiones principales: i) la histamina y los antihistamínicos, actuando sobre el receptor H1 a histamina, son capaces de incrementar la actividad transcripcional del receptor a glucocorticoides y ii) dicho efecto poseería relevancia terapéutica. Ambos aspectos serán discutidos a continuación.

LA HISTAMINA MODULA LA ACTIVIDAD DEL GR A TRAVÉS DEL H1R

En el presente trabajo hemos descrito que la histamina, actuando a través de su receptor H1R, es capaz de modular la actividad transcripcional del GR. Nuestros resultados muestran que la activación del H1R dispara un mecanismo regulatorio dual sobre la transactivación de genes inducida por el GR, involucrando a las subunidades $G\alpha_q$ y $G\beta\gamma$. A través de la vía canónica del H1R, la histamina posee un efecto inhibitorio mediado por las subunidad $G\alpha_q$ y los efectores PLC y Rac, mientras que a través de las subunidades $G\beta\gamma$, la histamina aumenta la actividad del GR vía la kinasa JNK. Paradigmáticamente, cuando un agonista se une a un GPCR, causa la activación de la proteína G heterotrimérica con la consecuente disociación de sus subunidades $G\alpha_q$ y $G\beta\gamma$, desencadenando la activación de vías de señalización intracelulares. Cuando la histamina se une y activa al H1R, ambas $G\alpha_q$ y $G\beta\gamma$ son liberadas simultáneamente, prevaleciendo los efectos del dímero $G\beta\gamma$, resultando en un incremento de la actividad del GR.

Por su parte y paradójicamente, cuando los antihistamínicos se unen al H1R e inactivan el receptor, se observa igualmente un incremento en la actividad del GR que podemos atribuir a la inactivación de la vía inhibitoria $G\alpha_q$ -PLC-Rac. Teniendo efectos opuestos sobre el H1R, los agonistas y agonistas inversos poseen el mismo efecto sobre

la actividad del GR. En este sentido, no deja de ser sorprendente como muchas veces las predicciones formuladas *a priori* no se condicen con los resultados obtenidos utilizando sistemas experimentales.

Los antihistamínicos, sin poseer ningún efecto *per se* sobre los sistemas de gen reportero, también aumentan la eficacia de los corticoides para la transrepresión de genes mediada por el GR modulando la actividad de NF- κ B. Los antihistamínicos mepiramina, trans-triprolidina, cetirizina, difenhidramina y azelastina incrementaron el efecto de la dexametasona sobre la transrepresión de genes inducidos por TNF- α . Cabe destacar que si bien se ha descrito que algunos antihistamínicos son capaces de inhibir la actividad de NF- κ B (Bakker et al., 2001), siempre se determinó su efecto sobre la actividad basal del sistema, mientras que en nuestro caso fueron evaluados frente a la inducción con TNF- α . En nuestro sistema, el efecto del cotratamiento con los antihistamínicos y la dexametasona no fue aditivo sino sinérgico, dado que dicho efecto fue superior a la suma de los efectos de ambos ligandos por separado.

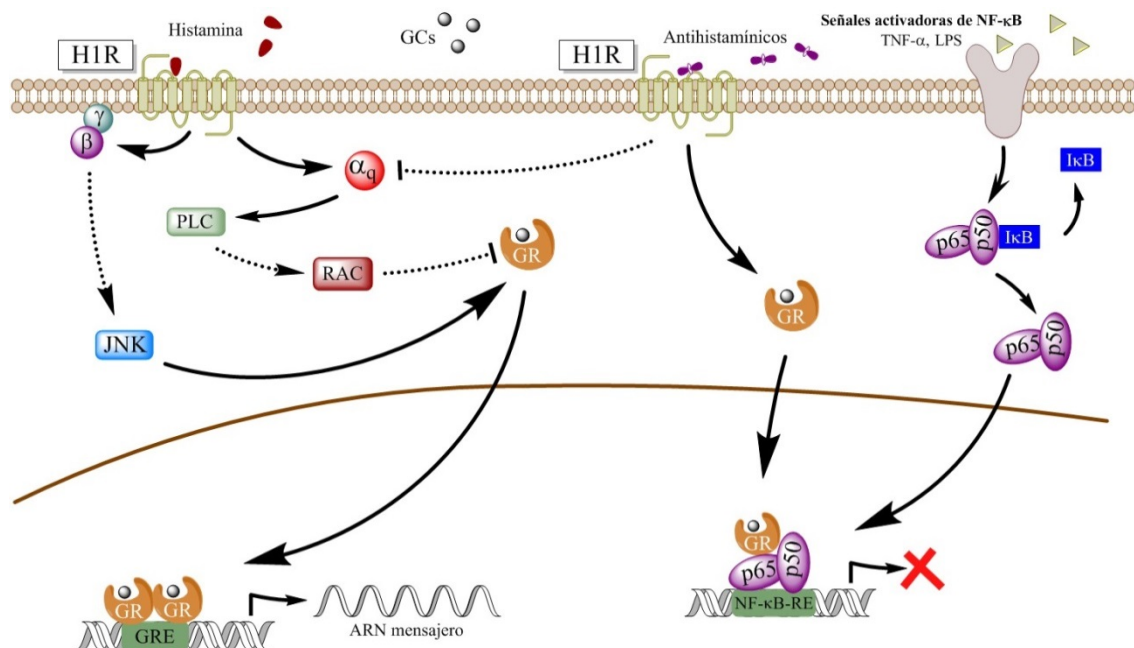


Figura 4.1: Mecanismo de acción propuesto para la modulación de la actividad transcripcional del receptor a glucocorticoides (GR) por parte de la señalización del receptor H1 a histamina (H1R).

Si bien nuestros resultados apuntan a que la señalización del H1R induce modificaciones post traduccionales del GR, no puede descartarse la existencia de otros mecanismos concomitantes por los cuales la histamina y los antihistamínicos modulen la actividad del GR. Ha sido descrito que la unión del GR a sitios GRE induce cambios epigenéticos, tales como la acetilación de histonas y la remodelación de la cromatina, además de reclutar a la ARN polimerasa II mediante interacciones con moléculas coactivadoras, que en muchos casos tienen actividad acetil transferasa y son parte de la maquinaria epigenética celular. Todos estos procesos resultan finalmente en la transactivación de genes inducidos por GCs (De Bosscher et al., 2010). En nuestro caso, existe la posibilidad de que alguna de las vías desencadenadas por la activación del H1R resulte en un aumento en la actividad del GR mediante el reclutamiento de cofactores epigenéticos a sitios blanco-específicos del GR. Si bien merecería ser estudiada en mayor profundidad, esta hipótesis escapa los objetivos de la presente tesis.

La modulación descrita en este trabajo sólo tendrá relevancia en aquellas células que coexpresen ambos receptores, permitiendo la interacción de sus vías de señalización. Ejemplos de dichos sistemas son las células endoteliales, las células dendríticas, los monocitos, neutrófilos, linfocitos B y T, y las células de la microglía (Lu et al., 2006; Panula et al., 2015). La existencia de estos tipos celulares que coexpresan ambos receptores sugiere que nuestros hallazgos podrían tener implicancias en diversos sistemas u órganos como por ejemplo el sistema inmunológico, el pulmón, la piel o el cerebro. Particularmente, las patologías de tipo alérgico-inflamatorias son especialmente relevantes dado que la mayoría de los tipos celulares mencionados pertenecen al sistema inmunológico. A su vez, las células endoteliales poseen un papel crucial en el desarrollo y exacerbación de trastornos alérgicos. Notablemente no todas las respuestas y funciones de las células endoteliales pueden ser suprimidas por corticoides (Shoda et al., 2016). El papel de las células dendríticas en la patogenia del asma y la rinitis alérgica ha sido destacado durante los últimos 15 años (Froidure et al., 2015). Por su parte, los monocitos y los linfocitos tienen un papel fundamental en la inflamación crónica de las vías aéreas, como por ejemplo el asma, a los cuales se suma el papel de los neutrófilos en la EPOC (Umland et al., 2002; Pazdrak et al., 2014; Jiang et

al., 2016). Por otro lado, la relevancia clínica también podría extenderse a un contexto neuronal, como el involucrado en los procesos de aprendizaje y de memoria post traumática o en la enfermedad de Parkinson. En el primer caso, se ha demostrado que tanto los glucocorticoides como la histamina modulan la proliferación y diferenciación de células neuronales afectando procesos cognitivos y el establecimiento de la memoria, especialmente la vinculada a experiencias traumáticas (Molina-Hernandez et al., 2008; Fitzsimons et al., 2013). Más aun, ligandos antihistamínicos ampliamente difundidos en el mercado, como la difenhidramina, reducen significativamente la fijación de recuerdos negativos post-estrés sin afectar los recuerdos neutros o positivos (Papassotiropoulos et al., 2013). Respecto de la enfermedad de Parkinson, evidencias recientes apuntan a que la inflamación crónica producida por células de la microglía podría contribuir a la muerte de neuronas dopaminérgicas. En este sentido, se ha descrito que el GR posee un papel importante en el control de la reactividad de la microglía y su desregulación en la enfermedad de Parkinson puede conducir a daños por una inflamación sostenida (Ros-Bernal et al., 2011). Dado que las células de la microglía expresan el H1R, la modulación histaminérgica descrita en nuestro trabajo puede ser relevante para esta enfermedad.

EL PAPEL DE JNK EN LA MODULACIÓN HISTAMINÉRGICA

Las kinasas c-Jun amino terminales (JNK) son un grupo de MAP kinasas que están codificadas en tres genes, JNK1, JNK2 y JNK3, existiendo 10 isoformas en total, 4 de ellas para JNK1, 4 para JNK2 y 2 para JNK3. La activación de JNK está dada por una fosforilación dual sobre residuos treonina y tirosina, llevada a cabo por las kinasas de MAP kinasas (MKKs), MKK4 y MKK7. Se cree que ambas podrían responder a diferentes estímulos. Estas kinasas, a su vez son activadas por numerosas kinasas río arriba (MAPKKKs), tales como MEKK1-5, MUK/DLK, MLK3/SPRK, TAK1, y TPL-1/2 entre muchas otras, y a su vez, una vasta cantidad de efectores median la señalización que activa a estas últimas (Davis, 2000).

En nuestro trabajo hemos descrito que la modulación de la actividad del GR por parte de la histamina involucra la activación de JNK. Como ya se mencionó, esto resulta controversial dado que clásicamente se ha descrito que JNK posee un efecto inhibitorio sobre la actividad transcripcional del GR (Rogatsky et al., 1998; Szatmary et al., 2004; Davies et al., 2008). Nuestros resultados, utilizando la misma línea celular y el mismo sistema de gen-reportero que en el segundo trabajo citado, muestran efectos contrarios a los descritos por los autores. Considerando que la única diferencia entre los diseños experimentales consiste en el modo en el que JNK es activada, hipotetizamos que dicha variable resulta sumamente relevante y determinante del resultado obtenido. Mientras que en nuestro sistema activamos JNK farmacológicamente a través de la activación del H1R por parte de la histamina, en los trabajos previos la activación de JNK se produjo utilizando herramientas moleculares, ya sea sobreexpresando JNK y su activador, la mutante constitutivamente activa de Rac racQ61L, o bien sobreexpresando su activador MKK7 o MLK3.

En relación a esto, por un lado se encuentra ampliamente documentado que los GPCRs son capaces de modular la vía de las MAPKs, para lo cual, dependiendo de la especificidad de la proteína G acoplada y del repertorio de moléculas de señalización disponibles, se pueden generar diferentes patrones de activación de cada miembro de las MAPKs (Gutkind, 2000). En particular, se ha reportado que las subunidades G $\beta\gamma$ en células HEK293, son capaces de activar JNK preferentemente a través de MKK4, y en menor medida a través de MKK7 (Yamauchi et al., 1999). Por otra parte, se ha identificado a la proteína de anclaje JIP1, capaz de unir MLK3, MKK7 y JNK1 pero no MKK4 (Whitmarsh et al., 1998).

Considerando la cantidad de isoformas de JNK, las diferentes kinasas que las activan (MKK7 y MKK4) y la vasta cantidad de sus moduladores descritos, y que las subunidades G $\beta\gamma$ activan preferencialmente MKK4, mientras que MLK3 pareciera activar preferentemente MKK7, creemos que el efecto diferencial sobre la actividad del GR puede ser explicado de acuerdo al modo en que JNK es activada. Vale decir que la

activación genérica de JNK no poseería un efecto unívoco sobre la actividad del GR, si no que dependería de los actores involucrados río arriba en la activación de la kinasa.

Por otra parte, los autores que describieron el efecto inhibitorio de JNK utilizando el gen reportero MMTV-Luc en células HeLa (Szatmary et al., 2004) posteriormente demostraron que los efectos de JNK son específicos para el elemento regulatorio del ADN. En estas mismas células la activación de JNK produce efectos opuestos, aumentando o inhibiendo la transactivación de los promotores TAT3-Luc y MMTV-Luc, respectivamente. Ambos sistemas gen reportero difieren en que TAT3 posee un promotor con secuencia GRE simple, mientras que MMTV posee un promotor con secuencia GRE compuesta, con sitios de unión adicionales, capaz de unir otros factores de transcripción. Estas diferencias justifican lo observado respecto del efecto de la activación de JNK sobre la actividad transcripcional del GR, considerando que exista una modulación alostérica de su conformación dada por las diferentes secuencias GRE (Szatmary y Kebis, 2012). Sin embargo, en nuestros experimentos, la activación de JNK se traduce en un aumento en la transactivación de ambos reporteros. En este caso, la activación farmacológica de JNK a través del H1R, a diferencia de la sobreexpresión de MKK7, podría conducir a modificaciones sobre el GR que afecten diferencialmente su interacción con cofactores.

IMPORTANCIA DE LOS ELEMENTOS DE RESPUESTA Y LOS COFACTORES

El modelo más simple que da cuenta del mecanismo de acción del GR implica que el mismo, luego de unirse a su ligando transloca al núcleo, en donde modula la expresión de genes, ya sea uniéndose al ADN, interactuando con otros factores de transcripción o por un mecanismo combinado. Tomando por caso dicho modelo simplificado, se identifican 3 especies: el ligando, el GR, y el ADN.

Sin embargo, la respuesta a la activación del GR no es una simple respuesta binaria a la unión de su ligando, sino que por el contrario, numerosos factores

intervienen entre la unión del ligando y la modulación génica (John et al., 2009). Estos factores, que incluyen la interacción con cofactores, resultan específicos para el tipo celular, el tejido y el gen en cuestión (Rogatsky et al., 2003; Bolton et al., 2007; So et al., 2007; Gertz et al., 2013). Diferentes ligandos inducen diferentes patrones de interacción con cofactores y la interacción con estos determina la unión al ADN y la inducción o represión génica (Lachize et al., 2009). La unión del GR al ADN recluta cofactores para formar complejos regulatorios funcionales que remodelan la cromatina y modifican la actividad de la maquinaria de transcripción (Collingwood et al., 1999). En este marco, la estructura y actividad de los complejos regulatorios, en un elemento de respuesta determinado, estará determinada por 3 factores: la secuencia del elemento de respuesta (los sitios GRE no son una única secuencia sino elementos compuestos que forman una familia de secuencias diversas), la disponibilidad de los mismos para unirse al GR y la actividad y disponibilidad de cofactores presentes en la célula (So et al., 2007).

Por mucho tiempo se pensó que los GRE eran meros sitios de anclaje para el GR. Sin embargo recientemente se demostró que diferentes secuencias de unión al GR, aun con diferencias en tan sólo un par de bases, afectan diferencialmente la conformación del GR y su actividad (Meijsing et al., 2009). Esto supone al ADN como un modulador alostérico del GR. Más aun, ligandos que no transactivan genes en un tipo de GRE pueden hacerlo en otro tipo de GRE. Esto le confiere a las secuencias GRE, y a los elementos de respuesta en general, la capacidad de proveer diferentes acciones regulatorias en diferentes posiciones del genoma.

Todo ello determina, a nivel fisiológico, que el GR al unirse a los corticoides producidos en la glándula adrenal afecte procesos tan complejos y diversos en forma altamente específica en diferentes células o tejidos. Por otra parte, a nivel farmacológico sustenta la intensa y reciente búsqueda de moduladores selectivos del GR (SGRMs), los cuales retienen eficacia antiinflamatoria pero menores efectos adversos que los corticoides clásicos. Se postula que el incremento en el margen de seguridad de este tipo de ligandos se debería a un reclutamiento diferencial de

cofactores con patrones de expresión específicos de cada tipo celular, explicándose así tanto la especificidad génica como la especificidad celular y tisular (De Bosscher et al., 2010).

En conclusión, los ligandos, los cofactores, las modificaciones post traduccionales y los eventos específicos para cada promotor gobiernan el mecanismo de acción molecular del GR y determinan en última instancia, la especificidad génica, celular y tisular de los efectos de su activación. Esto debe ser necesariamente tenido en cuenta al momento de planificar experimentos y efectuar el análisis de sus resultados. En nuestro caso utilizamos diferentes tipos celulares, la línea celular pulmonar A549 y la línea celular pro-monocítica U937, en los que evaluamos la transactivación y transrepresión de la expresión de diferentes genes endógenos. El particular repertorio de cofactores de estas células sumado a los eventos específicos producidos a nivel de los promotores de los distintos genes justifica las discrepancias observadas al evaluar el efecto de los diferentes antihistamínicos sobre la regulación de la expresión de cada gen y en cada línea celular.

ANTIISTAMINICOS Y MODULACION DE GENES ENDOGENOS

Los resultados obtenidos para la modulación de la expresión de genes endógenos regulados por el GR por parte de los antihistamínicos, muestran que a pesar de existir cierta diversidad en sus efectos, la mayoría de los ligandos ensayados incrementa la eficacia de la dexametasona. Sin embargo, la dificultad para generalizar los efectos de la modulación histaminérgica revela la complejidad del fenómeno estudiado, y en consecuencia invita a extender el análisis previo considerando las diferencias farmacológicas de los antihistamínicos ensayados.

Como ya mencionamos, los antihistamínicos mepiramina y trans-triprolidina aumentan la actividad del GR para transactivar el reportero TAT3-Luc presentando similar potencia y eficacia. Sin embargo, cuando se evaluó su capacidad de modular la

transrepresión del reportero inducido por NF- κ B, su eficacia difirió, sugiriendo que el mecanismo involucrado podría ser diferente a aquél implicado en los procesos de transactivación. Estas diferencias en los mecanismos de acción de ambos ligandos ya se encuentran documentadas. Si bien mepiramina y trans-triprolidina son agonistas inversos del H1R, ambos difieren en su sensibilidad al desacople de la proteína G del H1R, en su habilidad de modificar la respuesta máxima a histamina, y fundamentalmente, en cuanto a la interferencia con la señalización de otros GPCRs no relacionados. Todo esto sugiere que los mecanismos moleculares por los cuales despliegan su eficacia negativa sobre el H1R son diferentes. Particularmente, la mepiramina se une preferencialmente al estado inactivo del H1R pero acoplado a la proteína G mientras que la trans-triprolidina, lo hace al estado inactivo pero no acoplado del receptor (Fitzsimons et al., 2004).

Considerando la totalidad de los antihistamínicos ensayados, se ha documentado la afinidad, la potencia y la eficacia sobre la reducción de inositoles, sobre la represión de la actividad de reporteros inducibles por NF- κ B y sobre ensayos celulares funcionales (R-SAT, *receptor selection and amplification technology*) para gran cantidad de ellos (Bakker et al., 2001; Bakker et al., 2007). En estos trabajos pueden observarse diferencias significativas en cuanto a estos parámetros para los distintos antihistamínicos evaluados. Tomando por caso, la R-cetirizina presenta la máxima eficacia para reducir inositoles pero la eficacia más baja (un 70%) para reducir la actividad de NF- κ B, mientras que inversamente, la mepiramina presenta máxima eficacia para este último parámetro pero un 85% de eficacia en relación a la reducción de los niveles de inositoles basales. Por su parte, la triprolidina presenta máxima eficacia en ensayos funcionales R-SAT pero la mínima (63%) para reducir la actividad de NF- κ B. En cuanto a sus afinidades y potencias, existe una muy buena correlación entre la afinidad y la potencia para reducir los niveles basales de inositoles, pero una baja correlación entre la afinidad y la potencia para reducir la actividad de NF- κ B.

Estas diferencias sugieren que, más allá de que todos sean agonistas inversos del H1R, los mecanismos moleculares por los cuales ejercen sus efectos probablemente

sean diferentes, tal como se describió para la mepiramina y la triprolidina. Así como los avances en el conocimiento y las metodologías permitió reclasificar a los ligando antihistamínicos de antagonistas competitivos a agonistas inversos, la profundización y el avance en los conocimientos de sus mecanismos de acción molecular podría permitir una mejor comprensión de sus efectos sobre la modulación de la actividad del GR.

Las diferencias recién descritas para los ligandos antihistamínicos, se hacen más evidentes al evaluar sus efectos sobre la modulación de la actividad transcripcional del GR en la expresión de una gran variedad de genes endógenos. En este caso entran en juego otros factores importantes y determinantes del efecto global, tales como el elenco diferente de cofactores celulares y la secuencia y arquitectura de los elementos de respuesta de cada gen y su accesibilidad. Se encuentra ampliamente documentado que las diferencias entre los GRE simples de sistemas reporteros y los GRE compuestos de los genes endógenos muestran una falta de correlación en los resultados obtenidos entre ensayos *in vitro* y ensayos *in vivo*. Por ejemplo, muchos ligandos disociados del GR (disociados para la transactivación y la transrepresión) poseen eficacia nula para transactivar la expresión de reporteros GRE-dependientes, aunque resultan capaces de transactivar genes endógenos regulados por secuencias GRE (De Bosscher et al., 2010). Tanto las diferencias a nivel de los cofactores como a nivel de los promotores podría justificar en nuestro caso, que aunque tanto la mepiramina como la trans-triprolidina mostraron eficacia positiva para la inducción por dexametasona del gen reportero TAT3-Luc, la mepiramina no modificó la inducción de MKP1 por dexametasona en células A549 pero la aumentó en las células U937, mientras que la trans-triprolidina incrementó la inducción de MKP1 en A549 pero la inhibió en U937.

A nivel de la transrepresión de los genes evaluados, como se menciona en la Introducción, el GR puede antagonizar la actividad de NF- κ B en el núcleo de cuatro formas distintas: por interacción directa con la subunidad p65, por reclutamiento de histona deacetilasas al complejo p65-CBP-HAT, por interferencia con la fosforilación del dominio C-terminal de la ARN polimerasa II, o por inducción de la expresión de su inhibidor I- κ B. Los mecanismos subyacentes son aun controversiales. Algunos autores

sugieren que la interacción entre el GR y NF- κ B previene a este último de su unión al ADN mientras que otros estudios proponen que existiría una competencia por cofactores. Más aún, la inducción de I- κ B para inhibir NF- κ B sólo sería relevante en unos pocos tipos celulares (Smoak y Cidlowski, 2004). Todo esto demuestra que existen múltiples mecanismos y cierta especificidad celular para el antagonismo entre el GR y NF- κ B. A esta especificidad celular debe sumarse la especificidad génica. Por ejemplo, se ha descrito en la línea celular U937 que los glucocorticoides inhiben la secreción de IL-8 inducida por TNF- α a través de un mecanismo que involucra la acetilación de histonas (Tsaprouni et al., 2007), mientras que en células A549, los glucocorticoides inhiben la expresión de IL-8 por un mecanismo independiente de histonas que involucra la fosforilación del dominio C-terminal de la ARN polimerasa II (Nissen et al., 2000). Este ejemplo claramente refleja las diferencias a nivel de los tipos celulares y en nuestro caso podría justificar que la clorfeniramina y la difenhidramina en células U937 aumentaron el efecto de la dexametasona sobre la expresión de IL-8 pero lo inhibieron en células A549. En el caso de GMCSF se ha descrito en células A549 que los glucocorticoides inhiben su expresión por un mecanismo que involucra histona deacetilasas (Ito et al., 2000), mientras que en el caso de COX2 se ha demostrado que la dexametasona puede inhibir su expresión a nivel transcripcional por interacción directa del GR con la subunidad p65 de NF- κ B (Cho et al., 2009), así como también por un aumento en el metabolismo de su ARN mensajero (Barrios-Rodiles et al., 1999). Nuevamente estas diferencias entre mecanismos podrían justificar en nuestro caso la capacidad de la clorfeniramina y la difenhidramina para incrementar el efecto de dexametasona sobre la expresión de IL-8 aunque no posean eficacia para modular la expresión de COX2 en un mismo tipo celular, las células A549; así como también las diferencias observadas entre los distintos tipos celulares, tal como el aumento en la transrepresión de COX2 y GMCSF por difenhidramina en células U937 y su falta de eficacia para modular la expresión de los mismos genes en células A549.

En cuanto al GR, la fosforilación y las modificaciones post traduccionales afectan su actividad transcripcional modificando su localización intracelular, su vida media y las interacciones con el ADN y con cofactores (Beck et al., 2011). En particular, el perfil de

fosforilación del receptor determina el reclutamiento de cofactores específicos hacia determinados genes. Por ejemplo, la forma fosforilada en S226 es eficientemente reclutada hacia los genes TAT y GILZ (Blind y Garabedian, 2008), mientras que la triple fosforilación en S203, S211 y S226 afecta el reclutamiento y la interacción con el cofactor GRIP-1 de manera específica en cuanto al promotor y el tipo celular (Avenant et al., 2010). Lo mismo se ha descrito para la triple fosforilación y otros coactivadores incluyendo la histona acetil-transferasa (Kino et al., 2007). Más aun, se sugiere que la fosforilación en S404 altera la capacidad del GR de reclutar a NF-kB y los cofactores CBP/p300 (Galliher-Beckley et al., 2008).

Nuestros resultados muestran que los antihistamínicos incrementan el efecto de la dexametasona sobre la modulación de genes endógenos pro y antiinflamatorios en la mayoría de los casos evaluados. La diversidad observada respecto de la eficacia de los distintos ligandos podría ser explicada a la luz de todos estos reportes. Los antihistamínicos evaluados podrían modular la actividad del GR a través de diferentes mecanismos, los cuales se traducen en modificaciones post traduccionales e interacciones particulares, que determinan reclutamiento e interacciones diferenciales del GR con los cofactores u otros factores de transcripción presentes en el tipo celular estudiado determinando el efecto observado.

EFFECTOS ADVERSOS

Los corticoides actúan en casi todas las células del organismo, teniendo efecto en diversos sistemas como el cardiovascular, el inmunológico, el reproductor y el sistema nervioso central. A nivel farmacológico son las drogas antiinflamatorias más efectivas, sin embargo, el tratamiento con ellas se ve limitado por la gran cantidad de efectos adversos serios que las acompañan, entre ellos osteoporosis, dislipemias, redistribución de la grasa corporal, debilidad y atrofia muscular, problemas de conducta, insulinoresistencia, intolerancia a la glucosa e incluso diabetes. Tanto los efectos benéficos como los adversos son ejercidos actuando sobre el GR. Muchos de los

efectos adversos resultan principalmente debidos a los procesos de transactivación de genes (glaucoma, hipertensión, diabetes), mientras que otros resultan de la transrepresión (represión del eje hipotalámico-hipofisario-corticoadrenal, susceptibilidad a infecciones). Algunos son atribuidos a ambos procesos (osteoporosis) y muchos otros no han sido completamente dilucidados (sangrado gastrointestinal y ulcera péptica) (Sundahl et al., 2015).

La osteoporosis y los efectos sobre el metabolismo de la glucosa son los efectos adversos más frecuentes y por lo tanto los más estudiados a la hora de evaluar la seguridad de nuevos ligandos del GR. La osteoporosis es el resultado de varios factores que conducen a una disminución en la proliferación y actividad de los osteoblastos y un aumento de la actividad de los osteoclastos. Los GCs pueden disminuir la actividad de los osteoblastos induciendo apoptosis sobre ellos, suprimiendo la hormona de crecimiento y los factores IGF-1 y TGF- β . También aumentan la actividad de los osteoclastos transreprimiendo el gen de osteoprotegerina (OPG) y transactivando el gen de su ligando (OPG-L). En cuanto a la hiperglucemia, los GCs incrementan la síntesis de glucosa mediante procesos clásicos de transactivación de genes cuyas enzimas se encuentran involucradas en la gluconeogénesis, como la glucosa-6-fosfatasa, PEPCK, TAT, etc. También activan la enzima glucógeno sintetasa e inactivan la glucógeno fosforilasa, lo cual conduce a un aumento de glucógeno en el hígado. Respecto a otros efectos adversos, mucho se ha progresado en los últimos años en el conocimiento de los mecanismos moleculares subyacentes, sin embargo queda mucho por investigar acerca de su impacto frente a la búsqueda de nuevos ligandos (Schacke et al., 2002).

Nuestros resultados muestran que los antihistamínicos aumentan la eficacia de la dexametasona tanto respecto de la transactivación como de la transrepresión de genes. Más aún, al evaluar esta modulación sobre la expresión de genes endógenos pro y antiinflamatorios, encontramos que la mayoría de los antihistamínicos evaluados aumenta la eficacia de la dexametasona sobre dichos procesos. Esto resulta muy importante teniendo en cuenta la relevancia clínica del cotratamiento con ambos ligandos. Sin embargo, ningún estudio está completo si se ignoran los potenciales

efectos adversos del mismo. En consecuencia, los efectos adversos descritos y sus mecanismos moleculares deben ser tenidos en cuenta a la hora de evaluar la seguridad del cotratamiento. Dado que los efectos antiinflamatorios y los adversos ocurren por los mismos mecanismos moleculares a través del GR, debe evaluarse la potencial modulación de estos últimos por parte de los antihistamínicos. Aunque este es un objetivo claro, que tenemos en cuenta y que investigaremos próximamente, el alcance del mismo escapa a los tiempos de esta tesis.

RELEVANCIA CLINICA

En el presente trabajo tratamos de responder, a nivel molecular, las consecuencias del cotratamiento con antihistamínicos y corticoides. Esto es particularmente importante dado que el H1R y el GR son los blancos farmacológicos con mayor cantidad de drogas aprobadas (Overington et al., 2006), y existen numerosas situaciones en que ligandos de ambos sistemas son coadministrados. Sin embargo, esta asociación de drogas carece de una base mecanística o molecular y simplemente surge de la observación y la práctica clínica. Aun así, resulta importante tener en cuenta la interacción entre las drogas desde un punto de vista farmacológico, considerando la posibilidad de efectos sinérgicos o antagónicos. En nuestro caso, la histamina, y más aún los antihistamínicos, poseen un efecto sinérgico sobre la actividad transcripcional del GR inducida por dexametasona. La comprensión del mecanismo de acción conjunto de estas drogas, ampliamente utilizadas, es crucial para mejorar la especificidad y seguridad de las mismas, dando racionalidad a las asociaciones comúnmente utilizadas.

El ejemplo más ilustrativo es la combinación de antihistamínicos y corticoides para tratar la rinitis alérgica. De acuerdo con la guía ARIA (*Allergic rhinitis and its impact on asthma*) y otras como la BSACI (*British Society for Allergy and Clinical Immunology*), la terapia combinada solo es útil cuando no hay una progresión favorable o cuando no se alivian los síntomas (Bousquet et al., 2008; Scadding et al., 2008). A pesar de estas recomendaciones, un estudio de 2011 muestra que la combinación es la opción más

utilizada en la práctica clínica para tratar todos los tipos de rinitis alérgica sin importar su duración ni su severidad (Navarro et al., 2011). Más aun, tres formulaciones conteniendo el antihistamínico azelastina y diferentes corticoides, mometasona, ciclesonida y fluticasona, han sido recientemente patentadas para el tratamiento de la rinitis alérgica (Wolthers, 2013). El antihistamínico actuaría en la fase temprana de la respuesta alérgica y los corticoides en la fase tardía. Esto puede explicar en parte el beneficio de la combinación, sin embargo dado que ambos ligandos se administran simultáneamente, hay una evidente necesidad de conocer que sucede con la interacción entre ambas vías de señalización. El conocimiento de la fisiopatología, el papel que las drogas juegan en ella y su interacción molecular permitirán desarrollar nuevas terapias u optimizar las terapias conocidas, maximizando los efectos beneficiosos y minimizando los adversos.

Otro ejemplo de la utilización simultánea de ambas drogas lo constituye la dermatitis atópica. Esta enfermedad de la piel, de origen inflamatorio y desarrollo crónico es tratada habitualmente con corticoides, aunque el tratamiento presenta numerosos efectos adversos y su utilidad y mecanismo de acción no es del todo comprendido. En un modelo animal de dermatitis atópica se evaluaron los efectos sinérgicos de corticoides y antihistamínicos, encontrándose que la olopatadina potencia el efecto inhibitorio del corticoide prednisolona y concluyendo que la combinación podría ser muy útil para tratar la enfermedad. No obstante, el mecanismo molecular de interacción no fue profundizado (Hoare et al., 2000; Kagawa et al., 2010).

El presente trabajo, además de aportar la base racional de las terapias actuales en donde se usan ligandos del GR y el H1R, permite a su vez diseñar nuevas estrategias para tratar enfermedades inflamatorias en las que se justifique el cotratamiento. En este sentido, el asma es una enfermedad de tipo inflamatoria crónica, sumamente relevante y con una muy alta morbilidad, que representa un excelente escenario para un potencial tratamiento conjunto.

ASMA

De acuerdo con la OMS, las enfermedades de tipo inflamatorias son un gran desafío para la medicina actual. Más de 300 millones de personas alrededor del mundo sufren de asma (Ficha Técnica N° 307, 2007) y se cree que 100 millones más lo harán hacia el año 2025 (Masoli et al., 2004). Su prevalencia mundial es variable, pero siempre creciente en las últimas décadas, ubicándose entre un 2 y más del 10% (CDC, 2013). También representa un problema mundial importante por su morbi-mortalidad. Una de cada 250 muertes globales son producidas por asma y se estima una pérdida de 15 millones de años de vida productiva por año debido a esta enfermedad (medido como DALYs o años de vida potencialmente perdidos) (WHO, 2002).

La eficacia de los antihistamínicos en el tratamiento del asma ha sido investigada durante los últimos 50 años. Se han evaluado antihistamínicos de primera y de segunda generación desde que se identificó el papel fundamental que tienen los mastocitos en el desarrollo del asma alérgico. Un meta-análisis de ensayos clínicos evaluando el efecto de los antihistamínicos en el asma en adultos, incluyendo desde el ketotifeno (un estabilizador de mastocitos) hasta la azelastina (antihistamínico de última generación), concluye que los antihistamínicos no mejoran el control de los síntomas del asma (Van Ganse et al., 1997). Los antihistamínicos terfenadina, cetirizina y loratadina han sido evaluados en 10 ensayos clínicos distintos. Los tres mejoran los síntomas del asma y la función pulmonar pero a dosis mucho más altas que las convencionales (Nelson, 2003). En conclusión, por un lado la histamina se encuentra indudablemente relacionada al desarrollo de la enfermedad debido a sus efectos proinflamatorios y a la abundancia de información preclínica que avala dicha relación, sin embargo los antihistamínicos no pueden ser usados como agentes individuales para el tratamiento del asma debido fundamentalmente a la nula o limitada eficacia observada en aquellos estudios.

Los corticoides son la terapia antiinflamatoria más efectiva para tratar el asma, constituyendo la terapia de elección en niños y adultos con asma severa. Guías internacionales, como GINA (Global Initiative for Asthma) y NAEPP (National Asthma

Education and Prevention), recomiendan la inhalación de corticoides como terapia de elección para controlar a largo plazo el asma persistente, debido a sus efectos antiinflamatorios (Williams et al., 2003; GINA, 2014). La supresión de genes proinflamatorios y la activación de genes antiinflamatorios da cuenta de los mecanismos moleculares que resultan en la mejora de los síntomas y en la función pulmonar, así como también en la disminución de exacerbaciones e hiperrespuesta de las vías aéreas (Diamant et al., 2007). Sin embargo existen dos problemas principales de la terapia con corticoides. Por un lado, el tratamiento crónico puede conducir a efectos adversos serios como osteoporosis, hiperglucemia y diabetes, así como también aumento de peso, insomnio y cataratas (Schacke et al., 2002; Cooper, 2004; Vega et al., 2007; McDonough et al., 2008). Por otro lado, existen poblaciones resistentes a los corticoides que representan el 5-10% de la población total (Jang, 2012).

Se han propuesto varios mecanismos moleculares para explicar o comprender la resistencia a corticoides observada en determinados pacientes. Algunos de ellos involucran la activación de la kinasa p38, un incremento en la expresión de la isoforma GR β , una inhibición defectuosa del factor AP-1, defectos a nivel de la acetilación de histonas o pacientes que sufren de EPOC (Barnes, 2006). Muchos inhibidores de p38 se encuentran en desarrollo clínico para usar en pacientes con elevados niveles de IL-2 e IL-4, así como también en pacientes con EPOC, donde p38 se encuentra activada, aunque poseen serios problemas de toxicidad y numerosos efectos adversos (Barnes, 2011). En relación al H1R, se ha observado que la histamina actuando a través de este receptor, induce la activación de p38 en una línea celular derivada de musculo liso y este efecto es bloqueado por el antihistamínico mepiramina (Robinson et al., 2001). En el marco de nuestro trabajo resulta tentador hipotetizar que los antihistamínicos, utilizados en una terapia combinada con corticoides, podrían reducir la activación de p38 brindando una utilidad adicional a aquellos pacientes asmáticos resistentes a corticoides en los casos en los que esta kinasa esté involucrada.

Para mejorar la relación de efectos benéficos y adversos se han investigado diferentes aproximaciones, desde la optimización química de los corticoides, hasta el

desarrollo de agonistas y moduladores selectivos del receptor a glucocorticoides (SEGRAs y SEGRMs). Una alternativa para controlar los efectos adversos son las terapias complementarias, en las cuales el agregado de una droga diferente permite reducir la dosis del corticoide. Los agonistas β 2-adrenergicos, la teofilina y los anti-leucotrienos son ampliamente utilizados para este propósito, siendo los primeros los más efectivos (Barnes, 2006). La combinación de agonistas β 2-adrenergicos y corticoides tiene racionalidad científica. Existen efectos complementarios a nivel de la fisiopatología del asma y efectos sinérgicos o al menos, aditivos a nivel molecular. Se ha demostrado que los agonistas β 2 aumentan la localización nuclear del GR y la transcripción génica inducida por glucocorticoides (Barnes, 2002). Por otro lado, el agregado de agonistas β 2-adrenergicos en el tratamiento de pacientes con asma no controlada con bajas dosis de corticoide es más efectivo que aumentar la dosis de esta droga, debido a que aumentos en la dosis no mejoran significativamente la eficacia (Kankaanranta et al., 2004).

Nuestros resultados en ensayos *in vitro* y en el modelo de asma murino sugieren que el agregado de un antihistamínico, en una terapia combinada junto con dosis bajas de un corticoide, podría mejorar la relación de efectos benéficos/adversos de este último, al permitir que la dosis baja del corticoide, potenciada por el antihistamínico, resulte eficaz y a la vez segura. No obstante aún debe evaluarse la potencial aparición de efectos adversos relacionados al cotratamiento. En conclusión, nuestro trabajo sirve como punto de partida para reevaluar el rol de los antihistamínicos en el tratamiento del asma, no como agentes individuales sino como agentes complementarios a corticoides inhalados. En el caso de comprobarse la efectividad del tratamiento propuesto se dispondría rápidamente de una nueva estrategia terapéutica, dado que ambas drogas se encuentran clínicamente disponibles, muchas veces incluso como parte de una misma formulación, lo cual garantiza su seguridad y facilita el ulterior desarrollo farmacotécnico.

MODELO MURINO DE ASMA Y PERSPECTIVAS FUTURAS

La eficacia observada en el modelo murino de asma al evaluar el cotratamiento de azelastina junto con la dosis baja de dexametasona, sugiere que esta combinación podría ser útil para el tratamiento del asma. De todos modos, la conclusión es muy preliminar, dado que es necesario medir otros parámetros complementarios que completen el estudio y evaluar otros ligandos, así como optimizar las dosis y vías de tratamiento.

El modelo murino utilizado supone la sensibilización por inhalación de ovoalbúmina como alérgeno, quien desencadena una reacción alérgico-inflamatoria de las vías aéreas que conduce a una hiperreactividad de las mismas, característica del fenotipo clínico de todos los tipos de asma. Tanto la cepa del animal (BALB/c) como el alérgeno y el adyuvante (hidróxido de aluminio), favorecen una respuesta inmune de tipo Th2, y la inducción de parámetros de respuestas alérgicas, tales como la síntesis de IgE específica para el alérgeno, el infiltrado eosinofílico de las vías aéreas y la hiperreactividad bronquial. En consecuencia, entre los parámetros pendientes de evaluación, es muy importante realizar un análisis histopatológico de los pulmones, a fin de evaluar la existencia de infiltrado pulmonar y de células productoras de mucus, ambas características de la inflamación en esta patología. Es necesario también determinar los niveles séricos de anticuerpos IgG1 (isotipo dependiente de citoquinas de linfocitos Th2) e IgG2 (isotipo dependiente de citoquinas de linfocitos Th1) específicos para ovoalbúmina, y el análisis de expresión de los genes de las citoquinas IL-4, IL-5 e IL-13, típicos de la respuesta montada por los linfocitos Th2. Tan importante son estas citoquinas que se encuentran en desarrollo anticuerpos dirigidos contra ellas como estrategia terapéutica para el tratamiento del asma severa (Martinez et al., 2013). Por último, el análisis de la respuesta fisiológica pulmonar resulta un parámetro muy importante, dado que como se dijo, la hiperreactividad de las vías aéreas (AHR) es una característica distintiva del asma bronquial y determinante para hacer un diagnóstico positivo en pacientes (Fenoy et al., 2009).

El modelo descrito representa el modelo más utilizado en estudios preclínicos, muy utilizado para elucidar muchos aspectos del asma. Sin embargo, dada su naturaleza aguda, presenta una serie de limitaciones, como por ejemplo, el remodelado de las vías aéreas es mínimo y muchos parámetros (AHR, inflamación eosinofílica) son transientes y revierten a las pocas semanas (Wang et al., 2004). En consecuencia, sería adecuado evaluar el cotratamiento de antihistamínicos y corticoides en modelos crónicos de asma, que representan mejor la patología humana. En estos modelos se reproduce mejor la metaplasia de células caliciformes, la hipertrofia epitelial, la fibrosis subepitelial y la hiperplasia del musculo liso (aunque limitada), típicos cambios de la arquitectura del parénquima pulmonar.

También sería apropiado evaluar otras vías de administración, como por ejemplo la vía inhalatoria, puesto que representa la vía utilizada en el tratamiento combinado de un corticoide con un agonista β 2-adrenergico, o la vía inhalatoria para el corticoide junto con la oral para el antihistamínico, por ser la utilizada en el cotratamiento con corticoides y antileucotrienos respectivamente (Deakins, 2015). A su vez sería interesante evaluar el cotratamiento optimizando la dosis de corticoide, dado que en el modelo de asma murino, uno de los tres parámetros evaluados, el análisis de la expresión del gen de IL-8, mostró que la dosis baja de corticoide resulto igual de eficaz que la dosis alta.

Por su parte, sería igualmente interesante evaluar el cotratamiento con otros antihistamínicos puesto que en nuestros ensayos *in vitro*, muchos de los antihistamínicos evaluados mostraron eficacia para aumentar los efectos de la dexametasona, en particular la cetirizina quien mostró el mejor perfil y se trata de un antihistamínico de segunda generación actualmente utilizado en la clínica.

Como se discutió anteriormente, más allá de la eficacia del cotratamiento con antihistamínicos y corticoides, es indefectiblemente necesario evaluar la potencial aparición de efectos adversos, tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*, dado que los efectos adversos de los corticoides podrían también verse potenciados por los

antihistamínicos. A nivel molecular, la caracterización de la modulación histaminérgica sobre la actividad del GR abre nuevos interrogantes, en particular, los referidos a los procesos en los que el GR podría verse afectado, como su translocación nuclear, su vida media, y su interacción con cofactores entre otros.

Finalmente este trabajo se vería complementado por el estudio de la modulación sobre la señalización del H1R por parte de los corticoides. Todos estos objetivos exceden ampliamente los límites de esta tesis, sin embargo muchos de ellos representan nuevos y próximos desafíos en el proyecto del cual este trabajo es una de sus partes. Las conclusiones que se derivan en este caso, los generan, los sustentan y los encauzan.

CONCLUSIÓN FINAL

La evidencia molecular presentada acerca de la modulación de la actividad del GR por la señalización del H1R, así como también los resultados preliminares obtenidos en el modelo de asma murino resultan sumamente alentadores, abren numerosas puertas e invitan a profundizar el estudio pensando en una potencial aplicación para el tratamiento del asma combinando un corticoide y un antihistamínico. Nuestros resultados sugieren que el agregado de un antihistamínico, en una terapia combinada junto con dosis bajas de un corticoide, permitiría reducir las dosis del corticoide, ineficaz por sí misma pero efectiva en combinación con un antihistamínico.

Los ensayos realizados *in vitro* permitieron caracterizar la modulación de la actividad del GR por la señalización del H1R, poniendo a su vez de manifiesto la complejidad de ambos sistemas y la necesidad de concebir las vías de señalización como redes altamente interconectadas resultando imprescindible estudiarlas en su conjunto. Desde un punto de vista farmacológico, esto resulta esencial para una mejor comprensión del mecanismo de acción de los fármacos, en términos de eficacia y seguridad, cuando múltiples vías son moduladas.

La presente tesis fue concebida con ese espíritu. Detrás de una vía, una red; detrás de una red, una célula y detrás de una célula, un paciente. Hemos respondido algunas preguntas pero son mucho más las que surgen reclamando respuestas. Es a través de las dudas, y no de las certezas, la manera que encontramos para avanzar. En este sentido, la cantidad de estudios que se abren representa el mejor cierre para este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

Arango-Lievano, M., W. M. Lambert and F. Jeanneteau (2015). "Molecular Biology of Glucocorticoid Signaling." *Adv Exp Med Biol* **872**: 33-57.

Arey, B. J. (2014). "Biased Signaling in Physiology, Pharmacology and Therapeutics".

Ashikaga, T., Y. Yoshida, M. Hirota, K. Yoneyama, H. Itagaki, H. Sakaguchi, M. Miyazawa, Y. Ito, H. Suzuki and H. Toyoda (2006). "Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). I. Optimization of the h-CLAT protocol." *Toxicol In Vitro* **20**(5): 767-773.

Ashwell, J. D., F. W. Lu and M. S. Vacchio (2000). "Glucocorticoids in T cell development and function*." *Annu Rev Immunol* **18**: 309-345.

Auboeuf, D., A. Honig, S. M. Berget and B. W. O'Malley (2002). "Coordinate regulation of transcription and splicing by steroid receptor coregulators." *Science* **298**(5592): 416-419.

Avenant, C., A. Kotitschke and J. P. Hapgood (2010). "Glucocorticoid receptor phosphorylation modulates transcription efficacy through GRIP-1 recruitment." *Biochemistry* **49**(5): 972-985.

Ayrolidi, E., L. Cannarile, G. Migliorati, G. Nocentini, D. V. Delfino and C. Riccardi (2012). "Mechanisms of the anti-inflammatory effects of glucocorticoids: genomic and nongenomic interference with MAPK signaling pathways." *FASEB J* **26**(12): 4805-4820.

Bakker, R. A., M. W. Nicholas, T. T. Smith, E. S. Burstein, U. Hacksell, H. Timmerman, R. Leurs, M. R. Brann and D. M. Weiner (2007). "In vitro pharmacology of clinically used central nervous system-active drugs as inverse H(1) receptor agonists." *J Pharmacol Exp Ther* **322**(1): 172-179.

Bakker, R. A., S. B. Schoonus, M. J. Smit, H. Timmerman and R. Leurs (2001). "Histamine H(1)-receptor activation of nuclear factor-kappa B: roles for G beta gamma- and G alpha(q/11)-subunits in constitutive and agonist-mediated signaling." *Mol Pharmacol* **60**(5): 1133-1142.

Bakker, R. A., K. Wieland, H. Timmerman and R. Leurs (2000). "Constitutive activity of the histamine H(1) receptor reveals inverse agonism of histamine H(1) receptor antagonists." *Eur J Pharmacol* **387**(1): R5-7.

Barnes, P. J. (2002). "Scientific rationale for inhaled combination therapy with long-acting beta2-agonists and corticosteroids." *Eur Respir J* **19**(1): 182-191.

Barnes, P. J. (2006). "Corticosteroids: the drugs to beat." *Eur J Pharmacol* **533**(1-3): 2-14.

- Barnes, P. J. (2011). "Glucocorticosteroids: current and future directions." *Br J Pharmacol* **163**(1): 29-43.
- Barnes, P. J., K. F. Chung and C. P. Page (1998). "Inflammatory mediators of asthma: an update." *Pharmacol Rev* **50**(4): 515-596.
- Barrios-Rodiles, M., G. Tiralocche and K. Chadee (1999). "Lipopolysaccharide modulates cyclooxygenase-2 transcriptionally and posttranscriptionally in human macrophages independently from endogenous IL-1 beta and TNF-alpha." *J Immunol* **163**(2): 963-969.
- Bartho, L. and R. Benko (2013). "Should antihistamines be re-considered as antiasthmatic drugs as adjuvants to anti-leukotrienes?" *Eur J Pharmacol* **701**(1-3): 181-184.
- Baschant, U., N. E. Lane and J. Tuckermann (2012). "The multiple facets of glucocorticoid action in rheumatoid arthritis." *Nat Rev Rheumatol* **8**(11): 645-655.
- Beato, M. and A. Sanchez-Pacheco (1996). "Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex." *Endocr Rev* **17**(6): 587-609.
- Beck, I. M., K. De Bosscher and G. Haegeman (2011). "Glucocorticoid receptor mutants: man-made tools for functional research." *Trends Endocrinol Metab* **22**(8): 295-310.
- Beck, I. M., W. Vanden Berghe, L. Vermeulen, K. R. Yamamoto, G. Haegeman and K. De Bosscher (2009). "Crosstalk in inflammation: the interplay of glucocorticoid receptor-based mechanisms and kinases and phosphatases." *Endocr Rev* **30**(7): 830-882.
- Beermann, S., M. Vauth, R. Hein, R. Seifert and D. Neumann (2014). "Distinct signalling pathways of murine histamine H1- and H4-receptors expressed at comparable levels in HEK293 cells." *PLoS One* **9**(9): e107481.
- Bernabo, N., B. Barboni and M. Maccarrone (2014). "The biological networks in studying cell signal transduction complexity: The examples of sperm capacitation and of endocannabinoid system." *Comput Struct Biotechnol J* **11**(18): 11-21.
- Betke, K. M., C. A. Wells and H. E. Hamm (2012). "GPCR mediated regulation of synaptic transmission." *Prog Neurobiol* **96**(3): 304-321.
- Beyer, C., E. Canchola and K. Larsson (1981). "Facilitation of lordosis behavior in the ovariectomized estrogen primed rat by dibutyryl cAMP." *Physiol Behav* **26**(2): 249-251.

Bilodeau, S., S. Vallette-Kasic, Y. Gauthier, D. Figarella-Branger, T. Brue, F. Berthelet, A. Lacroix, D. Batista, C. Stratakis, J. Hanson, B. Meij and J. Drouin (2006). "Role of Brg1 and HDAC2 in GR trans-repression of the pituitary POMC gene and misexpression in Cushing disease." *Genes Dev* **20**(20): 2871-2886.

Black, B. E., J. M. Holaska, F. Rastinejad and B. M. Paschal (2001). "DNA binding domains in diverse nuclear receptors function as nuclear export signals." *Curr Biol* **11**(22): 1749-1758.

Bladh, L. G., J. Liden, K. Dahlman-Wright, M. Reimers, S. Nilsson and S. Okret (2005). "Identification of endogenous glucocorticoid repressed genes differentially regulated by a glucocorticoid receptor mutant able to separate between nuclear factor-kappaB and activator protein-1 repression." *Mol Pharmacol* **67**(3): 815-826.

Bledsoe, R. K., V. G. Montana, T. B. Stanley, C. J. Delves, C. J. Apolito, D. D. McKee, T. G. Consler, D. J. Parks, E. L. Stewart, T. M. Willson, M. H. Lambert, J. T. Moore, K. H. Pearce and H. E. Xu (2002). "Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition." *Cell* **110**(1): 93-105.

Blind, R. D. and M. J. Garabedian (2008). "Differential recruitment of glucocorticoid receptor phospho-isoforms to glucocorticoid-induced genes." *J Steroid Biochem Mol Biol* **109**(1-2): 150-157.

Bolton, E. C., A. Y. So, C. Chaivorapol, C. M. Haqq, H. Li and K. R. Yamamoto (2007). "Cell- and gene-specific regulation of primary target genes by the androgen receptor." *Genes Dev* **21**(16): 2005-2017.

Bos, C. L., D. J. Richel, T. Ritsema, M. P. Peppelenbosch and H. H. Versteeg (2004). "Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction." *Int J Biochem Cell Biol* **36**(7): 1187-1205.

Bousquet, J., N. Khaltaev, A. A. Cruz, J. Denburg, W. J. Fokkens, A. Togias, T. Zuberbier, C. E. Baena-Cagnani, G. W. Canonica, C. van Weel, I. Agache, N. Ait-Khaled, C. Bachert, M. S. Blaiss, S. Bonini, L. P. Boulet, P. J. Bousquet, P. Camargos, K. H. Carlsen, Y. Chen, A. Custovic, R. Dahl, P. Demoly, H. Douagui, S. R. Durham, R. G. van Wijk, O. Kalayci, M. A. Kaliner, Y. Y. Kim, M. L. Kowalski, P. Kuna, L. T. Le, C. Lemiere, J. Li, R. F. Lockey, S. Mavale-Manuel, E. O. Meltzer, Y. Mohammad, J. Mullol, R. Naclerio, R. E. O'Hehir, K. Ohta, S. Ouedraogo, S. Palkonen, N. Papadopoulos, G. Passalacqua, R. Pawankar, T. A. Popov, K. F. Rabe, J. Rosado-Pinto, G. K. Scadding, F. E. Simons, E. Toskala, E. Valovirta, P. van Cauwenberge, D. Y. Wang, M. Wickman, B. P. Yawn, A. Yorgancioglu, O. M. Yusuf, H. Zar, I. Annesi-Maesano, E. D. Bateman, A. Ben Kheder, D. A. Boakye, J. Bouchard, P. Burney, W. W. Busse, M. Chan-Yeung, N. H. Chavannes, A. Chuchalin, W. K. Dolen, R. Emuzyte, L. Grouse, M. Humbert, C. Jackson, S. L. Johnston, P. K. Keith, J. P. Kemp, J. M. Klossek, D. Larenas-Linnemann, B. Lipworth, J. L. Malo, G. D. Marshall, C. Naspitz, K. Nekam, B. Niggemann, E. Nizankowska-Mogilnicka, Y. Okamoto, M. P. Orru, P. Potter, D. Price, S. W. Stoloff, O. Vandenplas, G. Viegi, D. Williams, O. World Health, Galen and AllerGen (2008). "Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in

collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen)." *Allergy* **63 Suppl 86**: 8-160.

Bovet, D. and A. M. Staub (1937). "Action protectrice des éthers phénoliques au cours de l'intoxication histaminique." *C. R. Soc. Biol. (Paris)* **127**: 547

549.

Brightling, C. E., P. Bradding, F. A. Symon, S. T. Holgate, A. J. Wardlaw and I. D. Pavord (2002). "Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma." *N Engl J Med* **346**(22): 1699-1705.

Broide, D. H., G. J. Gleich, A. J. Cuomo, D. A. Coburn, E. C. Federman, L. B. Schwartz and S. I. Wasserman (1991). "Evidence of ongoing mast cell and eosinophil degranulation in symptomatic asthma airway." *J Allergy Clin Immunol* **88**(4): 637-648.

Brown, G. M., L. J. Grota, D. P. Penney and S. Reichlin (1970). "Pituitary-adrenal function in the squirrel monkey." *Endocrinology* **86**(3): 519-529.

Burkhart, B. A., P. B. Hebbbar, K. W. Trotter and T. K. Archer (2005). "Chromatin-dependent E1A activity modulates NF-kappaB RelA-mediated repression of glucocorticoid receptor-dependent transcription." *J Biol Chem* **280**(8): 6349-6358.

Busse, W. W., E. Middleton, W. Storms, R. J. Dockhorn, T. J. Chu, J. Grossman, J. M. Weiler, E. A. Bronsky, L. E. Mansfield, T. D. Bell, G. R. Hemsworth, J. L. Perhach, T. A. D'Eletto and A. Dam (1996). "Corticosteroid-sparing effect of azelastine in the management of bronchial asthma." *Am J Respir Crit Care Med* **153**(1): 122-127.

Caron, M. G., Y. Srinivasan, J. Pitha, K. Kocielek and R. J. Lefkowitz (1979). "Affinity chromatography of the beta-adrenergic receptor." *J Biol Chem* **254**(8): 2923-2927.

Carrigan, A., R. F. Walther, H. A. Salem, D. Wu, E. Atlas, Y. A. Lefebvre and R. J. Hache (2007). "An active nuclear retention signal in the glucocorticoid receptor functions as a strong inducer of transcriptional activation." *J Biol Chem* **282**(15): 10963-10971.

Casale, T. B., D. Wood, H. B. Richerson, S. Trapp, W. J. Metzger, D. Zavala and G. W. Hunninghake (1987). "Elevated bronchoalveolar lavage fluid histamine levels in allergic asthmatics are associated with methacholine bronchial hyperresponsiveness." *J Clin Invest* **79**(4): 1197-1203.

CDC. (2013). "Centers for Disease Control and Prevention. Asthma Facts. CDC's National Asthma Control Program Grantees ", from http://www.cdc.gov/asthma/pdfs/asthma_facts_program_grantees.pdf.

Chen, W., T. Dang, R. D. Blind, Z. Wang, C. N. Cavasotto, A. B. Hittelman, I. Rogatsky, S. K. Logan and M. J. Garabedian (2008). "Glucocorticoid receptor phosphorylation differentially affects target gene expression." *Mol Endocrinol* **22**(8): 1754-1766.

Cho, I. J. and S. G. Kim (2009). "A novel mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and glucocorticoid receptor (GR) interacting protein-1-dependent combinatorial mechanism of gene transrepression by GR." *Mol Endocrinol* **23**(1): 86-99.

Chrousos, G. P. (2004). "The glucocorticoid receptor gene, longevity, and the complex disorders of Western societies." *Am J Med* **117**(3): 204-207.

Chrousos, G. P. and T. Kino (2005). "Intracellular glucocorticoid signaling: a formerly simple system turns stochastic." *Sci STKE* **2005**(304): pe48.

Clark, A. R. (2007). "Anti-inflammatory functions of glucocorticoid-induced genes." *Mol Cell Endocrinol* **275**(1-2): 79-97.

Collingwood, T. N., F. D. Urnov and A. P. Wolffe (1999). "Nuclear receptors: coactivators, corepressors and chromatin remodeling in the control of transcription." *J Mol Endocrinol* **23**(3): 255-275.

Cooper, M. S. (2004). "Sensitivity of bone to glucocorticoids." *Clin Sci (Lond)* **107**(2): 111-123.

Coso, O. A., H. Teramoto, W. F. Simonds and J. S. Gutkind (1996). "Signaling from G protein-coupled receptors to c-Jun kinase involves beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins acting on a Ras and Rac1-dependent pathway." *J Biol Chem* **271**(8): 3963-3966.

Crespo, P., N. Xu, W. F. Simonds and J. S. Gutkind (1994). "Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta gamma subunits." *Nature* **369**(6479): 418-420.

Dale, H. H. and P. Laidlaw (1910). "The physiological actions of B-iminazoethylamin." *J Physiol*(41): 318

344.

Dale, H. H. and P. Laidlaw (1919). "Histamine shock." *J Physiol*(52): 355

390.

- Davies, L., N. Karthikeyan, J. T. Lynch, E. A. Sial, A. Gkourtsa, C. Demonacos and M. Krstic-Demonacos (2008). "Cross talk of signaling pathways in the regulation of the glucocorticoid receptor function." *Mol Endocrinol* **22**(6): 1331-1344.
- Davies, T. H., Y. M. Ning and E. R. Sanchez (2002). "A new first step in activation of steroid receptors: hormone-induced switching of FKBP51 and FKBP52 immunophilins." *J Biol Chem* **277**(7): 4597-4600.
- Davis, R. J. (2000). "Signal transduction by the JNK group of MAP kinases." *Cell* **103**(2): 239-252.
- De Bosscher, K., I. M. Beck and G. Haegeman (2010). "Classic glucocorticoids versus non-steroidal glucocorticoid receptor modulators: survival of the fittest regulator of the immune system?" *Brain Behav Immun* **24**(7): 1035-1042.
- De Bosscher, K. and G. Haegeman (2009). "Minireview: latest perspectives on antiinflammatory actions of glucocorticoids." *Mol Endocrinol* **23**(3): 281-291.
- De Bosscher, K., G. Haegeman and D. Elewaut (2010). "Targeting inflammation using selective glucocorticoid receptor modulators." *Curr Opin Pharmacol* **10**(4): 497-504.
- Deakins, K. M. (2015). "Year in review 2014: asthma." *Respir Care* **60**(5): 744-748.
- Denny, W. B., D. L. Valentine, P. D. Reynolds, D. F. Smith and J. G. Scammell (2000). "Squirrel monkey immunophilin FKBP51 is a potent inhibitor of glucocorticoid receptor binding." *Endocrinology* **141**(11): 4107-4113.
- Diamant, Z., J. D. Boot and J. C. Virchow (2007). "Summing up 100 years of asthma." *Respir Med* **101**(3): 378-388.
- Dixon, R. A., B. K. Kobilka, D. J. Strader, J. L. Benovic, H. G. Dohlman, T. Frielle, M. A. Bolanowski, C. D. Bennett, E. Rands, R. E. Diehl, R. A. Mumford, E. E. Slater, I. S. Sigal, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz and C. D. Strader (1986). "Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin." *Nature* **321**(6065): 75-79.
- Donaldson, J. and S. J. Hill (1986). "Histamine-induced hydrolysis of polyphosphoinositides in guinea-pig ileum and brain." *Eur J Pharmacol* **124**(3): 255-265.
- Driver, A. G., C. A. Kukoly and T. E. Bennett (1989). "Expression of histamine H1 receptors on cultured histiocytic lymphoma cells." *Biochem Pharmacol* **38**(18): 3083-3091.

Druey, K. M., K. J. Blumer, V. H. Kang and J. H. Kehrl (1996). "Inhibition of G-protein-mediated MAP kinase activation by a new mammalian gene family." *Nature* **379**(6567): 742-746.

Duma, D., C. M. Jewell and J. A. Cidlowski (2006). "Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification." *J Steroid Biochem Mol Biol* **102**(1-5): 11-21.

Echeverria, P. C., G. Mazaira, A. Erlejman, C. Gomez-Sanchez, G. Piwien Pilipuk and M. D. Galigniana (2009). "Nuclear import of the glucocorticoid receptor-hsp90 complex through the nuclear pore complex is mediated by its interaction with Nup62 and importin beta." *Mol Cell Biol* **29**(17): 4788-4797.

Encio, I. J. and S. D. Detera-Wadleigh (1991). "The genomic structure of the human glucocorticoid receptor." *J Biol Chem* **266**(11): 7182-7188.

Erlemann, K. R., C. Cossette, S. Gravel, A. Lesimple, G. J. Lee, G. Saha, J. Rokach and W. S. Powell (2007). "Airway epithelial cells synthesize the lipid mediator 5-oxo-ETE in response to oxidative stress." *Free Radic Biol Med* **42**(5): 654-664.

Federman, A. D., B. R. Conklin, K. A. Schrader, R. R. Reed and H. R. Bourne (1992). "Hormonal stimulation of adenylyl cyclase through Gi-protein beta gamma subunits." *Nature* **356**(6365): 159-161.

Fenoy, I., M. Giovannoni, E. Batalla, V. Martin, F. M. Frank, I. Piazzon and A. Goldman (2009). "Toxoplasma gondii infection blocks the development of allergic airway inflammation in BALB/c mice." *Clin Exp Immunol* **155**(2): 275-284.

Fenoy, I. M., R. Chiurazzi, V. R. Sanchez, M. A. Argenziano, A. Soto, M. S. Picchio, V. Martin and A. Goldman (2012). "Toxoplasma gondii infection induces suppression in a mouse model of allergic airway inflammation." *PLoS One* **7**(8): e43420.

Fernandez, N., F. Monczor, B. Lemos, C. Notcovich, A. Baldi, C. Davio and C. Shayo (2002). "Reduction of G protein-coupled receptor kinase 2 expression in U-937 cells attenuates H2 histamine receptor desensitization and induces cell maturation." *Mol Pharmacol* **62**(6): 1506-1514.

Fitzsimons, C. P., F. Monczor, N. Fernandez, C. Shayo and C. Davio (2004). "Mepyramine, a histamine H1 receptor inverse agonist, binds preferentially to a G protein-coupled form of the receptor and sequesters G protein." *J Biol Chem* **279**(33): 34431-34439.

Fitzsimons, C. P., L. W. van Hooijdonk, M. Schouten, I. Zalachoras, V. Brinks, T. Zheng, T. G. Schouten, D. J. Saaltink, T. Dijkmans, D. A. Steindler, J. Verhaagen, F. J. Verbeek, P. J. Lucassen, E. R. de Kloet, O. C. Meijer, H. Karst, M. Joels, M. S. Oitzl and E. Vreugdenhil (2013). "Knockdown

of the glucocorticoid receptor alters functional integration of newborn neurons in the adult hippocampus and impairs fear-motivated behavior." *Mol Psychiatry* **18**(9): 993-1005.

Folkow, B., K. Haeger and G. Kahlson (1948). "Observations on reactive hyperaemia as related to histamine on drugs antagonising vasodilatation induced by histamine and the vasodilator properties of adenosine triphosphate." *Acta Physiol. Scand.*(15): 244
278.

Freedman, N. D. and K. R. Yamamoto (2004). "Importin 7 and importin alpha/importin beta are nuclear import receptors for the glucocorticoid receptor." *Mol Biol Cell* **15**(5): 2276-2286.

Froidure, A. and C. Pilette (2015). "[Human dendritic cells in allergic asthma and rhinitis]." *Med Sci (Paris)* **31**(2): 151-158.

Gallagher-Beckley, A. J., J. G. Williams, J. B. Collins and J. A. Cidlowski (2008). "Glycogen synthase kinase 3beta-mediated serine phosphorylation of the human glucocorticoid receptor redirects gene expression profiles." *Mol Cell Biol* **28**(24): 7309-7322.

Gertz, J., D. Savic, K. E. Varley, E. C. Partridge, A. Safi, P. Jain, G. M. Cooper, T. E. Reddy, G. E. Crawford and R. M. Myers (2013). "Distinct properties of cell-type-specific and shared transcription factor binding sites." *Mol Cell* **52**(1): 25-36.

Ghosh, C. C., S. Ramaswami, A. Juvekar, H. Y. Vu, L. Galdieri, D. Davidson and I. Vancurova (2010). "Gene-specific repression of proinflammatory cytokines in stimulated human macrophages by nuclear I κ B α ." *J Immunol* **185**(6): 3685-3693.

GINA. (2014). "Global Strategy for Asthma Management and Prevention.", from <http://www.ginasthma.org/>.

Glare, E. M., M. Divjak, M. J. Bailey and E. H. Walters (2002). "beta-Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels." *Thorax* **57**(9): 765-770.

Glass, C. K. and K. Saijo (2010). "Nuclear receptor transrepression pathways that regulate inflammation in macrophages and T cells." *Nat Rev Immunol* **10**(5): 365-376.

Grkovich, A., C. A. Johnson, M. W. Buczynski and E. A. Dennis (2006). "Lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in human U937 macrophages is phosphatidic acid phosphohydrolase-1-dependent." *J Biol Chem* **281**(44): 32978-32987.

Groeneweg, F. L., H. Karst, E. R. de Kloet and M. Joels (2012). "Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at the neuronal membrane, regulators of nongenomic corticosteroid signalling." *Mol Cell Endocrinol* **350**(2): 299-309.

Gutkind, J. S. (2000). "Regulation of mitogen-activated protein kinase signaling networks by G protein-coupled receptors." *Sci STKE* **2000**(40): re1.

Hafezi-Moghadam, A., T. Simoncini, Z. Yang, F. P. Limbourg, J. C. Plumier, M. C. Rebsamen, C. M. Hsieh, D. S. Chui, K. L. Thomas, A. J. Prorock, V. E. Laubach, M. A. Moskowitz, B. A. French, K. Ley and J. K. Liao (2002). "Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase." *Nat Med* **8**(5): 473-479.

Hamid, Q. A., S. E. Wenzel, P. J. Hauk, A. Tsicopoulos, B. Wallaert, J. J. Lafitte, G. P. Chrousos, S. J. Szefler and D. Y. Leung (1999). "Increased glucocorticoid receptor beta in airway cells of glucocorticoid-insensitive asthma." *Am J Respir Crit Care Med* **159**(5 Pt 1): 1600-1604.

Hardy, E., M. Farahani and I. P. Hall (1996). "Regulation of histamine H1 receptor coupling by dexamethasone in human cultured airway smooth muscle." *Br J Pharmacol* **118**(4): 1079-1084.

Hayden, M. S. and S. Ghosh (2008). "Shared principles in NF-kappaB signaling." *Cell* **132**(3): 344-362.

He, Y. and S. S. Simons, Jr. (2007). "STAMP, a novel predicted factor assisting TIF2 actions in glucocorticoid receptor-mediated induction and repression." *Mol Cell Biol* **27**(4): 1467-1485.

Hench, P. S., E. C. Kendall and et al. (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**(8): 181-197.

Hill, S. J. (1990). "Distribution, properties, and functional characteristics of three classes of histamine receptor." *Pharmacol Rev* **42**(1): 45-83.

Hill, S. J., C. R. Ganellin, H. Timmerman, J. C. Schwartz, N. P. Shankley, J. M. Young, W. Schunack, R. Levi and H. L. Haas (1997). "International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors." *Pharmacol Rev* **49**(3): 253-278.

Hoare, C., A. Li Wan Po and H. Williams (2000). "Systematic review of treatments for atopic eczema." *Health Technol Assess* **4**(37): 1-191.

Hoffmann, E., O. Dittrich-Breiholz, H. Holtmann and M. Kracht (2002). "Multiple control of interleukin-8 gene expression." *J Leukoc Biol* **72**(5): 847-855.

Hojjman, E., L. Rocha Viegas, M. I. Keller Sarmiento, R. E. Rosenstein and A. Pecci (2004). "Involvement of Bax protein in the prevention of glucocorticoid-induced thymocytes apoptosis by melatonin." *Endocrinology* **145**(1): 418-425.

Holaska, J. M., B. E. Black, F. Rastinejad and B. M. Paschal (2002). "Ca²⁺-dependent nuclear export mediated by calreticulin." *Mol Cell Biol* **22**(17): 6286-6297.

Houssay, B. A. and B. A (1931). "The hypophysis, carbohydrate metabolism and diabetes." *Endocrinology*(29): 649

652.

Hudson, W. H., C. Youn and E. A. Ortlund (2013). "The structural basis of direct glucocorticoid-mediated transrepression." *Nat Struct Mol Biol* **20**(1): 53-58.

Ikawa, Y., M. Suzuki, S. Shiono, E. Ohki, H. Moriya, E. Negishi and K. Ueno (2005). "Histamine H4 receptor expression in human synovial cells obtained from patients suffering from rheumatoid arthritis." *Biol Pharm Bull* **28**(10): 2016-2018.

Islam, K. N. and C. R. Mendelson (2008). "Glucocorticoid/glucocorticoid receptor inhibition of surfactant protein-A (SP-A) gene expression in lung type II cells is mediated by repressive changes in histone modification at the SP-A promoter." *Mol Endocrinol* **22**(3): 585-596.

Ismaili, N. and M. J. Garabedian (2004). "Modulation of glucocorticoid receptor function via phosphorylation." *Ann N Y Acad Sci* **1024**: 86-101.

Ito, K., P. J. Barnes and I. M. Adcock (2000). "Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1 β -induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12." *Mol Cell Biol* **20**(18): 6891-6903.

Ito, K., S. Lim, G. Caramori, K. F. Chung, P. J. Barnes and I. M. Adcock (2001). "Cigarette smoking reduces histone deacetylase 2 expression, enhances cytokine expression, and inhibits glucocorticoid actions in alveolar macrophages." *FASEB J* **15**(6): 1110-1112.

Itoh, M., M. Adachi, H. Yasui, M. Takekawa, H. Tanaka and K. Imai (2002). "Nuclear export of glucocorticoid receptor is enhanced by c-Jun N-terminal kinase-mediated phosphorylation." *Mol Endocrinol* **16**(10): 2382-2392.

Jacoby, E., R. Bouhelal, M. Gerspacher and K. Seuwen (2006). "The 7 TM G-protein-coupled receptor target family." *ChemMedChem* **1**(8): 761-782.

Jang, A. S. (2012). "Steroid response in refractory asthmatics." *Korean J Intern Med* **27**(2): 143-148.

Jiang, Z. and L. Zhu (2016). "Update on Molecular Mechanisms of Corticosteroid Resistance in Chronic Obstructive Pulmonary Disease." *Pulm Pharmacol Ther.*

John, S., T. A. Johnson, M. H. Sung, S. C. Biddie, S. Trump, C. A. Koch-Paiz, S. R. Davis, R. Walker, P. S. Meltzer and G. L. Hager (2009). "Kinetic complexity of the global response to glucocorticoid receptor action." *Endocrinology* **150**(4): 1766-1774.

Jutel, M., K. Blaser and C. A. Akdis (2005). "Histamine in allergic inflammation and immune modulation." *Int Arch Allergy Immunol* **137**(1): 82-92.

Kagawa, Y., K. Izawa, H. Yano and C. Kamei (2010). "Synergetic effects of prednisolone and olopatadine on atopic dermatitis model of hairless mice." *Pharmacology* **85**(5): 286-294.

Kaliner, M. A. (2009). "Azelastine and olopatadine in the treatment of allergic rhinitis." *Ann Allergy Asthma Immunol* **103**(5): 373-380.

Kankaanranta, H., A. Lahdensuo, E. Moilanen and P. J. Barnes (2004). "Add-on therapy options in asthma not adequately controlled by inhaled corticosteroids: a comprehensive review." *Respir Res* **5**: 17.

Karlstedt, K., T. Sallmen, K. S. Eriksson, M. Lintunen, P. O. Couraud, F. Joo and P. Panula (1999). "Lack of histamine synthesis and down-regulation of H1 and H2 receptor mRNA levels by dexamethasone in cerebral endothelial cells." *J Cereb Blood Flow Metab* **19**(3): 321-330.

Karst, H. and M. Joels (2005). "Corticosterone slowly enhances miniature excitatory postsynaptic current amplitude in mice CA1 hippocampal cells." *J Neurophysiol* **94**(5): 3479-3486.

Kassel, O. and P. Herrlich (2007). "Crosstalk between the glucocorticoid receptor and other transcription factors: molecular aspects." *Mol Cell Endocrinol* **275**(1-2): 13-29.

Katz, M. and E. H. Gans (2008). "Topical corticosteroids, structure-activity and the glucocorticoid receptor: discovery and development--a process of "planned serendipity"." *J Pharm Sci* **97**(8): 2936-2947.

Kenakin, T. (2004). "Efficacy as a vector: the relative prevalence and paucity of inverse agonism." *Mol Pharmacol* **65**(1): 2-11.

Kiefer, T. L., L. Lai, L. Yuan, C. Dong, M. E. Burow and S. M. Hill (2005). "Differential regulation of estrogen receptor alpha, glucocorticoid receptor and retinoic acid receptor alpha transcriptional activity by melatonin is mediated via different G proteins." *J Pineal Res* **38**(4): 231-239.

Kino, T., T. Ichijo, N. D. Amin, S. Kesavapany, Y. Wang, N. Kim, S. Rao, A. Player, Y. L. Zheng, M. J. Garabedian, E. Kawasaki, H. C. Pant and G. P. Chrousos (2007). "Cyclin-dependent kinase 5 differentially regulates the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor through phosphorylation: clinical implications for the nervous system response to glucocorticoids and stress." *Mol Endocrinol* **21**(7): 1552-1568.

Kino, T., A. Tiulpakov, T. Ichijo, L. Chheng, T. Kozasa and G. P. Chrousos (2005). "G protein beta interacts with the glucocorticoid receptor and suppresses its transcriptional activity in the nucleus." *J Cell Biol* **169**(6): 885-896.

Kleiman, A., S. Hubner, J. M. Rodriguez Parkitna, A. Neumann, S. Hofer, M. A. Weigand, M. Bauer, W. Schmid, G. Schutz, C. Libert, H. M. Reichardt and J. P. Tuckermann (2012). "Glucocorticoid receptor dimerization is required for survival in septic shock via suppression of interleukin-1 in macrophages." *FASEB J* **26**(2): 722-729.

Kwon, O. J., B. T. Au, P. D. Collins, I. M. Adcock, J. C. Mak, R. R. Robbins, K. F. Chung and P. J. Barnes (1994). "Tumor necrosis factor-induced interleukin-8 expression in cultured human airway epithelial cells." *Am J Physiol* **267**(4 Pt 1): L398-405.

La Baer, J. and K. R. Yamamoto (1994). "Analysis of the DNA-binding affinity, sequence specificity and context dependence of the glucocorticoid receptor zinc finger region." *J Mol Biol* **239**(5): 664-688.

Lachize, S., E. M. Apostolakis, S. van der Laan, A. M. Tijssen, J. Xu, E. R. de Kloet and O. C. Meijer (2009). "Steroid receptor coactivator-1 is necessary for regulation of corticotropin-releasing hormone by chronic stress and glucocorticoids." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(19): 8038-8042.

Lefstin, J. A., J. R. Thomas and K. R. Yamamoto (1994). "Influence of a steroid receptor DNA-binding domain on transcriptional regulatory functions." *Genes Dev* **8**(23): 2842-2856.

Lefstin, J. A. and K. R. Yamamoto (1998). "Allosteric effects of DNA on transcriptional regulators." *Nature* **392**(6679): 885-888.

Leurs, R., M. J. Smit and H. Timmerman (1995). "Molecular pharmacological aspects of histamine receptors." *Pharmacol Ther* **66**(3): 413-463.

Li, J., L. E. Hand, Q. J. Meng, A. S. Loudon and D. A. Bechtold (2011). "GPR50 interacts with TIP60 to modulate glucocorticoid receptor signalling." *PLoS One* **6**(8): e23725.

Liu, J. and D. B. DeFranco (2000). "Protracted nuclear export of glucocorticoid receptor limits its turnover and does not require the exportin 1/CRM1-directed nuclear export pathway." *Mol Endocrinol* **14**(1): 40-51.

Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* **25**(4): 402-408.

Lu, N. Z. and J. A. Cidlowski (2005). "Translational regulatory mechanisms generate N-terminal glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes." *Mol Cell* **18**(3): 331-342.

Lu, N. Z., S. E. Wardell, K. L. Burnstein, D. DeFranco, P. J. Fuller, V. Giguere, R. B. Hochberg, L. McKay, J. M. Renoir, N. L. Weigel, E. M. Wilson, D. P. McDonnell and J. A. Cidlowski (2006). "International Union of Pharmacology. LXV. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: glucocorticoid, mineralocorticoid, progesterone, and androgen receptors." *Pharmacol Rev* **58**(4): 782-797.

Mannhold, R., H. Kubinyi, G. Folkers, E. Ottow and H. Weinmann (2008). "Nuclear receptors as drug targets", John Wiley & Sons.

Martinez, F. D. and D. Vercelli (2013). "Asthma." *Lancet* **382**(9901): 1360-1372.

Masoli, M., D. Fabian, S. Holt, R. Beasley and P. Global Initiative for Asthma (2004). "The global burden of asthma: executive summary of the GINA Dissemination Committee report." *Allergy* **59**(5): 469-478.

McCreath, G., I. P. Hall and S. J. Hill (1994). "Agonist-induced desensitization of histamine H1 receptor-mediated inositol phospholipid hydrolysis in human umbilical vein endothelial cells." *Br J Pharmacol* **113**(3): 823-830.

McDonough, A. K., J. R. Curtis and K. G. Saag (2008). "The epidemiology of glucocorticoid-associated adverse events." *Curr Opin Rheumatol* **20**(2): 131-137.

McKenna, N. J., R. B. Lanz and B. W. O'Malley (1999). "Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology." *Endocr Rev* **20**(3): 321-344.

McKenna, N. J. and B. W. O'Malley (2002). "Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators." *Cell* **108**(4): 465-474.

- McKenna, N. J., J. Xu, Z. Nawaz, S. Y. Tsai, M. J. Tsai and B. W. O'Malley (1999). "Nuclear receptor coactivators: multiple enzymes, multiple complexes, multiple functions." *J Steroid Biochem Mol Biol* **69**(1-6): 3-12.
- McNeely, W. and L. R. Wiseman (1998). "Intranasal azelastine. A review of its efficacy in the management of allergic rhinitis." *Drugs* **56**(1): 91-114.
- Meijsing, S. H., M. A. Pufall, A. Y. So, D. L. Bates, L. Chen and K. R. Yamamoto (2009). "DNA binding site sequence directs glucocorticoid receptor structure and activity." *Science* **324**(5925): 407-410.
- Molina-Hernandez, A. and I. Velasco (2008). "Histamine induces neural stem cell proliferation and neuronal differentiation by activation of distinct histamine receptors." *J Neurochem* **106**(2): 706-717.
- Moore, J. T., J. L. Collins and K. H. Pearce (2006). "The nuclear receptor superfamily and drug discovery." *ChemMedChem* **1**(5): 504-523.
- Mullane, K. and M. Williams (2014). "Animal models of asthma: reprise or reboot?" *Biochem Pharmacol* **87**(1): 131-139.
- Munck, A. and T. Brinck-Johnsen (1967). "Specific metabolic and physicochemical interactions of glucocorticoids in vivo and in vitro with rat adipose tissue and thymus cells." *Excerpta Med Int Cong Ser*(132): 472
481.
- Nakagome, K., S. Matsushita and M. Nagata (2012). "Neutrophilic inflammation in severe asthma." *Int Arch Allergy Immunol* **158 Suppl 1**: 96-102.
- Navarro, A., A. Valero, M. J. Rosales and J. Mullol (2011). "Clinical use of oral antihistamines and intranasal corticosteroids in patients with allergic rhinitis." *J Investig Allergol Clin Immunol* **21**(5): 363-369.
- Necela, B. M. and J. A. Cidlowski (2004). "Mechanisms of glucocorticoid receptor action in noninflammatory and inflammatory cells." *Proc Am Thorac Soc* **1**(3): 239-246.
- Nelson, H. S. (2003). "Prospects for antihistamines in the treatment of asthma." *J Allergy Clin Immunol* **112**(4 Suppl): S96-100.

- Newton, R. and N. S. Holden (2007). "Separating transrepression and transactivation: a distressing divorce for the glucocorticoid receptor?" *Mol Pharmacol* **72**(4): 799-809.
- Newton, R., N. S. Holden, M. C. Catley, W. Oyelusi, R. Leigh, D. Proud and P. J. Barnes (2007). "Repression of inflammatory gene expression in human pulmonary epithelial cells by small-molecule I κ B kinase inhibitors." *J Pharmacol Exp Ther* **321**(2): 734-742.
- Nicolaidis, N. C., Z. Galata, T. Kino, G. P. Chrousos and E. Charmandari (2010). "The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function." *Steroids* **75**(1): 1-12.
- Nishida, T., M. Takano, T. Kawakami, N. Nishino, S. Nakai and Y. Hirai (1988). "The transcription of the interleukin 1 beta gene is induced with PMA and inhibited with dexamethasone in U937 cells." *Biochem Biophys Res Commun* **156**(1): 269-274.
- Nissen, R. M. and K. R. Yamamoto (2000). "The glucocorticoid receptor inhibits NF κ B by interfering with serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain." *Genes Dev* **14**(18): 2314-2329.
- Notcovich, C., F. Diez, M. R. Tubio, A. Baldi, M. G. Kazanietz, C. Davio and C. Shayo (2010). "Histamine acting on H1 receptor promotes inhibition of proliferation via PLC, RAC, and JNK-dependent pathways." *Exp Cell Res* **316**(3): 401-411.
- Oakley, R. H. and J. A. Cidlowski (2013). "The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease." *J Allergy Clin Immunol* **132**(5): 1033-1044.
- Oakley, R. H., C. M. Jewell, M. R. Yudt, D. M. Bofetiado and J. A. Cidlowski (1999). "The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor beta isoform. Specificity and mechanisms of action." *J Biol Chem* **274**(39): 27857-27866.
- Oakley, R. H., J. C. Webster, M. Sar, C. R. Parker, Jr. and J. A. Cidlowski (1997). "Expression and subcellular distribution of the beta-isoform of the human glucocorticoid receptor." *Endocrinology* **138**(11): 5028-5038.
- Ogawa, S., J. Lozach, C. Benner, G. Pascual, R. K. Tangirala, S. Westin, A. Hoffmann, S. Subramaniam, M. David, M. G. Rosenfeld and C. K. Glass (2005). "Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and toll-like receptors." *Cell* **122**(5): 707-721.
- Olijslagers, J. E., E. R. de Kloet, Y. Elgersma, G. M. van Woerden, M. Joels and H. Karst (2008). "Rapid changes in hippocampal CA1 pyramidal cell function via pre- as well as postsynaptic membrane mineralocorticoid receptors." *Eur J Neurosci* **27**(10): 2542-2550.

Olin, J. T. and M. E. Wechsler (2014). "Asthma: pathogenesis and novel drugs for treatment." *BMJ* **349**: g5517.

Orti, E., L. M. Hu and A. Munck (1993). "Kinetics of glucocorticoid receptor phosphorylation in intact cells. Evidence for hormone-induced hyperphosphorylation after activation and recycling of hyperphosphorylated receptors." *J Biol Chem* **268**(11): 7779-7784.

Overington, J. P., B. Al-Lazikani and A. L. Hopkins (2006). "How many drug targets are there?" *Nat Rev Drug Discov* **5**(12): 993-996.

Palczewski, K., T. Kumasaka, T. Hori, C. A. Behnke, H. Motoshima, B. A. Fox, I. Le Trong, D. C. Teller, T. Okada, R. E. Stenkamp, M. Yamamoto and M. Miyano (2000). "Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor." *Science* **289**(5480): 739-745.

Panula, P., P. L. Chazot, M. Cowart, R. Gutzmer, R. Leurs, W. L. Liu, H. Stark, R. L. Thurmond and H. L. Haas (2015). "International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCVIII. Histamine Receptors." *Pharmacol Rev* **67**(3): 601-655.

Papadimitriou, A. and K. N. Priftis (2009). "Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis." *Neuroimmunomodulation* **16**(5): 265-271.

Papassotiropoulos, A., C. Gerhards, A. Heck, S. Ackermann, A. Aerni, N. Schick Tanz, B. Auschra, P. Demougin, E. Mumme, T. Elbert, V. Ertl, L. Gschwind, E. Hanser, K. D. Huynh, F. Jessen, I. T. Kolassa, A. Milnik, P. Paganetti, K. Spalek, C. Vogler, A. Muhs, A. Pfeifer and D. J. de Quervain (2013). "Human genome-guided identification of memory-modulating drugs." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(46): E4369-4374.

Parsons, M. E. and C. R. Ganellin (2006). "Histamine and its receptors." *Br J Pharmacol* **147 Suppl 1**: S127-135.

Pazdrak, K. and A. Kurosky (2014). "Functional proteomics for the characterization of impaired cellular responses to glucocorticoids in asthma." *Adv Exp Med Biol* **795**: 255-270.

Picard, D. and K. R. Yamamoto (1987). "Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor." *EMBO J* **6**(11): 3333-3340.

Pratt, W. B. (1993). "The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor." *J Biol Chem* **268**(29): 21455-21458.

- Presman, D. M., E. Hoijman, N. R. Ceballos, M. D. Galigniana and A. Pecci (2006). "Melatonin inhibits glucocorticoid receptor nuclear translocation in mouse thymocytes." *Endocrinology* **147**(11): 5452-5459.
- Presman, D. M., V. Levi, O. P. Pignataro and A. Pecci (2012). "Melatonin inhibits glucocorticoid-dependent GR-TIF2 interaction in newborn hamster kidney (BHK) cells." *Mol Cell Endocrinol* **349**(2): 214-221.
- Python, F., C. Goebel and P. Aeby (2007). "Assessment of the U937 cell line for the detection of contact allergens." *Toxicol Appl Pharmacol* **220**(2): 113-124.
- Raff, M., B. Alberts, J. Lewis, A. Johnson and K. Roberts (2002). "Molecular Biology of the Cell 4th edition."
- Rask-Andersen, M., M. S. Almen and H. B. Schioth (2011). "Trends in the exploitation of novel drug targets." *Nat Rev Drug Discov* **10**(8): 579-590.
- Reichardt, H. M., K. H. Kaestner, J. Tuckermann, O. Kretz, O. Wessely, R. Bock, P. Gass, W. Schmid, P. Herrlich, P. Angel and G. Schutz (1998). "DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival." *Cell* **93**(4): 531-541.
- Reichardt, H. M., J. P. Tuckermann, M. Gottlicher, M. Vujic, F. Weih, P. Angel, P. Herrlich and G. Schutz (2001). "Repression of inflammatory responses in the absence of DNA binding by the glucocorticoid receptor." *EMBO J* **20**(24): 7168-7173.
- Reily, M. M., C. Pantoja, X. Hu, Y. Chinenov and I. Rogatsky (2006). "The GRIP1:IRF3 interaction as a target for glucocorticoid receptor-mediated immunosuppression." *EMBO J* **25**(1): 108-117.
- Rhen, T. and J. A. Cidlowski (2005). "Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs." *N Engl J Med* **353**(16): 1711-1723.
- Richter, M., A. M. Cantin, C. Beaulieu, A. Cloutier and P. Larivee (2003). "Zinc chelators inhibit eotaxin, RANTES, and MCP-1 production in stimulated human airway epithelium and fibroblasts." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **285**(3): L719-729.
- Robinson, A. J. and J. M. Dickenson (2001). "Activation of the p38 and p42/p44 mitogen-activated protein kinase families by the histamine H(1) receptor in DDT(1)MF-2 cells." *Br J Pharmacol* **133**(8): 1378-1386.
- Rogatsky, I. and L. B. Ivashkiv (2006). "Glucocorticoid modulation of cytokine signaling." *Tissue Antigens* **68**(1): 1-12.

Rogatsky, I., S. K. Logan and M. J. Garabedian (1998). "Antagonism of glucocorticoid receptor transcriptional activation by the c-Jun N-terminal kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(5): 2050-2055.

Rogatsky, I., H. F. Luecke, D. C. Leitman and K. R. Yamamoto (2002). "Alternate surfaces of transcriptional coregulator GRIP1 function in different glucocorticoid receptor activation and repression contexts." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(26): 16701-16706.

Rogatsky, I., J. C. Wang, M. K. Derynck, D. F. Nonaka, D. B. Khodabakhsh, C. M. Haqq, B. D. Darimont, M. J. Garabedian and K. R. Yamamoto (2003). "Target-specific utilization of transcriptional regulatory surfaces by the glucocorticoid receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(24): 13845-13850.

Rogatsky, I., K. A. Zarembek and K. R. Yamamoto (2001). "Factor recruitment and TIF2/GRIP1 corepressor activity at a collagenase-3 response element that mediates regulation by phorbol esters and hormones." *EMBO J* **20**(21): 6071-6083.

Ronacher, K., K. Hadley, C. Avenant, E. Stubbsrud, S. S. Simons, Jr., A. Louw and J. P. Hapgood (2009). "Ligand-selective transactivation and transrepression via the glucocorticoid receptor: role of cofactor interaction." *Mol Cell Endocrinol* **299**(2): 219-231.

Ros-Bernal, F., S. Hunot, M. T. Herrero, S. Parnadeau, J. C. Corvol, L. Lu, D. Alvarez-Fischer, M. A. Carrillo-de Sauvage, F. Saurini, C. Coussieu, K. Kinugawa, A. Prigent, G. Hoglinger, M. Hamon, F. Tronche, E. C. Hirsch and S. Vyas (2011). "Microglial glucocorticoid receptors play a pivotal role in regulating dopaminergic neurodegeneration in parkinsonism." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(16): 6632-6637.

Sainz, R. M., J. C. Mayo, R. J. Reiter, I. Antolin, M. M. Esteban and C. Rodriguez (1999). "Melatonin regulates glucocorticoid receptor: an answer to its antiapoptotic action in thymus." *FASEB J* **13**(12): 1547-1556.

Samarasinghe, R. A., S. F. Witchell and D. B. DeFranco (2012). "Cooperativity and complementarity: synergies in non-classical and classical glucocorticoid signaling." *Cell Cycle* **11**(15): 2819-2827.

Savory, J. G., B. Hsu, I. R. Laquian, W. Giffin, T. Reich, R. J. Hache and Y. A. Lefebvre (1999). "Discrimination between NL1- and NL2-mediated nuclear localization of the glucocorticoid receptor." *Mol Cell Biol* **19**(2): 1025-1037.

Scadding, G. K., S. R. Durham, R. Mirakian, N. S. Jones, S. C. Leech, S. Farooque, D. Ryan, S. M. Walker, A. T. Clark, T. A. Dixon, S. R. Jolles, N. Siddique, P. Cullinan, P. H. Howarth, S. M. Nasser,

A. British Society for and I. Clinical (2008). "BSACI guidelines for the management of allergic and non-allergic rhinitis." *Clin Exp Allergy* **38**(1): 19-42.

Schacke, H., W. D. Docke and K. Asadullah (2002). "Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids." *Pharmacol Ther* **96**(1): 23-43.

Schacke, H., H. Rehwinkel and K. Asadullah (2005). "Dissociated glucocorticoid receptor ligands: compounds with an improved therapeutic index." *Curr Opin Investig Drugs* **6**(5): 503-507.

Schena, M., L. P. Freedman and K. R. Yamamoto (1989). "Mutations in the glucocorticoid receptor zinc finger region that distinguish interdigitated DNA binding and transcriptional enhancement activities." *Genes Dev* **3**(10): 1590-1601.

Schmidt, P., F. Holsboer and D. Spengler (2001). "Beta(2)-adrenergic receptors potentiate glucocorticoid receptor transactivation via G protein beta gamma-subunits and the phosphoinositide 3-kinase pathway." *Mol Endocrinol* **15**(4): 553-564.

Schreiber, J., R. G. Jenner, H. L. Murray, G. K. Gerber, D. K. Gifford and R. A. Young (2006). "Coordinated binding of NF-kappaB family members in the response of human cells to lipopolysaccharide." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(15): 5899-5904.

Selye, H. (1946). "The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation." *J Clin Endocrinol Metab* **6**: 117-230.

Sharif, O., V. N. Bolshakov, S. Raines, P. Newham and N. D. Perkins (2007). "Transcriptional profiling of the LPS induced NF-kappaB response in macrophages." *BMC Immunol* **8**: 1.

Shimamura, T., M. Shiroishi, S. Weyand, H. Tsujimoto, G. Winter, V. Katritch, R. Abagyan, V. Cherezov, W. Liu, G. W. Han, T. Kobayashi, R. C. Stevens and S. Iwata (2011). "Structure of the human histamine H1 receptor complex with doxepin." *Nature* **475**(7354): 65-70.

Shin, Y. S., K. Takeda and E. W. Gelfand (2009). "Understanding asthma using animal models." *Allergy Asthma Immunol Res* **1**(1): 10-18.

Shoda, T., K. Futamura, K. Orihara, M. Emi-Sugie, H. Saito, K. Matsumoto and A. Matsuda (2016). "Recent advances in understanding the roles of vascular endothelial cells in allergic inflammation." *Allergol Int* **65**(1): 21-29.

Simons, F. E. and K. J. Simons (2011). "Histamine and H1-antihistamines: celebrating a century of progress." *J Allergy Clin Immunol* **128**(6): 1139-1150 e1134.

Simons, S. S., Jr. (2008). "What goes on behind closed doors: physiological versus pharmacological steroid hormone actions." *Bioessays* **30**(8): 744-756.

Smit, M. J., S. M. Bloemers, R. Leurs, L. G. Tertoolen, A. Bast, S. W. de Laat and H. Timmerman (1992). "Short-term desensitization of the histamine H1 receptor in human HeLa cells: involvement of protein kinase C dependent and independent pathways." *Br J Pharmacol* **107**(2): 448-455.

Smoak, K. A. and J. A. Cidlowski (2004). "Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation." *Mech Ageing Dev* **125**(10-11): 697-706.

So, A. Y., C. Chaivorapol, E. C. Bolton, H. Li and K. R. Yamamoto (2007). "Determinants of cell- and gene-specific transcriptional regulation by the glucocorticoid receptor." *PLoS Genet* **3**(6): e94.

Sousa, A. R., S. J. Lane, J. A. Cidlowski, D. Z. Staynov and T. H. Lee (2000). "Glucocorticoid resistance in asthma is associated with elevated in vivo expression of the glucocorticoid receptor beta-isoform." *J Allergy Clin Immunol* **105**(5): 943-950.

Sundahl, N., J. Bridelance, C. Libert, K. De Bosscher and I. M. Beck (2015). "Selective glucocorticoid receptor modulation: New directions with non-steroidal scaffolds." *Pharmacol Ther* **152**: 28-41.

Surjit, M., K. P. Ganti, A. Mukherji, T. Ye, G. Hua, D. Metzger, M. Li and P. Chambon (2011). "Widespread negative response elements mediate direct repression by agonist-liganded glucocorticoid receptor." *Cell* **145**(2): 224-241.

Szatmary, Z., M. J. Garabedian and J. Vilcek (2004). "Inhibition of glucocorticoid receptor-mediated transcriptional activation by p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase." *J Biol Chem* **279**(42): 43708-43715.

Szatmary, Z. and A. Kebis (2012). "Promoter-context as a determinant of glucocorticoid receptor-responsiveness to activation of p38 and JNK mitogen-activated protein (MAP) kinases." *Gen Physiol Biophys* **31**(3): 309-322.

Tanabe, T. and N. Tohnai (2002). "Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression." *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**: 95-114.

Terry, L. J., E. B. Shows and S. R. Wenthe (2007). "Crossing the nuclear envelope: hierarchical regulation of nucleocytoplasmic transport." *Science* **318**(5855): 1412-1416.

- Tsaprouni, L. G., K. Ito, I. M. Adcock and N. Panchard (2007). "Suppression of lipopolysaccharide- and tumour necrosis factor-alpha-induced interleukin (IL)-8 expression by glucocorticoids involves changes in IL-8 promoter acetylation." *Clin Exp Immunol* **150**(1): 151-157.
- Tuckermann, J. P., A. Kleiman, R. Moriggl, R. Spanbroek, A. Neumann, A. Illing, B. E. Clausen, B. Stride, I. Forster, A. J. Habenicht, H. M. Reichardt, F. Tronche, W. Schmid and G. Schutz (2007). "Macrophages and neutrophils are the targets for immune suppression by glucocorticoids in contact allergy." *J Clin Invest* **117**(5): 1381-1390.
- Tuckermann, J. P., H. M. Reichardt, R. Arribas, K. H. Richter, G. Schutz and P. Angel (1999). "The DNA binding-independent function of the glucocorticoid receptor mediates repression of AP-1-dependent genes in skin." *J Cell Biol* **147**(7): 1365-1370.
- Uhlenhaut, N. H., G. D. Barish, R. T. Yu, M. Downes, M. Karunasiri, C. Liddle, P. Schwalie, N. Hubner and R. M. Evans (2013). "Insights into negative regulation by the glucocorticoid receptor from genome-wide profiling of inflammatory cistromes." *Mol Cell* **49**(1): 158-171.
- Uings, I., I. Puxeddu, V. Temkin, S. J. Smith, D. Fattah, K. P. Ray and F. Levi-Schaffer (2005). "Effects of dexamethasone on TNF-alpha-induced release of cytokines from purified human blood eosinophils." *Clin Mol Allergy* **3**(1): 5.
- Umland, S. P., R. P. Schleimer and S. L. Johnston (2002). "Review of the molecular and cellular mechanisms of action of glucocorticoids for use in asthma." *Pulm Pharmacol Ther* **15**(1): 35-50.
- Van Ganse, E., L. Kaufman, M. P. Derde, J. C. Yernault, L. Delaunois and W. Vincken (1997). "Effects of antihistamines in adult asthma: a meta-analysis of clinical trials." *Eur Respir J* **10**(10): 2216-2224.
- Vandevyver, S., L. Dejager, J. Tuckermann and C. Libert (2013). "New insights into the anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids: an emerging role for glucocorticoid-receptor-mediated transactivation." *Endocrinology* **154**(3): 993-1007.
- Vandevyver, S., L. Dejager, T. Van Bogaert, A. Kleyman, Y. Liu, J. Tuckermann and C. Libert (2012). "Glucocorticoid receptor dimerization induces MKP1 to protect against TNF-induced inflammation." *J Clin Invest* **122**(6): 2130-2140.
- Vega, D., N. M. Maalouf and K. Sakhaee (2007). "CLINICAL Review #: the role of receptor activator of nuclear factor-kappaB (RANK)/RANK ligand/osteoprotegerin: clinical implications." *J Clin Endocrinol Metab* **92**(12): 4514-4521.

Wang, J. C., M. K. Derynck, D. F. Nonaka, D. B. Khodabakhsh, C. Haqq and K. R. Yamamoto (2004). "Chromatin immunoprecipitation (ChIP) scanning identifies primary glucocorticoid receptor target genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(44): 15603-15608.

Webster, J. C., C. M. Jewell, J. E. Bodwell, A. Munck, M. Sar and J. A. Cidlowski (1997). "Mouse glucocorticoid receptor phosphorylation status influences multiple functions of the receptor protein." *J Biol Chem* **272**(14): 9287-9293.

Wettschureck, N. and S. Offermanns (2005). "Mammalian G proteins and their cell type specific functions." *Physiol Rev* **85**(4): 1159-1204.

Whitmarsh, A. J., J. Cavanagh, C. Tournier, J. Yasuda and R. J. Davis (1998). "A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation." *Science* **281**(5383): 1671-1674.

WHO (2002). World Health Report

Williams, S. G., D. K. Schmidt, S. C. Redd, W. Storms, E. National Asthma and P. Prevention (2003). "Key clinical activities for quality asthma care. Recommendations of the National Asthma Education and Prevention Program." *MMWR Recomm Rep* **52**(RR-6): 1-8.

Wolthers, O. D. (2013). "New patents of fixed combinations of nasal antihistamines and corticosteroids in allergic rhinitis." *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* **7**(3): 223-228.

Yamashita, M., H. Fukui, K. Sugama, Y. Horio, S. Ito, H. Mizuguchi and H. Wada (1991). "Expression cloning of a cDNA encoding the bovine histamine H1 receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(24): 11515-11519.

Yamauchi, J., Y. Kaziro and H. Itoh (1999). "Differential regulation of mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4) and 7 (MKK7) by signaling from G protein beta gamma subunit in human embryonal kidney 293 cells." *J Biol Chem* **274**(4): 1957-1965.

Ylikomi, T., A. Vienonen and T. M. Ahola (2004). "G protein-coupled receptor 30 down-regulates cofactor expression and interferes with the transcriptional activity of glucocorticoid." *Eur J Biochem* **271**(21): 4159-4168.

Yoshikawa, T. and H. Kanazawa (2013). "Cellular signaling crosstalk between multiple receptors for investigation of pathophysiology in multifactorial diseases--what is clinically-relevant crosstalk?" *Curr Med Chem* **20**(9): 1091-1102.

Zhou, J. and J. A. Cidlowski (2005). "The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses." *Steroids* **70**(5-7): 407-417.

ABREVIATURAS

ACTH: adrenocorticotrofina

ADN: ácido desoxirribonucleico

AF-1: dominio de función de activación 1

AF-2: dominio de función de activación 2

AMPC: adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

ATP: adenosina trifosfato

ANOVA: Análisis de la Varianza

AP-1: proteína activadora 1

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

AZE: azelastina

BSA: seroalbúmina bovina

C3: exoenzima C3 de *Clostridium botulinum*

CET: cetirizina

CLOR: clorfeniramina

COX-2: ciclooxigenasa 2

CRH: hormona liberadora de corticotrofina

DAG: diacilglicerol

DEX: dexametasona

DIF: difenhidramina

EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica

ERK: kinasa regulada por señales extracelulares

GC: glucocorticoide

G α : subunidad alfa de la proteína G

G α t: subunidad alfa de la proteína G transducina

G $\beta\gamma$: dímero compuesto por las subunidades beta y gama de la proteína G

GDP: guanosín difosfato

GILZ: glucocorticoid-induced leucine zipper

Gq: subunidad alfa q de la proteína G

GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos

GPCR: receptor acoplado a proteína G

GR: receptor de glucocorticoides

GRE: elemento de respuesta a glucocorticoides

GTP: guanosín trifosfato

HDAC: histona deacetilasa

HPA: eje hipotalámico-pituitario-adrenal

H1R: receptor H1 a histamina

IL-8: interleuquina 8

IP3: inositol 1,4,5-trisfosfato

JNK: kinasa c-Jun N-terminal

LBA: lavado broncoalveolar

LPS: lipopolisacárido

Luc: luciferasa

MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos

MEP: mepiramina

MKP-1: MAPK fosfatasa 1

MMTV: promotor del virus de tumor mamario de ratón

NFκB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

OVA: ovoalbúmina

p65: alias RelA, subunidad del factor NF-κB

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PI3K: fosfoinositol 3-quinasa

PKC: proteína quinasa C

PLC: fosfolipasa C

PMA: forbol 12-miristato 14-acetato

PREX1: phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchanger 1

Rac1: Ras-related C3 *botulinum* toxin sustrato 1

RELA: alias p65, subunidad del factor NF- κ B

RGS2: regulador de señalización de proteínas G tipo 2

RhoA: Ras homolog gene family, miembro A

RU486: mifepristona

SEM: error estándar de la media

SFB: suero fetal bovino

SEGRA: agonista selectivo del GR

SEGRM: modulador selectivo del GR

SLC19A2: transportador de tiamina 1/familia de transportador de soluto 19 miembro 2

TAT: tirosina aminotransferasa

THBD: trombomodulina

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

TRIP: trans-triprolidina

UA: unidades arbitrarias