



Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Bioquímica Clínica



CIBICI-CONICET



Profundización del mecanismo involucrado en los efectos de Hormonas Tiroideas (HTs) en el inicio de la respuesta inmune adaptativa: Caracterización del Transporte y Metabolismo de HTs en Células Dendríticas.

Trabajo de Tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias Químicas

Presentado por

Nicolás Gigena

Bioquímico

Córdoba, Argentina

2017

Director de Tesis

Dra. Claudia Gabriela Pellizas

Co-Director de Tesis

Dra. Graciela Alicia Cremaschi

Comisión de Tesis

Dr. Víctor Gabriel Morón

Dra. Graciela Borioli

El presente trabajo de tesis fue realizado en mayor parte en el Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología: CIBICI-CONICET- Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Además, ciertos esquemas experimentales fueron desarrollados en el Centro de Investigaciones Biomédicas: BIOMED-CONICET, Pontificia Universidad Católica Argentina; en el Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidad Federal de Río de Janeiro y en el Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidad Federal de Río Grande del Sur, Brasil.

Los subsidios que financiaron este trabajo corresponden a la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SeCyT), el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT, FONCYT) y la Fundación Sales. Se destaca también, que este trabajo fue llevado a cabo durante el desempeño de las siguientes becas: Beca Doctoral asociada al proyecto PICT-2008-0890 (FONCYT), Beca Doctoral Tipo II de CONICET y Beca de la Academia Mundial de Ciencias en colaboración con el Consejo de Investigaciones Científicas de Brasil (TWAS-CNPq).

“...viejo mi querido viejo, ahora ya camina lerdo;
como perdonando el viento, yo soy tu sangre mi viejo
Yo, soy tu silencio y tu tiempo...”

Dedicado a la memoria de mi padre

Jorge Omar Gigena

ABREVIATURAS	9
RESUMEN	12
I - INTRODUCCIÓN	15
I.I – GLÁNDULA Y HORMONAS TIROIDEAS	16
I.I.1 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN	16
I.I.1.1 Biosíntesis de Hormonas Tiroideas	17
I.I.1.2 Fisiología Tiroidea	19
I.I.2 METABOLISMO DE HTs	22
I.I.2.1 Deiodinasa Tipo 1 (D1)	24
I.I.2.2 Deiodinasa Tipo 2 (D2)	25
I.I.2.3 Deiodinasa Tipo 3 (D3)	26
I.I.3 TRANSPORTE CELULAR DE HTs	28
I.I.3.1 Transportador de Monocarboxilatos Tipo 8 (MCT8)	30
I.I.3.2 Transportador de Monocarboxilatos Tipo 10 (MCT10)	31
I.I.3.3 Polipéptido Transportador de Aniones Orgánicos Tipo 1 (OAT1C1)	31
I.I.3.4 Transportadores Heterodiméricos de Aminoácidos Tipo L, Tipo 1 (LAT1) y 2 (LAT2)	32
I.I.4 MECANISMO DE ACCIÓN DE HTs	33

I.II – INTERACCIONES INMUNONEUROENDÓCRINAS	37
I.II.1 SISTEMA INMUNE Y EJE TIROIDEO	39
I.II.1.1 Inicio de la Respuesta Inmune	40
I.II.1.2 Células Dendríticas y Hormonas Tiroideas	43
I.II.1.3 Terapias a base de Células Dendríticas (DCs)	45
II - OBJETIVOS	47
III - MATERIALES Y MÉTODOS	49
III.1 Animales de Experimentación	49
III.2 Preparación y Cultivo de DCs	49
III.3 Extracción de ARN Total	50
III.4 Extractos Proteicos Celulares	51
III.5 Western Blot	51
III. 6 Transcripción Reversa (RT) y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	53
III.7 PCR Cuantitativa (qPCR)	55
III.8 Ensayos de Actividad Enzimática	56
III.9 Ensayos de Transporte de HTs	57
III.10 Citometría de Flujo	58
III.11 Determinación de Citoquinas Solubles	58
III.12 Cultivos Mixtos Leucocitarios	59
III.13 Análisis Estadístico	59

IV - RESULTADOS	60
IV.1 Estudio de los procesos de Transporte Celular de HTs a nivel de DCs	60
IV.1.1 Las DCs murinas transportan HTs de manera efectiva	60
IV.1.2 Las DCs murinas expresan MCT10 y LAT2 como principales THTs	63
IV.1.3 T ₃ regula positivamente el transporte de HTs en DCs	69
IV.2 Análisis del Metabolismo de HTs a nivel de DCs	73
IV.2.1 Las DCs murinas expresan D2 y D3, no D1	73
IV.2.2 Las DCs murinas exhiben capacidad de metabolizar HTs	75
IV.2.3 T ₃ regula el metabolismo de HTs en DCs	77
IV.3 Profundización del estudio de los efectos de HTs sobre las DCs	81
IV.3.1 T ₄ no induce maduración ni cambios fenotípicos en DCs	81
IV.3.2 Los efectos de T ₃ sobre DCs involucran, al menos en parte, la acción de Esfingosina Quinasa I y/o II	83
V - DISCUSIÓN	86
VI - CONCLUSIÓN GENERAL	97
VII - BIBLIOGRAFÍA	98
VIII - PRESENTACIONES EN CONGRESOS	104

IX - PUBLICACIONES	105
---------------------------	------------

X - AGRADECIMIENTOS	x
----------------------------	----------

Ac: Anticuerpo

ARN: Ácido Ribonucleico

BAT: Tejido Adiposo Marrón (del inglés "*brown adipose tissue*")

BSP: Bromosulfataleína

CD: Cluster de Diferenciación (del inglés "*cluster of differentiation*")

CPA: Célula Presentadora de Antígeno

Ds: Deiodinasas (referencia a proteínas)

DIOs: Deiodinasas (referencia a genes)

DC: Célula Dendrítica (del inglés "*Dendritic Cell*")

DEHAL: Iodotirosina Deshalogenasa (del inglés "*Iodotyrosine Dehalogenase*")

DIT: Diiodotironina

ERK: Kinasa extracelular regulada por señales (del inglés "*Extracellular signal-regulated kinase*")

GC: Glucocorticoide

GH: Hormona de Crecimiento (del inglés "*Growth Hormone*")

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (del inglés "*Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*")

HPT: Eje Hipotálamo-Pituitario-Tiroides

HT: Hormona Tiroidea

IL: Interleuquina

INF: Interferón

LAT: Transportador de Aminácidos Neutros Tipo L (del inglés "*Large Amino acid Transporter*")

Leu: Leucina

Li: Linfocito

LPS: Lipopolisacárido

MAPK: Proteín kinasa activada por mitógenos (del inglés *“Mitogen Activated Protein Kinase”*)

MCT: Transportador de Monocarboxilatos

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad (del inglés *“Major Histocompatibility Complex”*)

MIT: Monoiodotironina

NF-κB: Factor Nuclear-κB

NIH: Instituto Nacional de Salud (del inglés *“National Institute of Health”*)

OATP: Péptido transportador de aniones orgánicos

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PG: Prostaglandina

PI3K: Fosfatidilinositol 3 Quinasa (del inglés *“Phosphoinositide 3-Kinase”*)

PKA: Proteína Quinasa A

PKC: Proteína Quinasa C

RPMI: Medio de cultivo del Instituto Roswell Park Memorial (del inglés *“Roswell Park Memorial Institute medium”*)

S1P: Esfingosina 1 Fosfato (del inglés *“Sphingosine 1 Phospate”*)

SFB: Suero Fetal Bovino

SKI: Inhibidor de Esfingosina Quinasa (del inglés *“Sphingosine Kinase Inhibitor”*)

SNC: Sistema Nervioso Central

SphK: Esfingosina Quinasa (del inglés *“Sphingosine Kinase”*)

T₃: 3, 5, 3'-triodo-L-tironina

rT₃: T₃ Reversa

T₄: 3, 5, 3', 5'-tetraiodo-L-tironina, tiroxina

TBG: Globulina Fijadora de Tiroxina (del inglés "*Tiroxine Binding Globulin*")

TCR: Receptor de Linfocitos T (del inglés "*T-cell Receptor*")

Tg: Tiroglobulina

THT: Transportador de Hormonas Tiroideas

TNF: Factor de Necrosis Tumoral del inglés "*Tumoral Necrosis Factor*")

TPO: Tiroperoxidasa

TR: Receptor de Hormonas Tiroideas (del inglés "*Thyroid Hormone Receptor*")

TRE: Elemento de Respuesta a Hormonas Tiroideas (del inglés "*Thyroid Hormone Response Element*")

TRH: Hormona Liberadora de Tirotrófina (del inglés "*Thyrotropin--Releasing Hormone*")

TSH: Tirotrófina

TTR: Transtiretina

La supervivencia de un organismo se basa en la capacidad de las células, tejidos y órganos para comunicarse entre sí, manteniendo un equilibrio y llevando a cabo importantes funciones biológicas. En este sentido, los sistemas neuroendócrino e inmune están en constante comunicación para mantener la homeostasis del organismo y orquestar respuestas coordinadas frente a los distintos desequilibrios y patologías.

Las hormonas tiroideas (HTs) ejercen un rol sobre el inicio de la inmunidad adaptativa. El laboratorio donde se realizó esta Tesis Doctoral proporcionó la primera evidencia de la expresión de receptores de HTs (TR), principalmente la isoforma $\beta 1$, en las principales células presentadoras de antígeno, las células dendríticas (DCs), derivadas de médula ósea de ratón. Se demostró que niveles fisiológicos de triiodotironina (T_3) inducen la maduración de DCs y la secreción de IL-12. Además, DCs estimuladas con T_3 incrementaron la capacidad aloestimuladora de linfocitos T direccionando la respuesta hacia un perfil T helper 1 mediante la activación de una vía de señalización dependiente de Akt y NF- κ B, e independiente de PI3K. También se demostró sobre el mecanismo de acción de las HTs, la capacidad de interactuar con otras hormonas, entre otras con los glucocorticoides (GCs), en la expresión final de determinadas acciones metabólicas específicas de T_3 .

Por otra parte, estudios más recientes y llevados a cabo en el mismo laboratorio, revelaron que T_3 estimula a las DCs murinas, a diversos niveles, favoreciendo tanto su función inductora de la actividad antitumoral antígeno específica del linfocito T, incluyendo una mayor supervivencia y migración a nódulos linfáticos, como así también la capacidad aloestimuladora de células T. Además, se informó que T_3 instruye a las DCs para reforzar las respuestas citotóxicas específicas, mejorando la presentación cruzada de antígeno *in vivo*,

enfazando el potencial que T_3 tiene como potente herramienta en los tratamientos *ex vivo* de DCs.

Dado el creciente conocimiento de la inmunobiología de las DCs y la definición de respuestas antitumorales óptimas, estas células han sido blanco de estudio de estrategias inmunoterapéuticas contra el cáncer. En consecuencia, existe un gran interés por el estudio de la biología celular de DCs para ser aplicada a dichos protocolos. Es por ello que este trabajo de Tesis abordó el estudio de los mecanismos moleculares vinculados al transporte, metabolismo y señalización intracelular de HTs en DCs.

Esta Tesis se dividió en 3 partes, abordando el estudio de los fenómenos asociados al **(1) Transporte** y **(2) Metabolismo** de HTs en DCs, y **(3) la profundización del mecanismo de señalización** involucrado en el efecto de T_3 sobre DCs.

1 - Los resultados obtenidos en esta primera parte revelan la capacidad de las DCs de transportar HTs, tanto hacia el interior como hacia el exterior celular, y evidencian la preferencia de T_3 sobre tiroxina (T_4) en la captación, y de T_4 sobre T_3 en el proceso de eflujo. Además, sugieren fuertemente que los transportadores de HTs MCT10 y/o LAT2 serían las proteínas que participarían en su transporte (captación y/o eflujo) en DCs, poniendo de manifiesto la participación e importancia de MCT10 en la captación y por lo tanto en la acción de T_3 a nivel de DCs. Finalmente, hallazgos posteriores permitieron concluir que el transporte de HTs en DCs se encuentra regulado por T_3 .

2 - Los ensayos realizados en esta segunda parte del trabajo permitieron revelar la capacidad de metabolizar HTs que exhiben las DCs. Se pudo concluir que DCs expresan las Deiodinasas de Iodotironinas Tipo 2 (D2) y Tipo 3 (D3), y que en condiciones basales la expresión proteica y la actividad enzimática de D3 son mayores que las de D2, sugiriendo un rol preponderante de la inactivación de T_3 por D3 en el control de los niveles intracelulares de HTs en DCs. Por otro lado, ensayos posteriores permitieron concluir que T_3 regula a las deiodinasas de iodotironinas en DCs, aumentando la expresión y actividad de D3 y reduciendo la de D2, por lo tanto ejerciendo un control de sus propios niveles intracelulares.

3 - Finalmente, los hallazgos obtenidos en esta tercera y última parte del trabajo permitieron revelar que T_4 no ejerce efectos sobre la maduración y funcionalidad de las DCs, al menos cuando estos parámetros son evaluados mediante la producción y secreción de IL-12. En adición, resultados iniciales obtenidos para indagar la participación de la vía de señalización intracelular mediada por esfingolípidos en el efecto inducido por T_3 sobre las características y funcionalidad de DCs, permitieron concluir que los mismos tendrían, al menos en parte, un rol.

En conjunto, los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral amplían el conocimiento del efecto de HTs en los eventos de inicio de respuestas inmunes adaptativas, revelando el papel central de T_3 y caracterizando en profundidad los mecanismos de transporte de HTs y deiodinación de iodotironinas en estas células.

Viñetas Históricas de la Glándula Tiroides

El reconocimiento de la glándula tiroides como una entidad anatómica y fisiológica surgió como producto de las primeras disecciones humanas, a partir del siglo XVI. Leonardo Da Vinci es reconocido como el primero en dibujar la glándula tiroides como un órgano autónomo (1). Da Vinci inició la confección de un atlas anatómico, aunque no llegó a completarlo. Luego Michelangelo Buonarroti se comprometió a realizar los dibujos para “*De Re Anatomica*” de Realdus Columbus, pero la vejez se lo impidió. La “*Adenographia*” de Thomas Wharton, nombra en 1656 a la glándula tiroides por primera vez y la describe en mayor detalle, intentando asignar inclusive una función a la misma. Por lo tanto, la historia de esta glándula incluye un número interesante de hombres famosos a través de los años, desde Leonardo Da Vinci y Michelangelo Buonarroti hasta Andreas Vesalio y Thomas Wharton.

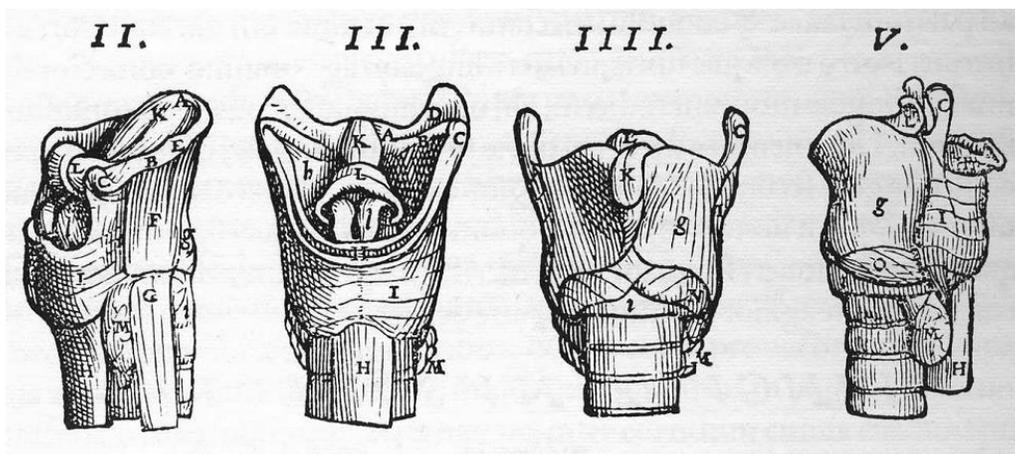


Figura. 1. Ilustración de la Glándula Tiroides por Vesalio en *De Humani Corporis Fabrica*, año 1543.

I.I.1 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

Situada en el cuello, la glándula tiroides es uno de los más grandes órganos endócrinos, con un peso aproximado de entre 15 y 30 gr en adultos. Esta glándula debe su nombre a la palabra griega “Thyros” (escudo), en base a su función protectora sobre la laringe. Embriológicamente, el tejido tiroideo se desarrolla desde la base de la lengua y se ubica finalmente en la cara anterior del cuello durante la gestación.

La glándula madura se compone de dos lóbulos unidos por una banda delgada de tejido, llamada Istmo (***Figura 2A***). En sí, la tiroides está compuesta de unidades funcionales denominadas folículos tiroideos, cuya morfología es esférica y vastamente irrigada por capilares sanguíneos. En el interior del folículo se encuentra un coloide proteico claro que es el constituyente principal de la masa total de la tiroides.

En una sección transversal, el tejido de la tiroides aparece lleno de estructuras estrechas en forma de anillo que presentan una sola capa celular rodeando un lumen. El diámetro de los folículos varía considerablemente de acuerdo al estado funcional, incluso dentro de la misma glándula, pero el promedio es alrededor de 200 μm . El epitelio descansa sobre una membrana basal rica en glicoproteínas que separan las células foliculares de los capilares que las rodean (***Figura 2B***) (2).

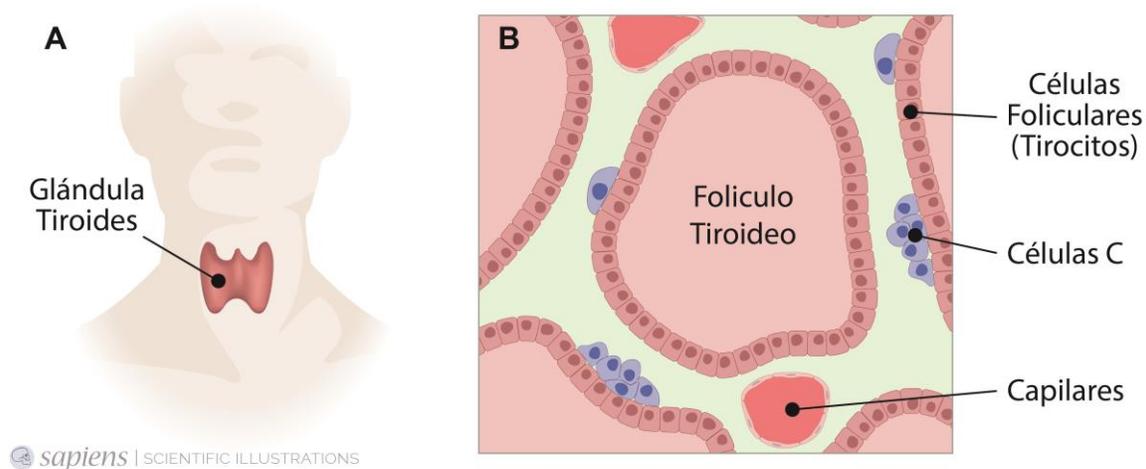


Figura 2. Glándula Tiroides. A) Anatomía de la glándula. B) Unidad funcional tiroidea.

1.1.1.1 Biosíntesis de Hormonas Tiroideas

La función de la tiroides es producir la cantidad de hormonas tiroideas (HTs) necesaria para satisfacer las demandas de los tejidos periféricos. Esto requiere un transporte suficiente de yoduro hacia la célula tiroidea, su transferencia al coloide y su oxidación mediada por la Peroxidasa Tiroidea (TPO) para permitir la síntesis hormonal. Este mecanismo requiere también la síntesis de Tiroglobulina (Tg), una glicoproteína que sirve de matriz para la síntesis de HTs a partir de sus residuos tirosilo que son iodados en el margen apical de la célula folicular tiroidea para formar Diodotirosina (DIT) y Monoiodotirosina (MIT). Por otro lado, TPO produce H_2O_2 que cataliza la oxidación del yoduro y su transferencia a los residuos tirosilo de la Tg. TPO también cataliza el acoplamiento de dos moléculas de DIT o una de DIT y una de MIT, lo que conduce a la formación de 3,5,3',5'-Tetraiodotironina (T_4 -Tiroxina) y 3,3',5-Triiodotironina (T_3), respectivamente. Estas HTs se almacenan en el coloide, pero formando parte aún de la molécula de Tg (**Figura 3**) (2).

El proceso de secreción de T_4 y T_3 involucra la recaptación de la Tg desde el coloide al interior de la célula sin hidrólisis enzimática previa. La Tg presente en el lumen folicular es englobada por pinocitosis mediante extensión de microvellosidades provenientes de la membrana apical dando lugar a la formación de vesículas recubiertas de membrana que se fusionan con lisosomas formando fagolisosomas. Posteriormente, la Tg es digerida en estos fagolisosomas por proteasas específicas para liberar T_4 , T_3 , DIT, y MIT que translocan hacia la parte basal de la célula. T_4 y T_3 se transportan fuera de los fagolisosomas a través de la membrana celular basolateral de la célula y hacia los capilares (2).

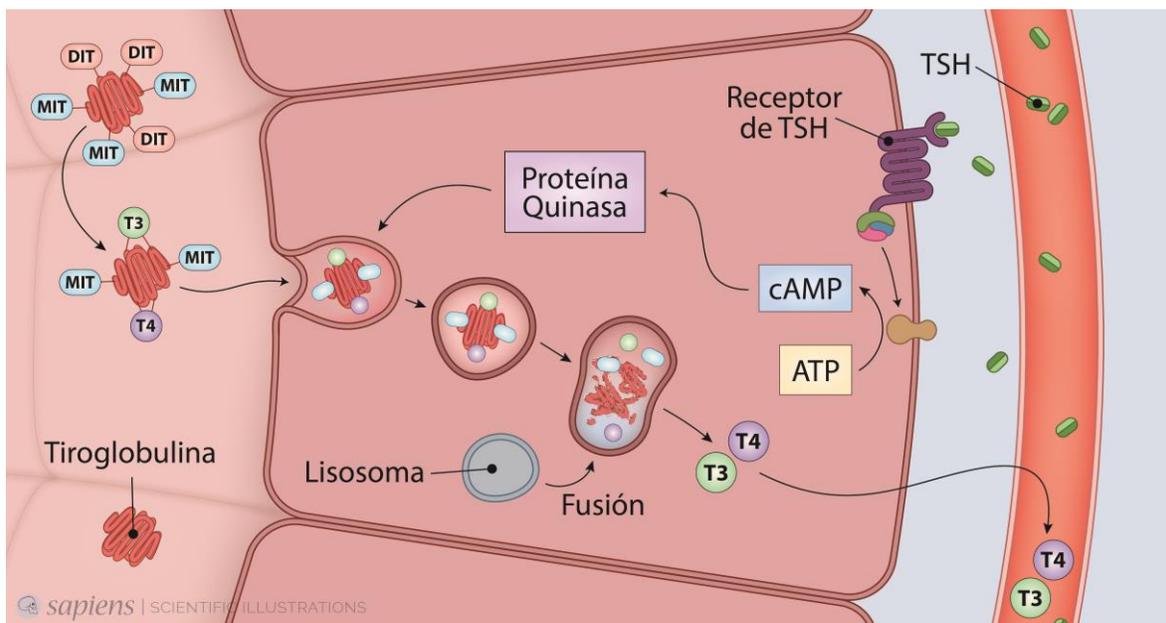


Figura 3. Biosíntesis de Hormonas Tiroideas. Síntesis y secreción de dichas hormonas a circulación. Formación de HTs en el coloide tiroideo, posterior fagocitosis del complejo de formación y subsecuente liberación de las hormonas al torrente sanguíneo.

A su vez, DIT y MIT son deiodinados para permitir el reciclaje del yoduro mediante la acción de la deshalogenasa de yodotirosinas (DEHAL). El yoduro liberado es reciclado a través de su incorporación al pool intratiroideo y rápidamente reorganificado, aunque una mínima fracción

retorna a circulación (3). La elevada cantidad de yoduro recuperada por este mecanismo, destaca la importancia de este proceso de reutilización del halógeno por la célula tiroidea.

La síntesis de las HTs requiere la expresión de un importante número de proteínas y factores de transcripción específicos de las células foliculares tiroideas. Si bien los detalles bioquímicos de estos procesos están más allá del alcance de esta tesis, los aspectos de mayor relevancia para la misma serán abordados en la sección pertinente.

1.1.1.2 Fisiología Tiroidea

Las transformaciones metabólicas que sufren las HTs en los tejidos periféricos determinan y regulan sus efectos biológicos. En consecuencia, la comprensión de la fisiología tiroidea supone un conocimiento acabado de las vías metabólicas de estas hormonas.

La síntesis de HTs requiere de una glándula desarrollada normalmente y de un aporte nutricional de yodo adecuado. Consiste en una serie de complejas reacciones bioquímicas secuenciales, controladas por mecanismos de regulación positiva y negativa gracias al eje Hipotálamo-Pituitaria-Tiroides (HPT) (4).

La glándula tiroides secreta principalmente la pro-hormona T_4 y pequeñas cantidades de la hormona biológicamente activa, T_3 . Si bien la concentración de T_4 total circulante es 50 veces mayor a la de T_3 total, dado que por su carácter lipofílico la mayor cantidad de HTs se encuentra unida a proteínas que facilitan el transporte en el plasma, la T_4 libre (fracción biodisponible) es solo 4 veces mayor a la de T_3 libre (5). Las principales proteínas plasmáticas con las que se asocia T_4 son la Globulina Fijadora de Tiroxina (TBG), la Transtiretina (TTR) y la Albúmina. Por otro lado, la mayor parte de T_3 está unida a TBG, y el resto a albúmina. Debido a que la mayor proporción de T_4 y T_3 circulante está unida a estas proteínas, su concentración, su grado de saturación y la afinidad que las HTs exhiben por ellas son los principales determinantes de la fracción libre hormonal (6).

Por su parte, las concentraciones de hormonas circulantes son mantenidas en el rango eutiroideo por un clásico mecanismo de retroalimentación negativa (**Figura 4**). La Hormona Liberadora de Tirotrófina (TRH) es sintetizada en el hipotálamo y estimula la síntesis y liberación de Tirotrófina (TSH) desde la glándula pituitaria. La TSH actúa a su vez sobre sus receptores específicos en las células foliculares tiroideas estimulando la síntesis y liberación de T_3 y T_4 . La acción de HTs está mediada por la unión a los receptores de HTs TRs. Cuando sus concentraciones aumentan, las HTs pueden inhibir la síntesis y secreción de TRH y TSH en el hipotálamo y pituitaria por unión a los TRs presentes en estos tejidos, completando así la retroalimentación negativa. Este mecanismo mantiene a las HTs y a TSH bajo una relación fisiológica inversa que define al eje HPT (7).

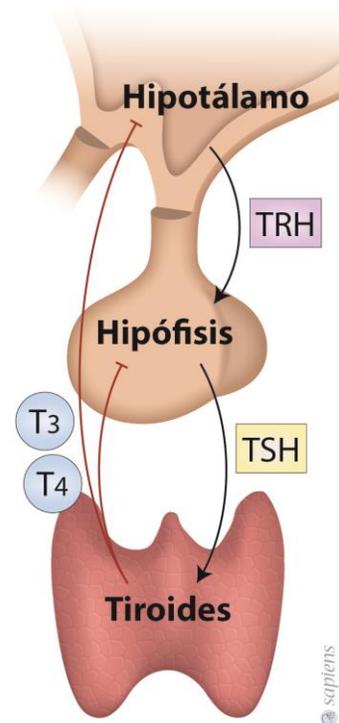


Figura 4. Eje Hipotálamo-Pituitario-Tiroideo. Mecanismo de retroalimentación negativa.

Cabe destacar que, aun siendo la TSH el regulador más importante de la liberación y secreción de HTs, la vía principal para la obtención de la HT biológicamente activa -T₃- en los tejidos blanco de la acción de estas hormonas es vía 5'-deiodinación a partir de T₄, proceso metabólico llevado adelante por enzimas específicas que serán caracterizadas a continuación.

1.1.2 METABOLISMO DE HTs

Las HTs sufren una serie de modificaciones metabólicas intracelulares en sus células blanco, las cuales involucran procesos de activación e inactivación. Existen diferentes sistemas enzimáticos que ejecutan estos procesos, denominados deiodinación, conjugación, deaminación y decarboxilación oxidativa, entre otros (8). Si bien cada uno de estos procesos trae aparejada una relevancia fisiológica, en esta tesis se hará foco en aquellos procesos involucrados en el control metabólico de los niveles intracelulares de las HTs.

La principal vía de metabolización de las HTs es la remoción secuencial de átomos de yodo de las mismas, proceso denominado “Deiodinación de Iodotironinas”. A través de la deiodinación, T_4 puede dar origen a T_3 , T_3 reversa (rT_3), diiodotironinas (T_2), moniodotironinas (T_1) y eventualmente tironina (T_0). Este mecanismo es muy importante ya que a pesar de que la T_4 es el principal producto de secreción de la glándula tiroides, así como el de mayor nivel sérico, su afinidad por los TRs es muy baja comparada con la de T_3 , funcionando principalmente como una pro-hormona (8).

A pesar de que los procesos dependientes de HTs están coordinados, los requerimientos locales particulares no pueden ser gobernados por mecanismos globales. En este sentido, el correcto funcionamiento del organismo requiere de cambios tejido-específicos en la acción de estas hormonas. Así, la expresión de Deiodinasas de Iodotironinas en cada tipo celular resulta en un potente mecanismo de control de los niveles locales de HTs (9).

Al presente se han identificado tres isoformas de deiodinasas de iodotironinas, denominadas D1, D2 y D3 (proteínas) y codificadas por los genes DIO1, DIO2 y DIO3, respectivamente. Difieren entre sí por sus propiedades catalíticas, patrones de expresión tisular y

mecanismos de regulación (**Figura 5**). Las características relevantes para este trabajo de tesis, se resumen en la **Tabla 1**.

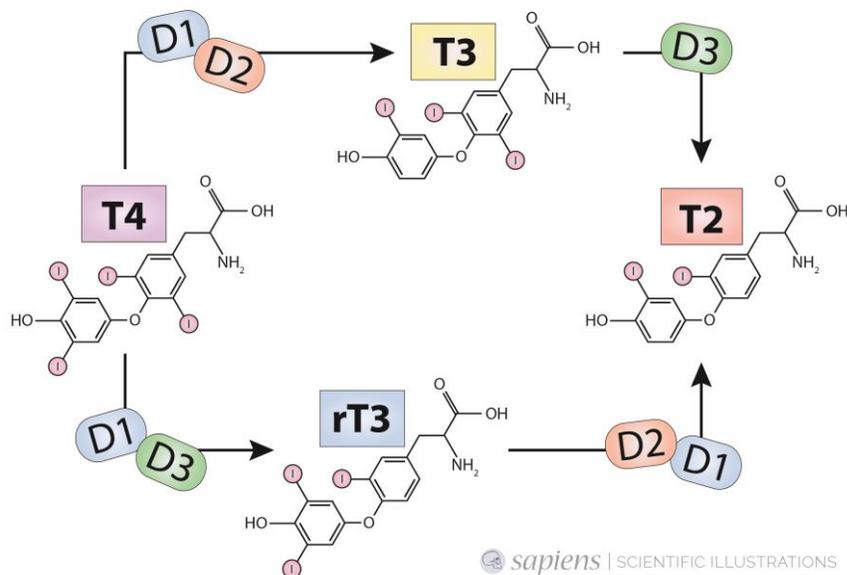


Figura 5: Esquema de deiodinaciones mediadas por DIOs-Ds (D1, D2 y D3).

Para dar como producto T₃, la deiodinación de T₄ debe ocurrir en el anillo externo, reacción catalizada por D1 y D2. Si la deiodinación tiene lugar en el anillo interno, T₄ se convierte en rT₃, la cual carece de actividad biológica. Esta última reacción es catalizada por D3, la cual también puede deiodinar T₃ y así finalizar con la acción de la HT (**Figura 5**). Las tres Ds son generalmente proteínas homodiméricas de aproximadamente 60 kDa, ancladas a membranas celulares (D1 y D3 a la membrana plasmática y D2 a la del retículo endoplásmico) a través de un segmento transmembrana simple.

Tabla 1: Características de las Ds humanas (Adaptado con modificaciones de Ref. 10)

Tipo	Deiodinación	Peso Molecular (monómero)	Expresión
D1	Anillo Interno (5' y 5)	29 kDa	Hígado, Riñón, Tiroides, Pituitaria
D2	Anillo Externo (5')	31 kDa	Pituitaria, Cerebro, BAT*, Tiroides, Corazón, Músculo Esquelético
D3	Anillo Interno (5)	32 kDa	Cerebro, Piel, Útero, Placenta, Feto

*Tejido Adiposo Marrón

A continuación se destacarán las propiedades más sobresalientes de cada deiodinasa, con la finalidad de describir los aspectos biológicos que serán evaluados a posteriori en el contexto de los objetivos de este trabajo de tesis.

1.1.2.1 Deiodinasa Tipo 1 (D1)

D1 está codificada por el gen DIO1 localizado en el ser humano en el cromosoma 1p32-33, que tiene como producto una proteína de 29 kDa en su forma monomérica. Hallazgos obtenidos en estudios de solubilización, permiten inferir que el peso molecular de esta enzima oscila entre 50 y 60 kDa, sugiriendo que la misma podría homodimerizar. La mayor actividad de D1 se localiza en hígado, riñón, tiroides y pituitaria; y se la encuentra ausente en el sistema nervioso central (SNC). Esta enzima posee la propiedad de deiodinar tanto a nivel del anillo externo (en posición 5'), como del interno (en posición 5), aunque la deiodinación en 5' está favorecida (11).

Como se mencionó anteriormente, D1 se ubica en la membrana plasmática de la célula. Esta ubicación explica cómo la T₃ generada en hígado y riñón vía D1 se equilibra rápidamente con los niveles de T₃ plasmática, explicando también la pobre contribución a la T₃ generada localmente para la ocupación de TRs específicos en estos tejidos (8).

Aunque D1 era considerada como la principal fuente de T_3 circulante, esta afirmación fue puesta en duda en los últimos años y aún existe controversia en esta temática (12).

1.1.2.2 Deiodinasa Tipo 2 (D2)

La generación de T_3 a partir de T_4 también se realiza mediante la acción de D2. Esta enzima remueve específicamente yodo del anillo externo (posición 5') con mayor afinidad por T_4 que por rT_3 . La expresión más alta de D2 se encuentra en estados hipotiroideos, se la puede hallar en SNC y pituitaria así como en placenta y BAT; en humanos también se ha descrito en tiroides, músculo esquelético y cardíaco (11).

El gen que codifica a esta enzima se encuentra localizado en el cromosoma humano 14q24.2-q24.3, y la proteína de expresión tiene un peso molecular de 31 kDa. Al igual que las otras Ds, D2 se presenta como homodímero con un peso molecular aproximado de 60 kDa (11). El centro catalítico de la enzima está altamente conservado entre diversas especies desde rata a pollo y humano. La D2 es la responsable de proveer un alto porcentaje de la T_3 intracelular en los tejidos que la expresan, especialmente en SNC (>80%) y pituitaria (50%). Además, en condiciones de eutiroidismo, su actividad provee hasta un 50% del total de la T_3 circulante (13).

La actividad de D2 puede ser inhibida por T_4 , favoreciendo su ubiquitinación y degradación proteosomal. Por otra parte, se ha demostrado una reducción en la actividad de D2 por T_3 (presumiblemente por un mecanismo dependiente del TR) en células pituitarias tumorales. En este sentido, los niveles de ARNm de D2 son regulados positivamente en ratas hipotiroideas (en cerebro, pituitaria y BAT) y negativamente en animales hipertiroideos (13). Estos hallazgos permiten presumir que T_4 y T_3 ejercerían efectos supresores sobre D2 utilizando mecanismos distintos.

Es de destacar que D2 está sometida a una retención estática en el retículo endoplásmico y no alcanza el compartimento de Golgi durante su tráfico. Por lo tanto, D2 genera T_3 en el citoplasma fácilmente accesible al núcleo en virtud de su proximidad física (13).

La actividad enzimática de D2 es esencial para mantener concentraciones locales normales de T_3 en diferentes situaciones, tanto fisiológicas como fisiopatológicas. Junto con el mecanismo de retroalimentación pituitario e hipotalámico, la actividad de D2 ejerce un rol crucial en la regulación de una vasta cantidad de procesos fisiológicos de suma relevancia para la función tiroidea periférica.

1.1.2.3 Deiodinasa Tipo 3 (D3)

Como se ha mencionado, D2 es capaz de generar T_3 a través de la deiodinación de T_4 en lo que se denomina un proceso “activante”. En contraste, D3 inactiva T_3 , y en menor medida, impide que T_4 sea activada (14).

Aunque D1 es capaz de deiodinar T_4 en su anillo interno y generar rT_3 , la enzima específica que cataliza esta reacción es la D3. La mayor actividad enzimática se localiza en placenta, cerebro, piel, hígado, intestino y útero gestante; y la expresión de esta enzima es usualmente mucho mayor en tejidos fetales que adultos. Se cree que su expresión en el feto protege a los órganos en desarrollo de la exposición de la HT activa. Aún en sujetos adultos, D3 parece ser una fuente importante de depuración de T_3 plasmática. Por su parte, la actividad de D3 se encuentra también altamente expresada en ciertos tumores, incluyendo hepatocarcinomas, hemangiomas, carcinomas de células basales y carcinomas tiroideos (15, 16).

El gen DIO3 que codifica a D3 se ubica en el cromosoma humano 14q32, y la proteína tiene como peso molecular 32 kDa en su forma monomérica. Se ha documentado que D3 existe

en células vivas como homodímero (estructura crítica para su actividad biológica) y como heterodímero junto a D1 y/o D2 (17). En cerebro y en piel (pero no en placenta) la actividad de D3 aumenta en el hipertiroidismo y disminuye en el hipotiroidismo, asociado en cerebro con cambios paralelos del ARNm de D3 (10).

D3 regula la concentración local de T_3 , por lo tanto juega un papel crucial en control de la acción de la HT activa a nivel celular en diferentes procesos metabólicos, ya sean fisiológicos o fisiopatológicos. Ha sido demostrado que la expresión región-específica de D3 en cerebro humano fetal y adulto correlaciona negativamente con los niveles de T_3 . También se ha vinculado el aumento de la expresión de D3 con enfermedades severas, siendo parte del “Síndrome de T_3 baja” o “Enfermedades No-Tiroideas” (18).

En conclusión, D2 le confiere a la célula la capacidad de producir cantidades adicionales de T_3 e incrementar la señalización de la HT. En contraste, la expresión de D3 resulta en acciones opuestas. Cabe destacar, que estos eventos ocurren en la célula sin cambios en los niveles plasmáticos de las HTs. Por lo tanto, las concentraciones séricas de estas hormonas no reflejan de manera fiel la señalización de las mismas dentro de la célula (19).

I.1.3 TRANSPORTE CELULAR DE HTs

La potencia biológica de las HTs es en gran parte determinada por su concentración intracelular, que es entre otras cosas, dependiente de su transporte a través de la membrana celular. Por consecuencia, dicho proceso es esencial para la acción de estas hormonas sobre el metabolismo celular (20).

Durante muchos años se sostuvo que las HTs atravesaban la membrana plasmática mediante difusión pasiva. Este pensamiento, basado en la estructura lipofílica de las HTs, ha sido actualizado gracias al mayor conocimiento adquirido sobre los mecanismos implicados en el transporte de las HTs a través de las membranas plasmática y nuclear de las células. Al respecto, en 2003 se publicaron los primeros hallazgos demostrando que la distribución intracelular de las HTs depende de la presencia de mecanismos activos de transporte transmembrana ejercidos por proteínas que reciben el nombre de Transportadores de HTs (THTs). Todos estos transportadores poseen característicamente 12 pasos transmembrana (**Figura 6**), pero debido a las fuertes diferencias de secuencia proteica entre ellos, es poco probable una conformación única (21).

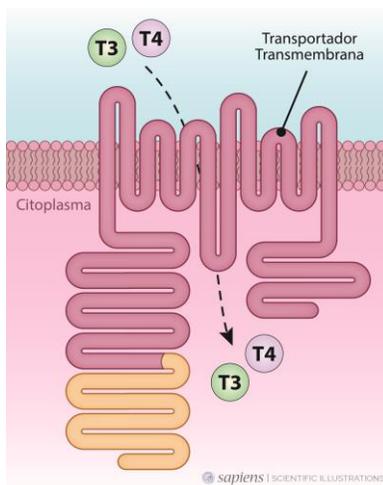


Figura 6: Transporte celular. Estructura general de los transportadores de HTs.

Hasta la fecha han sido identificados varios transportadores con alta afinidad por HTs, pero con diferentes patrones de expresión tisular. Si bien existe una lista creciente de proteínas capaces de transportar HTs a través de la membrana plasmática, muchos de ellos son promiscuos, uniendo un espectro demasiado amplio de ligandos (21).

Los principales THTs incluyen transportadores heterodiméricos de aminoácidos de tipo L (LAT): LAT1 y LAT2, varios miembros de la familia de polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OATP), y los transportadores de monocarboxilatos (MCT): MCT8 y MCT10 (**Tabla 2**).

Tabla 2: Transportadores de hormonas tiroideas (Adaptado con modificaciones de Ref. 4)

Transportador	Iodotironina transportada	Especificidad ^a	Expresión
MCT8	$T_3 > T_4 > rT_3 \sim T_2$	+++	Hígado, Riñón, Cerebro, Corazón, Músculo Esquelético, Placenta, Tiroides, Testículo
MCT10	$T_3 > T_4$	++	Intestino, Riñón, Hígado, Músculo Esquelético, Corazón, Placenta, Páncreas, Cerebro
OATP1C1	$T_4 > rT_3 > T_3$	++	Cerebro, Testículo
LAT1	$T_3 > T_4 > rT_3 > T_2$	+	Múltiple (Tumores, Cerebro, Bazo, Placenta, Testículo, Colon, Riñón, Intestino, Estómago, Ovario, Timo)
LAT2	$T_3 > T_4 > rT_3 > T_2$	+	Riñón, Placenta, Cerebro, Intestino, Testículo, Ovario, Hígado, Corazón, Músculo Esquelético, Pulmón, Estómago

^a Si un transportador sólo transporta iodotironinas, la especificidad es alta (+++). Si se conocen menos de otros cinco ligandos, la especificidad es moderada (++). Si se conocen más de cinco ligandos, el transportador se denota como multiespecífico (+).

A continuación, se destacarán las características más importantes de cada THT, con la finalidad de describir aquellas de relevancia en el contexto de este trabajo de Tesis Doctoral.

1.1.3.1 Transportador de Monocarboxilatos Tipo 8 (MCT8)

MCT8, también conocido como SLC16A2, fue identificado como el primer transportador específico de T_4 y T_3 , y además transporta sus metabolitos inactivos, rT_3 y $3,3'$ - T_2 . En este sentido, el transporte de T_3 es mayor que el de T_4 o rT_3 , respectivamente ($T_3 > T_4 > rT_3 \sim 3,3'$ - T_2) (**Tabla 2**). Es importante destacar que, para que los sustratos puedan ser transportados por MCT8 en humanos, deben poseer al menos un átomo de yodo por anillo aromático, preferentemente en posición 3 y 3', respectivamente (22).

El gen MCT8 humano se encuentra en el cromosoma Xq13.2. Sus seis exones codifican una proteína con 12 dominios transmembrana, y los dominios amino y carboxilo terminales tienen una localización citoplasmática (22). En humanos, MCT8 puede expresarse como una proteína grande de 613 aminoácidos o una más pequeña, de 539 aminoácidos. Este tamaño dependerá del sitio de inicio de la transcripción utilizado (23).

Se ha demostrado expresión de MCT8 en muchos tejidos, incluyendo el hígado, riñón, corazón, músculo esquelético, cerebro y tiroides (**Tabla 2**). Las mutaciones en el gen de MCT8 (codificado en el cromosoma X) causan un síndrome de retraso psicomotor grave con altos niveles de T_3 en suero de pacientes masculinos afectados, conocido como el síndrome de Allan-Herndon-Dudley (24). El descubrimiento de este transportador y su influencia clínica han motivado el estudio de los fenómenos de transporte celular de HTs convirtiendo este tópico en la rama de mayor auge dentro del campo de investigación en tiroides de los últimos años.

1.1.3.2 Transportador de Monocarboxilatos Tipo 10 (MCT10)

MCT10, también conocido como SLC16A10 o TAT1, también pertenece a la familia MCT. Transporta aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano) de una manera independiente de sodio y protones. Dentro de su familia, MCT10 es el que más estrechamente relacionado con MCT8 se encuentra, con una homología del 49%. La estructura del gen y la proteína es similar a la de MCT8. Contiene seis exones, que codifican para una proteína de 515 aminoácidos. Tiene una estructura típica de transportador con 12 pasos transmembrana, y a semejanza de MCT8, ambos extremos terminales proteicos se encuentran orientados hacia el interior celular (22).

MCT10 fue identificado como transportador para aminoácidos aromáticos y más tarde se demostró que es tan activo para el transporte de HTs como MCT8. MCT10 facilita el transporte tanto de T_4 como de T_3 , pero con preferencia por T_3 . De la misma manera que MCT8, MCT10 transporta bidireccionalmente HTs a través de la membrana plasmática (25). La información sobre la función y expresión de MCT10 es más limitada. Sin embargo, se sabe que se expresa de forma ubicua en intestino, riñón, hígado, músculo, placenta, etc. (**Tabla 2**).

1.1.3.3 Polipéptido Transportador de Aniones Orgánicos Tipo 1C1 (OATP1C1)

OATP1C1, también conocido como SLCO1C1, pertenece a la familia OATP. Todos los miembros de esta familia muestran un espectro amplio en cuanto a sustratos, ya que además de HTs transportan ácidos biliares, hormonas esteroideas y ciertas drogas (25). El análisis funcional de uno de los miembros de esta familia: OATP1C1, reveló que T_4 y rT_3 son sustratos de alta afinidad, mientras que la captación específica de T_3 es aproximadamente 5 veces menor que la de T_4 y rT_3 ($T_4 \sim rT_3 > T_3$) (**Tabla 2**).

En el humano el gen de OATP1C1 se localiza en el locus 12p12.2. Codifica para una proteína de 712 aminoácidos y contiene los 12 dominios transmembrana típicos. Se cree que la expresión de OATP1C1 es prácticamente exclusiva del endotelio vascular en los capilares del cerebro y de las células de Leydig del testículo (26).

En relación al transporte de HTs, se ha sugerido que la principal acción de OATP1C1 sería mediar la captación de T_4 a través de la barrera hematoencefálica, desde la sangre hacia el cerebro, para posteriormente ser convertida de manera local en T_3 activa, y que finalmente ésta sea transportada al interior de las neuronas gracias a MCT8 (27).

1.1.3.4 Transportadores Heterodiméricos de Aminoácidos Tipo L, Tipo 1 (LAT1) y 2 (LAT2)

Los transportadores de aminoácidos de tipo L son heterodímeros con una cadena ligera de 12 dominios transmembrana y una cadena pesada glicosilada con un único dominio transmembrana. Estas proteínas transportan aminoácidos neutros, tales como leucina, fenilalanina y tirosina, mediando un intercambio de aminoácidos en lugar de un transporte unidireccional (23).

La subunidad 1 (comúnmente conocida como LAT1 y codificada por el gen SLC7A5) y la subunidad 2 (LAT2, codificada por el gen SLC7A8) son transportadores independientes de sodio que, además de aminoácidos, transportan HTs con diferente afinidad (**Tabla 2**). LAT1 y LAT2 se expresan en diversos tejidos como en las membranas luminal y basal de las células endoteliales de los capilares cerebrales, riñón, placenta, cerebro, intestino, testículo, ovario y estómago; mientras que LAT1 además está muy expresado en células tumorales (**Tabla 2**). LAT1 está abundantemente expresado en la barrera hematoencefálica, donde exhibe una mayor afinidad por sus sustratos que en los tejidos periféricos (22, 28).

I.1.4 MECANISMO DE ACCIÓN DE HTs

Las HTs son esenciales para el desarrollo normal, la diferenciación y el equilibrio metabólico. La acción de estas hormonas está principalmente mediada por TRs nucleares, responsables de las principales funciones de estas hormonas (**Figura 7**) que actúan como factores de transcripción dependientes de ligando (29).

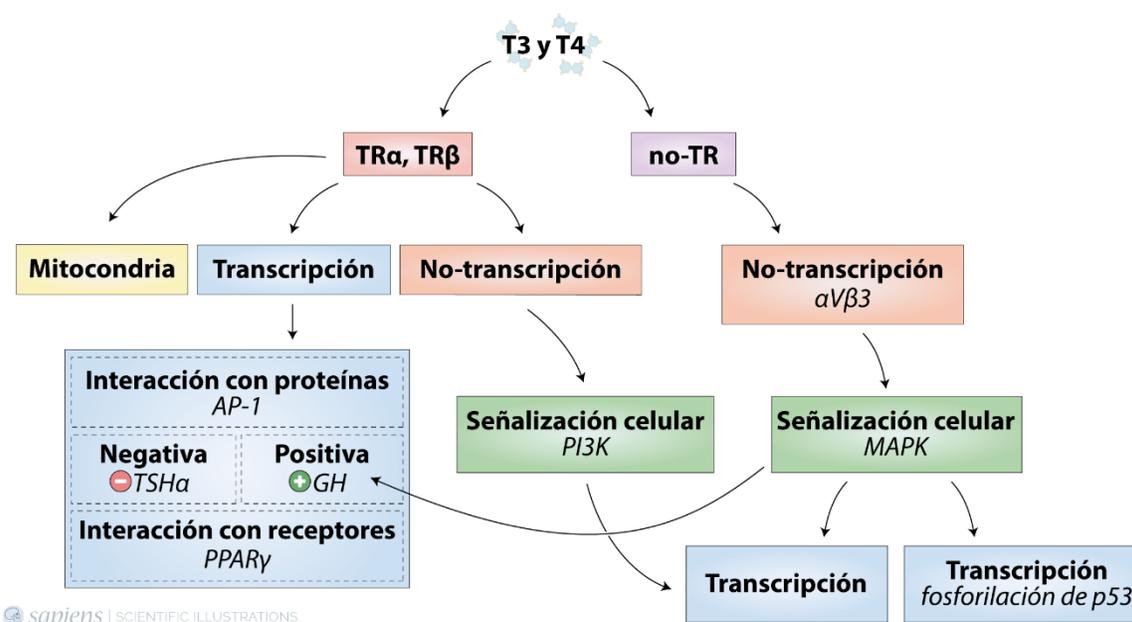


Figura 7: Señalización dependiente de Hormonas Tiroideas. Tipos de receptores, proteínas celulares y cascadas de señalización reguladas por HTs.

Se ha comprobado que existen dos isoformas principales de TRs, con diferentes patrones de expresión en el desarrollo y en los tejidos adultos. Las mismas están codificadas en 2 genes: TRA y TRB, que por procesos de empalme (“splicing”) alternativo o por la elección de diferentes promotores respectivamente, generan diversas variantes que aumentan aún más la heterogeneidad. El gen TRA da origen a TRα1, un receptor con capacidad de unión a T₃ y que se

expresa predominantemente en cerebro, corazón y músculo esquelético. TRA también origina otros dos productos sin capacidad de unión a la hormona activa, TR α 2 y TR α 3, y varias formas truncadas adicionales. Por su parte, a partir del gen TRB se generan cuatro isoformas a través de la elección de un promotor alternativo: TR β 1, TR β 2, TR β 3 y TR $\Delta\beta$ 3. Entre ellas: TR β 1, ampliamente distribuida, TR β 2 que se expresa principalmente en cerebro, retina y oído interno y TR β 3, en riñón, hígado y pulmón. Todas ellas tienen capacidad de unir T₃ (29).

Las distintas isoformas de los TRs difieren en longitud en ambos extremos amino y carboxi-terminal. Las diferencias fundamentales en el dominio de unión al ligando, han permitido el diseño de agonistas que interactúan específicamente con TR α o TR β . Por otro lado, la genética humana, modelos animales y el uso de agonistas farmacológicos selectivos han sido herramientas importantes para obtener información sobre el papel y la especificidad de las dos isoformas principales (30).

Los TRs se encuentran principalmente ubicados en el núcleo (o eventualmente pueden trasladarse desde el citoplasma al núcleo para regular la expresión génica). Cuando las HTs ingresan a la célula, se unen a sus receptores, que se encuentran constitutivamente unidos a secuencias específicas de ADN presentes en los genes blanco de su acción, denominadas elementos de respuesta a HTs (TRE). En los genes regulados positivamente por la T₃ y en ausencia de ligando, este complejo TR-TRE interactúa con diversas moléculas proteicas denominadas *correpresores*. Dicha interacción hace que el TR actúe como un represor constitutivo. Por su parte, cuando T₃ se une al complejo TR-TRE, la unión con correpresores se debilita, y por el contrario, el complejo interacciona ahora con proteínas *coactivadoras*. Esta nueva conformación, induce cambios conformacionales en la cromatina que dejan a los genes accesibles para que actúe la maquinaria transcripcional (31).

Los productos resultantes de la expresión de los genes blanco, a su vez median las acciones clásicas de las HTs en muchas funciones homeostáticas de las células y en la morfogénesis durante el desarrollo embrionario. Es de destacar que los efectos genómicos pueden requerir horas para manifestarse.

En contraste, algunos efectos de las HTs se producen rápidamente (segundos a minutos) y no se ven afectados por los inhibidores de la transcripción o traducción. Dichos efectos se denominan acciones no-genómicas de las HTs (32). Estas acciones pueden iniciarse tanto en la membrana plasmática, en citoplasma o en algunas organelas (mitocondrias). Entre los efectos iniciados en la membrana plasmática se incluyen la modulación del transporte de iones y glucosa a través de la activación de la proteína quinasa C (PKC) y A (PKA), varias proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs), como lo son las quinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK1/2), y también fosfolipasas C y D. En este sentido, se ha demostrado que una proteína estructural de membrana plasmática, la integrina $\alpha_v\beta_3$, puede actuar como un receptor de superficie celular para HTs (33). A través de esta proteína, la HT puede activar tanto la vía de ERK1/2 como la de Fosfatidilinositol-3-Quinasa (PI3K). Las consecuencias de dicha activación incluyen el tráfico intracelular de proteínas, angiogénesis y proliferación de células tumorales (32).

Entre los efectos no mediados por TRs nucleares, varias acciones rápidas ejercidas por T_3 han sido vinculadas con la activación de PI3K en células alveolares (34) y en fibroblastos humanos (35). A su vez, la activación de Akt, un evento crítico para el crecimiento y supervivencia celular (36), ha sido demostrada en células pancreáticas β , involucrando la activación de PI3K-p85 dependiente de TR β 1 citoplasmático (37).

En otro sentido, una de las funciones de los lípidos en el contexto de la biología celular es su capacidad de regular procesos cruciales para la vida de las células. En particular, los

“esfingolípidos” se han revelado como elementos claves en las cascadas de transducción de señales que regulan eventos como crecimiento, diferenciación y muerte celular. Los mismos tienen doble papel como moléculas bioactivas: por un lado actúan como segundos mensajeros en la transducción de señales extracelulares, regulando la dinámica de las membranas biológicas formando parte de los microdominios llamados “*lipid rafts*”. Consecuentemente, la biología de los esfingolípidos se ha convertido en un blanco importante para la investigación en la señalización celular. Los principales esfingolípidos bioactivos incluyen: ceramida, esfingosina, ceramida-1-fosfato y esfingosina-1-fosfato (S1P). La concentración de estos esfingolípidos está finamente reguladas a través del balance entre su síntesis enzimática y su defosforilación reversible (principalmente para S1P, producido por esfingosina quinasa (Sphk) I y II, cuya actividad sobre el sistema inmune es bien conocida) (38).

Es de destacar que existe evidencia de que dichos esfingolípidos están involucrados en la activación no-clásica de Akt. En este sentido, un incremento en la acción de la esfingomielinasa ácida (enzima que degrada esfingomielina), producida por estimulación exógena, produce una mayor activación de Akt (39). En contraparte, ceramida es capaz de inhibir la fosforilación de Akt, ya que impide la translocación de Akt a la membrana (40). En adición, ceramida-1-fosfato, a través de la activación de PI3K/Akt, promueve la supervivencia y proliferación de macrófagos (41, 42).

I.II – INTERACCIONES INMUNONEUROENDÓCRINAS

Las interacciones multidireccionales entre los sistemas inmune, endócrino y nervioso han sido demostradas en humanos y en modelos animales durante muchas décadas. Éstas tienen lugar a través de citoquinas, hormonas, neurotransmisores y sus receptores, que son comunes en las células de estos sistemas, conduciendo a distintos fenotipos inmunoneuroendócrinos. La supervivencia de un organismo se basa en la capacidad de las células, tejidos y órganos para comunicarse entre sí, manteniendo la homeostasis y llevando a cabo importantes funciones biológicas (**Figura 8**) (43).

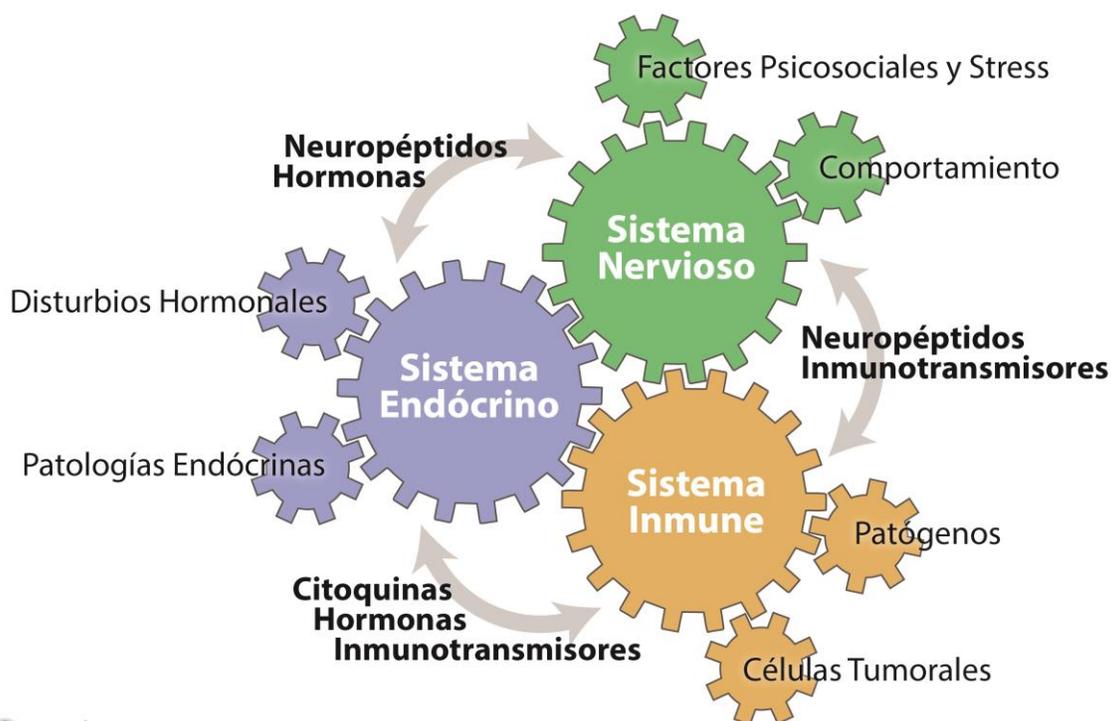


Figura 8: Interacciones Inmunoneuroendócrinas.

Las células inmunes pueden detectar agentes patógenos (virus, bacterias, hongos, células tumorales) y secretar proteínas que modifican a las células del sistema neuroendocrino, causando los síntomas de enfermedad después de la infección. En contraparte, los factores secretados por el sistema neuroendócrino pueden provocar cambios en la actividad de las células inmunes (44).

Las observaciones iniciales que demostraron los efectos de los factores neuroendócrinos sobre el sistema inmune fueron reportadas por patólogos que descubrieron que alteraciones hormonales podrían influir en el tamaño del timo (45). Por su parte, Selye y Fortier revelaron hace muchos años las primeras evidencias de que tanto estresores físicos como patológicos causan la activación del eje Hipotálamo-Pituitario-Adrenal (HPA), lo que produce la contracción del timo y de otros órganos linfáticos (46). Además, varios reportes han demostrado que el tratamiento con hormonas esteroideas produce la modificación de la función inmune. La exposición a dichas hormonas conduce a una alteración en la capacidad de estas células para responder a agentes infecciosos y otros patógenos (47, 48).

Si bien se reconoce que el sistema endócrino regula las respuestas metabólicas a través de la síntesis y liberación de hormonas específicas, mientras que el sistema inmune modula la actividad de las células inmunes mediante la liberación de citoquinas y péptidos (49), se ha demostrado que las células inmunes y las células endócrinas expresan receptores, tanto para citoquinas como para hormonas. En este sentido, las células inmunes pueden unirse a diferentes hormonas, neurotransmisores y neuropéptidos, y la actividad biológica de varias células neuroendocrinas puede ser modulada por citoquinas (50).

El estudio de las interacciones inmunoneuroendócrinas tiene un gran potencial para favorecer la comprensión acerca de los mecanismos involucrados en la coordinación de estos 3 sistemas para regular la homeostasis del organismo ante los cambios del medio ambiente (43).

I.II.1 SISTEMA INMUNE Y EJE TIROIDEO

En humanos adultos normales, las HTs modulan respuestas inmunes específicas, incluyendo inmunidad mediada por células, actividad de células NK, la acción antiviral del Interferón (IFN)- γ y la proliferación de linfocitos T y B (51).

Aunque el volumen de información sobre la relación entre las HTs y la inmunidad es relativamente grande, los datos son a veces difíciles de interpretar o incluso contradictorios (49). En relación a ello, las investigaciones están preferentemente focalizadas en la biología de los linfocitos B y T, evidenciando la contribución de las HTs en la modulación de actividades inmunes, tales como quimiotaxis, fagocitosis y explosión respiratoria en macrófagos y neutrófilos, y como la actividad citolítica y síntesis de citoquinas en linfocitos. Incluso, la presencia de receptores funcionales para HTs en los linfocitos, así como las frecuentes alteraciones inmunes observadas durante las fluctuaciones fisiológicas o patológicas de las HTs, refuerzan las interacciones entre dichas hormonas y el sistema inmune (33).

Para analizar el papel que las HTs ejercen sobre la inmunidad, se ha estudiado de qué manera afecta el eje HPT a la función inmune en individuos y animales con diferente estado tiroideo, pero sin patología autoinmune. El hipotiroidismo en los seres humanos, así como el hipotiroidismo experimental inducido por agentes antitiroideos o por tiroidectomía en roedores, se ha relacionado con la disminución de la actividad del timo, involución del bazo y ganglios linfáticos, y la supresión de la respuesta inmune humoral y mediada por células (52). Las consecuencias inmunológicas del hipotiroidismo incluyen el aumento de la severidad de la infección por el virus sincicial respiratorio (53) y puede contribuir a un mal pronóstico en los pacientes con enfermedades virales, sépticas o graves (54, 55, 56).

Por otro lado, existen resultados contradictorios en la literatura sobre los efectos del hipertiroidismo sobre el sistema inmune. De hecho, se demostró que la condición hipertiroidica puede conducir tanto a la supresión (57) como al incremento (58, 59) de las respuestas de anticuerpos (Acs) primarios o en la proliferación de linfocitos B y T (60). En sintonía con estos efectos controversiales, el tratamiento crónico con T_4 , la hormona que habitualmente se utiliza en terapias de reemplazo hipotiroideo, produjo un incremento en las respuestas de Acs específicos y en los niveles de citoquinas proinflamatorias en ratones (57, 58). Por el contrario, el tratamiento con dosis más altas de T_4 por tiempos cortos (3 a 7 días) indujo una disminución en la expresión de citoquinas y el deterioro de la respuesta de los linfocitos a la estimulación con mitógenos (61).

En este contexto, y a pesar de los avances obtenidos en el campo de la interacción entre las HTs y el sistema inmune, el estudio del efecto de estas hormonas en los eventos de inicio de la respuesta inmune y el direccionamiento de respuestas adaptativas es limitado (62), y fue fundamentalmente iniciado una década atrás en el laboratorio donde se realizó este trabajo de Tesis Doctoral.

1.II.1.1 Inicio de la Respuesta Inmune

Las respuestas inmunes son orquestadas por un grupo diverso de células funcionalmente especializadas y altamente diferenciadas (63). Las células dendríticas (DCs), protagonistas estelares de este grupo, son células presentadoras de antígenos (CPA) profesionales que cumplen una función crítica en la inducción y regulación de la respuesta inmune adaptativa, ya que son las células más eficientes en estimular a linfocitos T vírgenes e iniciar una respuesta inmune adaptativa. Residen en la mayoría de los tejidos periféricos, particularmente en sitios de interfase con el medio ambiente (piel y mucosas) (64). Constituyen una población heterogénea de células,

cuya característica común es la capacidad de captar, procesar y presentar antígenos a los linfocitos T, orientando luego el desarrollo de respuestas inmunes efectoras (63).

A pesar de que el estudio de las DCs ha sido complicado por su similitud con otros linajes hematopoyéticos, particularmente monocitos y macrófagos, se ha logrado caracterizar un espectro amplio de estados madurativos y funcionales. A los fines didácticos y en relación a los objetivos de este trabajo de Tesis, se realizará una simplificación didáctica de los polos opuestos, considerando que estas células se encuentran en dos estadios principales que difieren sustancialmente en su fenotipo y funcionalidad: (i) DC inmaduras (DCi) y (ii) DC maduras (DCm) **(Figura 9).**

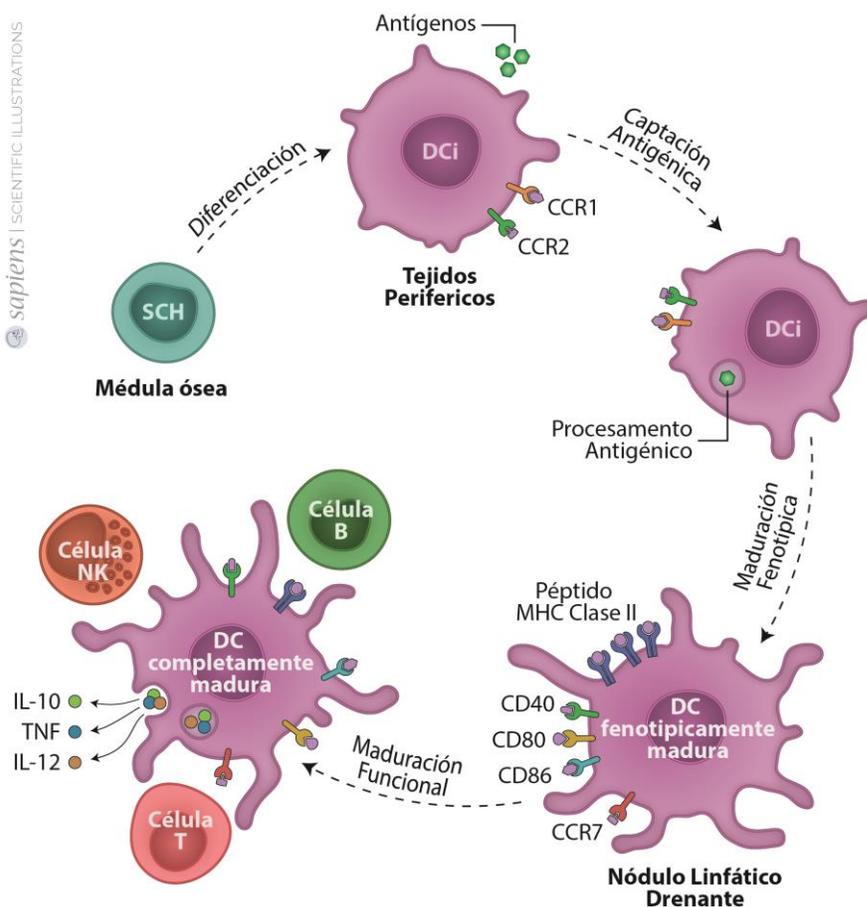


Figura 9. Biología de la Célula Dendrítica. Diferenciación y maduración.

Las DCi, en ausencia de procesos inflamatorios y de respuesta inmune, se encuentran recorriendo y censando los tejidos periféricos, el sistema circulatorio sanguíneo y linfático, y los órganos linfoides secundarios (65). En la periferia, estas células captan antígenos a través de dos mecanismos: macropinocitosis o endocitosis mediada por receptores. Así, las DCi responden incrementando su maquinaria de captación antigénica y de procesamiento frente al reconocimiento directo de antígenos patogénicos o a través del reconocimiento vía receptores para inmunoglobulinas y/o receptores del complemento. Por su parte, las DCi también se activan indirectamente al reconocer señales de alerta en el microambiente, tales como mediadores de la respuesta inflamatoria (factor de necrosis tumoral (TNF)- α , interleuquina (IL)-1 β , prostaglandina (PG) E-2, etc.) o moléculas intracelulares (señales de alerta) provenientes de células necróticas o dañadas (proteínas de shock térmico, ATP, UTP, ácido úrico) (66). En respuesta a estas señales, las DCi inician un programa de diferenciación llamado “maduración” a través del cual se convierten en CPA profesionales capaces de activar linfocitos T vírgenes.

Durante el proceso de maduración, las DCs reducen su capacidad endocítica a través de una disminución en la expresión de receptores antigénicos y menor capacidad fagocítica y macropinocítica. A su vez, las DCs incrementan la expresión del receptor de quimioquinas CCR7, cuyos ligandos (CCL19 y CCL21) son expresados por células endoteliales de los órganos linfáticos secundarios, sitios a los cuales se dirigen las DCs que han iniciado su proceso de maduración. Por su parte, las DCm expresan niveles elevados de las moléculas coestimuladoras CD40, CD80 y CD86 y muestran un aumento marcado en la expresión de complejos péptido antigénico/molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (67).

La interacción de DCm con linfocitos (Li) T vírgenes en los órganos linfáticos secundarios, gatilla la respuesta inmune adaptativa. El fenotipo final de los Li T estimulados dependerá de: a) el subtipo de DC, b) los receptores estimulados, c) el tipo y la dosis del antígeno, d) la vía de inmunización y e) el microambiente circundante a la CPA (63). Para que un Li T virgen comience su activación, se requieren dos señales provenientes de la unión con la DC: la primera, está dada por reconocimiento del péptido antigénico presentado por las moléculas del MHC, a través del Receptor de Células T (TCR). La segunda, es provista por moléculas coestimuladoras expresadas en la DC (CD80, DC86), que interactúan con sus ligandos, expresados en el linfocito T (CD28) (68). Estas señales inician la proliferación de los Li T, pero en ausencia de una citoquina polarizante, estas células no desarrollan una función efectora óptima. Debido a que la presencia de estas citoquinas es necesaria para una respuesta eficiente, se la ha denominado “tercera señal” (69).

1.II.1.2 Células Dendríticas y Hormonas Tiroideas

A comienzos de la década de 1990, resultados reportados por Mooij y sus colaboradores, demostraron que la estimulación de monocitos periféricos con HTs (tanto T₃ como T₄, y en menor medida rT₃) tenía un impacto sobre la diferenciación de estas células a DCs (70). Desde entonces y durante más de una década no se hicieron reportes que estudien con profundidad los efectos que las HTs pueden ejercer sobre estas células. En el año 2008, el grupo de trabajo donde se realizó esta Tesis Doctoral, proporcionó la primera evidencia de la expresión de TRs en DCs derivadas de médula ósea de ratón, tanto en DCi, como en DCs maduras con lipopolisacárido (LPS). Estas células presentan principalmente la isoforma TRβ1, con una sorprendente localización intracelular preferentemente citoplasmática. Se demostró además, que niveles fisiológicos de T₃ estimularon la expresión de marcadores de maduración en las DCs (MHC-II y moléculas coestimuladoras: CD80,

CD86 y CD40), aumentaron notablemente la secreción de IL-12 e incrementaron la capacidad de las DCs para inducir la proliferación y producción de INF- γ en células T vírgenes alogénicas (71).

El análisis posterior de las vías involucradas en los efectos que se habían reportado, reveló que la acción de T₃ sobre DCs es mediada, al menos en parte, por un mecanismo dependiente de TR β 1, a través de una vía de señalización intracelular que involucra a los efectores Akt y NF- κ B. En este sentido, fue demostrada por primera vez la participación de la vía de Akt independiente de la activación de PI3K, como responsable de la acción de T₃. Además se describió el rol esencial de TR β 1 en este efecto, como así también a NF- κ B como un nuevo factor de transcripción responsable de la expresión de este TR (72).

En estudios posteriores, el laboratorio demostró la capacidad de Dexametasona (glucocorticoide de síntesis) de contrarrestar los efectos inducidos por T₃ sobre la DC, efecto que estaría asociado a interferencias con este mecanismo de señalización intracelular y los eventos relacionados (73).

De manera consistente con los resultados iniciales de este grupo de trabajo, simultáneamente se reportó que el estado metabólico tiroideo influye en el fenotipo y función de las DCs humanas *in vivo*. En estos reportes, ensayos *in vitro* analizaron la influencia directa de las HTs sobre las DCs humanas, demostrando que T₃ tiene la capacidad de incrementar la expresión del marcador de maduración CD86 en las mismas (74).

Por otro lado, y en contraste con los importantes hallazgos obtenidos previamente en relación a los efectos inducidos por T₃ en DCs murinas con receptores de HTs tipo TR β 1 intactos (71, 72, 73), el laboratorio donde se realizó este trabajo de Tesis determinó que T₃ no pudo desencadenar efectos de maduración en DCs de ratones homocigotas “*knock-in*” para TR β 1 (TR β 1-PV). Curiosamente, las DCs tratadas con T₃ provenientes de estos ratones, exhibían una capacidad aloestimuladora de células T disminuida y una activación alterada de Akt en comparación con DCs

provenientes de ratones control (75). Estos hallazgos ponderan el papel crítico de la expresión de TR β 1 intacto en el control de la función y señalización dependiente de T_3 en DCs murinas.

I.II.1.3 Terapias a base de Células Dendríticas

Considerando la plasticidad y demás características únicas que exhibe la DC, se han diseñado estrategias de vacunación antitumoral a base de estas células (76). En este sentido, el objetivo principal de estas terapias basadas en DCs, es lograr inducir respuestas mediadas por células T específicas de tumor que sean de larga duración y lo suficientemente robustas para evocar una regresión y/o erradicación duradera del tumor (77). En las inmunoterapias de cáncer basadas en DCs, estas células son aisladas de sangre periférica del paciente y son estimuladas *in vitro* con antígenos tumorales. Posteriormente, estas DCs “cargadas” con antígenos se re-inyectan en los pacientes, migran a los tejidos linfoides y activan las células T específicas de antígeno para eliminar células tumorales. Sin embargo, prolongar la supervivencia de las DCs es un desafío actual dada su corta vida media (78).

Resultados obtenidos en el laboratorio donde se realizó este trabajo de tesis, demostraron que la T_3 , en múltiples niveles, induce en las DCs murinas diversas características favorables para su función antitumoral, incluyendo una mayor supervivencia, migración y capacidad aloestimuladora de células T. Además, T_3 instruye a las DCs para reforzar las respuestas citotóxicas específicas, mejorando la presentación cruzada de antígeno *in vivo* (75).

Estos hallazgos, junto a otros, permiten enfatizar sobre el potencial que T_3 tiene como potente herramienta en los tratamientos *ex vivo* de DCs. Al respecto, se destaca el potencial de su utilización con un enfoque alternativo para favorecer la inmunidad tumoral mediada por células T, en las estrategias de vacunación antitumoral a base de DCs.

En resumen, las DCs han sido blanco de estudio de estrategias inmunoterapéuticas contra el cáncer desde hace ya años. A pesar del entusiasmo inicial, ciertos resultados decepcionantes pusieron en duda su utilidad. Sin embargo, el creciente conocimiento de la inmunobiología de las DCs y la definición de respuestas antitumorales óptimas, permitirán el desarrollo más racional de inmunoterapias a base de estas células, que aún necesitan optimización (78). En consecuencia, existe un gran interés por el estudio celular de la biología de DCs que aporten bases moleculares para ser trasladadas a dichos protocolos. Estos conocimientos permitirían además, sentar bases para proveer de blancos moleculares que posiblemente puedan ser en el futuro evaluados como herramientas diagnósticas y de tratamiento en otras situaciones fisiopatológicas.

La mayoría de la información que destaca la interacción entre las distintas hormonas y las células del sistema inmune se centra en las interacciones hormonales con Lin B y T. El papel de las HTs en el control de la fisiología de las células presentadoras de antígeno ha sido abordado con menor énfasis. En este sentido, la señalización de HTs en la iniciación de la inmunidad adaptativa, proceso clave en la respuesta inmune, permanece aún sin ser dilucidado completamente. En esta perspectiva y considerando los hallazgos previos del laboratorio, para este trabajo de Tesis Doctoral se planteó el siguiente **OBJETIVO GENERAL**:

“Profundizar en el estudio de la interrelación entre el sistema endócrino y el sistema inmune, estudiando los eventos moleculares involucrados en el

Mecanismo de Acción de T₃ y T₄ sobre DCs”

Por su parte, cabe destacar que tanto el Transporte celular como el Metabolismo de HTs en DCs, pre-requisitos para los eventos celulares de la acción de estas hormonas, como así también las vías de señalización celular involucradas en estos eventos, permanecen aún sin ser dilucidados a este nivel. Dado que este conocimiento es crucial para comprender los mecanismos por los cuales las HTs ejercen las acciones descritas anteriormente, del objetivo general se desprenden los siguientes **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**:

1. ***Estudiar el proceso de Transporte Celular de HTs a nivel de DCs.*** A tal fin se determinará:
 - a. **Capacidad de DCs de transportar HTs. Caracterización de los parámetros cinéticos de transporte.**
 - b. **Expresión de Transportadores de HTs en DCs.**
 - c. **Regulación del transporte de HTs en DCs mediado por T₃.**

2. ***Analizar el Metabolismo de HTs a nivel de DCs.*** A este fin, se estudiará:
 - a. **Expresión de Deiodinasas de Iodotironinas en DCs.**
 - b. **Habilidad de DCs de metabolizar HTs.**
 - c. **Regulación del metabolismo de HTs en DCs mediado por T₃.**

3. ***Profundizar el estudio de los efectos de HTs sobre las DCs y los mecanismos de señalización involucrados.*** Con este propósito, se evaluará:
 - a. **Efecto de T₄ sobre la maduración y funcionalidad de DCs.**
 - b. **Estudio del rol de la vía intracelular mediada por Esfingolípidos en la señalización celular involucrada en el efecto de T₃ sobre DCs: Análisis de la expresión y participación de Esfingosina Quinasa I y II.**

Los experimentos realizados en este trabajo de Tesis Doctoral han sido planificados, diseñados y ejecutados en su mayoría en el Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI-CONICET) en la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba. No obstante, algunos fueron realizados en el laboratorio de la Dra. Graciela A. Cremaschi, Co-directora de este trabajo de Tesis, sito en el Centro de Investigaciones Biomédicas (BIOMED-CONICET) de la Pontificia Universidad Católica Argentina en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

III.1 Animales de experimentación: Fueron usadas ratones hembra de las cepas C57BL/6 (B6; H-2^b) y BALB/c (H-2^d) obtenidas por endocría en el bioterio de la institución donde se realizó este trabajo de tesis. Los ratones fueron mantenidos bajo condiciones específicas libres de patógenos y usados entre 6-10 semanas de edad. Los protocolos de uso de animales estuvieron en concordancia con la guía para el uso y cuidado de animales de laboratorio publicada por el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH) y el comité de cuidado animal institucional local.

III.2 Preparación y Cultivo de DCs: Las DCs fueron obtenidas como previamente fue descrito en el laboratorio donde se realizó este trabajo (75). Brevemente, progenitores de médula ósea fueron obtenidos del fémur y tibia de los ratones y cultivados en RPMI 1640 con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) depletado de HTs por tratamiento con resinas AG-1-X8 (Bio-Rad, Hércules, USA) y en presencia de GM-CSF (Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos). Una combinación de 100 U/mL de penicilina G, 100 µg/mL de estreptomina y 50 µg/mL de gentamicina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) fue utilizada como antibiótico. Al día 7 de cultivo, más del 85% de las células no adherentes colectadas expresaron CMH-II, CD40, CD80 y CD11c, pero no Gr-1.

Las DCs fueron re-cultivadas en placas de cultivo de pocillos múltiples de 6, 24 ó 48 pocillos según el esquema experimental. Posteriormente fueron tratadas con T_3 (5 nM, DC_{T3}) o T_4 (10 nM, 100 nM o 1 μ M, DC_{T4}) de manera individual, durante los tiempos indicados en cada caso y a 37°C. Ambas hormonas fueron obtenidas desde Sigma-Aldrich. Las reacciones fueron finalizadas mediante el agregado de solución salina fría. Cultivos paralelos fueron mantenidos sin estímulo y usados como controles (Control). La concentración de los diluyentes utilizados fue idéntica en cada cultivo, independientemente de los tratamientos individuales. Para descartar una posible contaminación de T_3 y/o T_4 con endotoxinas, se determinó el contenido de LPS luego de la reconstitución de las hormonas, el cual arrojó valores inferiores a 0,015 UI/ml (límite de detección) en ambos casos, medido por el test de Limulus (Limulus Amebocyte Lysate Assay, Sigma-Aldrich).

III.3 Extracción de ARN Total: Las células fueron homogeneizadas con Trizol (Invitrogen, Bs. As., Argentina) y la extracción fue realizada acorde al protocolo basado en el método de Chomczynski y Sacchi (79), tal como se describió previamente en el laboratorio (71). Las DCs fueron lisadas con 1 mL de Trizol cada 5×10^6 células. Se adicionó 0,2 mL de Cloroformo por mL de lisado, la mezcla se agitó vigorosamente, se incubó 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó a $12.000 \times g$ durante 15 min a 4°C. El ARN presente en la fase acuosa superior fue recuperado, precipitado con Isopropanol y centrifugado a $12.000 \times g$ a 4°C por 15 min. El precipitado se lavó con Etanol 75 %, se centrifugó a $8.000 \times g$ por 15 min a 4°C, se secó en estufa a 37°C y finalmente se disolvió en agua libre de nucleasas. Posteriormente se procedió a la evaluación de la concentración de la solución de ARN mediante su absorbancia a 260 nm. Por su parte, la relación de absorbancia entre 260 y 280 nm permitió evaluar la calidad de la muestra obtenida. Finalmente se evaluó de manera indirecta la integridad del material extraído mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, y la visualización de las fracciones de ARN ribosomal 18 y 28 S.

III.4 Extractos Proteicos Celulares: Para la obtención de extractos proteicos totales se utilizó una placa de cultivo de 6 pocillos múltiples, un pocillo para cada punto experimental. Las células se colectaron, centrifugaron y resuspendieron en 150 μ L de buffer para lisados totales celulares [50 mM HEPES (pH 7,0); 2 mM $MgCl_2$; 250 mM NaCl; 0,1 mM EDTA; 0,1mM EGTA y 0,1 % Nonidet 40] suplementado con inhibidores de proteasas (1mM DTT, 1mM PMSF, 10 μ g/mL pepstatina A, 10 μ g/mL aprotinina, 10 μ g/mL leupeptina) y se incubaron durante 30 min en hielo. Posteriormente se centrifugó a 10.000 x g durante 5 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se conservó a -80 °C hasta su utilización. La concentración proteica fue cuantificada en una alícuota utilizando la técnica de Bradford (80), empleando albúmina sérica bovina como estándar.

III.5 Western Blot: Se realizaron utilizando metodología estándar, como fue reportado por nuestro laboratorio (75). Brevemente, se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y análisis ulterior por inmunomarcación utilizando el sistema Mini-Protean 3 o 4 (Bio-Rad). Se utilizaron entre 20 y 50 μ g de extractos proteicos totales, dependiendo de la proteína en estudio. Dichos extractos fueron resuspendidos en agua para homogenizar el volumen y mezclados con buffer de siembra [62 mM Tris (pH 6,8); 10 % v/v glicerol anhidro; 2 % p/v SDS; 0,1 M DTT; 0,004 % azul de bromofenol). Las muestras así preparadas fueron colocadas en baño termostatzado a 37°C durante 30 min o hervidas durante 5 min para permitir la desnaturalización y reducción de las proteínas, enfriadas en hielo e inmediatamente sembradas en el gel resolutivo (8 al 12 % dependiendo del tamaño de la proteína en cuestión). Como buffer de corrida fue utilizada una solución conteniendo 192 mM glicina, 25 mM Tris (pH 8,8) y 0,1 % SDS. La corrida electroforética se realizó a 100 volts constantes durante períodos variables (2-3 horas). Una vez finalizada la corrida electroforética, las proteínas fueron electro-transferidas a membranas de nitrocelulosa de 0,45 μ m de poro (Schleicher-Schuell, Dassel, Germany) en buffer

de transferencia [192 mM glicina, 25mM Tris (pH 8,8), 20 % Metanol] sometidas a una diferencia de potencial constante de 100 volts (250-350 mA, 30-40 W) durante 60 min.

Posteriormente las membranas fueron incubadas en solución de bloqueo [100 mM Tris (pH 8,0); 150 mM NaCl; 0,1 % Tween 20; 5 % albúmina bovina] durante 60 min a temperatura ambiente bajo agitación permanente. Las membranas bloqueadas fueron incubadas con anticuerpos primarios dirigidos contra las proteínas de interés diluidos en solución de bloqueo (según se indica en **Tabla 3**) por 1-2 h a temperatura ambiente, o bien durante toda la noche a 4°C, con agitación suave. Las membranas fueron lavadas con TBS-Tween [100 mM Tris (pH 8,0); 150 mM NaCl; 0,1 % Tween 20] a temperatura ambiente, a modo de eliminar el anticuerpo primario no específicamente unido.

Tabla 3. Anticuerpos Primarios utilizados. Se indica para cada proteína, la especie de generación del anticuerpo y su isotipo. Se indica además, el proveedor de cada anticuerpo y la dilución hace referencia a la concentración final utilizada en los ensayos de western blot.

Proteína	Especie	Proveedor	Catálogo	Isotipo	Dilución
D2	Ratón	Abcam (Cambridge, UK)	ab135711	Conejo	1:1000
D3	Ratón	Abcam (Cambridge, UK)	ab82041	Conejo	1:1000
MCT10	Ratón	Abcam (Cambridge, UK)	ab171649	Conejo	1:500
LAT2	Ratón	Abcam (Cambridge, UK)	ab75610	Conejo	1:500
Actina	Conejo	Santa Cruz (Dallas, USA)	sc-1616	Ratón	1:5000

La inmunodetección del anticuerpo primario se realizó por incubación con un anticuerpo secundario fluorescente capaz de reconocer el isotipo del anticuerpo primario utilizado. Este anticuerpo secundario se preparó en solución de bloqueo (según indicado en **Tabla 4**) y se incubó con la membrana por 1 h a temperatura ambiente con agitación suave. El exceso de anticuerpo secundario fue eliminado mediante lavados con TBS-Tween y un lavado final con TBS. El revelado de las bandas reactivas se llevó a cabo mediante el uso del escáner y software “Odyssey” (LI-COR Biosciences, Nebraska, USA).

Tabla 4. Anticuerpos Secundarios utilizados. Se indica para cada proteína, la especie de generación del anticuerpo y su isotipo. Se indica además, el proveedor de cada anticuerpo y la dilución hace referencia a la concentración final utilizada en los ensayos de western blot.

Proteína	Especie	Proveedor	Catálogo	Isotipo	Dilución
<i>Anti-IgG</i>	<i>Conejo</i>	LI-COR Biosciences (Nebraska, USA)	IRDye 800CW 926-32213 Verde	<i>Burro</i>	<i>1:15000</i>
<i>Anti-IgG</i>	<i>Conejo</i>	LI-COR Biosciences (Nebraska, USA)	IRDye 680RD 926-68073 Rojo	<i>Burro</i>	<i>1:15000</i>
<i>Anti-IgG</i>	<i>Ratón</i>	LI-COR Biosciences (Nebraska, USA)	IRDye 800CW 926-32212 Verde	<i>Burro</i>	<i>1:15000</i>

III.6 Transcripción Reversa (RT) y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): A partir de 3 µg de ARN total, el ARN mensajero (ARNm) fue transcrito reversamente a ADN complementario (ADNc) por incubación con 0,25 µM de “primers” degenerados oligo-dT12VG, 20 U de inhibidor de ARNasas, 4 µl de buffer 5X RT [250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂ y 10 mM DTT]; 0,5 mM de cada dNTP y 1 U de M-MLV RT (Transcriptasa Reversa del Virus de Leucemia Murina de

Moloney) durante 1h a 37 °C. La M-MLV RT remanente fue inactivada a 95 °C por 5 min. El ADNc se amplificó por PCR Convencional, como fue descrito en el laboratorio (81) con modificaciones menores. El volumen final utilizado fue de 20 ul de buffer conteniendo 1,5 mM MgCl₂; 4 ul de buffer de PCR 5X; 1 U de Taq-polimerasa (Promega, Madison, USA); 0,25 mM de cada dNTP (Promega) y 2 ul de ADNc.

Un control negativo (agua estéril en lugar de la solución de ADNc) se incluyó en cada ejecución de PCR. La amplificación por PCR Convencional se realizó utilizando el sistema *iCycler* (Bio-Rad). Un par de “*primers*” específico para cada gen de interés fue utilizado para la amplificación por PCR (**Tabla 5**). Los “*primers*” para los THTs (MCT8, MCT10, OATP1C1, LAT1 y LAT2) y las DIOs (DIO1, DIO2 y DIO3) fueron diseñados para distinguir ADNc y ADN genómico/pseudogenes que enlazan las secuencias de 2 exones excluyendo un intrón (Sigma-Aldrich, Bs. As., Argentina). Para el ARNm de Dio 2 y 3, ya que los primers se diseñaron en una única región exónica, la contaminación con ADN genómico se excluyó realizando reacciones de control paralelas sin transcripción reversa. Las expresiones de estos ARNm se normalizaron utilizando ARNm de β-actina. El perfil térmico utilizado fue de 95°C durante 5 min (38 ciclos para THTs, 35 ciclos para DIOs y 30 ciclos para β-Actina) a 95°C durante 40 segundos, un gradiente entre 59 y 65°C durante 40 segundos, 72°C durante 40 segundos, y 72°C durante 10 min.

Los productos de PCR Convencional se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa al 2%, seguida de una tinción con Bromuro de Etidio. La amplificación específica del gen de interés se confirmó mediante secuenciación automática (Macrogen, Seoul, Corea).

Tabla 5. Secuencias de “primers” utilizadas para PCR Convencional y PCR Cuantitativa. Se indica para cada gen, el tipo de primer y su secuencia en orientación 5’-3’.

Gen	Primer	Secuencia
MCT8 (NM_009197.2)	Sentido	CCCATTGCATTTGAGCTGGTG
	Antisentido	TTGATGCATCAGAGGGACGAAG
MCT10 (NM_001114332.1)	Sentido	CTAGTTGGTCCTCAGGATGCTTC
	Antisentido	GGGATTAACAGAGCACAACACC
OATP1C1 (NM_013797.5)	Sentido	GTGGGGACAATGGGATTACC
	Antisentido	CTTCTGACACCTGCCCATC
LAT1 (NM_011404.3)	Sentido	TCAGCTTCTCAACTGGCTGTG
	Antisentido	GCTTGTTCTCCACCAGACACC
LAT 2(NM_016972.2)	Sentido	GATAGTCCTTCGCTGGAAGAAGC
	Antisentido	GGGTTTGTGTTGCCAGTAGACAC
DIO1 (NM_007860.3)	Sentido	GTGGTGGACACAATGCAGAAC
	Antisentido	GTGTCTAGGTGGAGTGCAAAGC
DIO2 (NM_010050.2)	Sentido	GCCACCTGACCACCTTTCA
	Antisentido	CTTGGTTCCGGTGCTTCTTAA
DIO 3(NM_172119.2)	Sentido	AACTCTAGCAGTTCGCATATGG
	Antisentido	CCCACCAATTCAGTCACTGTGTC

Nota: el diseño de todos los primers fue realizado utilizando el software *Primer3* (<http://primer3.ut.ee>)

III.7 PCR Cuantitativa (qPCR): La amplificación mediante PCR Cuantitativa (qPCR) o en Tiempo Real se realizó mediante una adaptación de la PCR convencional utilizando “*SYBR green*” como reportero. Las reacciones de amplificación fueron realizadas en el termociclador ABI Prism 7500 detection system (Applied Biosystem, Foster City, USA) en volúmenes de 15 µl conteniendo buffer de PCR 1X; 1,5 mM MgCl₂; 0,3 µM del “*primer*” sentido; 0,3 µM del “*primer*” antisentido; 0,25 mM

de cada dNTP; 0,5 U Taq-polimerasa; 1:40.000 de SYBR green (Molecular Probes, Eugene, USA); 30 nM de Rox (Roche Applied Science, Indianápolis, USA) y 1 μ l de ADNc.

La cuantificación de cambios relativos en la expresión génica del gen de interés respecto al gen de expresión constitutiva β -actina, usado como control interno, fue realizada mediante el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ como fue reportado previamente en el laboratorio (82, 83). Para cada par de “primers” bajo las condiciones ensayadas, se observó la presencia de un solo pico en la curva de disociación, indicando que un solo producto de PCR fue generado en la amplificación. La identidad se evaluó mediante la observación del tamaño previsto del amplicón en geles de agarosa resueltos por electroforesis y su posterior secuenciamiento.

La eficiencia de qPCR para cada par de primers se calculó usando curvas estándar generadas por diluciones en serie de ADNc de DCs. Todas las eficiencias de qPCR oscilaron entre 96 y 102% en diferentes ensayos. Los niveles de ARNm se muestran normalizados con el ARNm del gen de referencia β -actina. También se utilizó Gliceraldehído 3-Fosfato Deshidrogenasa (GAPDH) y Proteína de Unión a TATA para normalizar ARNms blanco, obteniendo resultados similares.

III.8 Ensayos de Actividad Enzimática: Para la determinación de la actividad de D2, las DCs fueron lavadas con PBS y lisadas en buffer fosfato de sodio 150 mM conteniendo 1 mM de EDTA, 250 mM de Sucrosa y 10 mM de DTT (pH 6,9). 20 μ g de proteínas fueron incubados por duplicado durante 3 h a 37°C con [125 I]-T₄ purificada previamente en una columna de Sephadex LH-20 (Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences, Shelton, USA), 1 mM PTU y 20 mM DTT en buffer fosfato de potasio 100 mM conteniendo 1 mM EDTA y 1 nM T₄ (pH 6,9) en un volumen final de reacción de 300 μ l como lo reportó Louzada y col., (84). La reacción se detuvo a 4° C en baño de hielo, con la adición de 200 μ l de SFB y 100 μ l de Ácido Tricloroacético (50% v/v), seguido de agitación vigorosa. Las muestras se centrifugaron a 10.000 x g por 3 min, se tomaron 360 μ l del sobrenadante y se

determinó el ^{125}I liberado (cpm) durante la reacción de deiodinación, utilizando un contador γ . La actividad de D2 se expresó en fmoles de T_4 deiodinada/min/mg proteína. Estos experimentos se realizaron con la colaboración del laboratorio dirigido por la Dra. Denise Pires-Carvalho (Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidad Federal de Río de Janeiro, Brasil).

Por su parte, para la determinación de la actividad de D3 se utilizó la metodología reportada por Wajner y col., (85) utilizando cromatografía en papel. Para ello, las DCs fueron sonicadas en un buffer conteniendo 10 mM Tris-HCl y 0,25 M de Sacarosa (pH 7,5). Se incubaron 100 μg del producto de sonicación celular durante 1 h en un buffer conteniendo 200.000 cpm de ^{125}I - T_3 (Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences), 2 nM T_3 y 20 mM de DTT. La reacción se detuvo mediante la adición de 200 μl de etanol 95%, 50 μl de NaOH 0,04 N y 5 mg de PTU. La deiodinación se determinó en base en la cantidad de ^{125}I - T_2 producido después de la separación de los productos de reacción por cromatografía en papel. Estos experimentos fueron realizados en colaboración con el laboratorio dirigido por la Dra. Ana Luiza Maia (Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidad Federal de Río Grande del Sur, Brasil).

III.9 Ensayos de Transporte de HTs: Para determinar la captación de HTs, las DCs se lavaron con medio de incubación (PBS Dulbecco conteniendo 0,1% de D-glucosa y 0,1% de BSA). Dicha captación fue evaluada por incubación (3-90 min) de las células a 37°C con 1 nM (200.000 cpm) de ^{125}I - T_3 o ^{125}I - T_4 en 1,5 ml de medio. Después de la incubación, las células se lavaron con medio, se lisaron con NaOH 0,1 M y se determinó el ^{125}I captado mediante un contador γ . Para evaluar la dependencia de Na^+ del proceso de captación de ^{125}I - T_3 , DCs se incubaron en un buffer conteniendo NaCl 142,9 mM; 4,7 mM de KCl; 1,2 mM de MgSO_4 ; 1,2 mM de KH_2PO_4 ; 1,8 mM de

CaCl₂; 20 mM de HEPES y 0,1% de BSA (pH 7,4) o en medio en el que el Na⁺ fue sustituido con una cantidad equimolar de Colina.

Para la medición del flujo de salida (Eflujo) de HTs de las DCs, luego de la captación de HTs durante 30 min con medio de incubación conteniendo 1 nM (200.000 cpm) de [¹²⁵I]-T₃ o [¹²⁵I]-T₄, las células fueron lavadas y posteriormente incubadas con medio de eflujo (PBS Dulbecco conteniendo 0,1% de D-glucosa y 0,1% de BSA) a distintos tiempos. Después de la incubación con el medio de eflujo, las células fueron lavadas y lisadas con NaOH 0,1 M. Las cpm remanentes fueron determinadas en un contador γ .

A los fines de determinar especificidad de transporte, la captación y el eflujo de [¹²⁵I]-T₃ o [¹²⁵I]-T₄ se llevaron a cabo en presencia o ausencia de iodotironinas no radiactivas, L-Leucina (inhibidor de LATs), bromosulfoftaleína (BSP, inhibidor de MCTs) o ambos, a las concentraciones indicadas en cada caso.

III.10 Citometría de Flujo: A los fines de determinar citoquinas intracelulares, se utilizó la metodología previamente reportada en nuestro laboratorio (75). Brevemente, las DCs se lavaron dos veces con PBS suplementado con 2 % de FBS y se resuspendieron en PBS con SFB al 10 %. Las células se incubaron con los siguientes anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromo durante 30 min a 4° C: anti-CD11c-isotiocianato de fluoresceína (FITC) y anti-IL-12 conjugado con ficoeritrina (PE) (BD Biosciences, San Jose, EE.UU). Las células fueron luego procesadas en un citómetro de flujo FACS Canto II (BD Biosciences) y analizadas utilizando el software FlowJo (Tree Star, Ashland, USA).

III.11 Determinación de Citoquinas Solubles: La detección de IL-12p70 se realizó en sobrenadantes de cultivos celulares utilizando un ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA). El anticuerpo de captura incluyó un anticuerpo monoclonal anti-IL-12p70 de ratón (clon C15.6, BD

Biosciences). El anticuerpo de detección incluyó un anticuerpo biotinilado de rata anti-IL-12p70 de ratón (C17.8 clon, BD Biosciences). Como enzima y sustrato se utilizaron estreptavidina-peroxidasa de rábano picante y 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) sal de diamonio (Sigma-Aldrich), respectivamente.

III.12 Cultivos Mixtos Leucocitarios: Estos ensayos se realizaron para evaluar la capacidad de las DCs de estimular esplenocitos alogénicos *in vitro*, como se reportó previamente en el laboratorio (75). Brevemente, los esplenocitos alogénicos (de ratones BALB/c, 1×10^5 células/pocillo, células respondedoras) se incubaron durante 3 días con las DCs irradiadas (30 Gy, células estimuladoras) a una relación de 01:15 (DCs/esplenocitos) en placas de 96 pocillos de fondo redondo. En el día 2, 0,5 μCi (0,0185 MBq)/pocillo de [^3H]-Timidina (Amersham Life Sciences, Buckinghamshire, UK) se incorporó en cada pocillo durante 18 h. La proliferación se determinó como cpm de determinaciones por triplicado, en un contador β de centelleo líquido.

III.13 Análisis Estadístico: El análisis de las diferencias entre los grupos (tres o más grupos) se llevó a cabo por análisis de la varianza de un solo factor (ANOVA), seguido por la prueba de comparaciones múltiples de Student-Newman-Keuls. Para el análisis de las diferencias entre dos grupos, la significancia estadística se determinó mediante la prueba *t* de Student para observaciones no apareadas. Los análisis estadísticos fueron realizados con la utilización del software Prism 5.01 (GraphPad Software, San Diego, USA). Valores de $P < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos. Todos los experimentos se realizaron al menos por triplicado.

IV.1 Estudio de los procesos de Transporte Celular de HTs a nivel de DCs.**IV.1.1 Las DCs murinas transportan HTs de manera efectiva**

Con la finalidad de caracterizar el proceso de transporte de HTs a nivel de las DCs, se evaluó la captación y el eflujo de ambas hormonas, T₃ y T₄, mediante la utilización de sus variantes radiomarcadas con ¹²⁵I. Para ello, se cultivaron DCs obtenidas de sus progenitores de médula ósea de ratón de acuerdo a lo reportado por el grupo de trabajo (71). Posteriormente, un análisis de captación a diversos tiempos de [¹²⁵I]-T₃ y [¹²⁵I]-T₄ (1 nM) demostró que ambas HTs fueron transportadas por DCs, aunque la captación celular de [¹²⁵I]-T₃ fue significativamente mayor que la de [¹²⁵I]-T₄ en todos los tiempos evaluados, alcanzando un valor 5,7 veces mayor a los 90 minutos (**Figura 10A**). Estos hallazgos revelan que a igual concentración, la principal HT captada por DCs es T₃. Un punto a destacar en estos ensayos es la tasa porcentual de captación de [¹²⁵I]-T₃ en función del tiempo, dado que la misma aumentó linealmente durante los primeros 30 minutos y se redujo después, siguiendo un comportamiento similar al descrito para otras células sensibles a HTs (86).

Posteriormente, se evaluaron los efectos que concentraciones crecientes de iodotironinas no marcadas ejercían sobre la captación de [¹²⁵I]-T₃. Este análisis permitió obtener parámetros cinéticos de gran significancia en relación al transporte de HTs en este tipo celular, los que se detallan a continuación.

Como se muestra en la **Figura 10B**, se registró una reducción en la captación de [¹²⁵I]-T₃ luego de la adición de iodotironinas no marcadas, T₃ ó T₄, en concentraciones crecientes. Estos resultados permitieron definir dos procesos bien diferenciados: uno de ellos no se satura con concentraciones de T₃ ó T₄ de hasta 10 μM, mientras que el otro proceso de captación, este sí

saturable, exhibe un valor de K_m para su inhibición con T_3 de $0,76 \mu M$. Del mismo modo, se observó que el IC_{50} para la inhibición de esta captación por T_4 es de $7,78 \mu M$. Este comportamiento de la captación de T_3 en DCs es similar a los ya descritos en otros sistemas celulares (86, 87). Es importante destacar que debido a que la captación de $[^{125}I]-T_4$ fue significativamente menor que la de $[^{125}I]-T_3$ (**Figura 10A**), la caracterización de los parámetros cinéticos para la captación de $[^{125}I]-T_4$ no fue posible.

Finalmente, se evaluó el eflujo de ambas hormonas a nivel celular. Como se muestra en la **Figura 10C**, el eflujo de $[^{125}I]-T_3$ tiene una velocidad significativamente menor que la de $[^{125}I]-T_4$. En este sentido, alrededor del 63% de la $[^{125}I]-T_3$ permanece dentro de las DCs a los 60 minutos después de su captación, en comparación con un 32% de la $[^{125}I]-T_4$.

En conjunto, estos resultados revelan la capacidad de las DCs de transportar HTs, tanto hacia el interior como hacia el exterior celular, y evidencian la preferencia de captación de T_3 sobre T_4 y de T_4 en comparación con T_3 en el proceso de eflujo.

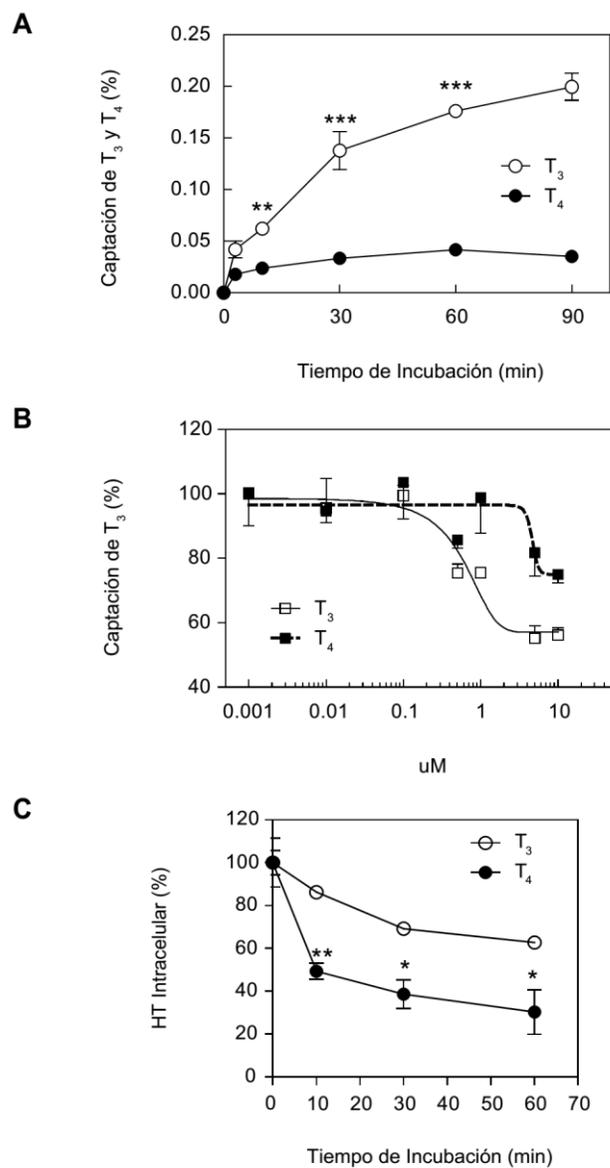


Figura 10: Caracterización del transporte de HTs en DCs. (A) Captación de 1 nM de [125 I]- T_3 (o) y [125 I]- T_4 (●) en función del tiempo. La captación fue evaluada en DCs derivadas de médula ósea de ratón. Se utilizó D-PBS conteniendo 0,1% de glucosa y 0,1% de BSA como medio de captación. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ en comparación a [125 I]- T_4 al mismo tiempo de incubación. **(B)** Efectos de concentraciones crecientes (1 nM a 10 μ M) de iotironinas no marcadas (\square T_3 , T_4 ■) en la captación de [125 I]- T_3 durante 30 minutos en DCs. **(C)** Eflujo de HTs en DCs. Las células se incubaron durante 30 minutos con 1 nM de [125 I]- T_3 (o) o [125 I]- T_4 (●). Posteriormente, se retiró el medio de captación y las células fueron lavadas e incubadas en medio de eflujo durante 0, 30 y 60 minutos. Luego, el porcentaje de [125 I]- T_3 y [125 I]- T_4 en el lisado celular se determinó en cada tiempo evaluado. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ comparado con [125 I]- T_3 . Todos los resultados se expresan como media \pm DE (%) y corresponden a un experimento representativo de un total de 3 con resultados similares.

IV.1.2 Las DCs murinas expresan MCT10 y LAT2 como principales THTs.

Considerando la capacidad de DCs para transportar HTs y los antecedentes de la presencia de proteínas específicas que favorecen ese transporte en varios sistemas celulares animales y humanos de manera tejido-específica, surgió el interés por evaluar la identidad de tales THTs en DCs. A tal fin, se analizó la expresión de los principales THTs descritos a nivel de ARNm: MCT8, MCT10, OATP1C1, LAT1 Y LAT2, mediante RT-PCR convencional.

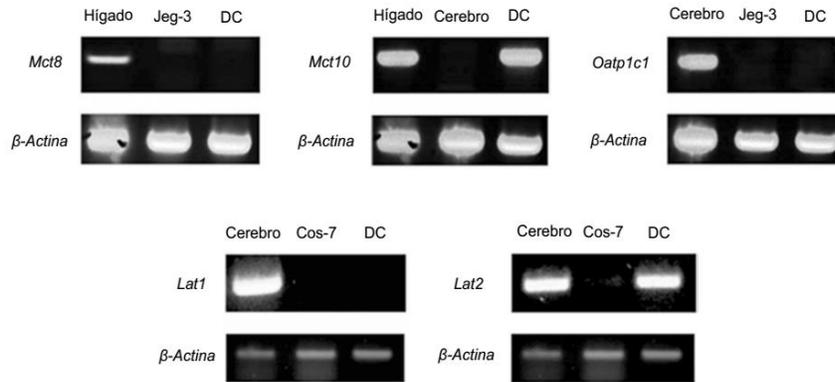
Como se observa en la **Figura 11A**, las DCs expresan ARNm de MCT10 (panel superior medio) y de LAT2 (panel inferior derecho). A su vez, no expresan niveles detectables por RT-PCR convencional de ARNm de MCT8 (panel superior izquierdo), OATP1C1 (panel superior derecho) o LAT2 (panel inferior izquierdo). La identidad génica de los ARNm de cada THT evidenciado en DCs fue confirmada mediante secuenciamiento genético de los amplicones obtenidos en la RT-PCR (Macrogen, Corea del Sur).

De acuerdo a estos resultados, se analizó la expresión de MCT10 y LAT2 a nivel de proteína por Western Blot con extractos proteicos totales de DCs. Estos evidenciaron la expresión de las proteínas MCT10 y LAT2 (**Figura 11B**), aunque en un grado menor (a concentraciones proteicas totales iguales) que sus controles positivos (células K562 y HeLa, respectivamente).

Finalmente, un análisis densitométrico comparativo de los THT expresados en DCs: MCT10 y LAT2, no permitió registrar ningún cambio significativo entre sus niveles de expresión en DCs (**Figura 11C**).

En conjunto, estos hallazgos sugieren fuertemente que MCT10 y/o LAT2 serían los THTs que participarían en el transporte de HTs (captación y/o eflujo) en DCs.

A



B



C

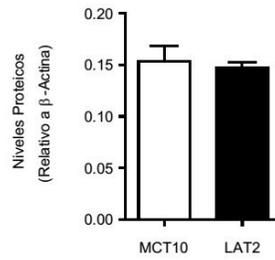


Figura 11: Expresión de THTs en DCs. (A) Detección de ARNm de MCT8 (panel superior izquierdo), MCT10 (panel superior medio), OATP1C1 (panel superior derecho), LAT1 (panel inferior izquierdo) y LAT2 (panel inferior medio) por análisis de RT-PCR convencional del ARN total de DCs. ARN total de hígado y cerebro de ratón, de células COS-7 y JEG-3 fueron analizados en paralelo como controles positivos (primera columna) o negativos (segunda columna), respectivamente. ARNm de β -Actina se utilizó como gen constitutivo. Los productos de RT-PCR se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa al 2% seguido de tinción con bromuro de etidio. (B) Western Blot representativo de lisados totales de DCs para MCT10 (panel izquierdo) y LAT2 (panel derecho). Los lisados totales de células K562 y HeLa se corrieron en paralelo como controles positivos de MCT10 y LAT2, respectivamente. Las muestras fueron separadas en un gel SDS-PAGE al 10%, transferidas posteriormente a membranas de nitrocelulosa, e incubadas con anticuerpos específicos anti-MCT10 o anti-LAT2. El control de carga se realizó utilizando un anticuerpo anti- β -actina. Se muestra un experimento representativo de 3 independientes realizados por triplicado y con resultados similares. (C) Análisis densitométrico de Western blot. Los datos se expresan como media \pm DE de un experimento representativo de 3 con resultados similares y realizado por triplicado.

Por otra parte, dado que MCT10 y LAT2 son transportadores sodio-independientes (88, 89), evaluamos la dependencia de sodio (Na^+) del proceso de captación hormonal. Para este propósito, se realizaron experimentos de captación de ^{125}I - T_3 sustituyendo, de manera equimolar, a Na^+ por Colina en el medio de captación. Como se observa en la **Figura 12**, tal sustitución no indujo ninguna modificación en la captación de ^{125}I - T_3 , lo que indicaría que bajo estas condiciones el transporte de HTs no depende de Na^+ en DCs, reforzando las evidencias obtenidas para las proteínas ya descritas.

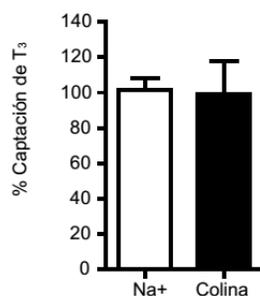


Figura 12: THTs en DCs. Dependencia de Na^+ en la captación de ^{125}I - T_3 en DCs: las células fueron incubadas con 1 nM de ^{125}I - T_3 por 30 minutos en medio conteniendo cloruro de sodio (barra blanca) o medio conteniendo colina, libre de sodio (barra negra). Los resultados se expresan como media \pm DE del porcentaje de ^{125}I - T_3 captada por células incubadas con medio conteniendo sodio. Los datos se expresan como media \pm DE de un experimento representativo de 3 con resultados similares y realizado por triplicado.

Considerando que el laboratorio donde se realizó este trabajo de Tesis Doctoral previamente describió los efectos que T_3 ejerce sobre la maduración y funcionalidad de las DCs (71, 72, 73, 75), se evaluó el rol de cada uno de los THTs expresados a nivel de DCs en el transporte de T_3 y en un marcador biológico sensible a la acción de T_3 a este nivel.

En primer lugar se realizaron ensayos de captación de T_3 , en los cuales y mediante la utilización de inhibidores específicos de cada uno de los THTs expresados, el ingreso de [125 I]- T_3 a la DC a través de dicho THT fue impedido. Como se observa en la **Figura 13A**, la adición del aminoácido L-Leucina (Leu, inhibidor específico de LAT2, 100 μ M) no fue capaz de reducir la captación de [125 I]- T_3 . Por su parte, el tratamiento con Bromosulfaleína (BSP, inhibidor específico de MCT10, 100 μ M) redujo significativamente la captación de [125 I]- T_3 , a niveles por debajo del 50% de la captación sin BSP (Control). A su vez, cuando ambos inhibidores fueron agregados simultáneamente, la captación de [125 I]- T_3 disminuyó significativamente a valores aún más bajos (alrededor del 45% de la captación del Control). Sin embargo, la diferencia entre BSP y Leu + BSP no fue estadísticamente significativa.

Estos resultados, en concordancia con lo descrito para el proceso saturable de captación de [125 I]- T_3 (**Figura 13B**), sugieren que MCT10 sería el THT responsable, al menos en su mayor parte, de la captación de T_3 en DCs. Sin embargo, la expresión de LAT2 en estas células, tanto a nivel de ARNm como de proteína, sugiere que este THT podría jugar algún rol en el proceso de transporte de HTs, no detectable por los métodos utilizados.

Si bien estos hallazgos anteriormente descriptos permiten inferir que MCT10 está principalmente involucrado en la acción de T_3 en DCs, un ensayo funcional sobre la DC fue necesario para corroborar esta hipótesis. Considerando que el laboratorio donde se realizó este trabajo de tesis reportó que T_3 modula la secreción de citoquinas en DCs con producción y secreción de IL-12 e inducción de un perfil Th1 (71), se realizaron ensayos de inhibición de la captación de T_3 en DCs utilizando los inhibidores específicos ya descriptos y evaluando los niveles de secreción de IL-12, marcador muy sensible al efecto de T_3 a este nivel. Para ello, DC inmaduras (DCi) fueron tratadas con T_3 (5 nM) y con el inhibidor específico (Leu y/o BSP, 100 y 10 μ M, respectivamente) durante 18 h (cabe aclarar que en estos ensayos biológicos se utilizó una concentración menor de BSP dado que, a 18 h de tratamiento, 100 μ M provocó la muerte celular). Al finalizar el tiempo de tratamiento, se analizaron los niveles de IL-12 mediante ELISA en los sobrenadantes de cultivo de los distintos grupos. Como se muestra en la **Figura 13B**, la adición de Leu en presencia de T_3 no indujo ningún cambio significativo en la secreción de IL-12 en DCs, en comparación al Control (DCi + T_3). Sin embargo, BSP redujo la secreción de IL-12 inducida por T_3 en un 46% con respecto al Control, mientras que la presencia de ambos inhibidores juntos (Leu + BSP) no disminuyó la secreción de IL-12 por debajo de los valores obtenidos luego del tratamiento con BSP solo. Es de destacar, sin embargo, que el tratamiento con BSP no anuló el efecto de T_3 sobre la producción de IL-12 en DCs. Estos resultados indicarían que la cantidad de T_3 que es captada por la DC mediante el proceso no saturable (o por otros THTs desconocidos) sea suficiente para inducir, aunque en menor proporción, la habilidad de las DCs de secretar IL-12. Es importante destacar además, que ni BSP ni Leu (en las concentraciones ensayadas) alteró significativamente la viabilidad celular en el tiempo experimental, medido por ensayo de muerte celular con Anexina V y 7-aminoactinomicina D (datos no mostrados).

En conjunto, estos hallazgos manifiestan la importancia de MCT10 en la captación y por lo tanto en la acción de T_3 a nivel de DCs, describiendo su participación en el primer evento celular involucrado en el mecanismo de acción de T_3 , su transporte al interior celular.

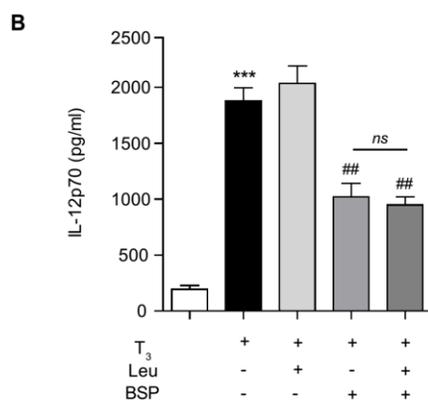
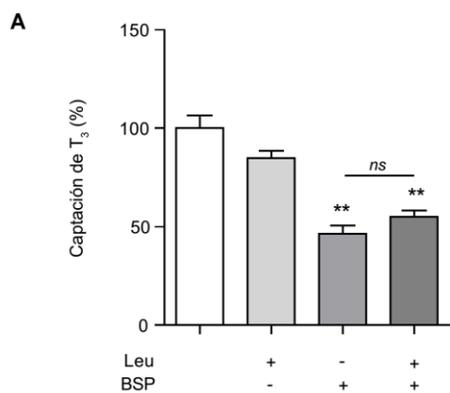


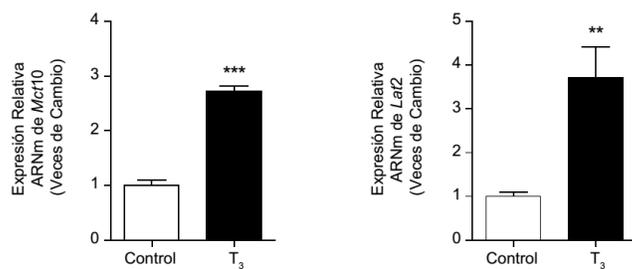
Figura 13: Efecto de los inhibidores de MCT10 y LAT2 sobre (A) la captación de T₃ y (B) la secreción de IL-12 inducida por T₃ en DCs. (A) Efecto de 100 μM de los inhibidores: BSP, Leu o ambos en la captación de [¹²⁵I]-T₃. Las DCs se incubaron durante 30 min con 1 nM de [¹²⁵I]-T₃ en ausencia o presencia de inhibidores y se determinó la captación de la hormona. Los resultados se expresan como media ± DE del porcentaje de captación de DCs control (sin inhibidores), y son de un experimento representativo de un total de 3 con resultados similares llevados a cabo por triplicado. ** P < 0.01 comparado con DC control, ns: no significativo. **(B)** Efecto de los inhibidores: BSP (10 μM), Leu (100 μM) o ambos en la secreción de IL-12 en DCs. Las DCs se incubaron durante 18 h con T₃ con o sin los inhibidores mencionados. La secreción de IL-12 se determinó en los sobrenadantes de cultivo por ELISA. Los resultados se expresan como media ± DE y son de un experimento representativo de un total de 3 con resultados similares llevados a cabo por triplicado. *** P < 0,001 comparado con DC control, ## P <0,01 frente a T₃, ns: no significativo.

IV1.3 T₃ regula positivamente el transporte de HTs en DCs

Teniendo en cuenta que T₃ modula, con una exquisita especificidad tisular, a su propio mecanismo de acción y en consecuencia sus efectos en sus células blanco (90), se propuso investigar si el tratamiento con T₃ regula el transporte de HTs en DCs.

En primer lugar, se evaluó el efecto de T₃ (5 nM por 18 h) sobre la expresión de los THTs presentes en DCs a nivel de su ARNm y proteína. La **Figura 14A** muestra un análisis de RT-qPCR de ARNm de ambos THTs presentes en DCs: MCT10 y LAT2. Se observa que dicha concentración fisiológica de T₃, utilizada para registrar los efectos de la hormona a este nivel (71, 72, 73, 75) regulan de manera positiva la expresión del ARNm tanto de MCT10 como de LAT2 en DCs. Como se observa, la expresión de MCT10 aumentó un 172% frente a su control. Del mismo modo, LAT2 incrementó su expresión en un 271% frente al control. En concordancia con estos resultados, la expresión proteica de ambos transportadores fue incrementada por el tratamiento con T₃. Se registraron aumentos de en un 53% y 78%, para MCT10 y LAT2, respectivamente (**Figura 14B**).

A



B

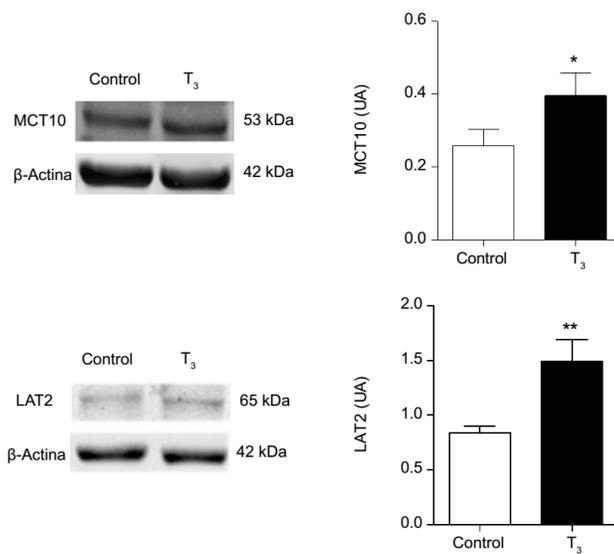


Figura 14: Efecto de T_3 sobre el transporte de HTs en DCs: los niveles de ARNm y proteína para MCT10 y LAT2 se evaluaron en DCs control (Control) o DCs tratadas con 5 nM de T_3 durante 18 hs (T_3). **(A)** Análisis de RT-qPCR para el ARNm de MCT10 (panel izquierdo) y LAT2 (panel derecho). Los niveles de ARNm de MCT10 y LAT2 se cuantificaron en relación a los de β -Actina. Los resultados se indican como veces de cambio relativas a los niveles de ARNm del control, y se expresan como media \pm DE. ** P <0,01; *** P <0,001, en comparación con el grupo control. **(B)** Análisis por Western blot de los niveles de proteína para MCT10 y LAT2. Los paneles de la izquierda muestran las bandas representativas de cada proteína, MCT10 (panel superior) y LAT2 (panel inferior). El control de carga se realizó con β -Actina. Los paneles de la derecha muestran el análisis densitométrico de las bandas. Los datos se expresan como media \pm DE (unidades arbitrarias, UA) y son parte de un experimento representativo de 3 con resultados similares y llevados a cabo por triplicado. * P <0,05; ** P <0,01, en comparación con el grupo control.

En segundo lugar, y teniendo en cuenta los resultados anteriores, se evaluó el efecto de T_3 (5 nM por 18 h) sobre el transporte de HTs en DCs: Captación y Eflujo de HTs. A tal fin, se evaluó la captación de [125 I]- T_3 y [125 I]- T_4 en DCs control y DCs tratadas con T_3 . Como muestra el panel izquierdo de la **Figura 15A**, el mencionado tratamiento sorprendentemente no tuvo efecto sobre la captación de [125 I]- T_3 . Sin embargo, la captación de [125 I]- T_4 sí aumentó significativamente en DCs estimuladas con T_3 (**Figura 15A, panel derecho**). Por su parte, se realizaron ensayos sobre el eflujo de HTs en DCs, tratadas o no con T_3 en la concentración y tiempo de tratamiento previamente mencionado. De manera inversa a lo registrado en los estudios del efecto de T_3 sobre la captación de HTs, el eflujo de [125 I]- T_3 fue significativamente mayor en DCs tratadas con T_3 que en su control (**Figura 15B, panel izquierdo**). Sin embargo, el eflujo de [125 I]- T_4 no se modificó con dicho tratamiento (**Figura 15B, panel derecho**).

Los datos obtenidos en estos experimentos permiten concluir que el transporte de HTs en DCs está regulado por T_3 . Los resultados sugieren que esta modulación sería debida, al menos en parte, al efecto de T_3 sobre la expresión de los THTs presentes en DCs y sobre la captación-eflujo de HTs.

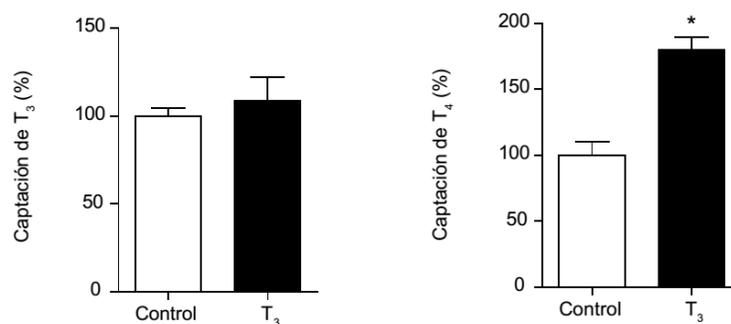
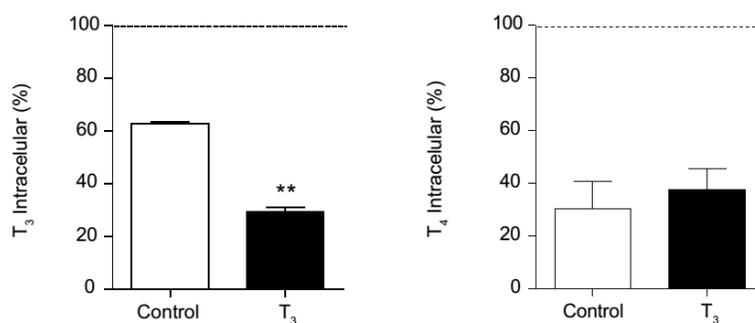
A**B**

Figura 15: Efecto de T₃ sobre la captación y eflujo de HTs en DCs: se evaluó la captación y el eflujo de ^{125}I -T₃ o ^{125}I -T₄ en DCs control (Control) o DCs tratadas previamente con 5 nM de T₃ durante 18 hs (T₃). **(A)** Captación de 1 nM de ^{125}I -T₃ (panel izquierdo) y 1 nM de ^{125}I -T₄ (panel derecho). * P < 0,05 frente al control. **(B)** Eflujo de la ^{125}I -T₃ (panel izquierdo) y la ^{125}I -T₄ (panel derecho) pre captado por las DCs. ** P < 0,01 comparado con el control. En cada ensayo, los datos se expresan como media ± DE y son parte de un experimento representativo de 3 realizados por triplicado.

IV.2 Análisis del Metabolismo de HTs a nivel de DCs.

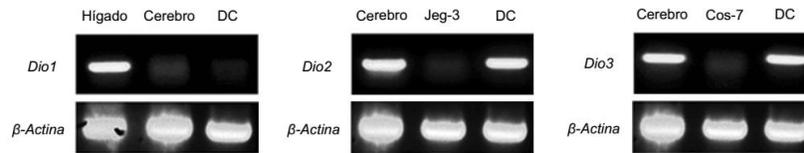
IV.2.1 Las DCs murinas expresan D2 y D3, no D1

Como se ha mencionado anteriormente, la metabolización de las HTs es un evento crucial en el mecanismo de acción de estas hormonas en sus tejidos blanco (9). Dado que estos procesos metabólicos están íntegramente asociados al control de las acciones hormonales, se evaluó si las DCs eran capaces de metabolizar estas hormonas.

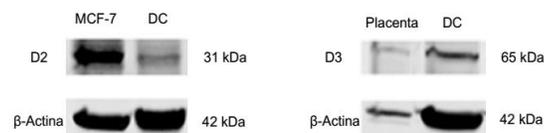
Para iniciar el análisis, se investigó la potencial presencia de los 3 tipos de DIOs/Ds (ARN mensajero y proteínas, respectivamente) descritas hasta la actualidad en DCs murinas, obtenidas como se reportó previamente en el laboratorio (71). Para ello, el perfil de expresión de DIO1, DIO2 y DIO3 se realizó mediante PCR Convencional. Como puede observarse en la **Figura 16A**, DCs expresan ARNm de D2 y D3, no así de D1.

A continuación se realizaron ensayos de Western Blot para evaluar la expresión proteica de las Ds presentes en DCs. Como se observa en la **Figura 16B**, las DCs expresan niveles proteicos de D2 y D3. Para D2, se evidenció una banda específica de 31 kDa correspondiente a la proteína en su estado monomérico. Por el contrario, para D3 no fue posible revelar la proteína monomérica (32 kDa), sino que se detectó una banda de 65 kDa, compatible con la presencia de la variante homodimérica de la enzima, descrita años atrás por Sagar y col. en células vivas (17).

A



B



C

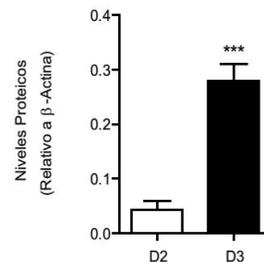


Figura 16: Expresión de Deiodinasas de Iodotironinas en DCs. (A) Detección de ARNm de D1 (panel izquierdo), D2 (panel medio) y D3 (panel derecho) por análisis de RT-PCR convencional del ARN total de DCs. ARN total de hígado y cerebro de ratón, de células Cos-7 y Jeg-3 se corrió en paralelo como controles positivos (primera columna), o controles negativos (segunda columna), respectivamente. ARNm de β-Actina se utilizó como gen constitutivo. Los productos de RT-PCR se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa al 2% seguido de tinción con bromuro de etidio. (B) Western Blot representativo de lisados totales de DCs para D2 (panel izquierdo) y D3 (panel derecho). Los lisados totales de células MCF-7 y Placenta se corrieron en paralelo como controles positivos de D2 y D3, respectivamente. Las muestras fueron separadas en un gel SDS-PAGE al 10%, transferidas posteriormente a membranas de nitrocelulosa, y se incubaron con anticuerpos específicos anti-D2 o anti-D3. El control de carga se realizó utilizando un anticuerpo anti-β-actina. Se muestra un experimento representativo de 3 independientes realizados por triplicado, y con resultados similares. (C) Expresión comparativa de Ds en DCs. Análisis cuantitativo densitométrico de Western Blot. Los datos se expresan como media ± DE de un experimento representativo de 3 con resultados similares y realizado por triplicado. *** P < 0,001 frente a D2.

P

or
su
par
te,
el
aná
lisis
den
sito
métr
ico
de
We

stern Blot sobre los niveles proteicos de estas Ds registró una significativa diferencia de expresión (6,5 veces) de D3 por sobre D2 (**Figura 16C**).

Tomando en cuenta todos estos resultados, se pudo concluir que DCs expresan D2 y D3, y que en condiciones basales la expresión proteica comparativa es mayor para D3.

IV.2.2 Las DCs murinas exhiben capacidad de metabolizar HTs

La expresión de Ds en DCs como principales enzimas reguladoras de los niveles locales de HTs, motivó el diseño y ejecución de ensayos que permitieran revelar una supuesta capacidad metabolizante en estas células. Para este fin, se determinaron las actividades enzimáticas de D2 y D3 como se describe a continuación.

En primer lugar, se adaptaron las técnicas para determinar actividad enzimática de D2 y de D3 en el modelo celular de DCs. En este sentido, inicialmente se evaluó a través de una curva de actividad enzimática vs. concentración de proteínas totales del homogenato celular, aquella concentración que refleja un comportamiento lineal de actividad enzimática, es decir, que permite detectar cambios lineales en esta actividad. En la **Figura 17A y B**, se grafican las curvas de actividad de D2 y D3, respectivamente, evaluadas con concentraciones crecientes de proteínas totales. Se ensayaron 3 concentraciones de proteínas totales (escogidas mediante análisis bibliográfico), las que permitieron establecer un rango de linealidad para cada actividad enzimática. De acuerdo a los resultados obtenidos, se escogieron para futuros ensayos concentraciones proteicas comprendidas en un rango de comportamiento lineal para cada actividad enzimática, 50 µg para cada Ds.

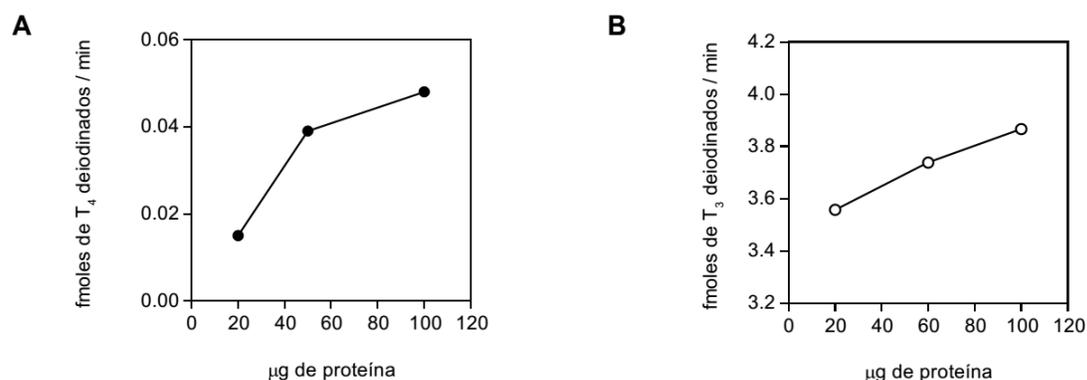


Figura 17: Actividad de Deiodinasas de Iodotironinas en función de la concentración de proteínas totales en DCs. Se determinó la actividad enzimática de D2 (A) y D3 (B) frente a concentraciones crecientes de proteínas totales provenientes de lisados de DCs.

Una vez adaptadas las técnicas a las condiciones del modelo experimental, se evaluó la capacidad de las DCs de metabolizar ambas HTs. La **Figura 18** representa de manera comparativa los niveles de actividad enzimática de D2 y D3. Como se puede observar, los niveles de [¹²⁵I]-T₃ deiodinada (actividad de D3) fueron significativamente mayores a los de [¹²⁵I]-T₄ deiodinada (actividad de D2). Se debe destacar que la diferencia de actividad en favor de D3 (6.6 veces) es muy similar a aquella diferencia encontrada entre los niveles proteicos de ambas Ds (**Figura 16C**).

Estos resultados permiten sugerir un rol preponderante de D3 por sobre D2 en el control de los niveles intracelulares de HTs en DCs, revelando que en estado basal estas células exhiben un perfil metabólico preferentemente inactivante sobre estas hormonas (deiodinación de T₃ a T₂ y de T₄ a rT₃).

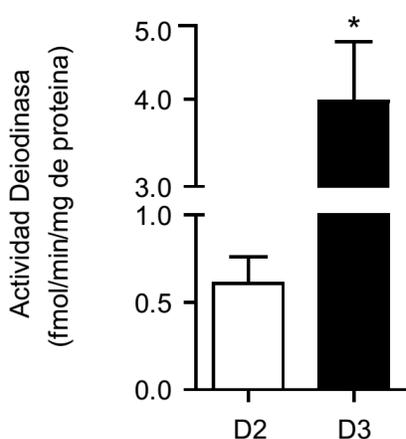


Figura 18: Actividad de Deiodinasas de Iodotironinas en DCs. Actividades de D2 y D3 en DCs. Los resultados se expresan como fmol de T4 deiodinada (actividad de D2) o fmol de T₃ diiodinada (actividad de D3) / min / mg de proteína. Los datos se expresan como media ± DE y son de un experimento representativo de 3 realizados por triplicado con resultados similares. * P <0,05 comparado con D2.

IV.2.3 T₃ regula el metabolismo de HTs en DCs

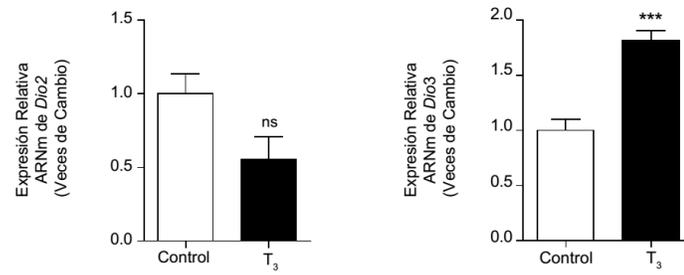
A continuación se evaluó si la modificación de los niveles intracelulares de HTs tiene un efecto sobre las actividades enzimáticas de las Ds expresadas en DCs. Para ello, iDCs fueron tratadas con T₃ (5 nM) por 18 h y posteriormente se determinaron: la capacidad de T₃ de regular la expresión génica y proteica de las deiodinasas de iodotironinas, y sus actividades enzimáticas.

Se pudo observar que los resultados obtenidos mostraron que T₃ aumentó significativamente la expresión del ARNm de D3 (81% frente a su control, **Figura 19A**) y también los niveles proteicos de D3 (274% frente a su control, **Figura 19B**). Además, se registró un aumento significativo de la actividad enzimática de D3 posterior al tratamiento con T₃ (78% frente

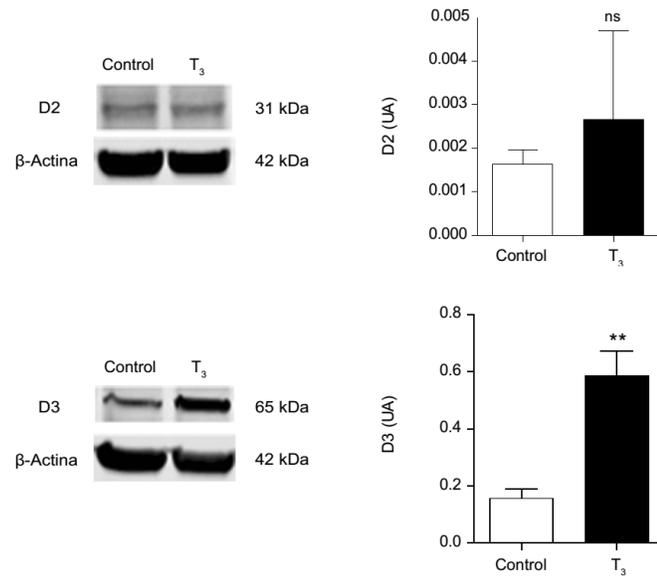
a su control, **Figura 19C**). Por el contrario, los niveles del ARNm de D2 no variaron en células tratadas con T_3 (**Figura 19A**). A su vez, los niveles proteicos de D2 no se modificaron ante el tratamiento con T_3 (**Figura 19A**) aunque su actividad sí registró una ligera pero significativa disminución (18%, **Figura 19C**).

Los resultados obtenidos permitieron concluir que T_3 regula a las deiodinasas de iodotironinas en DCs, aumentando la expresión y actividad de la tipo 3 y reduciendo la de tipo 2, por lo tanto ejerciendo un control de sus propios niveles intracelulares.

A



B



C

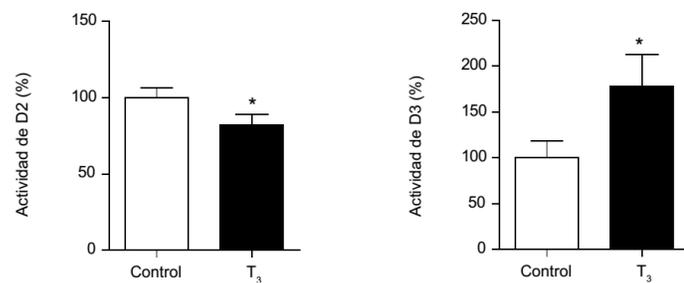


Figura 20: Efecto de T₃ sobre el metabolismo de HTs en DCs. Niveles de ARNm de D2 y D3, y proteicos de D2 y D3 se evaluaron en DC control (Control) o DCs tratadas con 5 nM de T₃ por 18 h (T₃). **(A)** Análisis de qPCR para el ARNm de D2 (panel izquierdo) y D3 (panel derecho). Los niveles de ARNm de D2 y D3 se cuantificaron en relación a los de β-Actina. Los resultados se indican como veces de cambio relativas a los niveles de ARNm del control. *** P <0,001; ns = no significativo, frente al control. **(B)** Análisis por Western Blot de los niveles de proteína para D2 y D3. Los paneles de la izquierda muestran las bandas representativas de cada proteína, D2 (panel superior) y D3 (panel inferior). El control de carga se realizó con β-Actina. Los paneles de la derecha muestran el análisis densitométrico de las bandas de cada Western Blot. Los datos se expresan como media ± DE (unidades arbitrarias, UA) y son parte de un experimento representativo de 3 con resultados similares y llevados a cabo por triplicado. ** P <0,01; ns = no significativo, comparado con el control.

IV.3 Profundización del estudio de los efectos de HTs sobre las DCs.**IV.3.1 T₄ no induce maduración ni cambios fenotípicos en DCs**

Como fue comentado anteriormente, el laboratorio donde se realizó este trabajo de tesis demostró que T₃ tiene efectos relevantes sobre la maduración y la funcionalidad de las DCs murinas (71, 72, 73, 75). No obstante, y a pesar de que se considera a T₃ la HT activa, la principal HT liberada por la glándula tiroidea es T₄, como también la de mayor concentración sérica (19). Por su parte, T₄ es captada por la DC aunque con mucha menor afinidad que T₃ y con una mayor velocidad de eflujo de esta célula (**Figura 10A y C, respectivamente**). Todas estas evidencias condujeron a la evaluación del efecto de diferentes concentraciones de T₄ sobre un parámetro sensible a la acción de T₃ sobre la DC: producción y secreción de IL-12, tal como fue reportado oportunamente para T₃ (71). Para ello, DCs obtenidas de precursores de médula ósea fueron incubadas por 18 h con concentraciones crecientes de T₄ (desde sub a suprafisiológicas) y posteriormente se determinó la producción y secreción de IL-12 mediante citometría de flujo y ELISA, respectivamente.

Como se observa en la **Figura 20A**, ninguna de las concentraciones de T₄ ensayadas (T₄ 10 nM o subfisiológica, T₄ 100 nM o fisiológica, T₄ 1 μM o suprafisiológica) fue capaz de estimular la producción de IL-12 al tiempo evaluado. Por otro lado, cuando se determinó la secreción de IL-12 al sobrenadante celular, tampoco fue posible registrar cambios cuando se comparó la secreción de DCs no tratadas (Control) con las 3 concentraciones ensayadas de T₄ (**Figura 20B**).

Estos hallazgos, demuestran que T₄ no tendría efecto sobre la maduración y la funcionalidad de DCs. Sin embargo, dado que T₄ es denominada una pro-hormona (por su

IV - RESULTADOS

posterior conversión en sus células blanco a T₃), se pensó en la posibilidad de que para registrar sus efectos, éstos se deberían evaluar con mayor tiempo de tratamiento.

En consecuencia, los ensayos de secreción de IL-12 fueron evaluados a 3 diferentes tiempos de tratamiento (18, 24 y 36 h). Como se muestra en la **Figura 20C**, ninguna de las concentraciones de T₄ evaluadas fue capaz de modificar la secreción de IL-12 en comparación al control.

Estos resultados permiten concluir que T₄ no ejerce efectos sobre la maduración y funcionalidad de la DC, al menos cuando éstos son evaluados mediante la producción y secreción de IL-12.

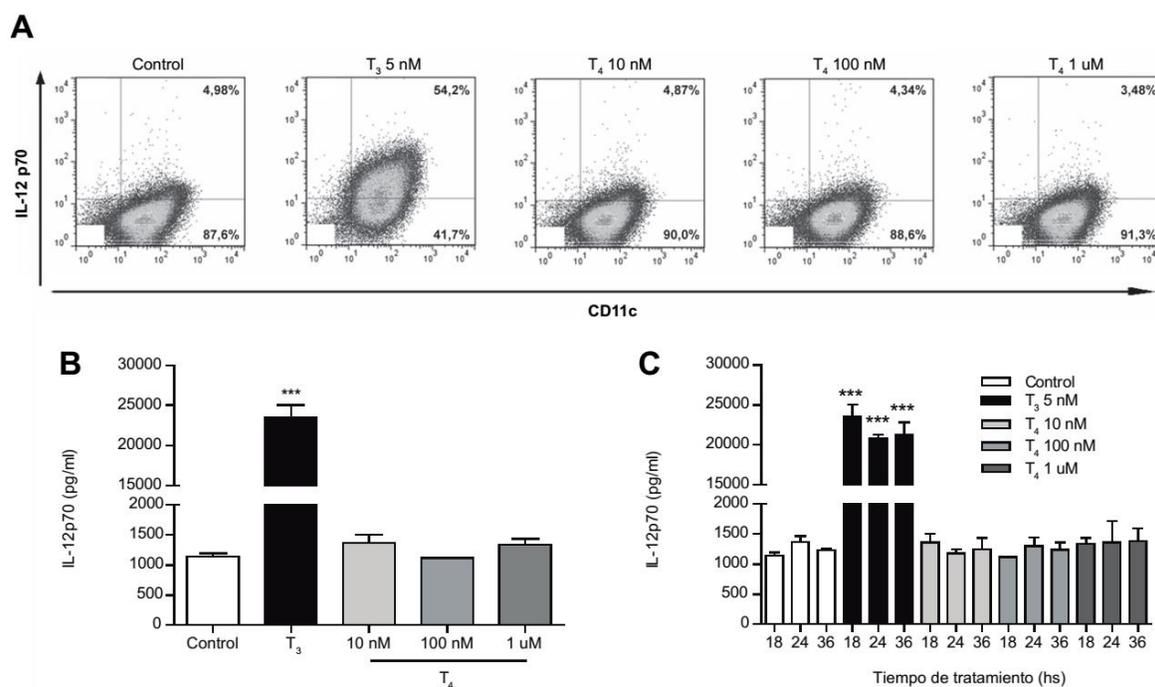


Figura 20: Efectos de T₄ sobre la producción y secreción de IL-12 en DCs. (A, B) DCs se incubaron con medio de cultivo (Control), T₃ (5 nM) o T₄ (10 nM, 100 nM o 1 M) durante 18 h. (A) los niveles de IL-12 intracelular se analizó por citometría de flujo en DCs utilizando un anticuerpo anti-IL-12 conjugado con PE. Se muestran gráficos representativos de 3 experimentos independientes realizados por triplicado. (B) La secreción de IL-12 se determinó en sobrenadantes de cultivo por ELISA. Los datos se expresan como media ± DE de un experimento representativo de 3 con resultados similares realizados por triplicado. *** P < 0,001 frente a DCs control (Control). (C) Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de T₄ (10 nM, 100 nM y 1 mM) sobre la secreción de IL-12 por ELISA a diferentes tiempos de incubación (18, 24 y 36 horas). Los datos se expresan como media ± DE de un experimento representativo de 3 con resultados similares realizados por triplicado. *** P < 0,001 comparado con DCs control

IV.3.2 Los efectos de T₃ sobre DCs involucran, al menos en parte, la acción de Esfingosina Quinasa I y/o II

Los reportes realizados por el laboratorio donde se realizó esta tesis, permitieron demostrar que T₃ induce sus efectos sobre la maduración y funcionalidad de DCs murinas a través de un mecanismo que involucra al TRβ1 (determinado in vitro e in vivo, (71, 75) y mediante vías Akt y NF-κB dependientes (e independientes de PI3K). Aunque fosforilaciones de Erk1/2, p38 y Jun quinasa parecerían no estar involucradas en la activación de DCs mediada por T₃ (72), la vía intracelular involucrada en los efectos inducidos por T₃ sobre DCs permanece sin dilucidar completamente. Un estudio realizado en el laboratorio de la Dra Graciela Cremaschi (Co-Directora de este Trabajo de Tesis Doctoral) (91), demostró por primera vez la interacción de vías de acción genómicas y no-genómicas que involucran la participación de la “*vía de señalización intracelular mediada por esfingolípidos*”, como mediadora del efecto de las HTs sobre la proliferación y activación de Li T. Considerando que ha sido demostrado que los mediadores de esta vía de señalización participan en la maduración, migración y supervivencia de DCs (92, 93, 94, 95, 96), se decidió iniciar el estudio de la participación de esta vía en el mecanismo de acción de T₃ a nivel de DCs.

Numerosos autores han destacado la acción de Esfingosina Quinasa I y II (SphK I y II) en eventos celulares relacionados a la maduración y funcionalidad de DCs (92, 97). Estos datos motivaron la evaluación de participación de SphK I y/o II en los efectos de T₃ sobre DCs. Para ello, se analizó el perfil de expresión del ARNm de SphK I y II en DCs tratadas con T₃ (5 nM) durante 18 h, en comparación con DCs no tratadas (Control). Como se observa en **Figura 21A**, T₃ es capaz de aumentar la expresión de SphK II, no así de SphK I. Estos resultados condujeron a evaluar el efecto

de la inhibición de la actividad de SphK II (con el inhibidor químico SKI, 5 nM) y la evaluación de la secreción de IL-12 por DCs luego del tratamiento con T₃ por 18 h.

La **Figura 21B** muestra que la presencia del inhibidor de la enzima SphK II (SKI) induce una reducción significativa de la secreción de IL-12 al medio de cultivo respecto de los niveles registrados para el grupo tratado con T₃ (5 nM) solamente.

Considerando que estos ensayos han sido los primeros ejecutados con el fin de investigar la participación de la vía intracelular mediada por esfingolípidos en DCs tratadas con T₃, sus resultados permiten concluir que existe una participación, al menos parcial, de algunos mediadores involucrados (potencialmente Esfingosina-1-Fosfato, producto de la acción de SphK I y II) en los mecanismos que T₃ utiliza para gatillar sus efectos en estas células.

La profundización de estos estudios permitirá aportar mayores evidencias acerca de la participación de esta vía de señalización intracelular en los efectos inducidos por T₃ a nivel de DCs.

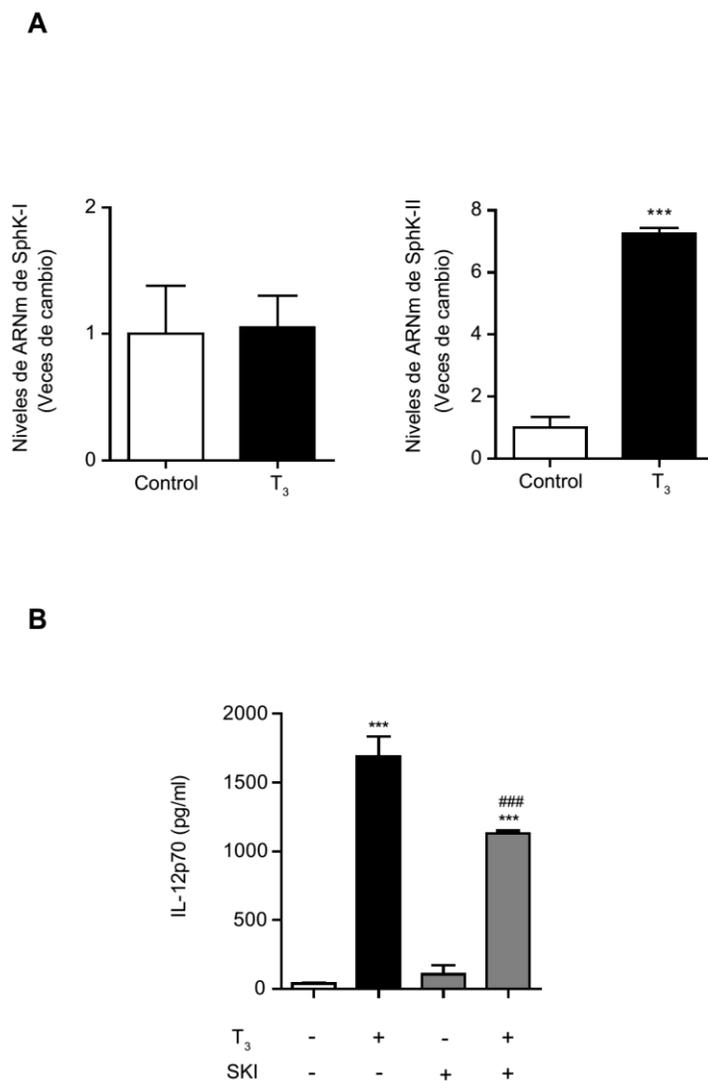


Figura 21: Inhibición de Sphk-I y II en DCs. Niveles de ARNm de SphK I y II se evaluaron en DCs control (Control) o DCs tratadas con 5 nM de T₃ por 18 h (T₃). **(A)** Análisis de qPCR para el ARNm de *SphK I* (panel izquierdo) y *SphK II* (panel derecho). Los niveles de ARNm de *SphK I* y *II* se cuantificaron en relación a los de β -Actina. Los resultados se indican como veces de cambio relativas a los niveles de ARNm del control. *** P <0,001 frente a DCs control (Control). **(B)** La secreción de IL-12 se determinó en sobrenadantes de cultivo por ELISA. Los datos se expresan como media \pm DE de un experimento representativo de 3 con resultados similares realizados por triplicado. *** P <0,001 comparado con DCs control (Control).

Las HTs ejercen amplios efectos biológicos en todas las especies de vertebrados. Sus papeles críticos en la regulación del crecimiento, desarrollo y metabolismo son particularmente notables. La mayoría de los tejidos expresan alguna o varias isoformas del receptor de HTs y, por lo tanto, son blanco de la acción de estas hormonas. Es por ello, que las alteraciones en los mecanismos de regulación de la disponibilidad de la hormona tiroidea o en su señalización tienen el potencial para afectar muchos sistemas fisiológicos, incluso generando diversos estados patológicos (18). En este sentido, la potencia biológica de las HTs se encuentra fuertemente influenciada por su concentración intracelular, que a su vez depende de **a)** la concentración de HTs circulante; **b)** el transporte de HTs a través de la membrana plasmática; y **c)** la presencia de Ds, que activan o inactivan HTs (20).

En este trabajo de Tesis Doctoral se investigaron los fenómenos asociados al transporte y metabolismo de HTs en DCs, siguiendo una línea de investigación lógica en base a los efectos que estas hormonas ejercen sobre dichas células, y que fueron descritos por nuestro grupo de trabajo a lo largo de la última década, como así también se inició la profundización del estudio de los mecanismos moleculares asociados a los efectos mencionados.

Las DCs son células críticas para la toma de decisiones inmunológicas que deben integrar señales de varias vías y receptores, incluyendo aquellas involucradas en la captación y reconocimiento de patrones, citoquinas pro-inflamatorias y hormonas, para determinar el tipo y magnitud de las respuestas inmunes adaptativas. Desde el año 2008 en adelante, hallazgos de nuestro laboratorio describieron los efectos que T_3 produce sobre la maduración y función de la DC. Al respecto, nuestro grupo reportó que las DCs derivadas de médula ósea de ratón expresan TR β 1 y que niveles fisiológicos de la HT activa (T_3) estimulan la maduración de las mismas y la

producción de IL-12, aumentando la capacidad aloestimuladora de linfocitos T y direccionando la respuesta hacia un perfil Th1. Estos resultados revelaron efectos sobresalientes de T_3 en el inicio de la inmunidad adaptativa, dotando a la DC además, de una mayor capacidad para estimular las respuestas de células T citotóxicas, con profundas implicancias en la inmunoterapia basada en DCs (71, 72, 73, 75). Por lo tanto, la acción de las HTs puede representar un blanco atractivo para la manipulación racional de la inmunogenicidad de DCs, ya sea sola o en combinación con otras estrategias inmunoterapéuticas (98).

Los resultados presentados en este trabajo de tesis destacan los mecanismos de transporte de HTs a través de la membrana plasmática de DCs y el metabolismo de dichas hormonas dentro de la célula, eventos críticos para la acción hormonal a nivel celular. Hasta donde sabemos, ambos mecanismos fueron escasa y sólo parcialmente estudiados en pocas células del sistema inmune hasta la fecha (99, 100, 101, 102) y por lo tanto éste es el primer estudio sistemático en el campo, realizado a nivel de DCs.

Por su parte, aunque varios efectos no genómicos rápidos iniciados principalmente por T_4 en la membrana plasmática han sido reportados, se acepta que T_4 actúa principalmente como una pro hormona a través de su conversión a T_3 , proporcionando la mayor parte de los niveles de T_3 circulantes e iniciando la acción de HTs dentro de las células blanco (32). La proporción de T_3 plasmática en comparación a la de T_3 producida localmente varía entre los diferentes tejidos, en aquellos con captación y conversión local de HTs muy activas (como la corteza cerebral), alrededor del 80% de la T_3 intracelular deriva de la T_4 sérica. En otros tejidos (riñón, por ejemplo) esta fracción es tan baja como un 13% (103). Resultados de esta tesis muestran que, de manera diferente a lo reportado por Mascanfroni y col. para T_3 (71), el tratamiento de DCs con varias dosis y a varios tiempos de exposición con T_4 no tiene ningún efecto sobre la producción y secreción de

IL-12, marcador muy sensible de la acción de T_3 a nivel de DCs. Estos resultados nos sugieren fuertemente que la respuesta de las DCs murinas a las HTs sería mediada, principalmente por efecto directo que T_3 ejerce sobre estas células. Cabe mencionar que en algunos tejidos, particularmente el SNC, la T_3 derivada de la deiodinación de T_4 mediada por D2 parece actuar en otras células, distintas a las que dieron origen a ésta (10). Por lo tanto, aunque T_4 es la principal HT circulante, T_3 también podría ser suministrada a las DCs desde otras células vecinas en sus sitios de maduración, ganglios linfáticos y bazo, por ejemplo. Teniendo en cuenta los eventos reportados previamente inducidos por T_3 sobre las características de DCs y sobre su función (71, 75), este enunciado parece racional en el contexto de una restricción de la activación indebida de DCs en circulación para preservar la precisión de las respuestas inmunes adaptativas. Otros hallazgos que se discutirán a lo largo de esta sección favorecerán la comprensión de la falta de efecto de T_4 , principalmente los relacionados a su transporte y metabolización celular.

Como se ha mencionado anteriormente, la actividad biológica de HTs depende de la concentración de T_3 intracelular, controlada por el transporte de HTs a través de las membranas de las DCs y el metabolismo de dichas hormonas dentro de estas células. En este sentido, los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis abren el conocimiento sobre ambos eventos a nivel de DCs, punto crucial para el destino del sistema inmune expuesto a patógenos o señales de daño. Los hallazgos obtenidos muestran que ambos transportadores, MCT10 y LAT2, están presentes en la DC a nivel de ARNm y proteína. Friesema y col., (104) demostraron que MCT10 es tan activo para el transporte de HTs como MCT8, el principal y más estudiado THT debido a su expresión en el cerebro, cuya mutación conduce al síndrome de Allan-Herndon-Dudley (24). Aunque en la literatura disponible se encuentre escasa información sobre la expresión de THTs en las células del sistema inmune, merece destacarse que neutrófilos murinos expresan ARNm de MCT10 pero no de MCT8 (102), y que la línea celular de macrófagos RAW264.7 también expresa

ARNm de MCT10 pero tampoco expresa ARNm de MCT8 ni de OCTP1C1 (105), en consonancia con nuestros resultados. Es importante subrayar que los macrófagos están filogenética- y funcionalmente relacionados a las DCs, y fue reportado que macrófagos derivados de la médula ósea de ratón también experimentan efectos dependientes de T_3 (106), aunque el mecanismo de transporte HTs en estas células aún no fue evaluado.

El análisis exhaustivo del mecanismo de transporte de HTs reveló que las DCs son más eficaces transportando T_3 que T_4 , hallazgo en consonancia con la expresión y preferencia de transporte para MCT10 y LAT2 reportadas en varios sistemas (87, 104). De acuerdo a estos resultados, la captación de T_3 en DCs es mediada por un mecanismo independiente de la presencia de sodio en el medio, tal como se había descrito para el transporte de HTs mediante MCT10 y LAT2 (88, 89).

En relación a los parámetros cinéticos del transporte de HTs y para las concentraciones de HTs que fueron evaluadas, el proceso de captación de T_3 exhibió tanto un componente saturable como así también un componente no saturable, en estrecho acuerdo con el transporte de HTs en otras células (86, 87). Es importante subrayar, que el transporte no saturable podría reflejar la difusión de HTs a través de la membrana celular y/o un sistema de transporte con valores de Km en el rango milimolar por mediadores aún no identificados (86). Por otro lado, cuando se adiciona T_3 no radiomarcada, el proceso saturable muestra una reducción en la captación de [125 I]- T_3 dependiente de la dosis, con una Km aparente 10 veces por debajo de la concentración de T_4 necesaria para inhibir el 50% de esta captación (0,76 μ M vs. 7,78 μ M). Estos valores de Km e $IC50$ para T_3 y T_4 respectivamente, son similares a aquellos previamente reportados para la captación de ambas HTs por los principales THTs (87). Es importante destacar, que el análisis cinético detallado de la captación de [125 I]- T_4 no fue posible debido a su baja magnitud. En conjunto, estos

resultados cinéticos proporcionan una mayor evidencia en relación al transporte preferente de T_3 por sobre T_4 a nivel de DCs, y dan un soporte adicional a la falta de efectos de T_4 sobre la función de DCs, al menos en los tiempos y concentraciones evaluados.

Los resultados del estudio del transporte de T_3 en DCs en presencia de inhibidores selectivos de MCT10 y LAT2 sugieren fuertemente el papel principal de MCT10 en el transporte de T_3 en DCs. De acuerdo con estos hallazgos, se informó anteriormente que los LATs presentan menor afinidad que los MCTs para transportar HTs (107), y un informe reciente reveló que LAT2 exhibe una mayor afinidad por 3, 3'-diiodotironina (T_2 , una iodotironina que sólo ejerce pocos efectos biológicos), una menor para T_3 y ninguna afinidad para T_4 (89), lo que refuerza la evidencia de que LAT2 exhibiría una participación menor en la captación de T_3 a través de la membrana de la DC. Merece destacarse también que MCT10 parece facilitar el transporte bidireccional de T_3 y T_4 a través de la membrana plasmática (104), aunque se sugirió que desempeña un papel prominente en el eflujo de T_3 de las células (108). En este sentido y teniendo en cuenta la preferencia de MCT10 para el transporte de T_3 , el mayor eflujo de T_4 que T_3 desde las DCs podría ser debido, al menos en parte, a otros moduladores conocidos y desconocidos del mecanismo de acción de HTs dentro de la célula. En relación a ello, se ha reportado a μ -cristallin o CRYM, como una proteína citoplasmática de unión a T_3 dependiente de NADPH, que se une a T_3 con mayor afinidad que T_4 y que es un regulador clave de la biodisponibilidad intracelular de T_3 (109). La profundización del estudio de la acción de T_3 dentro de la DC favorecerá el esclarecimiento de este proceso, actualmente en estudio en el laboratorio donde se realizó este trabajo de Tesis Doctoral.

Sorprendentemente, mientras que el ARNm de MCT10 y LAT2, y los niveles de sus proteínas se incrementaron después de tratamiento de DCs con T_3 , la velocidad del eflujo de T_3

(pero no su captación) se incrementó en comparación con las células no tratadas. Estos resultados podrían estar relacionados, al menos en parte, a la función preferible de MCT10 por el eflujo de T_3 (108). A la inversa, la captación de T_4 se incrementó en DCs tratadas con T_3 . Aunque bajo esta circunstancia la entrada de T_4 a las DCs puede ser favorecida como un mecanismo compensatorio para contrarrestar la caída en el nivel intracelular T_3 , la captación de T_4 es significativamente menor que la de T_3 en todos los tiempos evaluados. Estos hallazgos podrían estar involucrados en la depuración de T_3 de las DCs, manteniendo un balance homeostático y restringiendo la acción de HTs posterior a la activación de dichas células.

Puesto que los niveles de HTs fluctúan muy levemente en el plasma de individuos sanos, los procesos metabólicos que responden a HTs son activados y desactivados por estas hormonas a través de vías de deiodinación que tienen lugar dentro de la misma célula blanco. Por lo tanto, existe una compleja red de mecanismos que regulan la expresión y actividad de deiodinasas de iotironinas, mediando una rápida modificación de la señalización dependiente de HTs en una célula específica (19). Aunque este mecanismo también debería tener lugar en las células del sistema inmune que responden a HTs, la expresión de Deiodinasas de Iotironinas se ha reportado solo en algunos tipos de estas células. Estos reportes incluyen la expresión de la proteína D3 en granulocitos y macrófagos de un modelo experimental de rata de encefalomiелitis alérgica experimental (99), la detección de D3 por inmunocitoquímica en las células inflamatorias que rodean a un absceso local (99), la expresión de niveles basales del ARNm de D2 en la línea celular de macrófago RAW264.7 (que aumenta después del tratamiento con LPS) con niveles de ARNm de D1 y D3 bajo el límite de detección (105), y la expresión del ARNm de D2 y D3 en leucocitos de hámster (101). Varios autores reportaron que el metabolismo de HTs en neutrófilos fagocíticos resulta en la producción de iodo inorgánico importante para la función de estas células (110, 111), sugiriendo una vinculación con Ds. Por otro lado, Kwakkel y col., (105) describieron un

aumento en la actividad de D2 en procesos inflamatorios agudos y/o crónicos. Estos son algunos de los escasos reportes sobre actividad deiodinasa de Ds en células de linaje inmune producidos hasta el momento.

De igual manera que con el transporte de HTs, nuestros resultados proporcionan el primer reporte sobre el metabolismo de HTs en DCs murinas, abarcando todo el proceso metabólico desde las expresiones y las actividades de Ds, hasta su regulación por parte de la propia T_3 . Al respecto, los resultados muestran la expresión de ARNm de D2 y D3 en DCs, pero no de D1. Este perfil de expresión no es sorprendente, ya que se asemeja al perfil de muchas células que responden a HTs, donde tanto D2 como D3 están principalmente involucradas en el control de la acción de HTs a nivel celular (19). Por el contrario, D1, una enzima de alto K_m (10^{-7} - 10^{-6} M) expresada preferentemente en hígado, riñón, tiroides y pituitaria, contribuye principalmente a la circulación de T_3 y actúa como una enzima de barrido, muy importante en el reciclaje de iodo desde iodotironinas menores y biológicamente inactivas (112, 113). Por otra parte, dado que D1 se encuentra en la membrana plasmática y tiene baja afinidad por T_4 , la T_3 generada por D1 difunde rápidamente de las células y llega al plasma sin afectar sensiblemente las concentraciones intracelulares de T_3 (13). Cabe señalar que los niveles de proteína de D3 y su actividad enzimática son mayores que los de D2. Por otra parte, teniendo en cuenta que ambas enzimas exhiben K_m bajo (rango nM, (8)), pero que D3 tiene una vida media más larga que D2 (114), se sugiere un mayor papel de la inactivación de T_3 por D3 que de la generación intracelular de T_3 por actividad de D2 sobre T_4 . Estos resultados son esperables debido a la escasa captación de T_4 por la célula y manifiestan otro mecanismo de control celular sobre la acción de T_3 en DCs, favoreciendo su inactivación. Como D3 también cataliza la inactivación de T_4 por su conversión al metabolito inactivo rT_3 , la pequeña cantidad de T_4 que ingresa a las DCs podría ser también sensible a dicha inactivación, aportando mayores evidencias de la falta de efecto de T_4 en estas células. Estos

resultados poseen una gran relevancia ya que este mecanismo podría estar involucrado en el control de la acción de T_3 en DCs para evitar la perpetuación de la respuesta proinflamatoria inducida a través del perfil Th1 y la actividad de las células T citotóxicas desencadenada por T_3 (71, 75). Si se consideran en conjunto, los resultados que muestran una baja captación de T_4 por las DCs y aquellos que revelan una disminución de la activación de HTs por D2 dentro de la célula, debe mencionarse nuevamente que T_3 puede ser suministrada a las DCs en parte desde el medio extracelular. Sin embargo, como ya fuese mencionado, T_3 también podría ser producida por actividad de D2 sobre T_4 en las células vecinas en sus sitios de activación (10). Dado que es esperable que las DCs estén en estado inmaduro en circulación, se podría hipotetizar que esta segunda fuente de T_3 poseería una magnitud suficiente para modular el funcionamiento de las DCs, y desempeñaría un papel importante en el control del lugar preciso de maduración de estas células.

Los resultados muestran que el efecto de T_3 sobre el aumento de la expresión y actividad de D3 es más evidente que la reducción de D2 en DCs, indicando que la actividad celular de T_3 debe ser finamente regulada en estas células. Estos resultados observados en relación a la regulación de deiodinasas de iodo tironinas por T_3 a nivel de la DC están de acuerdo con muchos autores (112, 115) que reportaron que las fluctuaciones en las concentraciones de T_3 y T_4 podrían conducir a cambios homeostáticos recíprocos en la actividad de D2 y D3. De hecho, a medida que las concentraciones de T_3 aumentan, la expresión del ARNm de D3 se incrementa, aumentando la depuración de T_3 ; mientras que la expresión del ARNm de D2 decae modestamente, disminuyendo la producción de T_3 . Por el contrario, si las concentraciones de T_3 descienden, una disminución de la vía de D3 atenuará la eliminación de T_3 . Además, se ha demostrado que la degradación mediada por ubiquitina de D2 regula la activación de HTs en varios tejidos. En esta situación, la degradación proteasomal de D2 mediada por ubiquitina, se incrementa después de la

exposición al sustrato (T_4), y representa un mecanismo post translacional rápido y sensible para controlar y limitar la actividad de D2, y por consecuencia la producción de T_3 (116). Teniendo en cuenta la baja magnitud de la captación de T_4 por las DCs, este mecanismo difícilmente podría tener lugar en estas células, aunque no puede ser descartado.

A continuación, se muestra un Esquema Integrador de los resultados obtenidos en esta parte del trabajo de Tesis Doctoral y referidos a la caracterización de los eventos de Transporte y Metabolismo de HTs en DCs, y la regulación de los mismos por efecto de T_3 (**Figura 22**).

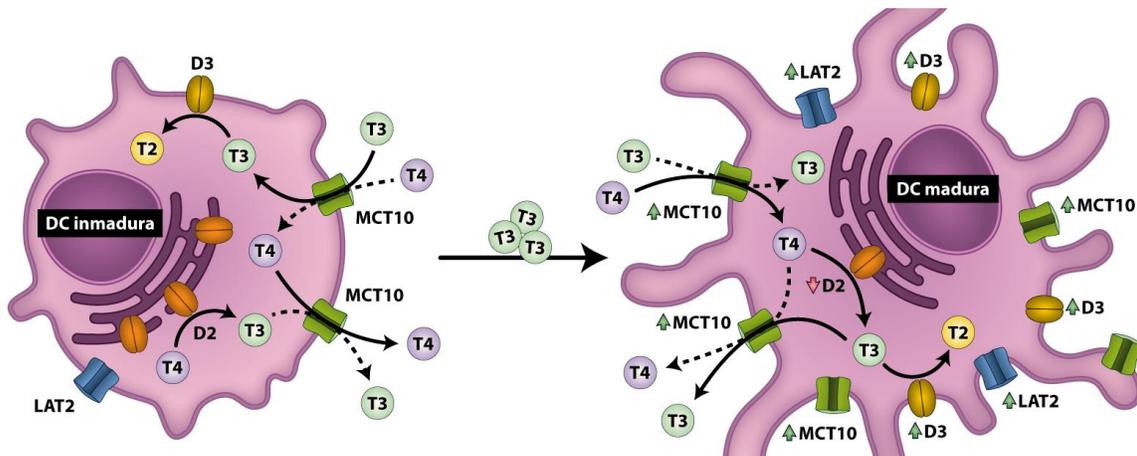


Figura 22: Esquema Integrador Transporte y Metabolismo de HTs en DCs. Resumen de los resultados de esta parte del trabajo de Tesis Doctoral, que permitieron describir la presencia de proteínas involucradas en los fenómenos de Transporte y Metabolismo de HTs en DCs, y su regulación por parte de T_3 . Las flechas con líneas completas indican mayor preferencia del THT para dicho proceso que las flechas con líneas punteadas.

Por otro lado, en este trabajo de Tesis Doctoral se inició el estudio de la participación de la vía intracelular mediada por los esfingolípidos en los efectos registrados por T_3 sobre DCs, y mediados por la activación de Akt independientemente de PI3K (72). En este sentido, reportes previos aportaron evidencia de que ciertos esfingolípidos se ven involucrados en la activación no-clásica de Akt (38, 39, 40). Otros autores han destacado también la acción de SphK I y II en eventos celulares relacionados a la maduración y funcionalidad de DCs (92, 97), motivando la búsqueda de hallazgos que permitan dilucidar el rol que estas enzimas pueden cumplir en la señalización dependiente de T_3 en DCs. Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral demostraron que T_3 incrementó la expresión de SphK II, no así de SphK I. Además, éstos mostraron que la inhibición de la actividad de ambas enzimas indujo una reducción significativa de la secreción de IL-12 al medio de cultivo respecto de los niveles registrados para las DCs estimuladas con T_3 . Si bien estos resultados son muy preliminares, los hallazgos obtenidos permiten inferir la potencial relación existente entre mediadores de la vía intracelular mediadas por esfingolípidos y los efectos de T_3 descritos anteriormente a nivel de las características y funcionalidad de las DCs (71, 75), tal como fuese descrito en otros tipos celulares blanco de la acción de estas hormonas (33, 91). La profundización de este estudio, actualmente en curso en el laboratorio donde se realizó este trabajo de Tesis Doctoral, permitirá dilucidar estos eventos.

En conclusión, nuestros resultados subrayan con mayor detalle la acción de HTs a nivel de DCs, revelando el papel preferencial de T_3 sobre T_4 , describiendo los mecanismos de transporte de HTs y deiodinación de iodotironinas en estas células y vislumbrando la participación de la vía de señalización intracelular de las esfingomielinas en los efectos de dicha HT sobre las características y funcionalidad de las DCs. Los resultados obtenidos amplían el conocimiento del efecto de HTs en la iniciación de la respuesta inmune y su rol dirigiendo la inmunidad adaptativa. Además, estos hallazgos tienen profundas implicaciones en la inmunopatología, incluyendo el cáncer y las manifestaciones autoinmunes de la glándula tiroidea en la encrucijada de los sistemas inmune y endocrino. Cabe señalar la relevancia de estos resultados con respecto a los efectos registrados de T_3 en el funcionamiento de la DC, ya que el conocimiento del transporte y el metabolismo de las HTs en DCs provee valiosas herramientas para manipular el potencial inmunogénico de estas células, abriendo la posibilidad de regular positivamente el desarrollo de inmunidad protectora o negativamente controlando la generación de inflamación tiroidea autoinmune.

Es importante resaltar que estos resultados fueron presentados en diversas reuniones científicas internacionales, nacionales y locales. Además, la mayor parte de los resultados de este trabajo de Tesis Doctoral fueron recientemente publicados en la revista "Journal of Endocrinology", como se menciona al final de este trabajo de Tesis Doctoral.

Los hallazgos que en este trabajo de Tesis Doctoral se describen proveen un mayor entendimiento de la interrelación entre el sistema inmune y el sistema endócrino, ya que profundizan el conocimiento de los eventos moleculares que están vinculados al efecto de HTs sobre la DC. Además, y si bien los mismos ameritan ser estudiados en mayor profundidad, estos reportes confirman suposiciones previas en relación a los efectos previamente descritos para T₃ sobre este tipo de célula inmune.

Por su parte, siendo las patologías relacionadas con la glándula tiroides las disfunciones endócrinas más comunes, nuestras observaciones pueden contribuir a la comprensión de las bases moleculares de las patologías tiroideas mediadas por el sistema inmune y de las consecuencias inmunológicas de los desórdenes hipo e hipertiroideos.

Finalmente, vale destacar que el conocimiento del Transporte y el Metabolismo de las HTs en DCs provee valiosas herramientas para manipular el potencial inmunogénico de estas células, abriendo la posibilidad de regular positivamente el desarrollo de inmunidad protectora o negativamente controlando la generación de inflamación tiroidea autoinmune.

- 1- Lydiatt y Bucher, 2011. *Historical vignettes of thyroid gland*. 24:1-9.
- 2- Dagrosa 2015. *Síntesis, liberación y transporte de las hormonas tiroideas*. *Fisiopat Mol y Clin Endocr Sección X*:489-498.
- 3- Renko y col., 2016. *A nonradioactive DEHAL assay for testing substrates, inhibitors, monitoring endogenous activity*. *Endocrinology* 157:4516-4525.
- 4- Pellizas y col., 2015. "Mecanismos de Acción de las Hormonas Tiroideas". En: "Fisiología Molecular y Clínica Endocrinológica", Eds: Calandra R y Barontini M, Eli Lilly Interamérica Sucursal Argentina, 2015, pp: 499-517.
- 5- Williams y Basett, 2011. *Deiodinases: the balance of thyroid hormone: local control of thyroid hormone action: role of type 2 deiodinase*. *J Endocrinol* 209:261-272.
- 6- Mondal y col., 2016. *Chemistry and Biology in the Biosynthesis and Action of Thyroid Hormones*. 55:7606-30.
- 7- Basett y Williams, 2008. *Critical role of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in bone*. 43:418-26.
- 8- Dumitrescu y col., 2013. *The syndromes of reduced sensitivity to thyroid hormone*. *Biochim Biophys Acta* 1830:3987-4003.
- 9- Dentice y col., 2013. *The deiodinases and the control of intracellular thyroid hormone signaling during cellular differentiation*. *Biochim Biophys Acta* 1830:3937-45.
- 10- St Germain y col., 2009. *Minireview: Defining the roles of the iodothyronine deiodinases: current concepts and challenges*. *Endocrinology* 150:1097-107.
- 11- Darras y Van Herk, 2012. *Iodothyronine deiodinase structure and function: from ascidians to humans*. *J Endocrinol* 215:189-206.
- 12- Solís y col., 2011. *Bioactivity of thyroid hormones. Clinical significance of membrane transporters, deiodinases and nuclear receptors*. *Rev Cl Rev Invest Clin* 63:287-308.
- 13- Gereben y col., 2015. *Scope and limitations of iodothyronine deiodinases in hypothyroidism*. *Nat Rev Endocrinol* 11:642-52.
- 14- Dentice y Salvatore, 2011. *Deiodinases: the balance of thyroid hormone: local impact of thyroid hormone inactivation*. *J Endocrinol* 209:273-82.
- 15- Ciavardelli y col., 2014. *Type 3 deiodinase: role in cancer growth, stemness, and metabolism*. *Front Endocrinol* 5:215.
- 16- Casula y col., 2012. *Thyroid hormone deiodinases and cancer*. *Front Endocrinol* 3:74.
- 17- Sagar y col., 2008. *The thyroid hormone-inactivating deiodinase functions as a homodimer*. *Mol Endocrinol* 22:1382-93.
- 18- Charalambous y Hernandez, 2013. *Genomic imprinting of the type 3 thyroid hormone deiodinase gene: regulation and developmental implications*. *Biochim Biophys Acta* 1830:3946-55.
- 19- Bianco, 2013. *Cracking the code for thyroid hormone signaling*. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 124:26-35.
- 20- van der Deure y col., 2010. *Molecular aspects of thyroid hormone transporters, including MCT8, MCT10, and OATPs, and the effects of genetic variation in these transporters*. *J Mol Endocrinol* 44:1-11.
- 21- Bernal y col., 2015. *Thyroid hormone transporters--functions and clinical implications*. *Nat Rev Endocrinol* 11:406-17.
- 22- Visser y col., 2011. *Minireview: thyroid hormone transporters: the knowns and the unknowns*. *Mol Endocrinol* 25:1-14.

- 23- Kinne y col., 2011. Primary and secondary thyroid hormone transporters. *Thyroid Res* 4 Suppl 1:S7.
- 24- Charzewska y col., 2016. Hypomyelinating leukodystrophies –a molecular insight into the white matter pathology. *Clin Genet* 90:293-304.
- 25- van Mullem y col., 2016. Effects of thyroid hormone transporters MCT8 and MCT10 on nuclear activity of T3. *Mol Cell Endocrinol* 437:252-260.
- 26- Bourgeois y col., 2016. Characterization of Chicken Thyroid Hormone Transporters. *Endocrinology* 157:2560-74.
- 27- Mayerl y col., 2014. Transporters MCT8 and OATP1C1 maintain murine brain thyroid hormone homeostasis. *J Clin Invest* 124:1987-99.
- 28- Li y col., 2016. Large amino acid transporter 1 mediated glutamate modified docetaxel-loaded liposomes for glioma targeting. *Colloids Surf B Biointerfaces* 141:260-7.
- 29- Brent y col., 2012. Mechanisms of thyroid hormone action. *J Clin Invest* 122:3035-43.
- 30- Flamant y col., 2013. Thyroid hormone receptors: the challenge of elucidating isotype-specific functions and cell-specific response. *Biochim Biophys Acta* 1830:3900-7.
- 31- Astapova y col., 2013. The in vivo role of nuclear receptor corepressors in thyroid hormone action. *Biochim Biophys Acta* 1830:3876-81.
- 32- Davis y col., 2016. Nongenomic actions of thyroid hormone. *Nat Rev Endocrinol* 12:111-121.
- 33- Cremaschi y col., 2016. Thyroid hormones and their membrane receptors as therapeutic targets for T cell lymphomas. *Pharmacol Res* 109:55-63.
- 34- Lei y col., 2008. T3 increases Na-K-ATPase activity via a MAPK/ERK1/2-dependent pathway in rat adult alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294:L749-54.
- 35- Cao y col., 2005. Thyroid hormone induces rapid activation of Akt/protein kinase B-mammalian target of rapamycin-p70S6K cascade through phosphatidylinositol 3-kinase in human fibroblasts. *Mol Endocrinol* 19:102-12.
- 36- Park y col., 2006. An essential role for Akt1 in dendritic cell function and tumor immunotherapy. *Nat Biotechnol* 24:1581-90.
- 37- Verga Falzacappa y col., 2007. Thyroid hormone receptor TRbeta1 mediates Akt activation by T3 in pancreatic beta cells. *J Mol Endocrinol* 38:221-33.
- 38- Young y col., 2013. Sphingolipids: regulators of crosstalk between apoptosis and autophagy. *J Lipid Res* 54:5-19.
- 39- Osawa y col., 2011. Acid sphingomyelinase regulates glucose and lipid metabolism in hepatocytes through AKT activation and AMP-activated protein kinase suppression. *FASEB J* 25:1133-44.
- 40- Stratford y col., 2001. Ceramide dissociates 3'-phosphoinositide production from pleckstrin homology domain translocation. *Biochem J* 354:359-68.
- 41- Gomez-Muñoz y col., 2005. Ceramide-1-phosphate promotes cell survival through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *FEBS Lett* 579:3744-50.
- 42- Gangoiti y col., 2008. Ceramide 1-phosphate stimulates macrophage proliferation through activation of the PI3-kinase/PKB, JNK and ERK1/2 pathways. *Cell Signal* 20:726-36.
- 43- Ashley y col., 2016. Neuroendocrine-immune circuits, phenotypes, and interactions. *Horm Behav* 87:25-34.
- 44- Butts y col., 2008. Neuroendocrine factors alter host defense by modulating immune function. *Cell Immunol* 252:7-15.
- 45- Selye, 1941. Variations in organ size caused by chronic treatment with adrenal cortical compounds: An example of a dissociated adaptation to a hormone. *J Anat* 76:94-99.
- 46- Selye y Fortier, 1949. Adaptive reactions to stress. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* 29:3-18.

- 47- Webster y col., 2002. Corticotropin releasing hormone (CRH) antagonist attenuates adjuvant induced arthritis: role of CRH in peripheral inflammation. *J Rheumatol* 29:1252-61.
- 48- Butts y col., 2007. Progesterone inhibits mature rat dendritic cells in a receptor-mediated fashion. *Int Immunol* 19:287-96.
- 49- De Vito y col., 2011. Thyroid hormones as modulators of immune activities at the cellular level. *Thyroid* 21:879-90.
- 50- Wrona, 2006. Neural-immune interactions: an integrative view of the bidirectional relationship between the brain and immune systems. *J Neuroimmunol* 172:38-58.
- 51- Hodkinson y col., 2009. Preliminary evidence of immune function modulation by thyroid hormones in healthy men and women aged 55-70 years. *J Endocrinol* 202:55-63.
- 52- Silberstein y col., 2009. Immunology, signal transduction, and behavior in hypothalamic-pituitary-adrenal axis-related genetic mouse models. *Ann N Y Acad Sci* 1153:120-30.
- 53- Watanabe y col., 2008. A new assay system for evaluation of developmental immunotoxicity of chemical compounds using respiratory syncytial virus infection to offspring mice. *Environ Toxicol Pharmacol* 25:69-74.
- 54- Afhami y col., 2007. Assessment of the factors involving in the development of hypothyroidism in HIV-infected patients: a case-control study. *Infection* 35:334-8.
- 55- Ho y col., 2004. Hypothyroidism and adrenal insufficiency in sepsis and hemorrhagic shock. *Arch Surg* 139:1199-203.
- 56- Golomec y col., 2008. Nonthyroidal illness syndrome and euthyroid sick syndrome in intensive care patients. *Semin Perinatol* 32:413-8.
- 57- Bittencourt y col., 2007. Antibody responses in hyperthyroid rats. *Int Immunopharmacol* 7:989-93.
- 58- Vinayagamoorthi y col., 2005. Potentiation of humoral immune response and activation of NF-kappaB pathway in lymphocytes in experimentally induced hyperthyroid rats. *Cell Immunol* 238:56-60.
- 59- Nandakumar y col., 2008. Activation of NF-kappaB in lymphocytes and increase in serum immunoglobulin in hyperthyroidism: possible role of oxidative stress. *Immunobiology* 213:409-15.
- 60- Klecha y col., 2006. Integrative study of hypothalamus-pituitary-thyroid-immune system interaction: thyroid hormone-mediated modulation of lymphocyte activity through the protein kinase C signaling pathway. *J Endocrinol* 189:45-55.
- 61- Yao y col., 2007. Inhibitory effects of thyroxine on cytokine production by T cells in mice. *Int Immunopharmacol* 7:1747-54.
- 62- De vito y col., 2012. Nongenomic effects of thyroid hormones on the immune system cells: New targets, old players. *Steroids* 77:988-95.
- 63- Satpathy y col., 2012. Re(de)fining the dendritic cell lineage. *Nat Immunol* 13:1145-54.
- 64- Petersen y col., 2010. Tumor antigen presentation by dendritic cells. *Crit Rev Immunol* 30:345-86.
- 65- Merad y col., 2013. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol* 31:563-604.
- 66- Gallo y col., 2013. The dendritic cell response to classic, emerging, and homeostatic danger signals. Implications for autoimmunity, *Front Immunol* 4:138.
- 67- Savina y col., 2007. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol Rev* 219:143-56.
- 68- Mescher y col., 2006. Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells. *Immunol Rev* 211:81-92.

- 69- Curtsinger y Mescher, 2010. Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Curr Opin Immunol* 22:333-40.
- 70- Mooij y col., 1994. Effect of thyroid hormones and other iodinated compounds on the transition of monocytes into veiled/dendritic cells: role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, tumour-necrosis factor-alpha and interleukin-6. *J Endocrinol* 140:503-12.
- 71- Mascanfroni y col., 2008. Control of dendritic cell maturation and function by triiodothyronine. *FASEB J* 22:1032-42.
- 72- Mascanfroni y col., 2010. Nuclear factor (NF)-kappaB-dependent thyroid hormone receptor beta1 expression controls dendritic cell function via Akt signaling. *J Biol Chem* 285:9569-82.
- 73- Montesinos y col., 2012. Dexamethasone counteracts the immunostimulatory effects of triiodothyronine (T3) on dendritic cells. *Steroids* 77: 67–76.
- 74- Dedecjus y col., 2011. Thyroid hormones influence human dendritic cells' phenotype, function, and subsets distribution. *Thyroid* 21:533-40.
- 75- Alamino y col., 2015. Antitumor Responses Stimulated by Dendritic Cells Are Improved by Triiodothyronine Binding to the Thyroid Hormone Receptor β . *75:1265-74*.
- 76- Cintolo y col., 2012. Dendritic cell-based vaccines: barriers and opportunities. *Future Oncol* 8:1273-99.
- 77- Hildner y col., 2008. *Batf3* deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* 322:1097-100.
- 78- Constantino y col., 2016. Antitumor dendritic cell-based vaccines: lessons from 20 years of clinical trials and future perspectives. *Transl Res* 168:74-95.
- 79- Chomczynski y Sacchi, 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-9.
- 80- Bradford, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54.
- 81- Susperreguy y col., 2007. Growth hormone (GH) treatment reduces peripheral thyroid hormone action in girls with Turner syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 67:629-36.
- 82- Susperreguy y col., 2011. Growth hormone treatment in children with idiopathic short stature: correlation of growth response with peripheral thyroid hormone action. *Clin Endocrinol (Oxf)* 74:346-53.
- 83- Nazar y col., 2012. Thyroid peroxidase gene expression is induced by lipopolysaccharide involving nuclear factor (NF)- κ B p65 subunit phosphorylation. *Endocrinology* 153:6114-25.
- 84- Louzada y col., 2014. Type 2 iodothyronine deiodinase is upregulated in rat slow- and fast-twitch skeletal muscle during cold exposure. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 307:E1020-9.
- 85- Wajner y col., 2011. IL-6 promotes nonthyroidal illness syndrome by blocking thyroxine activation while promoting thyroid hormone inactivation in human cells. *J Clin Invest* 121:1834-45.
- 86- Visser y col., 2009. Transport of thyroxine and 3,3',5-triiodothyronine in human umbilical vein endothelial cells. *Endocrinology* 150:1552–1557.
- 87- Loubière y col., 2012. Expression and function of thyroid hormone transporters in the microvillous plasma membrane of human term placental syncytiotrophoblast. *Endocrinology* 153:6126-35.
- 88- Halestrap y Wilson, 2012. The monocarboxylate transporter family--role and regulation. *IUBMB Life* 64:109-19.
- 89- Kinne y col., 2015. Involvement of the L-Type Amino Acid Transporter Lat2 in the Transport of 3,3'-Diiodothyronine across the Plasma Membrane. *Eur Thyroid J* 4(Suppl 1):42-50.

- 90- Yen, 2015. *Unliganded TRs regulate growth and developmental timing during early embryogenesis: evidence for a dual function mechanism of TR action.* *Cell Biosci* 5:8.
- 91- Barreiro Arcos y col., 2011. *Cooperative nongenomic and genomic actions on thyroid hormone mediated-modulation of T cell proliferation involve up-regulation of thyroid hormone receptor and inducible nitric oxide synthase expression.* *J Cell Physiol* 226:3308-18.
- 92- Eigenbrod y col., 2006. *Sphingosine kinase and sphingosine-1-phosphate regulate migration, endocytosis and apoptosis of dendritic cells.* *Immunol Invest* 35:149-65.
- 93- Jung y col., 2007a. *Sphingosine kinase inhibitor suppresses a Th1 polarization via the inhibition of immunostimulatory activity in murine bone marrow-derived dendritic cells.* *Int Immunol* 19:411-26.
- 94- Jung y col., 2007b. *Sphingosine kinase inhibitor suppresses dendritic cell migration by regulating chemokine receptor expression and impairing p38 mitogen-activated protein kinase.* *Immunology* 121:533-44.
- 95- Spiegel y Milstien, 2011. *The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity.* *Nat Rev Immunol* 11:403-15.
- 96- Schwiebs y col., 2016. *Activation-Induced Cell Death of Dendritic Cells Is Dependent on Sphingosine Kinase 1.* *Front Pharmacol* 7:94.
- 97- Gräler, 2012. *The role of sphingosine 1-phosphate in immunity and sepsis.* *Am J Clin Exp Immunol* 1:90-100.
- 98- Alamino y col., 2016. *The thyroid hormone triiodothyronine reinvigorates dendritic cells and potentiates anti-tumor immunity.* *Oncoimmunology* 5:e1064579.
- 99- Boelen y col., 2008. *Type 3 deiodinase is highly expressed in infiltrating neutrophilic granulocytes in response to acute bacterial infection.* *Thyroid* 18:1095-1103.
- 100-Boelen y col., 2009. *Type 3 deiodinase expression in inflammatory spinal cord lesions in rat experimental autoimmune encephalomyelitis.* *Thyroid* 19 (12):1401-1406.
- 101-Stevenson y col., 2014. *Cell-autonomous iodothyronine deiodinase expression mediates seasonal plasticity in immune function.* *Brain Behav Immun* 36:61-70.
- 102-van der Spek y col., 2017. *Thyroid hormone metabolism in innate immune cells.* *J Endocrinol* 232:R67-R81.
- 103-Dayan y Panicker, 2009. *Novel insights into thyroid hormones from the study of common genetic variation.* *Nat Rev Endocrinol* 5:211-218.
- 104-Friesema y col., 2008. *Effective cellular uptake and efflux of thyroid hormone by human monocarboxylate transporter 10.* *Mol Endocrinol* 22:1357-1369.
- 105-Kwakkel y col., 2014. *A novel role for the thyroid hormone-activating enzyme type 2 deiodinase in the inflammatory response of macrophages.* *Endocrinology* 155:2725-2734.
- 106-Perrotta y col., 2013. *The thyroid hormone triiodothyronine controls macrophage maturation and functions: protective role during inflammation.* *Am J Pathol* 184:230-247.
- 107-Friesema y col., 2005. *Thyroid hormone transporters.* *Biochem Soc Trans* 33:228-232.
- 108-Muller y col., 2014. *Tissue-specific alterations in thyroid hormone homeostasis in combined Mct10 and Mct8 deficiency.* *Endocrinology* 155:315-325.
- 109-Suzuki y col., 2007. *micro-Crystallin as an intracellular 3,5,3'-triiodothyronine holder in vivo.* *Mol Endocrinol* 21:885-894.
- 110-Woeber y col., 1972. *Stimulation by phagocytosis of the deiodination of L-thyroxine in human leukocytes.* *Science* 176:1039-1041.
- 111-Klebanoff y Green, 1973. *Degradation of thyroid hormones by phagocytosing human leukocytes.* *J Clin Invest* 52:60-72.

- 112-Darras y col., 2016. *Intracellular thyroid hormone metabolism as a local regulator of nuclear thyroid hormone receptor-mediated impact on vertebrate development. Biochim Biophys Acta 1849:130-141.*
- 113-Maia y col., 2011. *Deiodinases: the balance of thyroid hormone: type 1 iodothyronine deiodinase in human physiology and disease. J Endocrinol 209:283-297.*
- 114-Bianco y Kim, 2006. *Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. J Clin Invest 116:2571-2579.*
- 115-Bianco y col., 2002. *Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. Endocrin Rev 23:38-89.*
- 116-Arrojo E Drigo y col., 2013. *Role of the type 2 iodothyronine deiodinase (D2) in the control of thyroid hormone signaling. Biochem Biophys Acta 1830:3956-64.*

Los resultados de este trabajo de Tesis Doctoral fueron presentados en las siguientes reuniones científicas locales, nacionales e internacionales:

Gigena N, Alamino VA, Montesinos MM, Nazar M, Louzada RA, Wajner S, Maia AL, Masini-Repiso AM, Carvalho DP, Cremaschi GA, Pellizas CG. **“New Insights into Thyroid Hormone (TH) Mechanism of Action in Dendritic Cells (DCs): Characterization of TH Transport and Metabolism”**. 15th International Thyroid Congress. Octubre, 2015. Florida, Estados Unidos. **Libro de Resúmenes ITC-2015, p:A-189.**

Gigena N, Alamino VA, Montesinos MM, Nazar M, Masini-Repiso AM, Cremaschi GA, Pellizas CG. **“Caracterización de los procesos de Transporte y Metabolismo de Hormonas Tiroideas en Células Dendríticas”**. X Congreso de la Federación Argentina de Sociedades de Endocrinología. Octubre, 2014. Córdoba, Argentina. **RAEM-2014. Vol. 51. N° Sup. Pág. 108.**

Gigena N, Alamino VA, Montesinos MM, Nazar M, Masini-Repiso AM, Cremaschi GA, Pellizas CG. **“Transport and Metabolism of Thyroid Hormones in Mice Dendritic Cells: Expression of Genes Involved”**. XV Congress of the Latin American Thyroid Society. Marzo, 2013. Florianópolis, Brasil. **Libro de Resúmenes LATS-2013, p:242.**

Gigena N, Alamino VA, Montesinos MM, Nazar M, Masini-Repiso AM, Cremaschi GA, Pellizas CG. **“Transporte y Metabolismo de Hormonas Tiroideas en Células Dendríticas: expresión de genes involucrados”**. Jornadas Científicas Anuales 2012 de la Sociedad de Endocrinología y Metabolismo de Córdoba. SEMCO-2012. Diciembre, 2012. Córdoba, Argentina.

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, se publicó como 1^{er} autor el siguiente trabajo:

*** “DISSECTING THYROID HORMONE TRANSPORT AND METABOLISM IN DENDRITIC CELLS”**

Gigena Nicolás, Alamino Vanina A.; Montesinos Maria del Mar; Nazar Magalí; Louzada Ruy A.; Wajner Simone M; Maia Ana Luiza; Masini-Repiso Ana M; Carvalho Denise P.; Cremaschi Graciela A.; Pellizas Claudia G.

J Endocrinol. 2017 Feb; 232(2): 337-350.

Durante este período también se publicaron los siguientes trabajos como co-autor, producto de la colaboración estrecha con los proyectos correspondientes:

*** “DENDRITIC CELLS MATURED WITH TRIIODOTHYRONINE INDUCE A POTENT ANTITUMORAL IMMUNE RESPONSE: NOVEL ROLE OF TR β IN CANCER DEVELOPMENT”** Alamino VA; Mascanfroni

ID; Montesinos MM; Gigena N; Donadio AC; Milotich S; Masini-Repiso AM; Cheng SY; Rabinovich GA; Pellizas CG.

Cancer Res. 2015 Apr; 75 (7): 1265-74.

*** “DEXAMETHASONE COUNTERACTS THE IMMUNOSTIMULATORY EFFECTS OF TRIIODOTHYRONINE (T3) ON DENDRITIC CELLS”** María M. Montesinos¹, Vanina A. Alamino¹, Iván D. Mascanfroni,

Sebastián Susperreguy, Nicolás Gigena, Ana M. Masini-Repiso, Gabriel A. Rabinovich, Claudia G. Pellizas.

Steroids. 2012 Jan; 77 (1-2): 67-76.