

Aspectos Moleculares da Sensibilidade aos Glicocorticóides

revisão

RESUMO

Os glicocorticóides exercem um papel importante na regulação fisiológica e na adaptação a situações de *stress*, sendo a maioria dos efeitos destes hormônios mediada pela interação com os receptores glicocorticóides. A sensibilidade ao glicocorticóide depende da densidade celular de receptores expressos, bem como da eficiência da transdução do sinal mediada pelo complexo hormônio-receptor. Os estados de resistência ou de hipersensibilidade ao glicocorticóide, observados, respectivamente, nas doenças inflamatórias auto-imunes e na síndrome metabólica, podem representar a variabilidade dos fatores que influenciam a cascata de sinalização do glicocorticóide. O reconhecimento destes fatores contribui para uma melhor compreensão tanto do fenótipo clínico e da evolução destas doenças quanto da resposta terapêutica com glicocorticóide. A compreensão destes mecanismos fisiopatológicos também pode contribuir para a escolha de intervenções terapêuticas. Neste artigo de revisão, descrevemos os múltiplos fatores envolvidos nesta cascata de sinalização, os quais são capazes de influenciar a sensibilidade ao glicocorticóide. (Arq Bras Endocrinol Metab 2006;50/6:983-995)

Descritores: Glicocorticóide; Sensibilidade; Mecanismo de ação; Biologia molecular; Receptor glicocorticóide; Dexametasona

Cláudia D.C. Faria
Carlos Alberto Longui

Laboratório de Medicina Molecular, Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, SP.

ABSTRACT

Molecular Aspects of Glucocorticoid Sensitivity.

Glucocorticoids play an essential role in maintaining basal and stress-related homeostasis. Most known effects of glucocorticoids are mediated by the intracellular glucocorticoid receptors. The glucocorticoid sensitivity seems to depend on the amount of receptors expressed and the efficiency of glucocorticoid receptor-mediated signal transduction. Glucocorticoid resistance or hypersensitivity, seen in autoimmune-inflammatory diseases and in metabolic syndrome respectively, can represent the variability of several steps that influence the signaling cascade of glucocorticoid action. The recognition of these steps could provide the understanding of the clinical phenotype and course of such diseases as well as their responsiveness to glucocorticoid therapy. The comprehension of these pathophysiological mechanisms can also improve the possible therapeutic interventions. In this review, we have summarized the multiple factors that have been shown to be involved in this signaling cascade and, thus, to influence glucocorticoid sensitivity. (Arq Bras Endocrinol Metab 2006;50/6:983-995)

Keywords: Glucocorticoid; Sensitivity; Mechanism of action; Molecular biology; Glucocorticoid receptor; Dexamethasone

OS GLICOCORTICÓIDES SÃO PRODUZIDOS e secretados pelo córtex adrenal e exercem um papel importante em vários órgãos e sistemas, participando da regulação fisiológica e da adaptação às situações de *stress*.

Recebido em 18/02/05

Revisado em 26/09/05

Aceito em 29/05/06

A concentração de glicocorticoide circulante é regulada através do ajuste do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal, influenciado por fatores como o ritmo circadiano (1), o *stress* (2) e o *feedback* negativo (3); este último fator é exercido pelo próprio hormônio glicocorticoide, agindo sobre os receptores glicocorticóides (GR), presentes no hipotálamo e na hipófise.

Os GR são proteínas citoplasmáticas com estrutura contendo domínios comuns a outros membros da superfamília de receptores nucleares (4). Atuam como fatores de transcrição, alterando a expressão dos genes-alvo em resposta a um sinal hormonal específico (5). As suas funções ocorrem, pelo menos, em três níveis: recrutando os fatores da maquinaria geral de transcrição; modulando a ação dos fatores de transcrição, independentemente da ligação ao DNA; e modulando a estrutura da cromatina, permitindo a ligação de outras proteínas reguladoras ao DNA (6).

A resposta fisiológica e a sensibilidade aos glicocorticóides variam amplamente entre as espécies, os indivíduos, os tecidos, os tipos celulares e até mesmo durante as fases do ciclo de uma mesma célula (7,8). Muitas condições patológicas também estão relacionadas aos estados de resistência ou de hipersensibilidade aos glicocorticóides, e vários fatores influenciam a cascata de eventos que leva à modulação da sensibilidade aos glicocorticóides (9,10). Estes fatores incluem: a concentração hormonal, regulada pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal e influenciada pelas concentrações de CBG (11); a biodisponibilidade do glicocorticoide (12); a afinidade do receptor para ligação hormonal (13); a densidade intracelular de GR (14); a dissociação do GR do complexo com as hsp (15); a fosforilação do GR (16); a translocação nuclear do receptor ativado (17); a interação com o elemento responsivo ao glicocorticoide (GRE), bem como com os fatores de transcrição (18) (figura 1).

Considerando que a maior parte dos efeitos glicocorticóides é mediada pela ativação de seus receptores, um dos principais determinantes da responsividade e da sensibilidade a estes hormônios é a densidade intracelular do GR. Portanto, diversos métodos de avaliação *in vitro* e *in vivo* procuram correlacionar a sensibilidade tecidual aos glicocorticóides à densidade celular deste receptor (19-24).

RECEPTOR GLICOCORTICÓIDE

A estrutura protéica codificada pelo gene do receptor glicocorticoide é característica da família de receptores nucleares. Estes receptores são proteínas multifun-

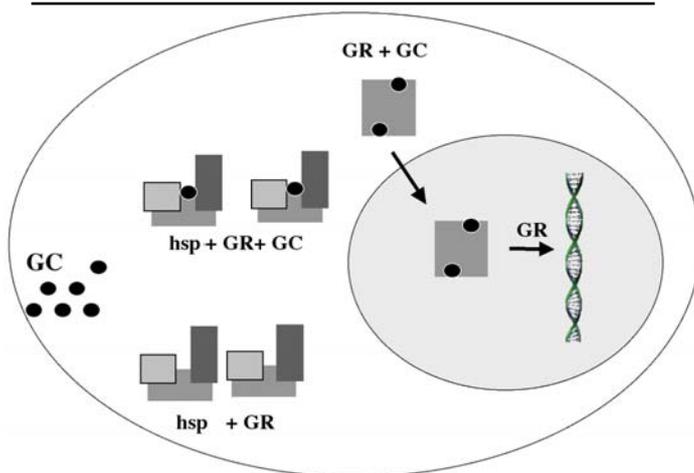


Figura 1. Esquemática do mecanismo de ação do receptor glicocorticoide.

Após interação hormonal, o receptor glicocorticoide dissocia-se do complexo com as hsp, forma homodimeros com outras moléculas do receptor ativado, transloca-se para o núcleo, interage com o elemento responsivo aos glicocorticóides, bem como com fatores de transcrição, modulando a expressão de genes-alvo.

GC: glicocorticoide; GR: receptor glicocorticoide; hsp: proteínas do choque térmico; GRE: elemento responsivo aos glicocorticóides.

cionais que traduzem o sinal determinado pelo seu hormônio ligante. Os receptores nucleares possuem três domínios comuns referidos como domínio de ligação ao ligante hormonal, localizado na extremidade carboxi-terminal; domínio central de ligação ao DNA, que compreende também o sítio de dimerização; e domínio de transativação na extremidade amino-terminal, responsável pela interação com os fatores de transcrição basal e com outros fatores de transcrição (25,26).

Os receptores nucleares, como todas as proteínas celulares, são sintetizados nos ribossomos citoplasmáticos e a migração dessas proteínas para o núcleo requer a existência do sinal de localização nuclear, situado próximo ao domínio de ligação ao DNA. Como resultado da existência deste sinal de localização nuclear, a maioria dos receptores nucleares já se encontra no próprio núcleo, mesmo na ausência de ligação hormônio-específica (27).

O receptor glicocorticoide é uma exceção, pois na ausência de ligação ao cortisol, encontra-se inativo no citoplasma, estabilizado por um complexo protéico denominado proteínas do choque térmico (*heat shock proteins*, hsp). Essa estrutura compreende, pelo menos, uma molécula do receptor, duas hsp de 90KD (hsp90) e uma outra proteína de aproximadamente 59KD (hsp59). As hsp permitem que o receptor adquira uma conformação tridimensional adequada para a sua ligação ao hormônio (28,29).

A função do domínio de ligação esteroidal, na extremidade carboxi-terminal, é complexa pois, além de ligar-se ao hormônio, contém seqüências importantes para a ligação de hsp, para a translocação nuclear, para a dimerização, para a transativação do gene-alvo e para o silenciamento do receptor na ausência de ligação hormonal (30).

A especificidade dos GR deve-se à habilidade em reconhecer as seqüências de ligação nos genes-alvo, denominadas elementos de resposta aos receptores glicocorticóides (GRE). A ligação do complexo hormônio-receptor ao GRE é mediada pela região do receptor denominada domínio de ligação ao DNA, constituído por 66 a 68 resíduos de aminoácidos (31). O domínio central de ligação ao DNA apresenta um alto grau de homologia entre todos os receptores nucleares e, como ocorre no domínio de ligação hormonal, a estrutura do domínio de ligação ao DNA é semelhante a todos os membros dessa superfamília. Esta região inclui dois subdomínios, denominados dedos de zinco (*zinc fingers*). A estrutura secundária de cada um desses subdomínios é altamente conservada e mantida por nove resíduos do aminoácido cisteína, dos quais oito interagem de modo coordenado, assumindo as duas formas tetraédricas separadas que permitem a ligação com um átomo de zinco. Os quatro resíduos de cisteína localizados em cada dedo ligam-se a uma molécula de zinco, permitindo a sua interação com o DNA (32,33).

A ligação do GR aos fatores de transcrição ou às moléculas co-ativadoras é mediada pelos domínios de transativação. Os receptores nucleares apresentam pelo menos dois domínios de transativação, o domínio de ativação de função independente de ligação AF-1 (Tau-1, $\tau 1$), localizado na porção amino-terminal e o de ativação de função dependente de ligação AF-2 (Tau-2, $\tau 2$), na extremidade carboxi-terminal. O domínio Tau-1 do GR localiza-se entre os resíduos dos aminoácidos 77 e 262 e o domínio Tau-2, entre os resíduos 407 e 574. Uma atividade transcricional ótima requer o sinergismo entre estas duas regiões (34).

Os GR ativados são capazes de agir especialmente como homodímeros, ligando-se ao DNA dupla-fita em uma seqüência específica de seis nucleotídeos (hexâmeros), denominada *half-sites*. Os receptores de hormônios esteróides, com exceção do receptor estrogênico, ligam-se ao DNA na seqüência específica AGAACA (35,36). Por convenção, as seqüências de DNA em dupla-fita são descritas pela seqüência somente de uma fita complementar, com a leitura dos nucleotídeos ordenada da extremidade 5' em direção à extremidade 3'. Outros receptores

nucleares reconhecem a seqüência de nucleotídeos AGGTCA, sendo a diferença entre esses dois *half-sites* determinada pelos dois nucleotídeos centrais (36-38).

Os homodímeros dos receptores esteróides preferencialmente se ligam a duas seqüências de hexâmeros orientadas em sentidos opostos (repetições invertidas) (36). Outros receptores nucleares, como o receptor do hormônio tireoidiano, ligam-se à molécula de DNA como heterodímeros. A interação dos heterodímeros com a molécula de DNA ocorre com as seqüências de hexâmeros orientadas no mesmo sentido (repetições diretas) (38).

O determinante primário da especificidade de reconhecimento dessas seqüências se deve a um grupo de resíduos de aminoácidos localizados na base do primeiro dedo de zinco, no chamado BOX P do domínio de ligação ao DNA. Os aminoácidos da base do primeiro dedo de zinco, adjacentes às cisteínas, são críticos na definição da especificidade da ligação aos elementos responsivos (39). A função do segundo dedo de zinco ainda não está totalmente elucidada, mas aparentemente auxilia a estabilidade da ligação da proteína ao DNA (40).

Mecanismo de ação hormonal

A cascata de eventos que leva à transativação ou à transrepressão gênica pelos glicocorticóides inicia-se com o hormônio lipofílico cruzando a membrana citoplasmática da célula-alvo. O complexo hormônio-receptor-elemento de resposta hormonal modula a transcrição dos genes-alvo dos glicocorticóides, positiva ou negativamente, na dependência do contexto do promotor e da participação de proteínas co-ativadoras ou co-repressoras. A ativação da transcrição gênica é mediada por um complexo de fatores reguladores da atividade da RNA polimerase, incluindo os co-fatores protéicos (fatores de transcrição basal) e os outros fatores associados (fatores gerais de transcrição) (41).

O receptor glicocorticóide também modula a ação dos fatores de transcrição independente de ligação direta ao DNA, por meio de interações diretas proteína-proteína com outros fatores de transcrição (30). Particularmente, para os glicocorticóides, a interação ocorre entre o complexo hormônio-receptor e os fatores de transcrição AP-1 (proteína de ativação 1 do complexo dos fatores de transcrição) e NF κ B (fator nuclear Kappa-B) nas regiões regulatórias de diversos genes (43). Monômeros ou dímeros de GR interagem com AP-1 ou com NF κ B e inibem a ativação transcricional de genes normalmente regulados por estes fatores (42). Os glicocor-

ticóides também modulam os efeitos de outros fatores de transcrição, como Stat4, Stat5, NF-1, Oct-1, SP-1, C/EBP, HNF3 e HNF4 (6).

Os hormônios esteróides podem, ainda, exercer os seus efeitos por vias alternativas não-genômicas. Esses efeitos foram documentados principalmente para a 1,25-vitamina D3, a progesterona e a aldosterona; eles parecem envolver os sistemas de segundos-mensageiros, incluindo a proteína-quinase C, os níveis intracelulares de cálcio e de óxido nítrico e as tirosino-quinases. Losel e cols. (44) sugeriram que os efeitos não-genômicos dos glicocorticóides provavelmente resultem da existência de uma forma de receptor glicocorticóide de membrana citoplasmática, originada por transcrição alternativa do gene do receptor glicocorticóide (44).

Gene codificador e isoformas protéicas do receptor glicocorticóide

O gene do GR está localizado no braço longo do cromossomo cinco (5q31), apresentando cerca de 140.000 pares de base (pb), e é composto por 9 exons (45).

O exon um (981 pb) não contém seqüências codificadoras. Essas seqüências começam no exon dois (1197 pb), o qual codifica todo o domínio Tau-1 na

extremidade amino-terminal. Os exons três (167 pb) e quatro (117 pb) codificam o primeiro e o segundo dedos de zinco no domínio de ligação ao DNA, respectivamente; enquanto os exons cinco (280 pb), seis (145 pb), sete (131 pb) e oito (158 pb) codificam o domínio de ligação esteroidal e o domínio de transativação Tau-2. O exon nove (4108 pb) codifica as duas extremidades alternativas, alfa e beta, no domínio de ligação esteroidal (46,47) (figura 2).

Análises da região 5' não traduzida (UTR) do exon um do gene do GR revelaram 11 diferentes isoformas, baseadas nas sete formas distintas do exon um. Todas as formas alternativas do exon um, como 1A- 1F e 1H, são transcritas em tecidos humanos, cada uma das quais apresentando um sítio doador de *splicing* específico, enquanto o sítio aceptor de *splicing*, localizado no exon dois, é o mesmo para as diferentes isoformas. A complexidade da região 5' UTR do gene do GR provavelmente se relaciona à variabilidade da sensibilidade tecido-específica dos glicocorticóides (48).

A região promotora do GR contém múltiplas seqüências citosina-guanina (ilhas GpC ou CG) e não apresenta as seqüências TATA ou CCAAT, as quais fazem parte do complexo de iniciação da transcrição,

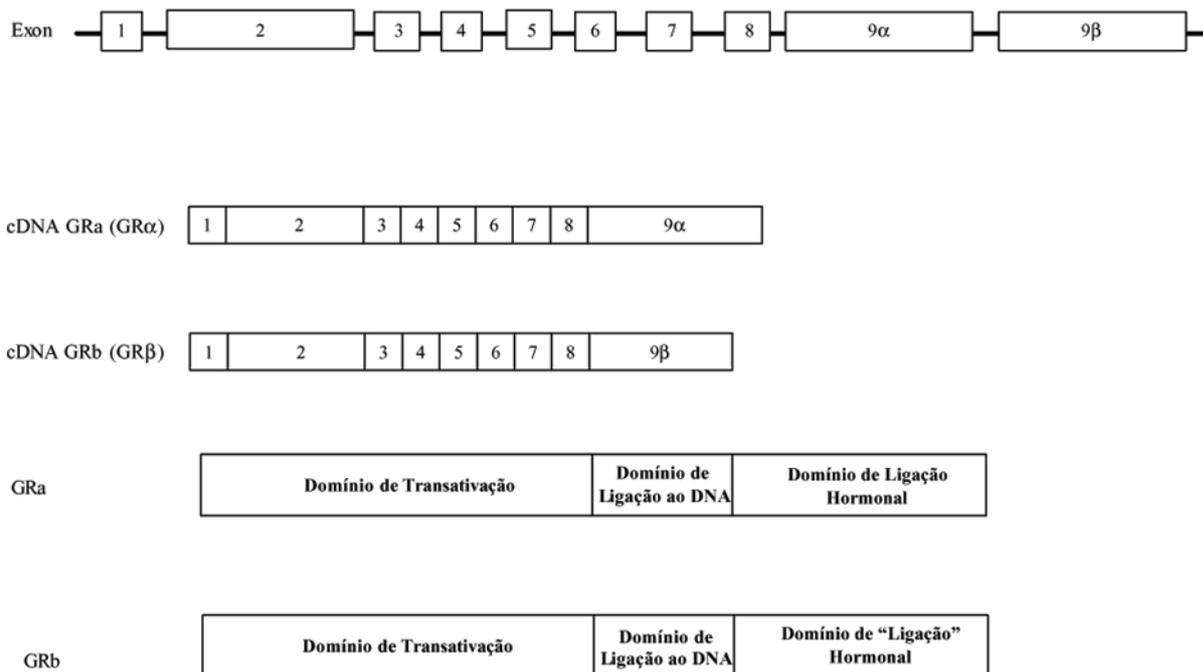


Figura 2. Representação da estrutura do gene do receptor glicocorticóide e das isoformas protéicas GR α e GR β . O gene do GR apresenta nove exons, e um *splicing* alternativo no nono exon gera as isoformas alfa (777 aminoácidos) e beta do GR (742 aminoácidos). Os domínios de transativação, de ligação ao DNA e de ligação hormonal estão representados.

refletindo a necessidade de expressão constitutiva deste gene. Vários fatores de transcrição ligam-se a diversos sítios nos promotores do GR, incluindo quatro sítios para Sp1 e três para YY1 no promotor 1B; seis para Sp1, um para AP-2, um para NFκB e um para o YY1 no promotor 1C (49). Estas seqüências distintas no exon um modulam a velocidade de transcrição, mas aparentemente não alteram a seqüência de leitura que começa no exon dois, garantindo a expressão constitutiva do GR na dependência das diversas condições fisiológicas.

Embora a expressão do exon um seja tão amplamente regulada, sua seqüência não é traduzida. Este fato se deve à presença de um códon de terminação logo no início do exon dois, apenas nove pares de bases após o códon de iniciação. A função e a regulação desta heterogeneidade são desconhecidas, mas sugere-se que auxiliem na regulação da expressão do GR de forma tecido-específica (49) e de isoformas específicas da membrana celular (50).

Existem ainda *splicings* alternativos que atingem a região codificadora do GR. Na extremidade 3' do transcrito primário do GR, um *splicing* alternativo no último exon resulta na formação de duas isoformas, a isoforma alfa (GRα) e a isoforma beta (GRβ) do receptor (figura 2). Hollenberg e cols. (45) isolaram os cDNA destas duas isoformas e observaram que eles diferiam apenas na extremidade 3'. As análises das seqüências de aminoácidos revelaram que as isoformas GRα e GRβ eram idênticas até o aminoácido 727, mas apresentavam distintos aminoácidos a partir desta posição.

A isoforma GRα possui 777 aminoácidos (massa molecular= 94 kDa) e é biologicamente ativa. A iniciação alternativa da tradução é um mecanismo de formação de isoformas de GRα. O produto protéico principal, de 94 kDa, representa a tradução de GRα a partir do primeiro códon AUG (Met1), sendo chamado GR-A. Entretanto, este códon iniciador situa-se em uma fraca seqüência consenso de iniciação de Kozak, levando a um escape de leitura ribossomal e de iniciação da tradução em outros códons AUG. O próximo códon de iniciação (met 27) origina uma proteína de 91 kDa, chamada GR-B. Esta espécie é quase duas vezes mais eficiente na transativação mediada pelo elemento do que GR-A, mas apresenta uma eficácia similar na repressão de NFκB (27).

Embora as isoformas GRα e GRβ sejam 94% idênticas, a isoforma beta é incapaz de ligar-se aos glicocorticóides e de ativar a transcrição gênica. Esta isoforma possui 742 aminoácidos e, apesar de também formar um complexo protéico com as hsp (hsp90), localiza-se primariamente no núcleo celular, mesmo na ausência do ligante. As modificações dos aminoácidos

no domínio de ligação hormonal, observadas no GRβ, determinam uma redução ou uma perda completa da capacidade de ligação hormonal (51,52).

Um outro *splicing* variante do GR foi descrito em células tumorais de paciente com mieloma múltiplo, chamado GR-P (53). Esta isoforma apresenta 676 aminoácidos e é codificada pelos exons dois a sete e parte do intron sete. Este GR truncado, sem grande parte do domínio de ligação esteroidal, aumenta a expressão de GRα em algumas linhagens celulares. Em certos casos de mieloma e outras neoplasias hematológicas córtico-resistentes, esta isoforma representa 10-50% dos GR (54).

Em pacientes com adenoma corticotrófico, foi descrito um outro *splicing* variante, com a retenção de três bases do intron que separa os exons três e quatro. A proteína resultante, GRγ, tem a inserção de uma arginina no domínio de ligação de DNA. Esta isoforma também é difusamente expressa e representa 4 a 8% do total de GR nos diversos tecidos, mas exibe somente metade da atividade transcricional de GRα. As conseqüências funcionais da expressão desta isoforma são desconhecidas, mas parecem estar correlacionadas com a resistência ao glicocorticóide em crianças com leucemia linfoblástica aguda (55).

A versatilidade do gene do GR em direcionar a expressão de sua proteína pode ser observada não somente pelos diversos promotores usados, mas também pelos numerosos polimorfismos descritos. Vários polimorfismos de único nucleotídeo foram documentados na base de dados do GR (http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/SNP/snp_ref.cgi?locusId=2908). Embora alguns destes *loci* polimórficos se correlacionem com doenças nos humanos, as diferenças individuais nas respostas aos glicocorticóides podem ser atribuídas às substituições na seqüência do GR. As mutações e os polimorfismos do GR também podem alterar a expressão do receptor, a sua interação com o DNA e com outras proteínas, modificando, portanto, o seu efeito biológico. Recentemente, demonstrou-se que a presença dos polimorfismos ER22/23EK e N363S resultam em redução ou aumento significativo da capacidade de transativação do gene do GR, respectivamente (56).

O grau de sensibilidade aos glicocorticóides pode estar associado com a síndrome metabólica. Assim, associações positivas foram mostradas entre expressão do gene do GR em mioblastos de músculo esquelético e resistência insulínica, índice de massa corporal (IMC) e pressão arterial (57). As variações no gene do GR que afetam a expressão deste gene, bem como os efeitos da proteína traduzida, podem, conseqüentemente, ter um impacto potencial nos fatores metabólicos. O polimorfis-

mo N363S, mudando uma asparagina por uma serina, é de interesse pois se sugere que esta modificação estabeleça um novo local de fosforilação, importante para as interações do receptor com fatores de transcrição, resultando em hiper-atividade do GR. Em uma população específica de pacientes obesos, diabéticos ou com doença coronariana, os indivíduos portadores do polimorfismo N363S apresentam ação aumentada do cortisol, resultando em maiores valores de IMC (9).

Sensibilidade aos glicocorticóides

A resposta de uma célula exposta a um glicocorticóide advém de diversos fatores moduladores, tais como a concentração do hormônio livre, a potência relativa do hormônio e a habilidade da célula em receber e traduzir o sinal hormonal. A concentração hormonal é regulada pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal e influenciada pela concentração da proteína transportadora CBG. Em uma família australiana portadora de deficiência de CBG, observou-se uma mutação no exon dois, resultando em um *stop* códon prematuro e em completa perda de função protéica. Indivíduos portadores desta mutação apresentam uma alta prevalência de fadiga e hipotensão (11).

A correlação direta entre a densidade dos GR em uma célula e sua sensibilidade aos glicocorticóides foi demonstrada em estudos que utilizaram sistemas variados. Bourgeois e Newby (57) desenvolveram clones celulares derivados de células de timoma do camundongo, os quais eram homozigotos (r+/r+ ou r-/r-) ou heterozigotos (r+/r-) para o GR. Os clones híbridos obtidos, sensíveis ao efeito apoptótico dos glicocorticóides, apresentavam uma, duas, três ou quatro cópias para o alelo r+, e continham diferentes quantidades de GR, como resultado do efeito de dosagem gênica. Após a administração de dexametasona, observou-se que a linhagem celular híbrida contendo apenas uma cópia do GR era a mais resistente ao efeito citolítico. Houve progressão de sensibilidade proporcional ao aumento do número de cópias do alelo r+ de GR em cada célula. Dong e cols. (58) demonstraram que a indução da transcrição de genes ativados pelos glicocorticóides apresentou uma correlação positiva com as variações da expressão de GR em células de hepatoma de ratos.

Fatores que influenciam a sensibilidade aos glicocorticóides

Biodisponibilidade do glicocorticóide

A biodisponibilidade intracelular do hormônio é modulada por duas isoformas da enzima 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase (11 β HSD), codificadas por genes distintos e que catalisam a interconversão da forma

ativa do hormônio (cortisol) para a inativa (cortisona) (59). Nos tecidos humanos, a 11 β HSD1 é amplamente distribuída, sendo especialmente abundante no fígado e no tecido adiposo. Atua principalmente como uma oxorredutase, convertendo a cortisona em cortisol. De modo oposto, a enzima 11 β HSD2 é encontrada predominantemente nos tecidos-alvo mineralocorticóides, como nos rins, no cólon e nas glândulas salivares, onde atuam protegendo o receptor mineralocorticóide (MR) da ação glicocorticóide. O MR apresenta a mesma afinidade para o cortisol e para a aldosterona, sendo que a inativação do cortisol em cortisona neste sítio favorece a ligação da aldosterona ao seu receptor (60). Mutações nos genes destas enzimas alteram suas atividades e, conseqüentemente, a biodisponibilidade do cortisol (12).

Densidade intracelular de GR

Como a densidade intracelular de GR é um dos principais determinantes da responsividade aos glicocorticóides, os fatores que regulam a sua expressão podem interferir no nível de resposta celular e na sensibilidade aos glicocorticóides. Dentre eles, existem a fase do ciclo celular (61), o envelhecimento (62), as alterações primárias do receptor e as anormalidades endócrinas, como a síndrome de Cushing ou a insuficiência adrenal (63). A expressão celular de GR correlaciona-se positivamente com a magnitude da resposta mediada pelos glicocorticóides e varia de modo tecido-específico, tendo no timo um dos órgãos com maior densidade de receptores por célula (14).

Os principais moduladores são os próprios glicocorticóides, que promovem uma redução na concentração de GR, conhecido como processo de *down-regulation* homólogo (64); este processo diminui a sensibilidade, oferecendo proteção parcial aos efeitos excessivos dos glicocorticóides (65). Os experimentos imunogênicos sugerem que a redução da expressão de GR seja o resultado direto da *down-regulation* induzida pelo ligante, descartando-se outros mecanismos propostos, como as modificações na forma do receptor ou o seqüestro do GR em algum compartimento subcelular. Reforça esta conclusão a observação de níveis diminuídos de RNA mensageiro do GR durante o processo de *down-regulation* homólogo (66).

Afinidade do GR ao glicocorticóide

A afinidade do GR ao glicocorticóide também regula o efeito final. As mutações pontuais no domínio de ligação esteroidal alteram a afinidade dos GR aos glicocorticóides (13) ou até mesmo a estabilidade do complexo hormônio-receptor (67), e são associadas a síndromes clínicas de resistência aos glicocorticóides.

Lind e cols. (68) observaram que as substituições do resíduo de cisteína na posição 736 pela serina (Cys736Ser) ou pela treonina (Cys736Thr) determinavam uma redução na afinidade de ligação hormonal, bem como uma redução da sensibilidade ao glicocorticóide em todos os métodos de transativação testados.

Huizenga e cols. (69) descreveram cinco pacientes com história clínica de resistência ao glicocorticóide, os quais apresentavam anormalidades no número de receptores, na afinidade de ligação hormonal e/ou na habilidade da dexametasona em inibir a proliferação celular. Utilizando-se da técnica de triagem para detecção de mutações (SSCP), os autores não encontraram alterações no gene do GR em nenhum destes pacientes, e concluíram que as anormalidades poderiam estar em qualquer local da cascata de sinalização, desde a ligação hormonal ao GR até os eventos pós-receptores.

Além das anormalidades no domínio de ligação hormonal, as mutações e os polimorfismos do GR também podem alterar os níveis de expressão do receptor, a sua interação com o DNA ou com outras proteínas, modificando, portanto, o seu efeito biológico. A maioria das mutações descritas determina uma resistência aos glicocorticóides, mas algumas delas levam aos estados de hipersensibilidade. Koper e cols. (70) identificaram um polimorfismo, localizado na posição 1220, que resulta em substituição da asparagina pela serina no códon 363 (Asp363Ser) do GR. Huizenga e cols. (71) observaram que os indivíduos portadores deste polimorfismo apresentavam uma hipersensibilidade à administração exógena de glicocorticóides, tanto em relação ao grau de supressão do cortisol após dexametasona quanto à resposta do cortisol à insulina.

Ativação do GR e dissociação do complexo com as hsp

Uma das mais importantes conseqüências da ligação do cortisol ao seu receptor é a indução de alteração tridimensional da molécula do GR. Como descrito anteriormente, quando o hormônio se liga a uma seqüência de aminoácidos hidrofóbicos, localizada nas α -hélices H3, H4 e H5, há uma mudança de conformação na α -hélice H12 e, conseqüentemente, na estrutura espacial do GR. Esta alteração de conformação induz à dissociação do complexo GR-hsp e à exposição do sinal de localização nuclear (72).

O antagonista de glicocorticóide, RU486, apresenta a capacidade de ligação ao GR, mas, como provoca uma alteração conformacional distinta, não exibe o efeito glicocorticóide (15).

Fosforilação do GR

Depois de traduzido, o GR serve como substrato para várias quinases e fosfatases, sendo fosforilado nos resíduos de serina e de treonina, presentes em sua porção amino-terminal. Quando o GR é ativado por seu agonista, vários aminoácidos na extremidade amino-terminal são fosforilados (73).

A identificação dos resíduos de aminoácidos fosforilados pode ser feita através do uso de fósforo marcado radioativamente (P^{32}). Os aminoácidos marcados são separados por HPLC e posteriormente seqüenciados. Nos camundongos, oito resíduos de aminoácidos foram então identificados, sendo eles serinas 122, 150, 212, 220, 234, 315 e 412 e treonina 159. Nos humanos, os aminoácidos correspondentes são as serinas 113, 141, 203, 211 e 226 (74,75). Apesar de o papel deste padrão de fosforilação específica ser pouco conhecido, a existência de mutações nos sítios de fosforilação apresenta um profundo impacto na estabilidade do receptor, na meia-vida e na sinalização para o promotor-específico (76). A fosforilação do GR também parece ser dependente da fase do ciclo celular (77).

Wang e cols. (75) produziram anticorpos que reconhecem os sítios de fosforilação do GR humano localizados nos resíduos de serina 203 (Ser203) e de serina 211 (Ser211). Na ausência de ligação hormonal, o grau de fosforilação da Ser211 era baixo quando comparado à fosforilação da Ser203. Após o tratamento com dexametasona, houve um aumento na fosforilação de ambos os resíduos e, utilizando uma variedade de agonistas e de antagonistas, os autores observaram que a atividade transcricional do GR correlacionava-se com o grau de fosforilação da Ser211. Observaram, ainda, que a fosforilação predominante dos resíduos de Ser203 determinava uma maior distribuição de GR no citoplasma e nas regiões perinucleares, enquanto que a fosforilação predominante da Ser211 era mais evidente no núcleo celular. Concluíram, então, que os diferentes padrões de fosforilação influenciam a localização subcelular do GR e, conseqüentemente, modulam a função do receptor.

O padrão de fosforilação do GR também é influenciado pela fase do ciclo celular. O tratamento com um agonista glicocorticóide é capaz de estimular a fosforilação durante a fase de síntese de DNA (S), mas não na fase de mitose (G2/M). Desta forma, as células sincronizadas na fase S são sensíveis, enquanto que as células na fase G2/M são resistentes aos glicocorticóides (16).

Ubiquitinação do GR

Wallace e Cidlowski (78) demonstraram que, em camundongos, o GR é degradado pela via da ubiquitina. A fosforilação do GR facilita a ação da enzima E2 de con-

jugação de ubiquitina e/ou da enzima E3 de ligação de ubiquitina. Estas enzimas reconhecem as proteínas-alvo e promovem uma ligação covalente da ubiquitina, com os seus 76 aminoácidos, aos resíduos de lisina. As proteínas ligadas à ubiquitina são transportadas para um complexo conhecido como proteassomo de degradação. Foi demonstrado que o GR é capaz de interagir com a enzima E2 de conjugação de ubiquitina e com a enzima E3 de ligação de ubiquitina (79).

Quando a degradação se encontra reduzida pela inibição do complexo proteassômico, a atividade do GR está aumentada. A inibição da degradação também pode aumentar a atividade de outros fatores de transcrição, como Sp1 e p53 (80). Em conjunto, a fosforilação e o padrão de degradação modulam a atividade do GR e, conseqüentemente, da sensibilidade aos glicocorticóides.

Translocação nuclear

A translocação nuclear acelera a resposta hormonal. Este padrão de resposta foi observado ao se tratarem células com o fármaco FK506 (Tacrolimus). Este fármaco liga-se à proteína hsp56, desligando o GR das hsp e facilitando sua translocação nuclear, com conseqüente aumento da transcrição glicocorticóide-mediada em baixas concentrações do hormônio, mas não em altas concentrações (17).

Mobilidade nuclear do GR

Na ausência de ligação hormonal, o GR α localiza-se no citoplasma em um complexo com as hsp. Com a ligação do cortisol, o complexo é desfeito e o receptor ativado transloca-se para o núcleo celular. A maioria dos estudos que utilizam proteínas fluorescentes (GFP ou YFP) ligadas aos receptores, sugere que a translocação nuclear completa do complexo GFP-GR α ocorre em 30 minutos após a adição do ligante (81).

No núcleo, o complexo GFP-GR α co-localiza-se com os sítios de iniciação da transcrição, apresentando uma distribuição predominantemente pontual. Uma forma similar de distribuição nuclear é observada para os ER (82), para o AR (83), para o MR (84), para o receptor de vitamina D (85) e para o TR β (86).

Para o GR, há também a descrição de co-localização com a matriz nuclear. Esta matriz é constituída por elementos que não participam da composição da cromatina. A principal proteína da matriz nuclear, a hnRNPU, interage com o GR (87). As regiões Tau2 do GR do rato também contêm um sinal de localização de matriz nuclear que facilita a interação entre o GR e a hnRNPU. Eggert e cols. (88) observaram que a expressão aumentada de hnRNPU inibia a indução de transativação pelo GR.

A mobilidade do GR nuclear depende ainda do ligante hormonal que ocupa o receptor. Por exemplo, o complexo YFP-hGR α -A no núcleo celular apresenta uma mobilidade mais baixa quando ativado pela triamcinolona ($t_{1/2}$ = 2,38 s), do que quando ativado pela cortisona ($t_{1/2}$ = 0,97 s). A correlação positiva entre a afinidade do ligante hormonal e a habilidade do ligante em desacelerar a mobilidade nuclear parece existir quando uma série de ligantes para o GR foi testada (89).

Transativação gênica pelo GR

A habilidade do GR ativado em promover a transativação dos genes responsivos aos esteróides depende da presença de co-ativadores, nucleoproteínas com atividade enzimática de remodelação da cromatina (36). Estas nucleoproteínas ligam-se à região promotora dos genes responsivos, via ativação do domínio Tau1 do GR.

Várias famílias de co-ativadores são descritas, incluindo as proteínas p160, como as proteínas co-ativadoras do receptor de esteróide (SRC-1, SRC-2, SRC-3) e a proteína-1 de interação ao receptor glicocorticóide (GRIP-1); as co-integradoras p300/proteína ligadora do elemento de resposta de ligação protéica ao AMPc (CBP) e proteínas associadas ao complexo p300/CBP (90).

Os co-ativadores p160 e p300/CBP possuem múltiplos motivos LXXLL (onde L= leucina e X= qualquer aminoácido), os quais representam domínios co-ativadores ou boxes de receptores nucleares. Estes motivos servem como uma interface entre os co-ativadores e a porção hidrofóbica formada pelas α -hélices H3/H4 e H5/H12 dos receptores nucleares, e cada proteína co-ativadora pode apresentar vários destes motivos. Todos estes co-ativadores possuem atividade histona-acetilase, capaz de liberar o DNA dos nucleossomos e permitir a interação do complexo de pré-iniciação da RNA polimerase II, da proteína ligadora TATA e de proteínas associadas à proteína ligadora TATA (91).

Outras proteínas também estão envolvidas na ligação de GR ao DNA, algumas delas com seus genes já clonados e seqüenciados, como o promotor de translocação do GR estimulado por ATP (ASTP), o complexo dos homólogos das proteínas SWI/SNF e o brm. Estas proteínas são helicases e facilitam a ligação do GR ao DNA (92).

Síndromes de resistência e de hipersensibilidade aos glicocorticóides

Como a responsividade dos tecidos-alvo ao glicocorticóide é fundamental ao efeito final deste hormônio, a resistência e a hipersensibilidade ao glicocorticóide

resultam em quadros clinicamente compatíveis com insuficiência adrenal ou com hipercortisolismo, respectivamente (52); para estas doenças, diversos métodos, *in vivo* e *in vitro*, podem ser utilizados para a avaliação da responsividade e da sensibilidade tecidual aos glicocorticóides (57,93-95).

As síndromes clínicas caracterizadas pela resistência aos glicocorticóides podem ser generalizadas ou específicas de um determinado tecido. A resistência generalizada aos glicocorticóides é definida por uma menor sensibilidade ao cortisol em todos os tecidos, incluindo o hipotálamo e a hipófise. Devido à falha no *feedback* negativo, as concentrações de ACTH e de cortisol elevam-se, compensando os efeitos sistêmicos da resistência periférica ao cortisol, mas com consequente acúmulo de andrógenos e de mineralocorticóide. O quadro clínico da resistência ao glicocorticóide varia desde completamente assintomático até casos severos de hiperandrogenismo, fadiga e excesso de mineralocorticóide (96).

Cerca de 6 a 7% dos pacientes em fase terminal da síndrome da imunodeficiência adquirida apresentam uma resistência generalizada ao glicocorticóide. Nestes pacientes, as concentrações elevadas de cortisol são usualmente insuficientes para compensar a resistência periférica e os sintomas de insuficiência adrenal são freqüentemente observados. Por outro lado, observa-se uma hipersensibilidade aos glicocorticóides em alguns tecidos de pacientes infectados pelo HIV. Esta hipersensibilidade tecido-específica parece ser determinada pela proteína viral Vpr, que atua como um co-ativador do complexo GR-GRE (97).

Em outras situações clínicas observa-se resistência tecido-específica, sem que haja aumento do cortisol circulante. A asma córtico-resistente, a artrite reumatóide e a osteoartrite, bem como algumas células linfóides tumorais que perderam a resposta aos glicocorticóides com o evoluir da doença, são exemplos destas condições clínicas (98). Na asma córtico-resistente, observam-se valores elevados de AP-1 que aparentemente seqüestram os GR no compartimento intranuclear (99).

Uma característica potencialmente importante de GR β é seu efeito dominante negativo. Como possui a capacidade de heterodimerização com GR α , a isoforma GR β inibe a regulação da transcrição gênica (15,100). Este mecanismo dominante negativo do GR β é induzido pela formação de heterodímeros GR α /GR β , incapazes de se ligarem aos co-ativadores, ao mesmo tempo em que reduzem a formação do homodímero GR α /GR α , causando assim uma resposta atenuada de GR α (100). O GR α também se liga ao

GRE nos promotores dos genes-alvo e apresenta uma afinidade superior ao GR β para esta seqüência, quando da ausência de ligação do glicocorticóide (15). O tratamento com glicocorticóide aumenta a ligação de GR α , e não de GR β , ao DNA (101).

A base molecular para a atividade dominante negativa do GR β foi recentemente elucidada. Yudit e cols. (102) utilizaram vários mutantes truncados de GR α para formar uma série de híbridos GR α /GR β . Após o seqüenciamento, os autores observaram que a ausência da α -hélice H12 no domínio de ligação hormonal não era necessária nem suficiente para o fenótipo dominante negativo de GR β . Demonstraram que apenas dois resíduos, dos 15 aminoácidos existentes no domínio de ligação hormonal de GR β , eram responsáveis pela atividade dominante negativa.

A importância fisiopatológica destes achados ainda é incerta, pois estudos que utilizaram a transfecção celular indicam a necessidade de um excesso de GR β , em concentrações cinco a dez vezes superiores ao GR α , para exercer uma completa inibição da transcrição (103).

As síndromes relacionadas à hipersensibilidade aos glicocorticóides foram menos estudadas, em parte por serem extremamente raras em sua forma generalizada. Os possíveis mecanismos determinantes de hipersensibilidade ao glicocorticóide incluem algumas mutações pontuais (104) ou a expressão anormalmente baixa dos fatores inibidores da cascata de ativação do GR (100). Uma forma leve de hipersensibilidade pode levar a alterações em sistemas mais sensíveis, como a regulação da pressão arterial e a distribuição do tecido adiposo. Freqüências elevadas de determinados polimorfismos, identificados por RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*), foram observadas em pacientes com hipertensão arterial familiar (105), bem como em alguns pacientes com obesidade, especialmente no fenótipo de distribuição visceral, sugerindo uma anormalidade na expressão do GR, ou até mesmo um desequilíbrio de ligação com uma possível mutação do GR nestas doenças (106).

A hipersensibilidade do tecido adiposo aos glicocorticóides associa-se à síndrome metabólica e algumas evidências sugerem que esta hipersensibilidade possivelmente seja um dos fatores determinantes primários da resistência insulínica (22).

No futuro, aplicações práticas dos métodos de avaliação de sensibilidade podem ser úteis tanto no diagnóstico de doenças que cursam com resistência ou hipersensibilidade aos glicocorticóides quanto na escolha de dose individualizada de glicocorticóide, seja para reposição hormonal ou para terapêutica antiinfla-

matória. A possibilidade de escolha de dose individualizada de glicocorticóide é essencial na redução dos riscos de efeitos colaterais.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Núcleo de Apoio à Publicação da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo — NAP-SC — o suporte técnico-científico à publicação deste manuscrito.

REFERÊNCIAS

1. Bradbury MJ, Akana SF, Cascio CS, Levin N, Jacobson L, Dallman MF. Regulation of basal ACTH secretion by corticosterone is mediated by both type I (MR) and type II (GR) receptors in rat brain. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991;40(3):133-42.
2. Makino S, Hashimoto K, Gold PW. Multiple feedback mechanisms activating corticotropin-releasing hormone system in the brain during stress. *Pharmacol Biochem Behav* 2002;73(1):147-58.
3. Laugero KD. Reinterpretation of basal glucocorticoid feedback: implications to behavioral and metabolic disease. *Vitam Horm* 2004;69:1-29.
4. Wright AP, Zilliacus J, McEwan IJ, Dahlman-Wright K, Almlöf T, Carlstedt-Duke J, et al. Structure and function of the glucocorticoid receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993;47(1-6):11-9.
5. de Kloet ER, Sutanto W, van den Berg DT, Carey MP, van Haarst AD, Hornsby CD, et al. Brain mineralocorticoid receptor diversity: functional implications. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993;47(1-6):183-90.
6. McEwan IJ, Wright AP, Gustafsson JA. Mechanism of gene expression by the glucocorticoid receptor: role of protein-protein interactions. *Bioessays* 1997;19(2):153-60.
7. Hsu SC, Qi M, DeFranco DB. Cell cycle regulation of glucocorticoid receptor function. *Embo J* 1992;11(9):3457-68.
8. Ebrecht M, Buske-Kirschbaum A, Hellhammer D, Kern S, Rohleder N, Walker B, et al. Tissue specificity of glucocorticoid sensitivity in healthy adults. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85(10):3733-9.
9. Buemann B, Black E, Holst C, Toubro S, Echwald S, Pedersen O, et al. The N363S polymorphism of the glucocorticoid receptor and metabolic syndrome factors in men. *Obes Res* 2005;13(5):862-7.
10. Kino T, De Martino MU, Charmandari E, Mirani M, Chrousos GP. Tissue glucocorticoid resistance/hypersensitivity syndromes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003;85(2-5):457-67.
11. Torpy DJ, Bachmann AW, Grice JE, Fitzgerald SP, Phillips PJ, Whitworth JA, et al. Familial corticosteroid-binding globulin deficiency due to a novel null mutation: association with fatigue and relative hypotension. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(8):3692-700.
12. Funder JW. Glucocorticoid receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992;43(5):389-94.
13. Hurley DM, Accili D, Stratakis CA, Karl M, Vamvakopoulos N, Rorer E, et al. Point mutation causing a single amino acid substitution in the hormone binding domain of the glucocorticoid receptor in familial glucocorticoid resistance. *J Clin Invest* 1991;87(2):680-6.
14. Miller AH, Spencer RL, Stein M, McEwen BS. Adrenal steroid receptor binding in spleen and thymus after stress or dexamethasone. *Am J Physiol* 1990;259(3 Pt 1):E405-12.
15. Bamberger CM, Chrousos GP. The glucocorticoid receptor and RU 486 in man. *Ann N Y Acad Sci* 1995;761:296-310.
16. King KL, Cidlowski JA. Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu Rev Physiol* 1998;60:601-17.
17. Hutchison KA, Dalman FC, Hoeck W, Groner B, Pratt WB. Localization of the approximately 12 kDa M(r) discrepancy in gel migration of the mouse glucocorticoid receptor to the major phosphorylated cyanogen bromide fragment in the transactivating domain. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993;46(6):681-6.
18. Smoak KA, Cidlowski JA. Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mech Ageing Dev* 2004;125(10-11):697-706.
19. Yehuda R, Boisoneau D, Mason JW, Giller EL. Glucocorticoid receptor number and cortisol excretion in mood, anxiety, and psychotic disorders. *Biol Psychiatry* 1993;34(1-2):18-25.
20. Hindmarsh PC, Brook CG. Single dose dexamethasone suppression test in children: dose relationship to body size. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1985;23(1):67-70.
21. Longui CA, Giusti MM, Calliari LE, Katiki T, Kochi C, Monte O. Partial glucocorticoid resistance in obese children detected by very low dose dexamethasone suppression test. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2003;16(9):1277-82.
22. Whorwood CB, Donovan SJ, Flanagan D, Phillips DI, Byrne CD. Increased glucocorticoid receptor expression in human skeletal muscle cells may contribute to the pathogenesis of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2002;51(4):1066-75.
23. DeLano FA, Schmid-Schonbein GW. Enhancement of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor density in the microcirculation of the spontaneously hypertensive rat. *Microcirculation* 2004;11(1):69-78.
24. Pujols L, Xaubet A, Ramirez J, Mulo J, Roca-Ferrer J, Torrego A, et al. Expression of glucocorticoid receptors alpha and beta in steroid sensitive and steroid insensitive interstitial lung diseases. *Thorax* 2004;59(8):687-93.
25. Zhang Z, Burch PE, Cooney AJ, Lanz RB, Pereira FA, Wu J, et al. Genomic analysis of the nuclear receptor family: new insights into structure, regulation, and evolution from the rat genome. *Genome Res* 2004;14(4):580-90.
26. Webster JI, Tonelli L, Sternberg EM. Neuroendocrine regulation of immunity. *Annu Rev Immunol* 2002;20:125-63.
27. Yudt MR, Cidlowski JA. Molecular identification and characterization of α and β forms of the glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol* 2001;15(7):1093-103.
28. Mendel DB, Orti E. Isoform composition and stoichiometry of the approximately 90-kDa heat shock protein associated with glucocorticoid receptors. *J Biol Chem* 1988;263(14):6695-702.

29. Buttgeriet F, Wehling M, Burmester GR. A new hypothesis of modular glucocorticoid actions: steroid treatment of rheumatic diseases revisited. **Arthritis Rheum** 1998;41(5):761-7.
30. Bamberger CM, Schulte HM, Chrousos GP. Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. **Endocr Rev** 1996;17(3):245-61.
31. Barnes PJ. Anti-leukotrienes: a new treatment for asthma. **Practitioner** 1998;242(1586):395-9.
32. Payne JC, Rous BW, Tenderholt AL, Godwin HA. Spectroscopic determination of the binding affinity of zinc to the DNA-binding domains of nuclear hormone receptors. **Biochemistry** 2003;42(48):14214-24.
33. Necela BM, Cidlowski JA. A single amino acid change in the first zinc finger of the DNA binding domain of the glucocorticoid receptor regulates differential promoter selectivity. **J Biol Chem** 2004;279(38):39279-88.
34. Warnmark A, Treuter E, Wright AP, Gustafsson JA. Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation. **Mol Endocrinol** 2003;17(10):1901-9.
35. Chandrasekhar S, Souba WW, Abcouwer SF. Identification of glucocorticoid-responsive elements that control transcription of rat glutamine synthetase. **Am J Physiol** 1999;276(2 Pt 1):L319-31.
36. Adams M, Meijer OC, Wang J, Bhargava A, Pearce D. Homodimerization of the glucocorticoid receptor is not essential for response element binding: activation of the phenylethanolamine N-methyltransferase gene by dimerization-defective mutants. **Mol Endocrinol** 2003;17(12):2583-92.
37. Liu D, Zhang Z, Gladwell W, Teng CT. Estrogen stimulates estrogen-related receptor alpha gene expression through conserved hormone response elements. **Endocrinology** 2003;144(11):4894-904.
38. Shaffer PL, Gewirth DT. Structural analysis of RXR-VDR interactions on DR3 DNA. **J Steroid Biochem Mol Biol** 2004;89-90(1-5):215-9.
39. Baumann H, Paulsen K, Kovacs H, Berglund H, Wright AP, Gustafsson JA, et al. Refined solution structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain. **Biochemistry** 1993;32(49):13463-71.
40. Luise B. DNA transcription. Zinc standard for economy. **Nature** 1992;356(6368):379-80.
41. Ogawa H, Yu RT, Haraguchi T, Hiraoka Y, Nakatani Y, Morohashi K, et al. Nuclear structure-associated TIF2 recruits glucocorticoid receptor and its target DNA. **Biochem Biophys Res Commun** 2004;320(1):218-25.
42. McKay LI, Cidlowski JA. CBP (CREB binding protein) integrates NF-kappaB (nuclear factor-kappaB) and glucocorticoid receptor physical interactions and antagonism. **Mol Endocrinol** 2000;14(8):1222-34.
43. Liden J, Rafter I, Truss M, Gustafsson JA, Okret S. Glucocorticoid effects on NF-kappaB binding in the transcription of the ICAM-1 gene. **Biochem Biophys Res Commun** 2000;273(3):1008-14.
44. Losel RM, Falkenstein E, Feuring M, Schultz A, Tillmann HC, Rossol-Haseroth K, et al. Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers. **Physiol Rev** 2003;83(3):965-1016.
45. Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, et al. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. **Nature** 1985;318(6047):635-41.
46. Oakley RH, Sar M, Cidlowski JA. The human glucocorticoid receptor beta isoform. Expression, biochemical properties, and putative function. **J Biol Chem** 1996;271(16):9550-9.
47. Breslin MB, Geng CD, Vedeckis WV. Multiple promoters exist in the human GR gene, one of which is activated by glucocorticoids. **Mol Endocrinol** 2001;15(8):1381-95.
48. Turner JD, Muller CP. Structure of the glucocorticoid receptor (NR3C1) gene 5' untranslated region: identification, and tissue distribution of multiple new human exon 1. **J Mol Endocrinol** 2005;35(2):283-92.
49. Breslin MB, Vedeckis WV. The human glucocorticoid receptor promoter upstream sequences contain binding sites for the ubiquitous transcription factor, Yin Yang 1. **J Steroid Biochem Mol Biol** 1998;67(5-6):369-81.
50. Chen F, Watson CS, Gametchu B. Association of the glucocorticoid receptor alternatively-spliced transcript 1A with the presence of the high molecular weight membrane glucocorticoid receptor in mouse lymphoma cells. **J Cell Biochem** 1999;74(3):430-46.
51. Giguere V, Hollenberg SM, Rosenfeld MG, Evans RM. Functional domains of the human glucocorticoid receptor. **Cell** 1986;46(5):645-52.
52. Charmandari E, Kino T, Chrousos GP. Familial/sporadic glucocorticoid resistance: clinical phenotype and molecular mechanisms. **Ann N Y Acad Sci** 2004;1024:168-81.
53. Krett NL, Pillay S, Moalli PA, Greipp PR, Rosen ST. A variant glucocorticoid receptor messenger RNA is expressed in multiple myeloma patients. **Cancer Res** 1995;55(13):2727-9.
54. de Lange P, Segeren CM, Koper JW, Wiemer E, Sonneveld P, Brinkmann AO, et al. Expression in hematological malignancies of a glucocorticoid receptor splice variant that augments glucocorticoid receptor-mediated effects in transfected cells. **Cancer Res** 2001;61(10):3937-41.
55. Beger C, Gerdes K, Lauten M, Tissing WJ, Fernandez-Munoz I, Schrappe M, et al. Expression and structural analysis of glucocorticoid receptor isoform gamma in human leukaemia cells using an isoform-specific real-time polymerase chain reaction approach. **Br J Haematol** 2003;122(2):245-52.
56. Russcher H, Smit P, van den Akker EL, van Rossum EF, Brinkmann AO, de Jong FH, et al. Two polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene directly affect glucocorticoid-regulated gene expression. **J Clin Endocrinol Metab** 2005;90(10):5804-10.
57. Bourgeois S, Newby RF. Correlation between glucocorticoid receptor and cytolytic response of murine lymphoid cell lines. **Cancer Res** 1979;39(11):4749-51.
58. Dong Y, Aronsson M, Gustafsson JA, Okret S. The mechanism of cAMP-induced glucocorticoid receptor expression. Correlation to cellular glucocorticoid response. **J Biol Chem** 1989;264(23):13679-83.
59. Frey FJ, Odermatt A, Frey BM. Glucocorticoid-mediated mineralocorticoid receptor activation and hypertension. **Curr Opin Nephrol Hypertens** 2004;13(4):451-8.

60. Paterson JM, Morton NM, Fievet C, Kenyon CJ, Holmes MC, Staels B, et al. Metabolic syndrome without obesity: Hepatic overexpression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in transgenic mice. **Proc Natl Acad Sci USA** 2004;101(18):7088-93.
61. Cidlowski JA, Michaels GA. Iteration in glucocorticoid binding site number during the cell cycle in HeLa cells. **Nature** 1977;266(5603):643-5.
62. Chang WC, Roth GS. Changes in the mechanisms of steroid action during aging. **J Steroid Biochem** 1979;11(1C):889-92.
63. Bamberger CM, Schulte HM, Chrousos GP. Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. **Endocr Rev** 1996;17(3):245-61.
64. Dong Y, Poellinger L, Gustafsson JA, Okret S. Regulation of glucocorticoid receptor expression: evidence for transcriptional and posttranslational mechanisms. **Mol Endocrinol** 1988;2(12):1256-64.
65. Bellingham DL, Sar M, Cidlowski JA. Ligand-dependent down-regulation of stably transfected human glucocorticoid receptors is associated with the loss of functional glucocorticoid responsiveness. **Mol Endocrinol** 1992;6(12):2090-102.
66. Oakley RH, Cidlowski JA. Homologous down regulation of the glucocorticoid receptor: the molecular machinery. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr** 1993;3(2):63-88.
67. Ashraf J, Thompson EB. Identification of the activation-labile gene: a single point mutation in the human glucocorticoid receptor presents as two distinct receptor phenotypes. **Mol Endocrinol** 1993;7(5):631-42.
68. Lind U, Carlstedt-Duke J, Gustafsson JA, Wright AP. Identification of single amino acid substitutions of Cys-736 that affect the steroid-binding affinity and specificity of the glucocorticoid receptor using phenotypic screening in yeast. **Mol Endocrinol** 1996;10(11):1358-70.
69. Huizenga NA, de Lange P, Koper JW, de Herder WW, Abs R, Kasteren JH, et al. Five patients with biochemical and/or clinical generalized glucocorticoid resistance without alterations in the glucocorticoid receptor gene. **J Clin Endocrinol Metab** 2000;85(5):2076-81.
70. Koper JW, Stolk RP, de Lange P, Huizenga NA, Molijn GJ, Pols HA, et al. Lack of association between five polymorphisms in the human glucocorticoid receptor gene and glucocorticoid resistance. **Hum Genet** 1997;99(5):663-8.
71. Huizenga NA, Koper JW, de Lange P, Pols HA, Stolk RP, Burger H, et al. A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene may be associated with and increased sensitivity to glucocorticoids in vivo. **J Clin Endocrinol Metab** 1998;83(1):144-51.
72. Bodine PV, Litwack G. Purification and structural analysis of the modulator of the glucocorticoid-receptor complex. Evidence that modulator is a novel phosphoglyceride. **J Biol Chem** 1988;263(7):3501-12.
73. Rogatsky I, Waase CL, Garabedian MJ. Phosphorylation and inhibition of rat glucocorticoid receptor transcriptional activation by glycogen synthase kinase-3 (GSK-3). Species-specific differences between human and rat glucocorticoid receptor signaling as revealed through GSK-3 phosphorylation. **J Biol Chem** 1998;273(23):14315-21.
74. Bodwell JE, Orti E, Coull JM, Pappin DJ, Smith LI, Swift F. Identification of phosphorylated sites in the mouse glucocorticoid receptor. **J Biol Chem** 1991;266(12):7549-55.
75. Wang Z, Frederick J, Garabedian MJ. Deciphering the phosphorylation "code" of the glucocorticoid receptor in vivo. **J Biol Chem** 2002;277(29):26573-80.
76. Webster JC, Jewell CM, Bodwell JE, Munck A, Sar M, Cidlowski JA. Mouse glucocorticoid receptor phosphorylation status influences multiple functions of the receptor protein. **J Biol Chem** 1997;272(14):9287-93.
77. Bodwell JE, Webster JC, Jewell CM, Cidlowski JA, Hu JM, Munck A. Glucocorticoid receptor phosphorylation: overview, function and cell cycle-dependence. **J Steroid Biochem Mol Biol** 1998;65(1-6):91-9.
78. Wallace AD, Cidlowski JA. Proteasome-mediated glucocorticoid receptor degradation restricts transcriptional signaling by glucocorticoids. **J Biol Chem** 2001;276(46):42714-21.
79. Sengupta S, Wasylyk B. Ligand-dependent interaction of the glucocorticoid receptor with p53 enhances their degradation by Hdm2. **Genes Dev** 2001;15(18):2367-80.
80. Davarinos NA, Pollenz RS. Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytoplasmic proteasome following nuclear export. **J Biol Chem** 1999;274(40):28708-15.
81. Htun H, Barsony J, Renyi I, Gould DL, Hager GL. Visualization of glucocorticoid receptor translocation and intranuclear organization in living cells with a green fluorescent protein chimera. **Proc Natl Acad Sci USA** 1996;93(10):4845-50.
82. Htun H, Holth LT, Walker D, Davie JR, Hager GL. Direct visualization of the human estrogen receptor alpha reveals a role for ligand in the nuclear distribution of the receptor. **Mol Biol Cell** 1999;10(2):471-86.
83. Tyagi RK, Lavrovsky Y, Ahn SC, Song CS, Chatterjee B, Roy AK. Dynamics of intracellular movement and nucleocytoplasmic recycling of the ligand-activated androgen receptor in living cells. **Mol Endocrinol** 2000;14(8):1162-74.
84. Fejes-Toth G, Pearce D, Naray-Fejes-Toth A. Subcellular localization of mineralocorticoid receptors in living cells: effects of receptor agonists and antagonists. **Proc Natl Acad Sci USA** 1998;95(6):2973-8.
85. Racz A, Barsony J. Hormone-dependent translocation of vitamin D receptors is linked to transactivation. **J Biol Chem** 1999;274(27):19352-60.
86. Baumann CT, Maruvada P, Hager GL, Yen PM. Nuclear cytoplasmic shuttling by thyroid hormone receptors. Multiple-protein interactions are required for nuclear retention. **J Biol Chem** 2001;276(14):11237-45.
87. Mattern KA, Humbel BM, Muijsers AO, de Jong L, van Driel R. hnRNP proteins and B23 are the major proteins of the internal nuclear matrix of HeLa S3 cells. **J Cell Biochem** 1996;62(2):275-89.
88. Eggert M, Michel J, Schneider S, Bornfleth H, Baniahmad A, Fackelmayer FO, et al. The glucocorticoid receptor is associated with the RNA-binding nuclear matrix protein hnRNP U. **J Biol Chem** 1997;272(45):28471-8.
89. Schaaf MJ, Cidlowski JA. Molecular determinants of glucocorticoid receptor mobility in living cells: the importance of ligand affinity. **Mol Cell Biol** 2003;23(6):1922-34.

90. Kang Z, Janne OA, Palvimo JJ. Coregulator recruitment and histone modifications in transcriptional regulation by the androgen receptor. **Mol Endocrinol** 2004;18(11):2633-48.
91. Roumestan C, Gougat C, Jaffuel D, Mathieu M. Glucocorticoids and their receptor: mechanisms of action and clinical implications. **Rev Med Interne** 2004;25(9):636-47.
92. Allgood VE, Oakley RH, Cidlowski JA. Modulation by vitamin B6 of glucocorticoid receptor-mediated gene expression requires transcription factors in addition to the glucocorticoid receptor. **J Biol Chem** 1993;268(28):20870-6.
93. Homo-Delarche F. Glucocorticoid receptors and steroid sensitivity in normal and neoplastic human lymphoid tissues: a review. **Cancer Res** 1984;44(2):431-7.
94. Cidlowski JA, Cidlowski NB. Glucocorticoid effects on HeLa S3 cell growth and thymidine incorporation. **Cancer Res** 1981;41(7):2687-91.
95. Melo MR, Faria CD, Melo KC, Rebouças NA, Longui CA. Real-time PCR quantitation of glucocorticoid receptor alpha isoform. **BMC Mol Biol** 2004;5(1):19.
96. Charmandari E, Kino T, Souvatzoglou E, Vottero A, Bhat-tacharyya N, Chrousos GP. Natural glucocorticoid receptor mutants causing generalized glucocorticoid resistance: molecular genotype, genetic transmission, and clinical phenotype. **J Clin Endocrinol Metab** 2004;89(4):1939-49.
97. Mirani M, Elenkov I, Volpi S, Hiroi N, Chrousos GP, Kino T. HIV-1 protein Vpr suppresses IL-12 production from human monocytes by enhancing glucocorticoid action: potential implications of Vpr coactivator activity for the innate and cellular immunity deficits observed in HIV-1 infection. **J Immunol** 2002;169(11):6361-8.
98. Longui CA, Vottero A, Adamson PC, Cole DE, Kino T, Monte O, et al. Low glucocorticoid receptor alpha/beta ratio in T-cell lymphoblastic leukemia. **Horm Metab Res** 2000;32(10):401-6.
99. Lane SJ, Lee TH. Mechanisms of corticosteroid resistance in asthmatic patients. **Int Arch Allergy Immunol** 1997;113(1-3):193-5.
100. de Castro M, Elliot S, Kino T, Bamberger C, Karl M, Webster E, et al. The non-ligand binding beta-isoform of the human glucocorticoid receptor (hGR beta): tissue levels, mechanism of action, and potential physiologic role. **Mol Med** 1996;2(5):597-607.
101. Oakley RH, Jewell CM, Yudit MR, Bofetiado DM, Cidlowski JA. The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor beta isoform. Specificity and mechanisms of action. **J Biol Chem** 1999;274(39):27857-66.
102. Yudit MR, Jewell CM, Bienstock RJ, Cidlowski JA. Molecular origins for the dominant negative function of human glucocorticoid receptor beta. **Mol Cell Biol** 2003;23(12):4319-30.
103. Oakley RH, Webster JC, Sar M, Parker CR Jr, Cidlowski JA. Expression and subcellular distribution of the beta-isoform of the human glucocorticoid receptor. **Endocrinology** 1997;138(11):5028-38.
104. Chakraborti PK, Garabedian MJ, Yamamoto KR, Simons SS Jr. Role of cysteines 640, 656, and 661 in steroid binding to rat glucocorticoid receptors. **J Biol Chem** 1992;267(16):11366-73.
105. Watt GC, Harrap SB, Foy CJ, Holton DW, Edwards HV, Davidson HR, et al. Abnormalities of glucocorticoid metabolism and the renin-angiotensin system: a four-corners approach to the identification of genetic determinants of blood pressure. **J Hypertens** 1992;10(5):473-82.
106. Weaver JU, Hitman GA, Kopelman PG. An association between a Bc11 restriction fragment length polymorphism of the glucocorticoid receptor locus and hyperinsulinaemia in obese women. **J Mol Endocrinol** 1992;9(3):295-300.

Endereço para correspondência

Cláudia D. Constantin Faria
Rua Marquês de Itu 977, apto. 122
01223-001 São Paulo, SP.
Fax: (11) 3667-9574
Email: ceclau@terra.com.br