

## ¿EL OCASO DEL MODELO DISOCIADO DE ACCION GLUCOCORTICOIDEA?

Diego M. Presman

Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIBYNE). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.  
Pabellón IFIBYNE, Ciudad Universitaria (C1428EGA). Buenos Aires –Argentina  
(Email:presmandm@fbmc.fcen.uba.ar)

### Resumen

Los glucocorticoides son hormonas esteroides que participan en la regulación de numerosos procesos fisiológicos y son esenciales para la vida. Desde un punto de vista farmacológico, estas hormonas son utilizadas en la clínica para el tratamiento de una amplia variedad de desórdenes inflamatorios e inmunológicos. Desafortunadamente, su uso crónico conduce a graves efectos adversos (*i.e.* desórdenes metabólicos). Es por ello que durante las últimas décadas se han realizado enormes esfuerzos para diseñar y evaluar compuestos sintéticos con funciones disociadas, o sea capaces de inducir los efectos deseados (antinflamatorios) y no provocar efectos adversos (metabólicos). El principal mecanismo de acción de los glucocorticoides involucra la unión específica del esteroide a un factor de transcripción, el receptor de glucocorticoides (GR). El paradigma vigente establece una relación directa entre el estado de oligomerización del GR (si actúa como dímero o como monómero) y su actividad fisiológica (efectos antinflamatorios o metabólicos). Este *modelo disociado* ha dirigido la búsqueda de ligandos más seguros durante los últimos 25 años, sin mayores éxitos hasta el momento. En este trabajo, se reexaminará y discutirá la evidencia que dio origen al modelo disociado y se contrastará con resultados recientemente publicados que apuntan a la necesidad de una revisión de dicho paradigma y a la construcción de un modelo que incluya nuevos determinantes con el fin de explicar los complejos mecanismos de la acción glucocorticoide.

*Palabras claves:* Receptor de glucocorticoides, dímero, monómero, tetrámero, modelo disociado.

### Abstract

**The twilight of the dissociated model of glucocorticoid action.** Glucocorticoids are used for the treatment of a vast array of inflammatory and immune disorders. Despite their severe side effects in chronic therapies, they remain among the most prescribed drugs in the world. Glucocorticoids exert their actions by binding to the glucocorticoid receptor (GR), a transcription factor belonging to the nuclear receptor superfamily. The current paradigm, which I would refer as the *dissociated model*, states that the uncoupling between GR activated pathways responsible for the desired pharmacological effects and pathways involved in adverse GR reactions could be achieved through specific ligands that would modulate GR's oligomeric state. Despite big efforts, no side-effect free drug has been found under this model.

In this review, I will critically re-examine the founding evidence that established the dissociated model from a chronological perspective and summarized compelling recent data against it. Finally, I suggest it is time for a new, updated, and more comprehensive model of GR action if we are to improve glucocorticoid pharmacological outcome.

*Keywords:* Glucocorticoid receptor, dimer, monomer, tetramer, dissociated model.

## 1. Introducción

Los glucocorticoides pertenecen a la familia de hormonas esteroides, junto con los mineralocorticoides, progestágenos, andrógenos y estrógenos [1]. Esenciales para la vida, los glucocorticoides poseen funciones indispensables en varios sistemas, como el endocrino, el renal, el inmune y el neuronal; ejerciendo efectos virtualmente en todos los tejidos y órganos del ser humano. Estas hormonas ayudan a mantener la homeostasis durante situaciones de estrés como hemorragias, infecciones, desórdenes metabólicos e incluso ansiedad [2].

Desde un punto de vista farmacológico, los glucocorticoides son extremadamente efectivos como agentes antiinflamatorios e inmunosupresores, por lo que su uso clínico resulta indispensable en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y desórdenes inflamatorios como la artritis reumatoidea, o incluso como inhibidores del rechazo de trasplante de órganos [3]. Además, estas hormonas son utilizadas en terapias combinadas frente a ciertos tipos de cáncer [4]. Desafortunadamente, el tratamiento crónico con glucocorticoides conlleva a severos efectos adversos, entre los que se encuentran diabetes, osteoporosis, atrofia de la piel, redistribución de la grasa, glaucoma, hipertensión arterial, psicosis y neurodegeneración, entre otros [1, 5, 6].

Si los efectos antiinflamatorios pudiesen, de alguna manera, ser separados de los efectos adversos, los beneficios clínicos serían enormes. Durante los últimos 25 años, se viene asociando este desacoplamiento de repuestas con la separación entre la inducción y represión que ejercen los glucocorticoides sobre la expresión génica. Bajo esta línea de pensamiento, se han invertidos numerosas sumas de dinero para (intentar) desarrollar *glucocorticoides con actividad disociadas*, es decir, drogas sintéticas capaces de mantener efectos clínicos deseados sin provocar efectos adversos [7].

En este trabajo, se examina la evidencia que dio génesis a este modelo disociado de acción glucocorticoidea. Durante este viaje, recorreremos las bases moleculares de acción de estas hormonas y descubriremos algunas fallas en la construcción del modelo vigente. Finalmente, se discute la necesidad de cambio al dogma actual que explique con mayor profundidad la acción de los glucocorticoides.

## 2. El Receptor de Glucocorticoides

Tanto las acciones fisiológicas como farmacológicas de los glucocorticoides están mediadas por el receptor de glucocorticoides (GR, NR3C1), un factor de transcripción perteneciente a la súper familia de receptores nucleares [8]. El GR parece expresarse en casi todos los tipos celulares, por lo que no es de extrañar que su ligando natural regule una gran diversidad de sistemas fisiológicos. El receptor se encuentra codificado por un solo gen, aunque mecanismos de *splicing* y de traducción alternativos generan varias isoformas [9]. Este

trabajo se enfocará exclusivamente en la isoforma alfa, la más abundante. Particularmente se discutirá cómo su estado de oligomerización ha sido tomado como determinante fundamental en la construcción del modelo disociado y en la búsqueda de compuestos con un mejor perfil farmacológico.

## 2.1 Estructura del GR

Como todo miembro de la superfamilia de receptores nucleares, el GR es una proteína modular organizada en tres dominios estructurales y funcionalmente bien definidos: un dominio N-terminal (NTD, *N-terminal domain*), un dominio central de unión al ADN (DBD, *DNA-binding domain*), y la porción C-terminal, llamada dominio de unión al ligando (LBD, *ligand binding domain*) [10, 11]. Hasta la fecha no se han podido obtener cristales de la proteína completa, aunque por separado se ha logrado dilucidar la estructura por cristalografía de rayos X del dominio DBD [12] y del LBD [13] en forma independiente.

El NTD es el dominio con mayor variabilidad de secuencia entre los receptores de esteroides, con menos del 15% de identidad de secuencia [8]. Este dominio carece de estructuras secundarias y terciarias definidas, por lo que se lo denomina intrínsecamente desordenado [14]. Funcionalmente, este dominio aloja uno de los módulos de transactivación del receptor (AF-1, *Activation Function 1*), capaz de interactuar con diversos cofactores, favoreciendo la actividad transcripcional del mismo [15]. Nuestro relativo escaso conocimiento de este dominio posiblemente contribuya a nuestra incapacidad de manipular adecuadamente la actividad transcripcional del GR.

Desde el punto de vista de su estructura primaria, su región central contiene el dominio de unión al ADN, altamente conservado entre los miembros de la familia de esteroides. Dos grupos de cuatro cisteínas, cada una coordinando un ión  $Zn^{++}$ , estabilizan una conformación adecuada para la unión a secuencias específicas del ADN, denominada elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE). La secuencia consenso GRE consiste en una secuencia pseudo-palindrómica conformada por dos regiones de 6 nucleótidos conservados, separados por 3 nucleótidos no conservados: TGTTCTnnnAGAACA [16-18]. Dicha estructura palindrómica sugiere la unión de una molécula de GR por región, dando lugar a una interacción del GR con el ADN en forma de dímero [19]. De hecho, se describió una región de cinco aminoácidos (D-loop) localizada entre las primeras dos cisteínas del segundo dedo de zinc que forma parte de la interface de dimerización del GR [12].

Entre la región central y la C-terminal se encuentra una región bisagra o *hinge*, que también fue asociada funcionalmente a la dimerización del receptor [20]. Finalmente, el dominio C-terminal del GR no sólo contiene la cavidad en donde se une el ligando, sino que también presenta una segunda región de activación (AF-2), el sitio de unión a chaperonas y otras proteínas [21], y otra región responsable de la dimerización del receptor [13]. Además de estos dominios, el GR presenta dos señales de localización nuclear (NLS) presentes en la región comprendida entre el DBD y el LBD [22].

## 2.2 Mecanismos clásicos de acción del GR

### 2.2.1 Unión directa al ADN: transactivación

En ausencia de hormona, el GR se encuentra principalmente en el citoplasma formando parte de un complejo proteico asociado a chaperonas como la Hsp90 e inmunofilinas como las FKBP; las cuales mantienen al receptor en una conformación transcripcionalmente inactiva pero capaz de unir hormona [23]. Luego de la unión del ligando, un cambio conformacional en el receptor desencadena su casi completa translocación al núcleo celular, donde ejerce la mayoría de sus funciones biológicas [22]. Al menos dos mecanismos están involucrados en el movimiento retrógrado del GR, uno dependiente de microtúbulos y Hsp90; y otro independiente mediado por importinas [24]. Una vez dentro del núcleo, el GR se distribuye de manera no-homogénea formando *foci* discretos, aunque su naturaleza exacta y función son desconocidas [25, 26].

El GR activo, como todo factor de transcripción, busca unirse a secuencias específicas de ADN, que en el caso del GR se denominan GREs como se mencionó previamente. Más aún, también se han descrito los llamados sitios 1/2GRE, que consisten justamente en la mitad de la secuencia de reconocimiento [27]. Alternativamente, el GR también puede unirse a otro elemento de respuesta de secuencia CTCC(N)<sub>0-2</sub>GGAGA, conocida como GRE negativos (nGREs) [28-30], aunque la relevancia *in vivo* de este tipo de secuencias ha sido cuestionada [31-34].

Aunque existen millones de secuencias a lo largo del genoma que son consistentes con elementos de respuesta a glucocorticoides, experimentos de inmunoprecipitación de cromatina seguidos de secuenciación profunda (ChIP-seq) mostraron que sólo una pequeña fracción de GREs, en el orden de miles, es ocupada por el GR dentro de un mismo tipo celular, siendo el estado de la cromatina el mayor determinante de la capacidad del GR de interactuar con el ADN *in vivo* [35]. Por lo tanto, la acción tejido-específica que los glucocorticoides ejercen podría estar supeditada, al menos en parte, al grado de accesibilidad de la cromatina en cada tipo celular [36, 37].

El GR, como la mayoría de los factores de transcripción, interactúa dinámicamente y en forma directa con la cromatina [17, 38]. Este proceso se ha denominado históricamente como *transactivación* del receptor. En este modo de acción, su actividad transcripcional depende del reclutamiento de coactivadores o correpresores. Es decir, un factor de transcripción otorga especificidad de acción a los cofactores, que son los últimamente responsables de modular la actividad transcripcional mediante la activación (o inhibición) de la RNA polimerasa II [39]. Todavía no ha sido establecido en qué momento los complejos GR-coactivador o GR-correpressor son formados, ya sea en el nucleoplasma, en los *foci* intranucleares, o después que el receptor se une al ADN.

### 2.2.2 Unión indirecta al ADN: el paradigma de la transrepresión

Además de su acción directa como factor de transcripción, el GR es capaz de interactuar con otras proteínas, afectando su función, mecanismo históricamente denominado *transrepresión*. Se ha descrito que el GR regula la actividad de NFκB y AP-1, factores claves de la respuesta inflamatoria [40]. Otros ejemplos incluyen PU.1, Smad3,4, T-bet, Oct 1/2, STAT6, STAT5, IRF3, COUP-TFII, NGFI-B/NuR77, CREB, entre otros [41, 42]. Esta

regulación puede ser tanto positiva (por ejemplo, con STAT5) como negativa (NFκB y AP-1), y a su vez puede depender tanto del tipo como del contexto celular [42]. De esta manera, dos factores de transcripción pueden formar un complejo e interactuar con el ADN a través de los elementos de respuesta de cualquiera de ellos, ampliando así el número de genes cuya expresión es modulada tanto en forma positiva como negativa [43].

### **3. El modelo disociado y la búsqueda de glucocorticoides con un mejor perfil farmacológico**

El modelo disociado se basa en los mecanismos clásicos descritos en la sección anterior, es decir, establece la existencia de dos grandes vías por las cuales el GR puede actuar: la vía directa (*transactivación*) y la vía indirecta (*transrepresión*) [7]. Desde un punto de vista clínico/farmacológico, generalmente se acepta que los genes regulados por la vía de transactivación están asociados principalmente al control de procesos metabólicos de los glucocorticoides (clínicamente considerados efectos adversos indeseables), mientras que los genes regulados por transrepresión se asocian a efectos antiinflamatorios e inmunosupresores (efectos benéficos) [6, 44]. Mas aún, bajo el modelo disociado se acepta que la *transactivación* comprende la inducción de la expresión génica como producto de la unión del homodímero de GR a sitios GRE mientras que, en la *transrepresión*, el complejo ligando-receptor, como monómero, inhibe la expresión de genes activados principalmente por NFκB o AP-1 [5, 6, 44, 45].

Este paradigma se estableció en la comunidad científica principalmente a partir de la caracterización del mutante A458T del GR, también conocido como GRdim. Básicamente, el modelo disociado se basa en dos premisas principales [7]:

1) El GRdim es incapaz de dimerizar y unirse al ADN en forma directa, eliminando su capacidad de transactivar pero no de transreprimir [46]. Por lo tanto, transactivación y transrepresión son dos mecanismos independientes o disociables.

2) El GRdim mantiene actividad antiinflamatoria pero no media efectos metabólicos [47, 48]. De esta manera, se estableció la idea de que, si una mutación puntual es capaz de producir un cambio en la estructura del receptor que lo hace disociar las acciones de transrepresión de las de transactivación, muy probablemente existan ligandos que también puedan lograrlo [7]. Bajo este supuesto, surge entonces el concepto de glucocorticoide disociado: un glucocorticoide capaz de activar la transrepresión, pero no la transactivación del GR. Este ligando mantendría así los efectos antiinflamatorios benéficos, pero disminuiría o idealmente eliminaría los efectos adversos, siendo, desde el punto de vista farmacológico, el glucocorticoide ideal [3, 49, 50]. Como el GRdim se caracterizó como supuestamente monomérico [46], los ligandos que promuevan un GR salvaje monomérico deberían tener un mejor perfil farmacológico, es decir, retendrían los efectos deseados en detrimento de los adversos [51].

La primera generación de ligandos disociados fue un completo fracaso. Por ejemplo, el compuesto RU24858, a pesar de su capacidad de promover transrepresión del GR [52], también generaba efectos adversos como pérdida de peso y reducción de masa ósea [53-55]. Otro ejemplo paradigmático es el Compuesto A. Este ligando no esteroide no promueve la dimerización del GR ni la transactivación del mismo [56, 57]. Sin embargo, a pesar de que inhibe la señalización mediada por NFκB, no tiene efectos sobre la actividad transcripcional de AP-1 [58]. Por otro lado, otros ligandos como el esteroide rígido 21-hidroxi-6,19-

epoxiprogesterona [59, 60], el cual no inhibe dimerización del GR, presenta un perfil de ligando disociado [61]. Estos ejemplos no hacen más que ilustrar que una caracterización binaria de la acción del GR es, por lo menos, demasiado simplista [32, 60].

En conclusión, y considerando que durante los últimos 25 años no se ha podido generar un ligando que pueda utilizarse crónicamente sin producir efectos adversos, es necesario abordar el problema desde otra perspectiva. De hecho, estudios posteriores sobre el GRdim han demostrado que los efectos antiinflamatorios de los glucocorticoides también se encuentran mediados por mecanismos de transactivación, e inversamente, la transrepresión es responsable de algunos efectos adversos [62, 63]. En la próxima sección analizaremos en detalle las evidencias que dieron origen al modelo disociado, y se discutirá la autenticidad de las dos propiedades del GRdim que dieron lugar al paradigma vigente: su supuesta incapacidad de dimerizar y su inhabilidad de unirse al ADN.

#### **4. El origen del modelo disociado**

La primera noción de que la actividad inductora del GR y su capacidad de reprimir genes podría disociarse surgió en un trabajo de principios de los '90 [64]. En aquella publicación, se demostró que deleciones de varios aminoácidos dentro del DBD del GR inhibían la capacidad del receptor de inducir la expresión de un gen reportero en forma directa, pero que dichas mutantes todavía conservaban la capacidad de inhibir parcialmente la actividad de AP-1. Ese trabajo concluye que el GR podría no requerir de la unión directa a ADN para su acción represora. Además, dado que la concentración de ligando requerida para (trans)reprimir era menor que la requerida para (trans)activar, se sugirió que el monómero de GR estaba involucrado en la represión, mientras que el homodímero participaba de la inducción de la expresión génica.

Inspirados por esos resultados, el grupo de Andrew Cato caracteriza al GRdim por primera vez en 1994 [46], hallando la primera mutación puntual capaz de disociar transactivación de transrepresión. Hacia finales de esa década, la caracterización fenotípica de un ratón *knock-in* para GRdim [47] dio origen formal al modelo de ligandos disociados y su búsqueda para disminuir los efectos perjudiciales de los glucocorticoides [7]. Debido a que la incapacidad de dimerizar y de unirse al ADN son las dos características del GRdim que dieron origen al modelo disociado, evaluaremos a continuación las evidencias a favor y en contra de ambas propiedades.

##### **4.1 ¿El GRdim es realmente un monómero?**

Pese a que el trabajo original del GRdim concluye explícitamente que esta mutante no es capaz de dimerizar [46], llamativamente no hay ningún experimento que evalúe el estado de oligomerización del receptor. Ninguno. ¿Cómo es esto posible? ¿Cómo llegan los autores a semejante conclusión sin evidencias directas? Recordemos que la búsqueda de ligandos disociados todavía se basa en generar un GR monomérico, y esto surge justamente de la supuesta incapacidad de dimerizar del GRdim [7].

Los autores [46] explican que la elección de la mutación del GRdim (A458T) se basó en una mutación ortóloga (A596T) en el receptor de andrógenos (AR) que, también según los autores, afecta su dimerización [65]. Más allá de que el efecto de una mutación

puede diferir entre miembros de la misma familia de receptores, llamativamente en el trabajo sobre la mutante de AR tampoco se demuestra en forma directa la incapacidad de dimerizar de esa mutante. Por el contrario, en dicha publicación [65] se argumenta que la razón para concluir que la mutación A596T afecta la dimerización del AR es que la misma está localizada en la región D-loop, ¡la cual ha sido sugerida como un fragmento relevante para la dimerización del...GR! [66]. Por lo tanto, la mutante GR A458T es incapaz de dimerizar porque la mutante AR A596T es incapaz de dimerizar. Pero a su vez la mutante AR A596T no es capaz de dimerizar por el solo hecho que esa misma región está involucrada en la dimerización del GR. Parece que nos encontramos en presencia de un razonamiento circular.

En el trabajo original del GRdim [46] se encuentra un segundo argumento a favor de la falta de dimerización de dicha mutante. Los autores en esta oportunidad se basan en trabajos previos [66, 67] donde se demuestra que mutaciones en la región D-loop afectan la dimerización del GR. Deducen por lo tanto que como la mutante GR A458T se encuentra en esa región, entonces debe tener afectada su dimerización. Sin embargo, un análisis más detallado de los trabajos citados muestra algunas inconsistencias. En el artículo de Umesono & Evans [67] se investigan regiones involucradas en el reconocimiento específico del receptor por el ADN, pero no evalúan la dimerización del propio receptor, aunque especulan que la región del D-loop “podría estar involucrada” en interacciones proteína-proteína del DBD. En el trabajo de Dahlman-Wright et al. [66] se caracteriza *in vitro* el segmento de cinco aminoácidos conocido como D-loop a partir del fragmento DBD de la proteína. Aquí los autores evalúan dimerización por un método dependiente de ADN llamado EMSA (Electromobility shift assay). Cabe recordar que el GRdim supuestamente no puede unir ADN, por lo que resulta paradójico que se utilice como evidencia una metodología que requiere que la proteína de interés sea capaz de interactuar con el ADN. De todas maneras, se concluye que algunas mutaciones en esta región afectan la dimerización. En rigor no prueban la mutación del GRdim aunque esto fue confirmado más recientemente [68]. Enfatizo, estos experimentos no evaluaron a la proteína completa, sino a un fragmento de la misma, el DBD. En conclusión, durante la génesis del modelo disociado no hubo evidencia sólida experimental que demuestre que el GRdim es monomérico.

Años más tarde, en 2012, el grupo de Cidlowski demostró por estudios de co-inmunoprecipitación que el GRdim es capaz de interactuar consigo mismo [69], sugiriendo fuertemente que dicha mutante no es monomérica. Más aún, nuestro grupo también contribuyó al debate utilizando la técnica de microscopía de fluorescencia llamada Número y Brillo [70], logrando caracterizar tanto el estado de oligomerización del GR salvaje como del GRdim, y demostrando que ambos receptores son mayormente diméricos una vez activos dentro del núcleo de células vivas [32, 71]. Otro grupo de investigación, utilizando otras técnicas cuantitativas de fluorescencia, estimó una mayor contribución monomérica del GRdim, pero aceptando que es capaz de dimerizar, la menos parcialmente [72]. En ese trabajo se utilizó la línea celular U2OS que se creía desprovista de GR endógeno, aunque luego se demostró que el mismo se expresaba en dicho modelo celular [73]. Esto podría generar una subestimación de la abundancia relativa de dímeros de GRdim calculada por esos abordajes experimentales. Por otro lado, estudios genómicos revelaron que el GRdim es capaz de unirse exclusivamente a sitios 1/2GRE, y esto es tomado como evidencia de la unión del GRdim al ADN como monómero [27]. Sin embargo, trabajos propios en vías de publicación [74], apoyan la idea que la gran mayoría de estos sitios no son hemi-sitios sino GREs completos altamente degenerados.

En conclusión, durante la génesis del modelo disociado no hubo evidencia concreta que sugiera que el GRdim fuese monomérico. Los experimentos que realmente evaluaron su estado de oligomerización demuestran que el GRdim puede dimerizar.

#### 4.2 ¿El GRdim interactúa directamente con el ADN?

La incapacidad del GRdim de unirse directamente al ADN es el pilar en el cual se basa la separación de los mecanismos de transactivación y transrepresión. La idea de que el GR inhibe la actividad de los factores AP-1 y NFκB por unión directa a dichas proteínas está fundada justamente en que el GRdim no es capaz de unirse al ADN. ¿Ahora bien, es cierto que el GRdim no puede unirse al ADN?

En el trabajo fundacional del GRdim [46], se describió a esta proteína como incapaz de unir ADN basados en resultados de ensayos de EMSA realizados con oligonucleótidos que contenían secuencias GREs. Este resultado fue confirmado con otro segmento de ADN conteniendo dos GREs en tándem [47]. Sin embargo, también se demostró que la mutante de rata es capaz de unirse *in vitro* a una región promotora con dos GREs [75] y de transactivar un determinado grupo de genes [76].

Con el advenimiento de la técnica de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), el debate quedó prácticamente saldado al demostrarse que el GRdim es capaz de unirse a ciertos *enhancers* de genes regulados por glucocorticoides [69], y en términos globales comparte su unión con aproximadamente dos tercios de los sitios a los cuales se une el GR salvaje [27, 74, 77].

Por lo tanto, dado que el GRdim es claramente capaz de unirse al ADN, la noción de que transrepresión involucra exclusivamente una acción indirecta con el ADN ya no es válida. Este hecho tiene enormes consecuencias para la lógica detrás del modelo disociado. Más aún, varios trabajos demuestran que los mecanismos inhibitorios del GR contra AP-1 y NFκB van más allá de la hipótesis de la transrepresión, aunque algunos siguen siendo consistentes [78, 79]. En el caso de NFκB, se reportó que el GR inhibe la unión de este factor de transcripción al ADN en forma global [80-82]. Por otro lado, la inhibición de AP-1 por GR sería mucho más compleja que un simple antagonismo mediado por interacciones proteína-proteína [83]. Finalmente, se ha descrito la capacidad del GR de unirse en forma directa tanto a elementos de respuesta de NFκB [84] como de AP-1 [85].

#### 4.4 El GRmon y el comienzo del fin para el modelo disociado

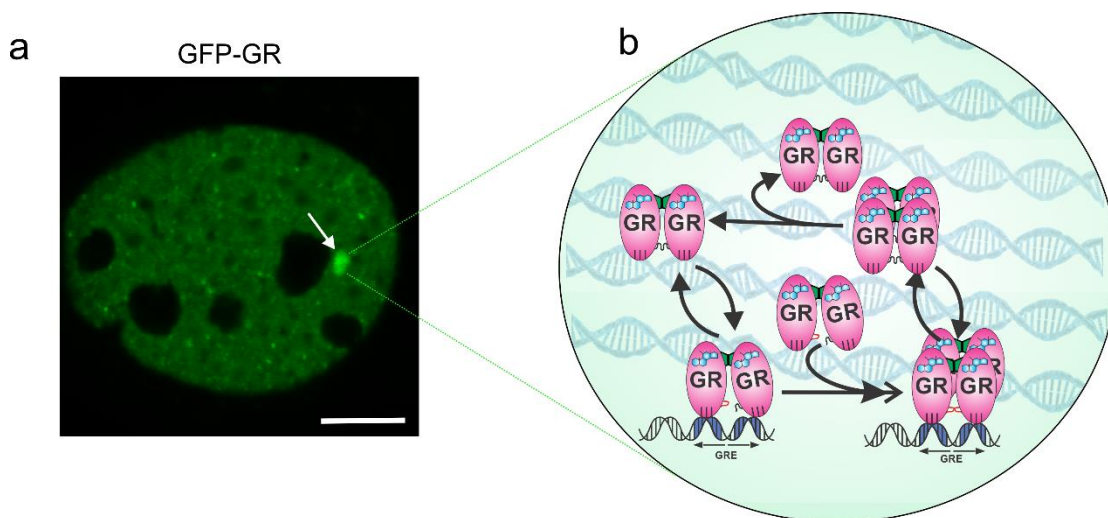
La noción de que una sola mutación puntual en el dominio de unión al ADN del GR fuese suficiente para inhibir completamente la dimerización del receptor contrastaba con evidencia que sugería que otros dominios del receptor también estaban involucrados en la formación de homodímeros de GR, especialmente el LBD [86]. En este sentido, generamos la doble mutante A465T/I634A, originalmente caracterizada por otros [87], en donde se afectan las dos regiones conocidas de dimerización, una localizada en el DBD (la mutante dim) y otra, en el LBD. Cuando ambas mutaciones están presentes, el GR, medido por la técnica de Número y Brillo, es mayormente monomérico [32]. Esta doble mutante se denominó GRmon.



GRmon es una “verdadera” mutante monomérica, que permitirá evaluar el papel que juega el estado de oligomerización del GR en su actividad transcripcional. Los primeros resultados, utilizando análisis de expresión de genes reporteros, arrojaron una falta de correlación entre el estado dimérico/monomérico del receptor y su capacidad de transactivar o transreprimir [32]. Es más, la caracterización genómica del GRmon en líneas celulares demuestra que esta mutante es prácticamente incapaz de unirse a la cromatina en forma global, y que es prácticamente un receptor no funcional [74]. Si bien el fenotipo del ratón *knock-in* para esta mutante todavía se desconoce, nuestros resultados preliminares sugieren que tendrá un fenotipo similar a la eliminación total del GR.

### 5. Ni dímeros ni monómeros. ¿el GR es un tetrámero?

Si bien se cree que la formación de homodímeros GR-GR es un evento clave en el mecanismo de acción del receptor, la demostración de que el GR es efectivamente un dímero proviene principalmente de experimentos realizados *in vitro*, en su mayoría con fragmentos de la proteína [88]. La incorporación de técnicas avanzadas de microscopía de fluorescencia al campo de la biología molecular está permitiendo responder preguntas hasta hace poco tiempo sin respuesta. La técnica de Número y Brillo, por ejemplo, permite determinar en células vivas el estado de oligomerización de proteínas fluorescentes con alta resolución espacial [70]. Sin embargo, en ausencia de marcadores especiales, no es posible medir aún el estado de oligomerización de un factor de transcripción en el momento en que se encuentra unido al ADN.



**Fig. 1.** La forma activa del GR es un tetrámero. a) La línea celular 3617 tiene integrada una repetición en tándem (~200 copias) de un *módulo* génico que contienen elementos GRE [17]. La fotografía muestra una célula que expresa GFP-GR activado con corticosterona. La flecha blanca muestra la zona de mayor acumulación de moléculas de GR, donde se encuentra la repetición. b) En base a los resultados de Número y Brillo [89] se modela lo que ocurre dentro de esa región, en donde el GR se une a la cromatina como dímero y luego de un cambio conformacional se produce la tetramerización del receptor [88]. Todos estos eventos se proponen como altamente dinámicos.

La noción de que el GR (y luego los factores de transcripción en general) interaccionan con el ADN en forma dinámica surgió a partir de un estudio donde se utilizó una línea celular muy especial [17]. La misma contiene un *array*, es decir, una repetición en tándem de varias copias de un *módulo* génico que contiene elementos GRE. De esta manera, es posible visualizar (por microscopía de fluorescencia) la unión específica del GFP-GR por la aparición de una mayor concentración de moléculas del receptor (**Figura 1a**). Mediante la aplicación de la técnica de Número y Brillo sobre esta línea celular, hemos podido determinar por primera vez el estado de oligomerización del GR cuando se encuentra unido al ADN (**Figura 1b**). Para nuestra sorpresa, encontramos que el GR no es un dímero ni un monómero, sino que es muy probablemente un tetrámero cuando se encuentra unido a cromatina [89]. Es más, una mutante que mimetiza el cambio conformacional que ocurre en el GR al unirse al ADN [90] resulta suficiente para promover la formación de tetrámeros en forma constitutiva [89]. Llamativamente, esta mutante actúa como un súper-receptor, activando y reprimiendo más genes que el GR salvaje [91].

## 6. Conclusiones

Además del papel fundamental que jugó la mutación GRdim en la génesis del modelo disociado, esta mutante fue utilizada en decenas de trabajos como una herramienta molecular para determinar si una determinada acción del GR es mediada por su forma dimerica, monomérica, dependiente o independiente de su unión al ADN [48, 92-105]. Si bien se ha reconocido que ya no puede trazarse una relación lineal entre la transactivación, la transrepresión y los efectos benéficos y adversos [6, 7, 62, 106-108], aún se sigue sosteniendo la relación dicotómica dímero/monómero como determinante de la acción molecular del GR [51, 109]. Resulta claro que se ha subestimado la complejidad de acción del GR al reducirlo a un modelo que, aunque resulte muy atractivo para el desarrollo farmacológico, no deja ser demasiado simplista. Es entonces imprescindible reevaluar los resultados obtenidos con el GRdim en función de las nuevas evidencias que cuestionan su caracterización original. La incorporación de un paradigma que integre la complejidad de acción del GR seguramente nos llevará a incrementar las probabilidades de desarrollar nuevos ligandos con mejor potencial farmacológico.

## Agradecimientos

Agradezco en primer lugar a la ANCEF N por otorgarme el premio Estímulo-2019. Agradezco infinitamente a todos los coautores de mis trabajos sin los cuales nada de esto hubiese sido posible. Un especial agradecimiento a la Prof. Adali Pecci, por introducirme al mundo de los glucocorticoides y leer críticamente este manuscrito. Finalmente, a la Universidad de Buenos Aires, al CONICET, a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, y al NIH.

## Referencias

1. C. Strehl & F. Buttgerit. *Mol. Cell Endocrinol.* **380**, 32 (2013).
2. J. C. Buckingham. *Br.J. Pharmacol.* **147 Suppl 1**, S258 (2006).
3. J. Rosen & J. N. Miner. *Endocr.Rev.* **26**, 452 (2005).

4. L. Zhao, S. Zhou & J. A. Gustafsson. *Endocr. Rev.* **40**, 1207 (2019).
5. H. Schacke, W. D. Docke & K. Asadullah. *Pharmacol. Ther.* **96**, 23 (2002).
6. A. R. Clark. *Mol. Cell Endocrinol.* **275**, 79 (2007).
7. A. R. Clark & M. G. Belvisi. *Pharmacol. Ther.* **134**, 54 (2012).
8. E. Borrelli, R. Heyman, M. His & R. M. Evans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 7572 (1988).
9. J. R. Revollo & J. A. Cidlowski. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1179**, 167 (2009).
10. R. Kumar & E. B. Thompson. *Steroids* **64**, 310 (1999).
11. S. Ramamoorthy & J. A. Cidlowski. *Endocr. Dev.* **24**, 41 (2013).
12. B. F. Luisi, W. X. Xu, Z. Otwinowski, L. P. Freedman, K. R. Yamamoto & P. B. Sigler. *Nature* **352**, 497 (1991).
13. R. K. Bledsoe, 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 & H. E. Xu. *Cell* **110**, 93 (2002).
14. S. S. Simons, Jr., D. P. Edwards & R. Kumar. *Mol. Endocrinol.* **28**, 173 (2014).
15. R. H. Oakley & J. A. Cidlowski. *J. Allergy Clin. Immunol.* **132**, 1033 (2013).
16. M. Beato. *Cell* **56**, 335 (1989).
17. J. G. McNally, W. G. Mueller, D. Walker, R. G. Wolford & G. L. Hager. *Science* **287**, 1262 (2000).
18. M. Beato, P. Herrlich & G. Schutz. *Cell* **83**, 851 (1995).
19. U. Strahle, G. Klock & G. Schutz. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 7871 (1987).
20. J. G. Savory, G. G. Prefontaine, C. Lamprecht, M. Liao, R. F. Walther, Y. A. Lefebvre & R. J. Hache. *Mol. Cell Biol.* **21**, 781 (2001).
21. R. Kumar & E. B. Thompson. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **94**, 383 (2005).
22. D. Picard & K. R. Yamamoto. *EMBO J.* **6**, 3333 (1987).
23. W. B. Pratt, M. D. Galigniana, Y. Morishima & P. J. Murphy. *Essays Biochem.* **40**, 41 (2004).
24. P. C. Echeverria & D. Picard. *Biochim. Biophys. Acta* **1803**, 641 (2010).
25. A. Griekspoor, W. Zwart, J. Neefjes & R. Michalides. *Nucl. Recept. Signal.* **5**, e003 (2007).
26. M. Stortz, D. M. Presman, L. Bruno, P. Annibale, M. V. Dansey, G. Burton, E. Gratton, A. Pecci & V. Levi. *Sci. Rep.* **7**, 6219 (2017).
27. H. W. Lim, N. H. Uhlenhaut, A. Rauch, J. Weiner, S. Hubner, N. Hubner, K. J. Won, M. A. Lazar, J. Tuckermann & D. J. Steger. *Genome Res* **25**, 836 (2015).
28. M. Surjit, K. P. Ganti, A. Mukherji, T. Ye, G. Hua, D. Metzger, M. Li & P. Chambon. *Cell* **145**, 224 (2011).
29. W. H. Hudson, C. Youn & E. A. Ortlund. *Nat. Struct. Mol. Biol* **20**, 53 (2013).
30. G. Hua, L. Paulen & P. Chambon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **113**, E626 (2016).
31. N. H. Uhlenhaut, G. D. Barish, R. T. Yu, M. Downes, M. Karunasiri, C. Liddle, P. Schwalie, N. Hubner & R. M. Evans. *Mol. Cell* **49**, 158 (2012).
32. D. M. Presman, M. F. Ogara, M. Stortz, L. D. Alvarez, J. R. Pooley, R. L. Schiltz, L. Grontved, T. A. Johnson, P. R. Mittelstadt, J. D. Ashwell, G. Burton, S. Ganesan, G. Burton, V. Levi, G. L. Hager & A. Pecci. *PLoS Biol* **12**, e1001813 (2014).
33. S. R. Starick, J. Ibn-Salem, M. Jurk, C. Hernandez, M. I. Love, H. R. Chung, M. Vingron, M. Thomas-Chollier & S. H. Meijnsing. *Genome Res.* **25**, 825 (2015).
34. V. Kadiyala, S. K. Sasse, M. O. Altonsy, R. Berman, H. W. Chu, T. L. Phang, & A. N. Gerber. *J. Biol. Chem.* **291**, 1267 (2016).
35. S. John, P. J. Sabo, R. E. Thurman, M. H. Sung, S. C. Biddie, T. A. Johnson, G. L. Hager

- & J. A. Stamatoyannopoulos. *Nat. Genet.* **43**, 264 (2011).
36. S. C. Biddie & S. John. *Mol. Endocrinol.* **28**, 3 (2014).
  37. T. A. Johnson, R. V. Chereji, D. A. Stavreva, S. A. Morris, G. L. Hager & D. J. Clark. *Nucleic Acids Res.* **46**, 203 (2018).
  38. V. Paakinaho, D. M. Presman, D. A. Ball, T. A. Johnson, R. L. Schiltz, P. Levitt, D. Mazza, T. Morisaki, T. S. Karpova & G. L. Hager. *Nat. Commun.* **8**, 15896 (2017).
  39. M. M. Aagaard, R. Siersbaek & S. Mandrup. *Biochim.Biophys.Acta* **1812**, 824 (2011).
  40. J. M. Busillo & J. A. Cidlowski. *Trends Endocrinol.Metab* **24**, 109 (2013).
  41. K. De Bosscher & G. Haegeman. *Mol. Endocrinol.* **23**, 281 (2009).
  42. O. Kassel & P. Herrlich. *Mol. Cell. Endocrinol.* **275**, 13 (2007).
  43. C. K. Glass & K. Saijo. *Nature reviews. Immunology* **10**, 365 (2010).
  44. R. S. Hardy, K. Raza & M. S. Cooper. *Nat Rev Rheumatol* **16**, 133 (2020).
  45. C. W. Lin, M. Nakane, M. Stashko, D. Falls, J. Kuk, L. Miller, R. Huang, C. Tyree, J. N. Miner, J. Rosen, P. R. Kym, M. J. Coghlan, G. Carter & B. C. Lane. *Mol. Pharmacol.* **62**, 297 (2002).
  46. S. Heck, M. Kullmann, A. Gast, H. Ponta, H. J. Rahmsdorf, P. Herrlich & A. C. Cato. *EMBO J.* **13**, 4087 (1994).
  47. H. M. Reichardt, K. H. Kaestner, J. Tuckermann, O. Kretz, O. Wessely, R. Bock, P. Gass, W. Schmid, P. Herrlich, P. Angel & G. Schutz. *Cell* **93**, 531 (1998).
  48. H. M. Reichardt, J. P. Tuckermann, M. Gottlicher, M. Vujic, F. Weih, P. Angel, P. Herrlich & G. Schutz. *EMBO J.* **20**, 7168 (2001).
  49. M. G. Belvisi, T. J. Brown, S. Wicks & M. L. Foster. *Pulm.Pharmacol.Ther.* **14**, 221 (2001).
  50. H. Schacke, H. Rehwinkel & K. Asadullah. *Curr. Opin. Investig. Drugs* **6**, 503 (2005).
  51. K. De Bosscher, I. M. Beck, D. Ratman, W. V. Berghe & C. Libert. *Trends Pharmacol. Sci.* **37**, 4 (2016).
  52. B. M. Vayssiere, S. Dupont, A. Choquart, F. Petit, T. Garcia, C. Marchandeu, H. Gronemeyer & M. Resche-Rigon. *Mol. Endocrinol.* **11**, 1245 (1997).
  53. M. G. Belvisi, S. L. Wicks, C. H. Battram, S. E. Bottoms, J. E. Redford, P. Woodman, T. J. Brown, S. E. Webber & M. L. Foster. *J. Immunol.* **166**, 1975 (2001).
  54. W. Eberhardt, T. Kilz, E. Akool, R. Muller & J. Pfeilschifter. *Biochem.Pharmacol.* **70**, 433 (2005).
  55. M. Janka-Junttila, E. Moilanen, H. Hasala, X. Zhang, I. Adcock & H. Kankaanranta. *J. Inflamm.(Lond)* **3**, 10 (2006).
  56. K. De Bosscher, W. Vanden Berghe, I. M. Beck, W. van Molle, N. Hennuyer, J. Hapgood, C. Libert, B. Staels, A. Louw & G. Haegeman. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **102**, 15827 (2005).
  57. S. Robertson, F. Lie-Reid, B. W. Vanden, K. Visser, A. Binder, D. Africander, M. Vismer, B. K. De, J. Hapgood, G. Haegeman & A. Louw. *J. Biol. Chem.* **285**, 8061 (2010).
  58. K. De Bosscher, I. M. Beck, L. Dejager, N. Bougarne, A. Gaigneaux, S. Chateauvieux, D. Ratman, M. Bracke, J. Tavernier, B. W. Vanden, C. Libert, M. Diederich & G. Haegeman. *Cell Mol. Life Sci.* **71**, 143 (2014).
  59. G. P. Vicent, M. C. Monteserin, A. S. Veleiro, G. Burton, C. P. Lantos & M. D. Galigniana. *Mol. Pharmacol.* **52**, 749 (1997).
  60. A. Pecci, L. D. Alvarez, D. M. Presman & G. Burton. *Mini Rev. Med. Chem.* **18**, 428 (2018).
  61. A. J. Orqueda, M. V. Dansey, A. Espanol, A. S. Veleiro, E. B. Joffe, M. E. Sales, G. Burton & A. Pecci. *Biochem.Pharmacol.* **89**, 526 (2014).

62. S. Vandevyver, L. Dejager, J. Tuckermann & C. Libert. *Endocrinology* **154**, 993 (2013).
63. M. Nixon, R. Andrew & K. E. Chapman. *Steroids* **78**, 59 (2013).
64. C. Jonat, H. J. Rahmsdorf, K. K. Park, A. C. Cato, S. Gebel, H. Ponta & P. Herrlich. *Cell* **62**, 1189 (1990).
65. F. Kaspar, H. Klocker, A. Denninger & A. C. Cato. *Mol. Cell Biol.* **13**, 7850 (1993).
66. K. Dahlman-Wright, A. Wright, J. A. Gustafsson & J. Carlstedt-Duke. *J. Biol. Chem.* **266**, 3107 (1991).
67. K. Umesono & R. M. Evans. *Cell* **57**, 1139 (1989).
68. L. C. Watson, K. M. Kuchenbecker, B. J. Schiller, J. D. Gross, M. A. Pufall & K. R. Yamamoto. *Nat Struct.Mol. Biol.* **20**, 876 (2013).
69. C. M. Jewell, A. B. Scoltock, B. L. Hamel, M. R. Yudt & J. A. Cidlowski. *Mol. Endocrinol* **26**, 244 (2012).
70. M. A. Digman, R. Dalal, A. F. Horwitz & E. Gratton. *Biophys.J.* **94**, 2320 (2008).
71. D. M. Presman, L. D. Alvarez, V. Levi, S. Eduardo, M. A. Digman, M. A. Marti, A. S. Veleiro, G. Burton & A. Pecci. *PLoS One.* **5**, e13279 (2010).
72. S. Oasa, S. Mikuni, J. Yamamoto, T. Kurosaki, D. Yamashita & M. Kinjo. *Sci Rep* **8**, 7488 (2018).
73. K. E. Hadley, A. Louw & J. P. Hapgood. *Steroids* **76**, 1176 (2011).
74. T. A. Johnson, V. Paakinaho, S. Kim, G. L. Hager & D. M. Presman. Under review, (2020).
75. M. Adams, O. C. Meijer, J. Wang, A. Bhargava & D. Pearce. *Mol.Endocrinol.* **17**, 2583 (2003).
76. S. H. Meijnsing, M. A. Pufall, A. Y. So, D. L. Bates, L. Chen & K. R. Yamamoto. *Science* **324**, 40 (2009).
77. B. J. Schiller, R. Chodankar, L. C. Watson, M. R. Stallcup & K. R. Yamamoto. *Genome Biol.* **15**, 418 (2014).
78. N. A. Rao, M. T. McCalman, P. Moulos, K. J. Francoijs, A. Chatziioannou, F. N. Kolisis, M. N. Alexis, D. J. Mitsiou & H. G. Stunnenberg. *Genome Res.* **21**, 1404 (2011).
79. M. A. Sacta, B. Tharmalingam, M. Coppo, D. A. Rollins, D. K. Deochand, B. Benjamin, L. Yu, B. Zhang, X. Hu, R. Li, Y. Chinenov & I. Rogatsky. *Elife* **7**, (2018).
80. K. S. Oh, H. Patel, R. A. Gottschalk, W. S. Lee, S. Baek, I. D. C. Fraser, G. L. Hager & M. H. Sung. *Immunity* **47**, 298 e295 (2017).
81. A. Ray, K. E. Prefontaine. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **91**, 752-756 (1994).
82. R. I. Scheinman, A. Gualberto, C. M. Jewell, J. A. Cidlowski & A. S. Baldwin. *Mol.Cell Biol.* **15**, 943 (1995).
83. S. C. Biddie, S. John, P. J. Sabo, R. E. Thurman, T. A. Johnson, R. L. Schiltz, T. B. Miranda, M. H. Sung, S. Trump, S. L. Lightman, C. Vinson, J. A. Stamatoyannopoulos & G. L. Hager. *Mol.Cell* **43**, 145 (2011).
84. W. H. Hudson, I. M. S. Vera, J. C. Nwachukwu, E. R. Weikum, A. G. Herbst, Q. Yang, D. L. Bain, K. W. Nettles, D. J. Kojetin & E. A. Ortlund. *Nat Commun* **9**, 1337 (2018).
85. E. R. Weikum, I. M. S. de Vera, J. C. Nwachukwu, W. H. Hudson, K. W. Nettles, D. J. Kojetin & E. A. Ortlund. *Nucleic Acids Res* **45**, 8596 (2017).
86. R. K. Bledsoe, E. L. Stewart & K. H. Pearce. *Vitam.Horm.* **68**, 49 (2004).
87. K. M. Ong, J. A. Blackford, Jr., B. L. Kagan, S. S. Simons, Jr. & C. C. Chow. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **107**, 7107 (2010).
88. D. M. Presman & G. L. Hager. *Transcription* **8**, 32 (2017).
89. D. M. Presman, S. Ganguly, R. L. Schiltz, T. A. Johnson, T. S. Karpova & G. L. Hager. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **113**, 8236 (2016).

90. T. Stockner, H. Sterk, R. Kaptein & A. M. Bonvin. *J. Mol. Biol.* **328**, 325 (2003).
91. V. Paakinaho, T. A. Johnson, D. M. Presman & G. L. Hager. *Genome Res.* **29**, 1223 (2019).
92. D. S. Waddell, L. M. Baehr, B. J. van den, S. A. Johnsen, H. M. Reichardt, J. D. Furlow & S. C. Bodine. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **295**, E785 (2008).
93. N. Harke, J. Leers, S. Kietz, D. Drenckhahn & C. Forster. *Mol. Cell Endocrinol.* **295**, 39 (2008).
94. H. H. Conaway, A. Pirhayati, E. Persson, U. Pettersson, O. Svensson, C. Lindholm, P. Henning, J. Tuckermann & U. H. Lerner. *J. Biol. Chem.* **286**, 31425-31436 (2011).
95. Y. Tao, C. Williams-Skipp, R. I. Scheinman. *J. Biol. Chem.* **276**, 2329 (2001).
96. S. Baumann, A. Dostert, N. Novac, A. Bauer, W. Schmid, S. C. Fas, A. Krueger, T. Heinzl, S. Kirchoff, G. Schutz & P. H. Kramer. *Blood* **106**, 617 (2005).
97. A. Rauch, S. Seitz, U. Baschant, A. F. Schilling, A. Illing, B. Stride, M. Kirilov, V. Mandic, A. Takacz, R. Schmidt-Ullrich, S. Ostermay, T. Schinke, R. Spanbroek, M. M. Zaiss, P. E. Angel, U. H. Lerner, J. P. David, H. M. Reichardt, M. Amling, G. Schutz & J. P. Tuckermann. *Cell. Metab.* **11**, 517 (2010).
98. R. Frijters, W. Fleuren, E. J. Toonen, J. P. Tuckermann, H. M. Reichardt, M. H. van der, E. A. van, M. J. van Lierop, W. Dokter & V. J. de, W. Alkema. *BMC. Genomics* **11**, 359 (2010).
99. U. Baschant, L. Frappart, U. Rauchhaus, L. Bruns, H. M. Reichardt, T. Kamradt, R. Brauer & J. P. Tuckermann. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **108**, 19317 (2011).
100. S. D. Reichardt, M. Foller, R. Rexhepaj, G. Pathare, K. Minnich, J. P. Tuckermann, F. Lang & H. M. Reichardt. *Endocrinology* **153**, 1783 (2012).
101. A. Kleiman, S. Hubner, J. M. Rodriguez Parkitna, A. Neumann, S. Hofer, M. A. Weigand, M. Bauer, W. Schmid, G. Schutz, C. Libert, H. M. Reichardt & J. P. Tuckermann. *FASEB J.* **26**, 722 (2012).
102. M. S. Oitzl, H. M. Reichardt, M. Joels & E. R. de Kloet. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **98**, 12790 (2001).
103. M. Asada, A. Rauch, H. Shimizu, H. Maruyama, S. Miyaki, M. Shibamori, H. Kawasome, H. Ishiyama, J. Tuckermann & H. Asahara. *Lab. Invest.* **91**, 203 (2011).
104. A. Agresti, P. Scaffidi, A. Riva, V. R. Caiolfa & M. E. Bianchi. *Mol. Cell* **18**, 109 (2005).
105. S. Vandevyver, L. Dejager, B. T. Van, A. Kleyman, Y. Liu, J. Tuckermann, & C. Libert. *J. Clin. Invest* **122**, 2130 (2012).
106. S. Hubner, L. Dejager, C. Libert & J. P. Tuckermann. *Biol. Chem.* **396**, 1223 (2015).
107. N. Sundahl, J. Bridelance, C. Libert, K. De Bosscher & I. M. Beck. *Pharmacol. & Therapeut.* **152**, 28 (2015).
108. A. Dibas & T. Yorio. *Eur. J. Pharmacol.* **787**, 57 (2016).
109. A. Louw. *Front. Immunol.* **10**, 1693 (2019).

*Manuscrito recibido el 30 de marzo de 2020.*

*Aceptado el 20 de abril de 2020.*