

I glucocorticoidi nel 2010

Giuseppe Nocentini e Emira Ayroldi

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Sezione di Farmacologia
Università degli Studi di Perugia

I glucocorticoidi (GCs) tra fisiologia e clinica: un rapporto dialettico

I glucocorticoidi giocano un ruolo importante nella terapia antinfiammatoria e immunosoppressiva. In particolare, i GCs sono ampiamente utilizzati per trattare le reazioni allergiche, le malattie infiammatorie e autoimmunitarie, quali ad esempio asma, dermatite, malattie infiammatorie intestinali, artrite reumatoide e sclerosi multipla. Inoltre, sono utilizzati nella prevenzione del rigetto dei trapianti e nel trattamento di neoplasie ematologiche. Le principali indicazioni terapeutiche dei GCs in malattie extrasurrenaliche sono riassunte nella Tabella 1.

I GCs esplicano un'importante azione sul sistema immunitario (fisiologica e farmacologica), modulando in modo significativo l'attività di tutte le cellule che partecipano alla risposta immune (naturale e adattativa). L'attività immunosoppressiva si sovrappone a quella antinfiammatoria: entrambe richiedono l'attivazione del recettore dei GCs (GR) e condividono meccanismi molecolari che coinvolgono l'inibizione della

attività leucocitaria. D'altra parte, i GCs agiscono anche sulle strutture parenchimali e connettivali proteggendole dagli effetti nocivi della risposta infiammatoria, sempre attraverso l'attivazione del GR.

Nella valutazione degli effetti farmacologici dei GCs, è importante sottolineare che i GCs endogeni svolgono un ruolo fondamentale nello sviluppo e nella maturazione del sistema immunitario e di altri organi, come ampiamente dimostrato dai modelli animali geneticamente modificati e dagli studi sui polimorfismi del

recettore dei GCs. Ambedue questi modelli hanno dimostrato a pieno la complessità della azione dei GCs su diversi organi e sistemi, al punto che polimorfismi del GR hanno ricadute su patologie psichiatriche, quali, ad esempio, la depressione [1].

La molteplicità d'azione dei GCs ha un pesante rovescio della medaglia in termini di effetti danni al sistema nervoso centrale. Gli effetti avversi dei GCs (riportati in dettaglio in Tabella 2) sono in parte correlati ai loro effetti sul sistema immunitario (come, ad

Patologie	Esempi
Reazioni allergiche	Asma, rinite allergica, orticaria, eczemi, reazioni atopiche locali, punture di insetto, reazioni da farmaci, malattia da siero, edema angioneurotico, shock
Disturbi collageneo-vascolari	Lupus eritematoso sistemico (LES), artrite reumatoide, Sindrome di Sjögren, polimiosite, polimialgia reumatica, sindromi miste del tessuto connettivo, arterite gigante-cellulare, arterite temporale
Malattie cutanee	Dermatite atopica, dermatosi, angioedema, psoriasi, lichen simplex cronico, micosi fungoide, pemfigo
Malattie gastrointestinali	Malattia infiammatoria intestinale, morbo celiaco
Malattie epatiche	Epatite cronica su base autoimmune attiva, epatite virale colestatica
Malattie oculari	Congiuntivite allergica, uveite acuta, coroidite, neurite ottica
Malattie della tiroide	Esoftalmo maligno, tiroidite subacuta
Malattie renali	Sindrome nefrosica
Malattie del sistema nervoso centrale	Edema cerebrale, ictus, lesioni del midollo spinale, sclerosi multipla
Malattie ematologiche	Anemia emolitica autoimmune o acquisita, trombocitopenia, porpora allergica acuta, porpora idiopatica trombocitopenia, leucemia acuta linfoblastica, mieloma multiplo, linfomi Hodgkin e non-Hodgkin
Infezioni	Setticemia da batteri gram-negativi con eccessiva risposta infiammatoria, meningiti da <i>Hemophilus influenzae</i> , meningo-encefaliti virali, polmonite da <i>Pneumocystis carinii</i> , mononucleosi infettiva
Trapianti d'organo	
Altre malattie	Lombalgia, edema polmonare, sarcoidiosi, ipercalcemia, mal di montagna

Tabella 1 - Indicazioni terapeutiche extrasurrenaliche dei GC

Endocrine	Soppressione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, irsutismo, impotenza, irregolarità mestruali, ritardo o arresto della crescita nei bambini
Cardiovascolari	Iperensione, tromboflebite
Metaboliche	Iperglicemia, diabete, insulinoresistenza; catabolismo proteico, obesità addominale, faccia a luna piena, gobba di bufalo; ritenzione di sodio ed acqua, alcalosi metabolica, ipokaliemia, ipocalcemia, calciuria
Dermatologiche	Ecchimosi e petecchie, rossore del viso, strie, acne, assottigliamento della cute
Gastrointestinali	Ulcera peptica, emorragia gastrica
Immunitarie	<i>Herpes zooster</i> e <i>simplex</i> , aumentata sensibilità alle infezioni, ritardata guarigione delle ferite
Neuropsichiche	Cefalea, iperattività psicomotoria, euforia, insonnia, alterazioni dell'umore con precipitazione di una sindrome maniaco-depressiva o di una psicosi
Oftalmiche	Cataratta posteriore, aumento della pressione endoculare, glaucoma, cheratiti
Osteomuscolari	Osteoporosi, predisposizione a fratture vertebrali da compressione, necrosi asettica della testa del femore e dell'omero, predisposizione alla rottura tendinea, miopatia, ridotta massa muscolare e dimagrimento progressivo degli arti

Tabella 2 - Principali reazioni avverse dei glucocorticoidi

esempio, un ritardo nel processo di riparazione delle ferite e una aumentata suscettibilità alle infezioni), ad effetti sul metabolismo (come, ad esempio, diabete e obesità) e all'aumento del catabolismo proteico (con effetti sul sistema osteoarticolare, muscolare e cutaneo).

Meccanismo d'azione dei GCs

La maggior parte degli effetti mediati dai GCs, a concentrazioni fisiologiche e farmacologiche, dipendono dalla loro interazione con il GR. L'isoforma del GR maggiormente studiata e più espressa ($GR\alpha$) presenta diverse regioni, funzionalmente specifiche, attraverso le quali il GR omodimerizza, si lega al DNA o interagisce con l'ormone. Nonostante si conosca un solo gene responsabile per la sintesi del GR, recenti studi hanno chiaramente dimostrato la presenza di diverse forme isomeriche del recettore dovute a modificazioni trascrizionali e post-trascrizionali.

Il gene GR produce, infatti, diversi splicing, dei quali due sono maggiormente espressi: il $GR\alpha$ e il $GR\beta$ (Figura 1a e b). Quest'ultimo deriva dallo splicing alternativo dell'esone 9 che comporta da una parte la perdita della capacità di legare il GC e dall'altra un'azione inibente il $GR\alpha$ attivato [2]. Un'acquisizione relativamente recente è che sull'esone 1 e 2 sono presenti un gran numero di

ATG che permettono l'inizio della traduzione della proteina [3] e che conferiscono al gene la potenzialità di sintetizzare diverse forme isomeriche del GR ($GR\alpha A$, $GR\alpha B1$, $GR\alpha B2$, ecc.). Le diverse isoforme presenti nelle cellule sono illustrate in Figura 1c.

Come è logico attendersi, questi recettori hanno diversa affinità per i GCs e sono differenzialmente espressi nei diversi tessuti e nelle diverse cellule, condizionando così la risposta biologica [4]. Inoltre, ciascuna di queste isoforme può andare incontro ad un diverso grado di fosforilazione, ubiquitinazione e sumolazione (Figura 1d), che modificano ulteriormente le proprietà funzionali dei GR [5, 6]. In definitiva, meccanismi trascrizionali, traduzionali e post-traduzionali producono diversi GR nei diversi tessuti e ciò può spiegare, almeno in parte, le molteplici azioni fisiologiche dei GCs ed anche come mai la risposta ai differenti i GCs possa essere diversa.

I GR modulano la trascrizione genica (effetti genomici)

La maggior parte dei recettori $GR\alpha$ (fa eccezione, ad esempio, la isoforma $GR\alpha D$) è localizzata nel citoplasma complessata a proteine diverse e non tutte note (heat shock proteins, immunofilline, protein chinasi e fosfolipasi) a formare il complesso del recettore. Quando il GC si lega al GR, si ha un cambiamento conforma-

zionale del GR che si dissocia dal recettosoma, migra nel nucleo, dimerizza e si lega a specifiche sequenze del DNA chiamate GRE (Glucocorticoid Responsive Elements), presenti nei promotori dei geni target dei GCs. In questo modo i GCs inducono l'espressione di centinaia di geni [7-10]. È interessante notare che la regolazione positiva della sintesi proteica è più o meno intensa in funzione del tipo di isoforma che lega i GRE. Il $GR\alpha C3$, per esempio, ha un'attività regolatoria a livello trascrizionale 2 volte superiore a quella di $GR\alpha A$. Il $GR\beta$ compete

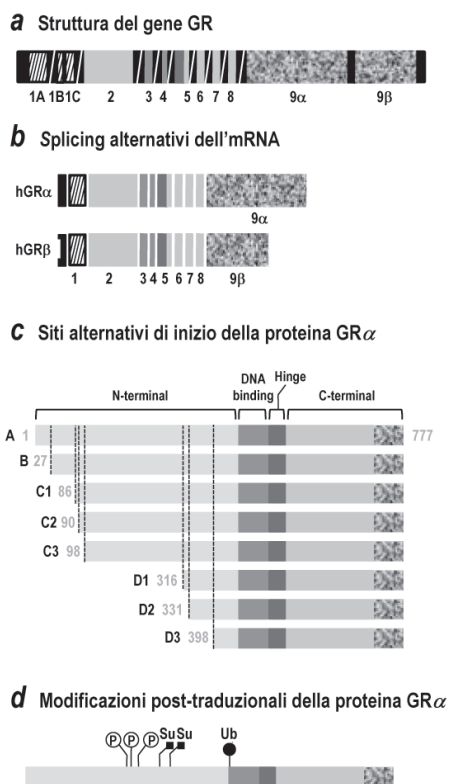


Figura 1 - Struttura del gene umano che codifica per il recettore dei GCs. Gli esoni sono numerati da 1 a 9 (a) e i diversi pattern corrispondono alla funzione della sequenza amminoacidica da loro codificata, come illustrato nel pannello (c). Gli introni sono in nero. Il diverso assemblamento degli esoni dà luogo a diversi splicing. I due più espressi ($GR\alpha$ e $GR\beta$) sono illustrati nel pannello (b). La traduzione dell'esone 2 per il $GR\alpha$ e $GR\beta$ può iniziare da ATG diversi, come illustrato nel pannello (c) per $GR\alpha$. Nel pannello (d) sono mostrati i siti sui quali il GR può essere fosforilato (P), sumolato (Su) e ubiquitinato (Ub).

con il GR α attivato per il legame con i GRE, ma non essendo capace di attivarlo, impedisce al GR α attivato/dimerizzato di svolgere la propria azione. Inoltre, l'attività del GR α livello del GRE può essere modulata positivamente e negativamente da altri fattori. Peroxisome proliferator activated receptor- α (PPAR- α), per esempio, sinergizza con il GR, mentre l'istone deacetilasi-2 (HDAC2) ne inibisce l'attività trascrizionale [11, 12].

I GCs possono regolare negativamente la trascrizione genica. La presenza di GRE negativi (nGRE) è stata a lungo supposta, ma mai dimostrata. Oggi si ritiene che un meccanismo più plausibile di inibizione della trascrizione genica sia la eterodimerizzazione del GR attivato con altri fattori di trascrizione che regolano positivamente la trascrizione, che sono così inibiti proprio dal legame con il GR. Questo meccanismo è stato dimostrato per numerosi fattori trascrizionali come NF- κ B, AP-1, IRF-3, STAT, CREB, NF-AT, T-Bet e GATA-3 [13]. Alcuni di essi giocano un ruolo fondamentale nella regolazione dell'espressione di mediatori della risposta infiammatoria e immune. Un altro meccanismo di inibizione della trascrizione, comporta il reclutamento di co-repressori invece di co-attivatori. Ad esempio, quando HDAC2 è reclutato dal GR al sito di legame con il GRE, ne inibisce l'attività trascrizionale. Infine, l'inibizione della trascrizione mediata dai GCs è anche secondaria all'over-espressione, GRE-dipendente, di inibitori di fattori di trascrizione pro-infiammatori. Ad esempio, i GCs aumentano l'espressione di I- κ B e di GILZ (Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper), quest'ultimo clonato più di 10 anni fa nel nostro laboratorio, che legano e inibiscono NF- κ B [14-16].

In definitiva, la regolazione trascrizionale positiva e negativa

mediata dai GCs (effetti genomici) dipende anche dall'espressione da parte della cellula di fattori di trascrizione e ciò determina effetti diversi nelle diverse cellule.

Gli effetti dei GCs sulle diverse cellule sono differenti: possibile correlazione con la variabilità individuale della risposta clinica dei pazienti

L'osservazione che i GCs danno effetti diversi in tessuti diversi non è solo clinica. Negli ultimi 10 anni sono stati effettuati studi in vitro di microarray su diverse cellule trattate con GCs per scoprire se i geni modulati dai GCs fossero gli stessi nei diversi tessuti [7-9]. In uno studio di meta-analisi, che analizzava i geni responsabili dell'apoptosi indotta dai GCs nelle cellule T, a diverso grado di maturazione, normali e neoplastiche, è stato sottolineato che solo pochi geni compaiono in tre o più studi [17]. Ciò porta alla conclusione che i diversi meccanismi descritti nei paragrafi precedenti operano al fine di diversificare la risposta genica nelle diverse cellule. Tra i geni invariabilmente modulati dai GCs si annovera GILZ, che può essere considerato un marker universale di risposta ai GCs [18].

La diversa risposta ai GCs (apoptosi, differenziazione, inibizione della proliferazione, ad esempio) non dipende solo dalla modulazione di geni diversi ma anche dallo stato funzionale della cellula. Per esempio, i GCs regolano l'apoptosi, inducendola o inibendola, e questo è possibile perché l'induzione dell'espressione dei geni pro-apoptotici induce apoptosi solo in specifiche popolazioni cellulari, in rapporto allo stato funzionale/differenziativo. A questo proposito, il nostro gruppo ha dimostrato che nei timociti che vanno incontro ad apoptosi in seguito al trattamento con GCs, non c'è solo l'induzione di

geni pro-apoptotici o la down-regolazione di fattori anti-apoptotici, come ci si potrebbe attendere, ma anche la up-regolazione di un gran numero di geni anti-apoptotici (quali, ad esempio, il recettore per la interleuchina (IL)-7 o CTLA-4 [7], che, in questo caso specifico, non è sufficiente per dare una risposta protettiva, ma che in altri contesti biologici potrebbe darla). È nostra opinione, infatti, che un simile ragionamento possa essere applicato non solo a tessuti differenti, ma anche a sottopopolazioni cellulari differenti (come quelle linfocitarie e macrofagiche), nelle quali, infatti, i GCs inducono effetti diversi quali apoptosi, proliferazione o differenziazione. Polimorfismi del GR, diversa localizzazione delle isoforme nelle cellule e nei tessuti e variabilità della risposta ai GCs in funzione di eventuali costimoli ambientali, sono certamente alla base della differente risposta clinica individuale allo stesso farmaco.

Gli effetti non-genomici dei GCs

Qualche anno fa, un medico di Medicina Generale ci riferiva con ammirazione degli effetti miracolosi dei GCs somministrati per via endovenosa su un suo paziente in shock. In questi casi quello che colpisce è, innanzitutto, la velocità con cui il paziente risponde. Anche l'effetto della somministrazione topica dei GCs durante un attacco d'asma si manifesta rapidamente. Per quanto alcuni degli effetti genomici dei GCs possano iniziare dopo 10 minuti dal contatto del GC con la cellula, gli effetti sopra descritti sono difficilmente attribuibili alla modulazione della trascrizione genica. Infatti, una serie di effetti non-genomici, più veloci, sono responsabili della risposta clinica quasi immediata. L'attivazione di secondi messaggeri, l'innescare di numerose cascate di trasduzione

del segnale, come ad esempio, l'attivazione della fosfolipasi, la modulazione del cAMP e dei pathways delle proteine chinasi e la mobilitazione del Ca⁺⁺ sono stati di volta in volta chiamati in causa per spiegare gli effetti rapidi dei GCs [19-21]. Si suppone che gli effetti non-genomici dipendano dall'attivazione del GR e del recettosoma, ma anche dalla modulazione di recettori transmembrana non specifici per i GCs (come, ad esempio, il GABA_A) e, ad alte dosi, dalla modificazione della fluidità della membrana cellulare [21]. Molti ricercatori hanno insistentemente proposto che gli effetti non-genomici dei GCs siano anche determinati da un recettore di membrana specifico per i GCs [20]. Tale recettore non è stato finora clonato e noi, d'altra parte, pensiamo che i meccanismi sopra esposti spieghino a sufficienza gli effetti non-genomici dei GCs.

Gli effetti non-genomici non sono solo responsabili degli effetti farmacologici dei GCs a manifestazione rapida. Essi, infatti, sinergizzano con gli effetti genomici nell'ottenere gli effetti finali dei GCs. Ad esempio, il nostro gruppo ha dimostrato che i GCs inducono apoptosi dei timociti attraverso meccanismi non-genomici che coinvolgono il pathway dalla ceramide e che la stessa via di trasduzione è modulata anche da meccanismi genomici [7, 19, 22].

Effetti dei GCs sulla risposta infiammatoria/immunitaria

Attraverso i meccanismi molecolari sopra descritti, i GCs giocano un ruolo fondamentale nella regolazione fisiologica dello sviluppo della risposta immune e nella soppressione della risposta infiammatoria. Gli effetti antinfiammatori e immunosoppressivi dei GCs sono inestricabilmente connessi, condividendo molti meccanismi e pathways. La

trans-repressione dei geni dell'infiammazione è il meccanismo generalmente accettato alla base della loro risposta antinfiammatoria. I GCs inibiscono, per esempio, fattori vasoattivi e chemiotattici, enzimi lipolitici, proteolitici, proinfiammatori come ciclo-ossigenasi (COX)-2 e nitric oxide synthase type 2 (NOS2) e diminuiscono l'extravasazione leucocitaria e la fibrosi. Inoltre, i GCs proteggono dall'apoptosi anche il tessuto in cui l'infiammazione si sviluppa con un'azione anti-apoptotica diretta e con una indirettamente mediata dall'inibizione dei mediatori dell'infiammazione, capaci essi stessi di indurre apoptosi. Questo meccanismo è di fondamentale importanza quando coinvolge i neuroni [23].

In maniera simile, i GCs inibiscono la produzione di mediatori importanti per la generazione di una risposta immune regolando citochine, recettori per citochine, apoptosi e proliferazione in una complessa rete di segnali che coinvolge tutte le cellule della risposta immune [24].

GCs ed extravasazione leucocitaria

I GCs modulano negativamente l'infiammazione acuta e cronica alterando il reclutamento, l'attivazione, la differenziazione e l'apoptosi delle cellule del sistema immunitario innato ed adattativo. I primi stadi dell'infiammazione sono caratterizzati dalla migrazione nel focolaio infiammatorio di neutrofili prima, e di monociti dopo, che differenziano in macrofagi. Nella fase che precede il reclutamento linfo-monocitario, l'interazione tra le cellule endoteliali e quelle leucocitarie promuove l'up-regolazione di molecole di adesione (P-selettina, E-selettina, ICAM-1 e VCAM-1)[25].

I GCs riducono la migrazione dei leucociti nel focolaio di in-

fiammazione attraverso un meccanismo indiretto e uno diretto. Il primo riguarda l'apoptosi dei leucociti e l'inibizione della produzione di citochine, riducendo così l'up-regolazione delle molecole di adesione endoteliali. Il secondo meccanismo riguarda invece la riduzione dell'espressione di molecole di adesione, come alcune selettine ed ICAM-1 [26-28]. Inoltre, gli eventi non-genomici indotti dai GCs inibiscono i pathways coinvolti nella trascrizione di adesine e nella riorganizzazione del citoscheletro, componenti essenziali per l'adesione e la mobilità cellulare [29].

GCs e macrofagi

I macrofagi sono la componente chiave nelle prime fasi e nella progressione dell'infiammazione, ma oggi è noto che partecipano anche nelle fasi risolutive grazie alla loro plasticità funzionale. Inoltre presentano l'antigene alle cellule T e possono essere polarizzati, in base agli stimoli ambientali a cui sono sottoposti, in M1 e M2. I macrofagi M1 (indotti da IFN- γ , LPS, TNF, GM-CSF) producono citochine pro-infiammatorie (IL-1 β , TNF- α , IL-6) e inducono risposte polarizzate Th1, mentre i macrofagi M2 sono dotati di funzioni immuno-regolatorie, promuovono rimodellamento e riparazione cellulare e inducono prevalentemente risposte polarizzate Th2.

I GCs interferiscono con la funzione macrofagica attraverso molti meccanismi. Diminuiscono, per esempio, la loro capacità di presentare l'antigene e l'azione facilitante che ha l'IFN- γ sulla loro capacità di processare l'antigene [30]. Il trattamento dei macrofagi con GCs induce una sottopopolazione macrofagica M2 e down-regola le citochine pro-infiammatorie come il TNF- α [31, 32], che gioca un ruolo chiave nella patogenesi di malattie autoimmunitarie e infiammatorie.

Inoltre i GCs down-regolano nei macrofagi l'espressione di molecole costimolatorie e dell'HLA (human lymphocyte antigen), il rilascio di citochine (IL-1, IL-6, IL12p70) e chemochine come Rantes e macrophage-inflammatory-protein (MIP)-1 α [33]. I GCs inducono anche apoptosi dei monociti umani di sangue periferico attraverso l'up-regolazione del recettore apoptotico Fas e del suo ligando- Fas-L [34].

GCs e linfociti

L'azione immunosoppressiva dei GCs, che si osserva in seguito al trattamento delle malattie autoimmunitarie e nella infiammazione cronica, dipende soprattutto dalla modulazione della risposta immunitaria adattativa con particolare riferimento all'attivazione dei linfociti T. I GCs hanno un'azione pro-apoptotica sui timociti doppio positivi CD4⁺CD8⁺ [7, 35], controllando in questa maniera la selezione timica, come suggerito dai modelli dei topi difettivi per l'espressione/funzione del GR [36]. Inoltre, i GCs modulano la differenziazione dei linfociti T maturi controllando l'espressione di citochine e dei loro recettori. I GCs, ad esempio, down-regolano l'IL-2, cruciale per l'attivazione ed espansione dei linfociti T [37], inibiscono la produzione di IFN- γ inibendo lo sviluppo di una risposta Th-1, mentre up-regolano la produzione di IL-4 favorendo una risposta Th-2. Anche molti recettori come IL-7R e Notch1 e alcuni fattori di trascrizione come GILZ e Runx1, sono regolati dai GCs e sono al contempo cruciali nella differenziazione delle cellule T [7, 15, 38-40].

Le cellule T regolatorie (Treg) sono una sottopopolazione di linfociti T CD4⁺CD25⁺ o CD8⁺CD25⁺ capaci di inibire l'eccessivo sviluppo di una risposta immunitaria e

di prevenire risposte immunitarie inappropriate contro antigeni self o antigeni non-self innocui [41, 42]. Le Treg giocano un ruolo chiave nel mantenere la tolleranza periferica, controllando quella piccola parte di cellule T circolanti autoreattive che evadono dalla selezione timica. Studi recenti dimostrano che i GCs favoriscono l'espansione di sottopopolazioni di T regolatorie a fenotipo CD8⁺CD28⁻ e FoxP3⁺CD4⁺CD25⁺ [43] e promuovono la sintesi di citochine antinfiammatorie come l'IL-10 [44]. Infine, le Treg dimostrano una sensibilità diversa nei confronti dell'apoptosi indotta dai GCs rispetto ai linfociti effettori CD4⁺CD25⁻ [45].

GCs e cellule dendritiche

Le cellule dendritiche (DC) rappresentano il principale sistema di connessione tra l'immunità innata e quella adattativa. Grazie alla loro plasticità funzionale, sono in grado di stimolare le cellule T potentemente o debolmente a seconda del loro grado di maturazione. È dimostrato che mentre le DC mature promuovono l'attivazione dei linfociti T naïve, quelle immature sono tollerogeniche, inducendo anergia ed apoptosi delle cellule T [46, 47]. Numerosi modelli sperimentali in vitro suggeriscono effetti diversi dei GCs sulle DC. I GCs, infatti, attraverso l'induzione della sintesi di IL-10 o l'inibizione della sintesi di IL-12 hanno effetti tollerogenici sulle DC di derivazione midollare (BMDC), su linee cellulari murine e sulle cellule dendritiche umane derivanti dai monociti. Le DC trattate in vitro con GCs rimangono ad uno stadio di differenziazione immaturo, conservando il fenotipo tollerogenico anche se co-trattate con LPS [48, 49]. Le DC umane di tipo mieloidi, trattate con desametasone (DEX) e LPS, producono IL-10, linfocina importante per la maturazione

delle Treg [50]. Infatti, il tipo di cellule T che si sviluppa in seguito al contatto con le DC (Treg o T effettrici) è importante per il segnale di tollerogenicità che proviene dalle DC stesse.

La resistenza ai GCs è un fenomeno di rilevanza clinica per il quale non esiste ancora un trattamento efficace

La resistenza ai GCs è l'ostacolo maggiore al trattamento di una serie di patologie croniche eulastiche o neoplastiche, come, per esempio, la broncopneumopatia cronica ostruttiva, l'artrite reumatoide o molte neoplasie ematologiche. Pochi pazienti sono resistenti già nelle prime fasi della terapia con GCs; si parla, in questo caso, di una resistenza primaria da ascrivere a mutazioni geneticamente determinate del GR. La maggior parte dei pazienti resistenti alla terapia con GCs, sviluppa resistenza dopo una fase di risposta clinica ottimale. Per questa resistenza secondaria sono stati chiamati in causa diversi meccanismi molecolari, differenti anche a seconda del tipo di patologia. La molteplicità dei meccanismi di resistenza acquisita, ad oggi non tutti noti, riflette la complessità e la diversità degli effetti farmacologici dei GCs. Sebbene mutazioni somatiche del GR siano responsabili della resistenza in vitro, queste non sono state individuate nei pazienti. Uno dei meccanismi più accreditati per spiegare la resistenza alla terapia con GCs è quello che coinvolge uno squilibrio delle forme isomeriche del GR nei siti di infiammazione, con il prevalere del GR β e γ ad attività antagonista (sia per l'ormone che per il GRE) sul GR α ad attività agonista [12]. Altri meccanismi di resistenza secondaria dipendono dall'induzione di citochine nelle aree di flogosi. Per esempio, IL-2 e IL-4 sono overe-

spressi negli epitelii delle vie aeree dei pazienti asmatici. Queste citochine riducono nei linfociti T la traslocazione nucleare del GR attivato probabilmente attraverso l'attivazione di P38 MAP chinasi, che fosforila e inibisce il GR [51]. Inoltre, queste citochine sono responsabili dell'aumentata espressione del fattore di trascrizione AP-1 che, complessandosi al GR attivato, ne inibisce il legame al DNA. Il reclutamento di HDAC2 nella zona promotrice dei geni dell'infiammazione è uno dei meccanismi attraverso i quali i GCs inibiscono l'espressione di tali geni. L'osservazione che l'attività di HDAC2 è ridotta in patologie croniche che rispondono poco ai GCs, suggerisce un altro meccanismo di resistenza [12]. Meccanismi molecolari simili sono alla base della mancata risposta apoptotica delle neoplasie ematologiche trattate con GCs [17]. È stato recentemente riportato che nella leucemia linfoblastica acuta (ALL), per esempio, una proteina codificata dal gene BTG1, sia responsabile della resistenza ai GCs. L'ipoespressione di BTG1 causa, infatti, una diminuita espressione del GR e della trascrizione mediata dal GR [52]. Inoltre, nella leucemia linfoblastica acuta a cellule T (T-ALL) che costituisce il 15% delle forme pediatriche e il 25% delle forme adulte di tutti i casi di ALL, l'inibizione del fattore di trascrizione Notch1 ripristina la sensibilità ai GCs delle forme resistenti, con riespressione del GR e riattivazione dei pathways apoptotici [53].

Quelli descritti sono solo alcuni esempi dei numerosi meccanismi molecolari responsabili della resistenza ai GCs. La conoscenza di tali meccanismi è di fondamentale importanza per attuare strategie farmacologiche atte a contrastarla.

Differenze tra i vari GCs

sintetici

Riteniamo, infine che valga la pena accennare ad un tema che avrà notevoli sviluppi nel prossimo futuro e che riguarda la specificità dei diversi GCs che attivano il GR. Pensiamo infatti che gli studi in corso su vecchie e nuove molecole permetteranno un utilizzo clinico differenziato su base razionale, migliorando così l'efficacia dei GCs e diminuendone gli effetti avversi.

Negli ultimi anni, sono stati commercializzati GCs di nuova generazione come il fluticasone, la budesonide e il mometasone che vengono utilizzati prevalentemente nel trattamento topico dell'asma, delle malattie infiammatorie intestinali e dell'infiammazione cutanee [54, 55]. I GCs di nuova generazione hanno effetti clinici diversi rispetto a quelli di vecchia generazione (DEX e metilprednisolone, ad esempio) innanzitutto per differenti proprietà farmacocinetiche. Infatti l'emivita e l'effetto di primo passaggio dei GCs di nuova generazione, permette a questi farmaci un'alta efficacia locale e scarsi effetti sistemici con un'ottima risposta clinica associata a scarsissimi effetti avversi anche nei pazienti più a rischio, come i bambini affetti da asma o rinite allergica.

D'altra parte, alcuni dati di laboratorio suggeriscono che gli effetti clinici osservati non dipendono solo dalle diverse proprietà farmacocinetiche, ma anche da caratteristiche farmacodinamiche differenti. Ad esempio, recentemente sono stati testati in vitro molti GCs, inclusi il DEX, il metilprednisolone e la budesonide e si è osservato che la concentrazione a cui avviene la transattivazione genica (misurata tramite l'up-regolazione dell'espressione di GILZ) non correla con quella a cui avviene la transrepressione genica (misurata tramite l'inibizione della espressione di IL-2)

[56]. Anche nel nostro laboratorio è stato osservato che i dosaggi a cui vengono utilizzati in clinica i diversi GCs non correlano con le rispettive concentrazioni efficaci per l'induzione dell'apoptosi dei timociti in vitro [57]. Questi studi suggeriscono che gli effetti dei GCs, sia voluti che avversi, dipendono sia dalle proprietà farmacocinetiche che farmacodinamiche specifiche di ciascun farmaco.

A nostro avviso, la diversa efficacia dei GCs è dovuta ad una diversa affinità per le numerose isoforme dei GR espresse diversamente nelle cellule e di cui abbiamo parlato nei paragrafi precedenti. Inoltre, c'è da considerare la "cross-specificità" dei GCs, cioè la possibilità che un ligando possa legarsi a più di un recettore della famiglia dei recettori nucleari. Per esempio, l'antagonista RU486 è efficace in egual misura sul recettore del progesterone e su quello dei GCs e il recettore xenobiotico orfano PXR (pregnane X receptor) lega sia il DEX che il RU486 [58].

La sfida più importante nella ricerca del GC "perfetto" è quella di individuare una molecola capace di dissociare gli effetti voluti da quelli avversi. È opinione comune che la transrepressione genica sia prevalentemente responsabile degli effetti antinfiammatori dei GCs mentre la transattivazione degli effetti avversi. Una separazione completa di tali processi così intimamente interconnessi è oggi ancora non attuabile, ma la migliore conoscenza dei meccanismi molecolari del GR ha portato all'identificazione e lo sviluppo di selective GR agonists (SEGRAs), ligandi che sarebbero capaci di dissociare l'attività antiinfiammatoria dagli effetti avversi [59]. Mentre si aspetta che la sperimentazione clinica di tali composti dia una risposta sulla loro efficacia, la ricerca di base sui GCs continua.

BIBLIOGRAFIA

- Hunsberger JG, Austin DR, Chen G, Manji HK. Cellular mechanisms underlying affective resiliency: the role of glucocorticoid receptor- and mitochondrially-mediated plasticity. *Brain Res* 2009; 1293: 76-84.
- Lu NZ, Cidlowski JA. Glucocorticoid receptor isoforms generate transcription specificity. *Trends Cell Biol* 2006; 16: 301-7.
- Lu NZ, Cidlowski JA. Translational regulatory mechanisms generate N-terminal glucocorticoid receptor isoforms with unique transcriptional target genes. *Mol Cell* 2005; 18: 331-42.
- Manning P, Gibson PG, Lasserson TJ. Ciclesonide versus other inhaled steroids for chronic asthma in children and adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2008; CD007031.
- Duma D, Jewell CM, Cidlowski JA. Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006; 102: 11-21.
- Gross KL, Lu NZ, Cidlowski JA. Molecular mechanisms regulating glucocorticoid sensitivity and resistance. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 300: 7-16.
- Bianchini R, Nocentini G, Krausz LT, Fettucciari K, Coaccioli S, Ronchetti S, *et al.* Modulation of pro- and antiapoptotic molecules in double-positive (CD4+CD8+) thymocytes following dexamethasone treatment. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 319: 887-97.
- Chauhan D, Auclair D, Robinson EK, Hideshima T, Li G, Podar K, *et al.* Identification of genes regulated by dexamethasone in multiple myeloma cells using oligonucleotide arrays. *Oncogene* 2002; 21: 1346-58.
- Schmidt S, Rainer J, Riml S, Ploner C, Jesacher S, Achmuller C, *et al.* Identification of glucocorticoid-response genes in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2006; 107: 2061-9.
- Beato M. Transcriptional control by nuclear receptors. *FASEB J* 1991; 5: 2044-51.
- Cuzzocrea S, Bruscoli S, Mazzon E, Crisafulli C, Donato V, Di Paola R, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha contributes to the anti-inflammatory activity of glucocorticoids. *Mol Pharmacol* 2008; 73: 323-37.
- Barnes PJ, Adcock IM. Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. *Lancet* 2009; 373: 1905-17.
- De Bosscher K, Haegeman G. Mini-review: latest perspectives on anti-inflammatory actions of glucocorticoids. *Mol Endocrinol* 2009; 23: 281-91.
- Neumann M, Naumann M. Beyond IkappaBs: alternative regulation of NF-kappaB activity. *FASEB J* 2007; 21: 2642-54.
- D'Adamio F, Zollo O, Moraca R, Ayroldi E, Bruscoli S, Bartoli A, *et al.* A new dexamethasone-induced gene of the leucine zipper family protects T lymphocytes from TCR/CD3-activated cell death. *Immunity* 1997; 7: 803-12.
- Ayroldi E, Migliorati G, Bruscoli S, Marchetti C, Zollo O, Cannarile L, *et al.* Modulation of T-cell activation by the glucocorticoid-induced leucine zipper factor via inhibition of nuclear factor kappaB. *Blood* 2001; 98: 743-53.
- Schmidt S, Rainer J, Ploner C, Presul E, Riml S, Kofler R. Glucocorticoid-induced apoptosis and glucocorticoid resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cell Death Differ* 2004; 11 Suppl 1: S45-55.
- Ayroldi E, Riccardi C. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ): a new important mediator of glucocorticoid action. *FASEB J* 2009; 23: 3649-58.
- Cifone MG, Migliorati G, Parroni R, Marchetti C, Millimaggi D, Santoni A, *et al.* Dexamethasone-induced thymocyte apoptosis: apoptotic signal involves the sequential activation of phosphoinositide-specific phospholipase C, acidic sphingomyelinase, and caspases. *Blood* 1999; 93: 2282-96.
- Losel R, Wehling M. Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 46-56.
- Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med* 2005; 353: 1711-23.
- Marchetti MC, Di Marco B, Cifone G, Migliorati G, Riccardi C. Dexamethasone-induced apoptosis of thymocytes: role of glucocorticoid receptor-associated Src kinase and caspase-8 activation. *Blood* 2003; 101: 585-93.
- Clark AR. Anti-inflammatory functions of glucocorticoid-induced genes. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 275: 79-97.
- Rook GA. Glucocorticoids and immune function. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 1999; 13: 567-81.
- Mackay CR. Moving targets: cell migration inhibitors as new anti-inflammatory therapies. *Nat Immunol* 2008; 9: 988-98.
- Patel NA, Patel JA, Stins MF, Kim KS, Chang SL. Dexamethasone affects cytokine-mediated adhesion of HL-60 human promyelocytic leukemia cells to cultured dermal microvascular endothelial cells. *Clin Immunol* 2001; 99: 387-94.
- Simoncini T, Maffei S, Basta G, Barsacchi G, Genazzani AR, Liao JK, *et al.* Estrogens and glucocorticoids inhibit endothelial vascular cell adhesion molecule-1 expression by different transcriptional mechanisms. *Circ Res* 2000; 87: 19-25.
- Wehling-Henricks M, Lee JJ, Tidball JG. Prednisolone decreases cellular adhesion molecules required for inflammatory cell infiltration in dystrophin-deficient skeletal muscle. *Neuromuscul Disord* 2004; 14: 483-90.
- Pitzalis C, Pipitone N, Perretti M. Regulation of leukocyte-endothelial interactions by glucocorticoids. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 966: 108-18.
- Hu X, Li WP, Meng C, Ivashkiv LB. Inhibition of IFN-gamma signaling by glucocorticoids. *J Immunol* 2003; 170: 4833-9.
- Steer JH, Vuong Q, Joyce DA. Suppression of human monocyte tumour necrosis factor-alpha release by glucocorticoid therapy: relationship to systemic monocytopenia and cortisol suppression. *Br J Clin Pharmacol* 1997; 43: 383-9.
- Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 2008; 13: 453-61.
- Schmidt M, Pauels HG, Lugerling N, Lugerling A, Domschke W, Kucharzik T. Glucocorticoids induce apoptosis in human monocytes: potential role of IL-1 beta. *J Immunol* 1999; 163: 3484-90.
- Schmidt M, Lugerling N, Lugerling A, Pauels HG, Schulze-Osthoff K, Domschke W, *et al.* Role of the CD95/CD95 ligand system in glucocorticoid-induced monocyte apoptosis. *J Immunol* 2001; 166: 1344-51.
- Almeida OF, Conde GL, Crochemore C, Demeneix BA, Fischer D, Hassan AH, *et al.* Subtle shifts in the ratio between pro- and antiapoptotic molecules after activation of corticosteroid receptors decide neuronal fate. *FASEB J* 2000; 14: 779-90.

36. Jondal M, Pazirandeh A, Okret S. Different roles for glucocorticoids in thymocyte homeostasis? *Trends Immunol* 2004; 25: 595-600.
37. Bamberger CM, Else T, Bamberger AM, Beil FU, Schulte HM. Regulation of the human interleukin-2 gene by the alpha and beta isoforms of the glucocorticoid receptor. *Mol Cell Endocrinol* 1997; 136: 23-8.
38. Lee HC, Shibata H, Ogawa S, Maki K, Ikuta K. Transcriptional regulation of the mouse IL-7 receptor alpha promoter by glucocorticoid receptor. *J Immunol* 2005; 174: 7800-6.
39. Cannarile L, Cuzzocrea S, Santucci L, Agostini M, Mazzon E, Esposito E, *et al.* Glucocorticoid-induced leucine zipper is protective in Th1-mediated models of colitis. *Gastroenterology* 2009; 136: 530-41.
40. Taniuchi I, Osato M, Egawa T, Sunshine MJ, Bae SC, Komori T, *et al.* Differential requirements for Runx proteins in CD4 repression and epigenetic silencing during T lymphocyte development. *Cell* 2002; 111: 621-33.
41. Askenasy N, Kaminitz A, Yarkoni S. Mechanisms of T regulatory cell function. *Autoimmun Rev* 2008; 7: 370-5.
42. Gerli R, Nocentini G, Alunno A, Bocci EB, Bianchini R, Bistoni O, *et al.* Identification of regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 2009; 8: 426-30.
43. Chen X, Oppenheim JJ, Winkler-Pickett RT, Ortaldo JR, Howard OM. Glucocorticoid amplifies IL-2-dependent expansion of functional FoxP3(+)CD4(+)CD25(+) T regulatory cells in vivo and enhances their capacity to suppress EAE. *Eur J Immunol* 2006; 36: 2139-49.
44. Xystrakis E, Kusumakar S, Boswell S, Peek E, Urry Z, Richards DF, *et al.* Reversing the defective induction of IL-10-secreting regulatory T cells in glucocorticoid-resistant asthma patients. *J Clin Invest* 2006; 116: 146-55.
45. Chen X, Murakami T, Oppenheim JJ, Howard OM. Differential response of murine CD4+CD25+ and CD4+CD25- T cells to dexamethasone-induced cell death. *Eur J Immunol* 2004; 34: 859-69.
46. Adler HS, Steinbrink K. Tolerogenic dendritic cells in health and disease: friend and foe! *Eur J Dermatol* 2007; 17: 476-91.
47. Puccetti P, Grohmann U. IDO and regulatory T cells: a role for reverse signalling and non-canonical NF-kappaB activation. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 817-23.
48. Roelen DL, van den Boogaardt DE, van Miert PP, Koekkoek K, Offringa R, Claas FH. Differentially modulated dendritic cells induce regulatory T cells with different characteristics. *Transpl Immunol* 2008; 19: 220-8.
49. Xia CQ, Peng R, Beato F, Clare-Salzler MJ. Dexamethasone induces IL-10-producing monocyte-derived dendritic cells with durable immaturity. *Scand J Immunol* 2005; 62: 45-54.
50. Bosma BM, Metselaar HJ, Nagtzaam NM, de Haan R, Mancham S, van der Laan LJ, *et al.* Dexamethasone transforms lipopolysaccharide-stimulated human blood myeloid dendritic cells into myeloid dendritic cells that prime interleukin-10 production in T cells. *Immunology* 2008; 125: 91-100.
51. Irusen E, Matthews JG, Takahashi A, Barnes PJ, Chung KF, Adcock IM. p38 Mitogen-activated protein kinase-induced glucocorticoid receptor phosphorylation reduces its activity: role in steroid-insensitive asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109: 649-57.
52. van Galen JC, Kuiper RP, van Emst L, Levers M, Tijchon E, Scheijen B, *et al.* BTG1 regulates glucocorticoid receptor autoinduction in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*.
53. Real PJ, Ferrando AA. NOTCH inhibition and glucocorticoid therapy in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2009; 23: 1374-7.
54. Adams N, Lasserson TJ, Cates CJ, Jones PW. Fluticasone versus beclomethasone or budesonide for chronic asthma in adults and children. *Cochrane Database Syst Rev* 2007; CD002310.
55. Angelucci E, Malesci A, Danese S. Budesonide: teaching an old dog new tricks for inflammatory bowel disease treatment. *Curr Med Chem* 2008; 15: 2527-35.
56. Smit P, Russcher H, de Jong FH, Brinkmann AO, Lamberts SW, Koper JW. Differential regulation of synthetic glucocorticoids on gene expression levels of glucocorticoid-induced leucine zipper and interleukin-2. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 2994-3000.
57. Bruscoli S, Di Virgilio R, Donato V, Velardi E, Baldoni M, Marchetti C, *et al.* Genomic and non-genomic effects of different glucocorticoids on mouse thymocyte apoptosis. *Eur J Pharmacol* 2006; 529: 63-70.
58. Yudt MR, Cidlowski JA. The glucocorticoid receptor: coding a diversity of proteins and responses through a single gene. *Mol Endocrinol* 2002; 16: 1719-26.
59. Schacke H, Berger M, Rehwinkel H, Asadullah K. Selective glucocorticoid receptor agonists (SEGRAs): novel ligands with an improved therapeutic index. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 275: 109-17. ■