Hormonas. Mecanismos de acción hormonal

HORMONAS ESTEROIDES

Isabel Luthy

Las hormonas esteroides (HS) juegan un rol crítico en el desarrollo, la diferenciación sexual, la reproducción, el crecimiento y el metabolismo. La acción clásica de las HS consiste en efectos "crónicos" o de larga duración, que pueden manifestarse en horas o días, e incluyen cambios en la expresión génica. Las HS ejercen su acción biológica mediante la unión de alta afinidad a receptores específicos, localizados intracelularmente en órganos blanco y que inician la estimulación o la represión de la transcripción de genes específicos de la célula (Shupnik, 1997). Los receptores de esteroides (RS) son factores de transcripción activados por ligando y actúan en general por unión a secuencias específicas del ADN llamadas elementos de respuesta hormonal (HRE) (Beato & Sánchez-Pacheco, 1996). Los RS forman una superfamilia de receptores nucleares, que representa la mayor familia de factores de transcripción conocida en eucariotes (ya se han identificado 48 de ellos en el genoma humano, pero la mayoría son "receptores huérfanos", de los que aún se espera conocer el ligando y a veces también la función). Comprenden a los receptores de estrógenos: RE, progesterona: RP, glucocorticoides: RG, mineralocorticoides: RM y andrógenos: RA. Los RS son proteínas de PM de 80 a 100 kDa, con entre 595 y 984 aa en humanos. Cada unidad monomérica une una única molécula de esteroide, pero los receptores se dimerizan. Son acídicos, asimétricos y están presentes en baja abundancia en las células blanco (0,001% de las proteínas solubles para el RM y 0,1% para el RP). Deben tener alta afinidad para sus respectivas hormonas, dado que las concentraciones séricas típicas oscilan entre 0,1 y 10 nM. Exceptuando a la fosforilación, no se conocen modificaciones covalentes post-transcripcionales.

El análisis de secuencia de aminoácidos (aa) y disección mutacional han demostrado que estos receptores son modulares, es decir, pueden ser divididos en diferentes dominios (Shupnik, 1997).

A/B	C	D	E	F

La zona amino (N) terminal A/B varía significativamente tanto en la secuencia como en su longitud entre los diferentes receptores y las diferentes especies, y es por lo tanto una zona inmunogénica. Usualmente contiene un dominio de trasactivación (AF-1) que activa genes blanco de forma constitutiva. Esta región puede también ser importante para determinar la especificidad de genes blanco en los receptores con diferentes isoformas, que reconocen el mismo HRE. La región central C contiene 8 residuos cisteína conservados que forman complejos con dos iones zinc en arreglos tetrahédricos formando estructuras llamadas "dedos de Zinc", que son responsables del reconocimiento del ADN. Esta zona C se denomina dominio de unión al ADN (DBD), y es la zona más conservada en la superfamilia de receptores. Estos dedos de zinc se unen a los HRE, secuencias de ADN que están ubicadas normalmente en la región 5' de los genes blanco de las hormonas (aunque también han sido identificados en intrones y aún 3' de la secuencia codificante) y se los clasifica como secuencias "enhancer" (Shupnik, 1997). La deleción o mutación de estas secuencias eliminan la respuesta hormonal, y la inserción en un gen que carece de él le confiere respuesta hormonal. El HRE de RG, RM, RA y RP consiste de dos repeticiones cortas (hexa-

méricas), invertidas, normalmente imperfectas, separadas por 3 nucleótidos y la secuencia es común a todas estas hormonas. El elemento de respuesta de RE es similar pero diferente, y consiste también de un palíndrome invertido (Tsai & O'Malley, 1994). Una corta secuencia de 5 aa situados en la base del primer "dedo" de Zn (proximal) llamada "caja P" es suficiente para conferir especificidad hacia la familia hexamérica correspondiente a RG o RE. Otra secuencia de 5 aa acídicos en el segundo "dedo" de Zn (distal), llamada "caja D" permite diferenciación funcional dentro de un tipo determinado de respuesta (Shupnik, 1997). Las interacciones específicas entre las bases del promotor y los aa de la "caja P" del DBD del RS se estabilizan por una serie de interacciones no específicas entre aa en las parte N y carboxi- (C) terminales del DBD y los residuos fosfato del ADN (Verrijdt y col, 2003). Luego de la región C, hay una región bisagra (zona D), que puede permitir que la proteína cambie su conformación o se pliegue, y a menudo contiene el dominio de localización nuclear (RG, RP), y/o un dominio de transactivación (receptor de hormona tiroidea, RG). El dominio de unión al ligando (HBD o región E) está localizado en posición C terminal de la región D. Esta zona es relativamente grande (alrededor de 250 aa) y es funcionalmente compleja. Contiene regiones importantes para la asociación con proteínas del shock térmico (hsp), dimerización, localización nuclear, transactivación, represión intramolecular (RP) y fundamentalmente unión del ligando. En la HBD se ha descripto la región de transactivación dependiente de unión al ligando llamada AF-2. El mayor dominio de dimerización de receptores ha sido localizado en la mitad C-terminal del HBD. Finalmente, localizada en el extremo C-terminal se halla la región F, de función específica no determinada aún. Se han obtenido clones genómicos para la mayoría de estos receptores. Estos genes usualmente contienen ~ 60kb y están interrumpidos por numerosos intrones. Múltiples sitios de iniciación son la regla (Tsai & O'Malley, 1994).

Los RS se recuperan de las células en forma de grandes heterocomplejos (9S) que contienen tanto hsp como inmunofilinas (ver más adelante). Algunas proteínas de este heterocomplejo cumplen funciones conocidas de chaperonas, (hsp70 y hsp90) y una de las funciones críticas de este complejo es la de facilitar el plegado del HBD de algunos receptores (RG y RM) en una estructura de alta afinidad por la hormona. Hsp90 interactúa directamente con el HBD de los receptores nucleares en una asociación que parece dar cuenta de la represión de la regulación de la transcripción por el receptor. Esta represión se anula cuando la hormona se une al receptor y se libera la hsp90 del complejo (Pratt & Toft, 1997). Los RS están constantemente pasando dentro y fuera del núcleo en células que carecen de hormona, y bajo estas condiciones de estado estacionario la mayoría de las moléculas de RG y RM se encuentran en el citosol, mientras que la mayoría de RP, RE y RA en el núcleo (Pratt & Toft, 1997). El complejo de chaperonas existe en el citosol como heterocomplejo multiproteico independientemente de su asociación con los receptores, funcionando como maquinarias de plegado proteico. Este heterocomplejo proteico está formado por múltiples proteínas. La hsp90 es una familia de proteínas ubicuas en eucariotes (hsp90 representa aproximadamente el 1-2% de las proteínas citosólicas). En ausencia de estrés, hsp90 se expresa constitutivamente en células, está muy fosforilada y está localizada predominantemente en el citoplasma y mínimamente en el núcleo. En condiciones de estrés hsp90 migra hacia el núcleo. Una molécula de RS se une a dos moléculas de hsp90. Se supone que la dimerización del receptor ocurre luego de la liberación del heterocomplejo proteico (Pratt & Toft, 1997). La hsp70 es una familia conservada en eucariotes. Varios de los miembros de esta familia están presentes

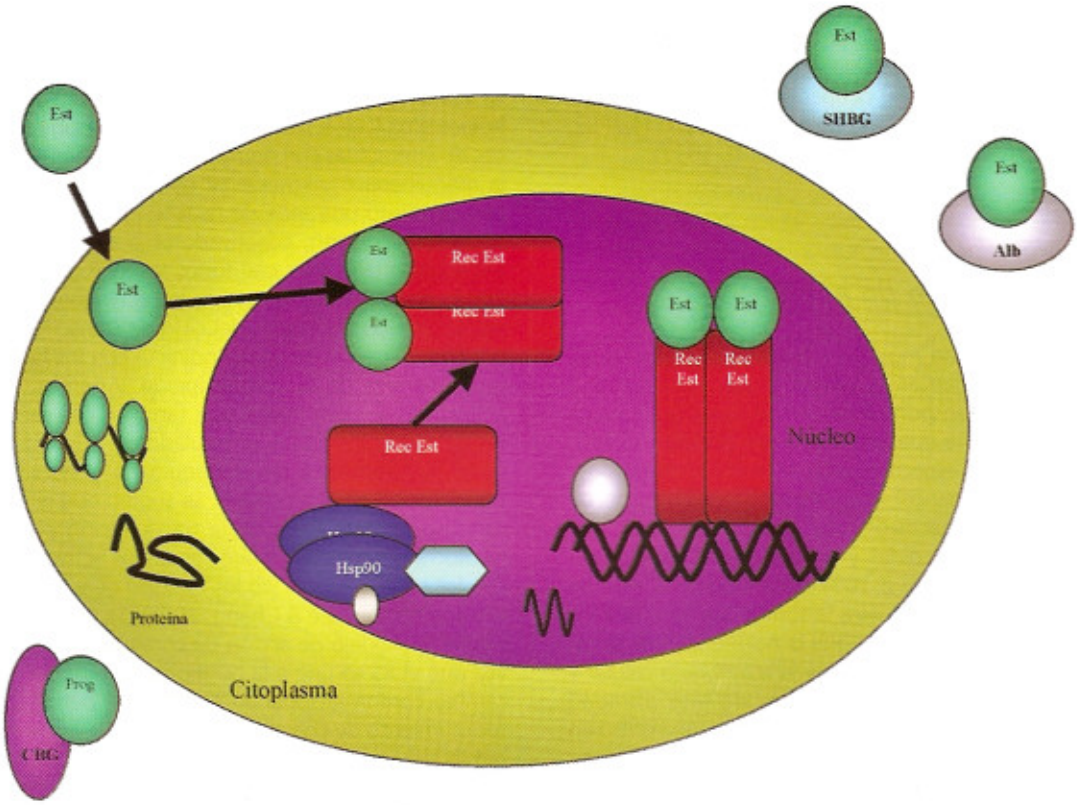

FIGURA : Se muestra en esta figura que las hormonas esteroides (Est) sexuales, estrógenos y andrógenos se hallan unidos a la globulina que une hormonas sexuales (SHBG), mientras que la progesterona (Prog) y los corticoides se unen a la globulina que une corticoides o transcortina (CBG). Todos las hormonas esteroides se unen con baja afinidad a la albúmina (Alb). Una fracción de HS se encuentra libre y es la biológicamente activa, que entra a la célula, llega hasta el núcleo en el caso de los esteroides sexuales o hasta el receptor citoplasmático en el caso de los de gluco y mineralocorticoides. Una vez que se produce la unión del esteroide al receptor si este último es nuclear se produce la separación del receptor del complejo proteico y la dimerización en un elemento de respuesta hormonal. Si el receptor es citoplasmático además se produce la translocación al núcleo. El receptor como dímero interacciona con coactivadores (c) además de la maquinaria básica de transcripción, que no se muestra por claridad. Se produce entonces un aumento en la transcripción de genes regulados por la hormona, y por lo tanto en la síntesis proteica. La respuesta clásica a hormonas esteroides es un incremento de la síntesis de proteínas específicas por la acción genómica de las hormonas.

en citoplasma y en organelas donde actúan como chaperonas en el plegado y translocación. Existen dos formas citoplasmáticas, una constitutiva de 73-kDa (dominante) y otra inducible por estrés de 72-kDa (minoritaria). Los miembros de esta familia unen proteínas con gasto de ATP para desenrollar regiones de proteínas, y la hidrólisis del ATP facilita la liberación de la proteína. La hsp70 interacciona directamente con HBD de los RS. La estequiometría no es clara y en este momento no está claro su rol en el complejo proteico. La p23 se une directamente a hsp90 en un proceso que requiere energía. Hay también inmunofilinas en el heterocomplejo proteico. Estas son proteínas ubicuas y conservadas que unen drogas inmuno-supresoras como FK506 y ciclosporina A. Se ha postulado que una inmunofilina, la FKBP52 puede cumplir un rol en el direccionamiento del receptor hacia el núcleo celular, aunque aún no se ha establecido fehacientemente su función. Se ha postulado un modelo para la formación del heterocomplejo proteico: en el primer paso existe una unión estrecha entre hsp90, la inmunofilina p60 y hsp70 por un lado y el RS por el otro, seguido de disociación de toda la p60 y canti

dades variables de hsp70 y unión de p23 que estabiliza el complejo. Se supone que la liberación de p60 deja libre el sitio aceptor de inmunofilinas en el hsp90 para su ocupación por otras proteínas que poseen secuencias de este tipo como FKBP52, FKBP51, CyP-40 o PP5 (Pratt & Toft, 1997).

Mecanismo de acción:

Las HS son moléculas hidrofóbicas que usualmente circulan en la sangre unidas débilmente a proteínas transportadoras séricas como la albúmina o la globulina que une esteroides sexuales, (SHBG, de reducida especificidad para la unión de estrógenos y andrógenos), o en algunos casos transportadores más específicos como transcortina (CGB, que une glucocorticoides y progesterona). Fisiológicamente solamente 5-10% de la hormona está en forma libre, siendo ésta la forma que se une a los receptores. Se supone que la hormona libre es capaz de difundir a través de la membrana celular y unirse a los sitios receptores de alta afinidad (Shupnik, 1997). Una vez que la hormona entró en la célula, se produce la unión de la misma con su receptor. Los RG y RM se encuentran en el citoplasma, mientras que los de estroides sexuales son nucleares. Al producirse la unión del RS con la hormona correspondiente, se libera el complejo proteico, los RS se dimerizan manteniendo la unión con la hormona, aunque existen evidencias de dimerización en ausencia de HS, (Tamrazi y col, 2002), se translocan al núcleo en el caso de los receptores citoplasmáticos, y en todos los casos se unen a las secuencias HRE de los promotores de genes regulados por la hormona, aumentando la transcripción de mensajeros específicos, que luego serán traducidos a proteínas. La mayoría de los genes regulados por hormonas posee un "TATA box", que indica el sitio de inicio de la transcripción. Para iniciar la transcripción, es necesario reclutar en el promotor los factores generales de transcripción y la ARN polimerasa II ya sea en forma secuencial o en la forma de una holoenzima (Lee & Chang, 2003). Los RS son capaces de interactuar con numerosos componentes de la maquinaria transcripcional general. Además se han descripto una serie de factores intermediarios de la transcripción, coactivadores o adaptadores transcripcionales para casi todos los RS (Gao y col, 2002). Se ha demostrado que los activatores estimulan una o más etapas del ciclo de transcripción por comunicación directa o indirecta con los factores generales de la transcripción. Además, los activatores pueden interactuar también con factores auxiliares, llamados coreguladores, aumentando el reclutamiento de la maquinaria general de transcripción en el promotor. Se sugirió que el mecanismo de activación de la transcripción podría involucrar interacciones directas de los activadores con los coreguladores y/o los factores generales de la transcripción (Lee & Chang, 2003). Se propone el siguiente modelo de acción de coreguladores: una vez que el RS se une a la hormona, se produce un cambio conformacional en el HBD que permite el reclutamiento de coactivadores, que a su vez facilitan la interacción más efectiva del receptor con la maquinaria transcripcional basal y se activa la transcripción. En cambio, cuando se une un antagonista, el cambio conformacional es diferente y el resultado es que si bien en algunos casos existe dimerización y unión al HRE en el ADN, no puede desalojarse a los posibles corepresores presentes resultando en una interacción no productiva con la maquinaria transcripcional basal. En el caso de agonistas/antagonistas parciales, la activación de la transcripción puede ser resultado de la relación relativa coactivadores/corepresores en una célula determinada (Shibata y col, 1997). La especificidad de expresión de receptores en células o de tejidos específicos, el metabolismo hormonal, el reclutamiento diferencial

de cofactores, los factores de transcripción dependientes de secuencia y finalmente, el reconocimiento diferencial del ADN probablemente actúan conjuntamente generando respuestas dependientes de hormona in vivo, aún en los caos en el que el HRE es común para diferentes receptores (Verrijdt y col, 2003). Basándose en estudios moleculares y bioquímicos intensivos acerca de los mecanismos de transcripción, se sugirió que por lo menos el RA es capaz de incrementar además la eficiencia de la elongación transcripcional en los genes blanco de andrógenos, además del tiempo de permanencia de la ARN polimerasa II en el promotor del gen blanco (Lee & Chang, 2003). Por otro lado las HS, juegan un rol importante en la estabilización de los mensajeros regulados por estas hormonas (Pascall, 1997).

Por otro lado, el ADN eucariote está organizado en forma de cromatina dentro de la célula. La forma básica de la cromatina es el nucleosoma, La estructura del nucleosoma puede ocultar determinados elementos de reconocimiento en el ADN, impidiendo la unión de los factores de trascripción correspondientes. Se cree que la unión de la hormona puede provocar un corrimiento o desorganización del nucleosoma en la región HRE, desenmascarando entonces los sitios de reconocimiento y facilitando así la unión de los factores de trascripción a esas secuencias (Beato & Sánchez-Pacheco, 1996). Para que la transcripción pueda iniciarse es necesario que la estructura de la cromatina alrededor de la región HRE en el promotor del gen blanco se reorganice. La acetilación de los residuos lisina en el extremo N terminal de las histonas desestabiliza los contactos entre el ADN y las histonas en los nucleosomas y permite el acceso de las proteínas que unen ADN (Lee & Chang, 2003). En contraste con la acetilación de histonas, la desacetilación de las mismas por la histona deacetiltransferasa lleva a la condensación de las estructuras nucelosomales provocando represión de la transcripción (Lee & Chang, 2003).

Isoformas de receptores:

La mayoría de los RS se expresan en diferentes isoformas y variantes de esas isoformas. Por ejemplo, estudios "in vitro" han demostrado que tanto en tejido de mama normal como tumoral se expresan varias variantes de "splicing" de ambas isoformas (α y β) del RE además de la forma salvaje (Poola y col, 2002). El RP posee también dos isoformas, A y B. Estas dos isoformas se transcriben de diferentes promotores inducibles por estrógenos, pero ambos promotores están en un único gen de RP; poseyendo la isoforma B los primeros 164 aa que están ausentes en la isoforma A (Giangrande & McDonnell, 1999).

Fosforilación de receptores:

Los RS que están unidos a hsp, están fosforilados basalmente, y exhiben un incremento de la fosforilación cuando se produce su unión del ligando. Las quinasas dependientes de cAMP y MAP pueden fosforilarlos. Se ha descripto que la fosforilación influencia la unión al ADN, la activación transcripcional, y la estabilidad de los receptores, aunque la regulación de la actividad de RS por fosforilación es compleja. Como en la mayoría de los factores de transcripción, ninguno de los sitios de fosforilación se comporta como una llave prendido/apagado (Weigel, 1996).

Receptores de membrana:

Además de las acciones descriptas a nivel genómico, se han encontrado una serie de efectos muy rápidos (de milisegundos a minutos) de las hormonas en los órganos blanco que no son compatibles con los mecanismos genómicos clásicos. Los meca

nismos implicados en la acción de esteroides incluyen influencias no específicas sobre la bicapa lipídica, unión específica a sitios de unión de membrana, interacción con otros receptores de membrana, modulación directa de complejos entre canales iónicos y neurotransmisores (como ciertos receptores de GABA) y activación directa de sistemas de segundos mensajeros (Moss y col, 1997). La mayoría de los trabajos realizados sobre efectos rápidos de estrógenos en el sistema nervioso central indicarían la existencia de otro RE, o de otra isoforma del REα asociados a la membrana (Kelly & Levin, 2001). Se han descripto acciones no genómicas mediadas por hormona para cada tipo de esteroide, incluyendo progestágenos, andrógenos y estrógenos. Ejemplos de estas respuestas biológicas incluyen la proliferación de líneas celulares de mama inducida por estrógenos, la dilatación de los vasos sanguíneos mediada por estrógenos y la activación de la reacción acrosomal inducida en esper-matozoides por progesterona (Hammes, 2003). Uno de los dos RE de membrana podría ser la expresión del mismo transcripto que para un RE nuclear, mientras que los RM y RP parecen ser productos de genes diferentes que los de los receptores nucleares. Existen también interfaces de mecanismos no genómicos y genómicos para esteroides. Por ejemplo, para los mecanismos no genómicos, los estrógenos pueden promover fosforilación en serina del RE nuclear, pudiendo de esta manera alterar la actividad transcripcional de estos receptores nucleares (Davis y col, 2002). Muy recientemente, se han clonado 14 genes de diferentes especies que codifican para receptores de progesterona que están localizados en la membrana plasmática y que tienen tanto los 7 dominios transmembrana como un dominio extracelular N terminal y un dominio intracelular C terminal típicos de los receptores acoplados a proteína G (Zhu y col, 2003). Se ha demostrado además un único sitio de unión de alta afinidad y saturable para progesterona en algunas de estas proteínas. Estudios adicionales en uno de estos receptores mostró que la unión es específica para progestágenos y fácilmente desplazable. Más aún, la cinética de asociación y disociación es rápida (ocurre en unos pocos minutos), lo cual es típico de RS de membrana. Es muy interesante que varios progestágenos y antiprogestágenos sintéticos, que tienen una alta afinidad de unión al RP nuclear, no muestran afinidad por el RP de membrana estudiado (Zhu y col, 2003).

Bibliografía

1. Beato, M., Sánchez-Pacheco, A. (1996). Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex. Endocrine Rev. **17:** 587-609.
2. Davis, P.J., Tillmann, H.C., Davis, F.B., Wehling, M. Comparison of the mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone and steroid hormones. J Endocrinol Invest (2002) **25:** 377-388.
3. Gao, X., Loggie, B.W., Nawaz, Z. (2002). The roles of sex steroid receptor coregulators in cancer. Molecular Cancer **1:** 7.
4. Giangrande, P.H., McDonnell, D.P. The A and B isoforms of the human progesterone receptor: two functionally different transcription factors encoded by a single gene. Recent Prog Horm Res (1999) **54:** 291-313.
5. Hammes, S.R. The further redefining of steroid-mediated signaling. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2003) **100:** 2168-2170.
6. Kelly, M.J., Levin, E.R. (2001). Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. Trends Endoc. Metab. **12:** 152-156.
7. Lee, D.K., Chang, C. Molecular communication between androgen receptor and general transcription machinery. J. Ster. Biochem Mol. Biol. (2003) **84:** 41-49.
8. Moss, R.L., Gu, Q., Wong, M. (1997). Estrogen: nontranscriptional signaling pathway. Rec. Progr. Horm. Res. **52:** 33-69.
9. Pascall, J.C. (1997). Post-transcriptional regulation of gene expression by androgens: recent observations from the epidermal growth factor gene. J. Mol. Endocrinol. **18:** 177-180.
10. Poola, I., Abraham, J., Liu, A. Estrogen receptor beta splice variants mRNAs are differentially altered during breast carcinogenesis. J. Ster. Biochem. Mol. Biol. (2002) **82:** 169-179.
11. Pratt, W.B., Toft, D.O. (1997). Steroid receptor interaction with Heat Shock Protein and immunophilin chaperones. Endocrine Reviews **18:** 306-360.
12. Shibata, H., Spencer, T.E., Oñate, S.A., Jenster, G., Tsai, S.Y., Tsai, M-J., O'Malley, B.W. (1997). Role of co-activators and co-repressors in the mecanism of steroid/thyroid receptor action. Rec. Progr. Horm. Res. **52:** 141-165.
13. Shupnik, M.A. (1997). Steroid & thyroid hormone receptors. En: 1997 Syllabus. Introduction to molecular & cellular research. The Endocrine Society.
14. Tamrazi A, Carlson KE, Daniels JR, Hurth KM, Katzenellenbogen JA. (2002). Estrogen Receptor Dimerization: Ligand Binding Regulates Dimer Affinity and Dimer Dissociation Rate. Mol Endocrinol **16:** 2706-19.
15. Tsai, M-J, O'Malley, B.W. (1994). Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. Annu. Rev. Biochem. **63:** 451-486.
16. Verrijdt, G., Haelens, A., Claessens, F. Selective DNA recognition by the androgen receptor as a mechanism for hormone-specific regulation of gene expression. Mol. Genetics Metab. (2003) **78:** 175-185.
17. Weigel, N.L. (1996). Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. Biochem. J. **319:** 657-667.
18. Zhu, Y., Bond, J., Thomas, P. Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progestin receptor Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2003) **100:** 2237-2242.