



Tesis para optar al Título de Doctor en Ciencias Químicas

**MODULACIÓN DE LA INMUNIDAD ADAPTATIVA POR
CÉLULAS DENDRÍTICAS ESTIMULADAS CON
HORMONAS TIROIDEAS.
INTERACCIÓN CON GLUCOCORTICOIDES.**

Lic. Vanina Alejandra Alamino

Director de Tesis: Dra. Claudia G. Pellizas

Departamento de Bioquímica Clínica

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI-CONICET)

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba

Córdoba, Argentina, Febrero de 2014

Director de Tesis

Dra. Claudia Pellizas

Comisión de Tesis

Dra. Teresa Scimonelli

Dra. Laura Cervi

Dr. Fernando Irazoqui

Evaluador externo

Dr. Guillermo Juvenal

El presente trabajo fue realizado en el Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología CIBICI-CONICET, en el Departamento de Bioquímica Clínica de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. El mismo fue llevado a cabo durante el desempeño de las Becas Internas de Posgrado Tipo I y Tipo II otorgadas por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Los subsidios que financiaron este trabajo corresponden a la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SeCyT), la Agencia Córdoba Ciencia, el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT, FONCYT).

A mi familia...

Y a los amores de mi vida, Daniel y Allegra...

ÍNDICE

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	4
I.1 Interacciones inmunoneuroendócrinas	4
I.2 Hormonas tiroideas	6
I.3 Hormonas tiroideas y sistema inmune	12
I.4 Células dendríticas	15
I.5 Células dendríticas en inmunoterapia	27
I.6 Células dendríticas y hormonas tiroideas	33
I.7 Glucocorticoides	35
II. OBJETIVOS	42
III. MATERIALES Y MÉTODOS	45
III.1 Ratones	45
III.2 Preparación y cultivo de DCs	45
III.3 Análisis del fenotipo de DCs por citometría de flujo	46
III.4 Determinación intracelular de citoquinas (citometría de flujo)	46
III.5 Determinación de citoquinas en sobrenadantes (ELISA)	47
III.6 Cultivo alogénico	47
III.7 Preparación de extractos celulares totales, nucleares y citoplasmáticos	48
III.8 Western Blot	49
III.9 Ensayo de citotoxicidad <i>in vivo</i>	50
III.10 Ensayo de presentación cruzada de antígenos	50

III.11	Determinación de muerte celular	51
III.12	Migración de DCs <i>in vivo</i>	52
III.13	Extracción de ARN	52
III.14	Transcripción reversa	53
III.15	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)	53
III.16	Modelo tumoral B16-OVA	54
III.17	Inmunoterapia basada en DCs	55
III.18	Obtención y determinación del linaje de linfocitos infiltrantes de tumor	55
III.19	Producción de INF- γ por esplenocitos de ratones portadores de tumor	56
III.20	Análisis estadístico	57
IV.	PARTE 1	58
IV.1	RESULTADOS 1. Efecto de dexametasona sobre el mecanismo de acción de las hormonas tiroideas a nivel de las células dendríticas	58
IV.1.1	Dex inhibe la maduración de DCs inducida por T3	58
IV.1.2	Dex controla el balance entre las citoquinas pro y antiinflamatorias en DCs estimuladas con T3	60
IV.1.3	Dex reduce la capacidad aloestimuladora de DCs maduras con T3	63
IV.1.4	Dex inhibe la activación de Akt inducida por T3 en DCs	66
IV.1.5	Dex reduce la expresión de TR β 1 en DCs de manera dependiente de GR	68
IV.1.6	Dex reduce la translocación de NF- κ B desde el citoplasma al núcleo celular inducida por T3 en DCs	70
IV. 2	DISCUSIÓN 1	71
V.	PARTE 2	79
V.1	RESULTADOS 2. Evaluación de la modulación de la respuesta inmune adaptativa por células dendríticas estimuladas con T3	79

V.1.a Efecto de células dendríticas estimuladas con T3 sobre el balance de células T regulatorias y células T efectoras Th17	79
V.1.a.1 T3 estimula la producción de TNF- α , IL-6 e IL-23 en DCs	79
V.1.a.2 DCs estimuladas con T3 inducen la secreción de IL-17 en esplenocitos alogénicos	80
V.1.a.3 Los linfocitos T $\gamma\delta$ son los principales responsables del aumento de producción de IL-17 inducido por DCs maduras con T3	83
V.1.a.4 DCs maduras con T3 disminuyen el porcentaje de linfocitos T regulatorios	85
V.1.b Capacidad de células dendríticas maduras con T3 de estimular una respuesta inmune antitumoral <i>in vivo</i>	87
V.1.b.1 T3 aumenta significativamente la habilidad de las DCs de estimular una respuesta citotóxica antígeno-específica <i>in vivo</i>	87
V.1.b.2 T3 aumenta la capacidad de DCs de inducir la Presentación Cruzada de antígenos <i>in vitro</i> , a través de la vía citosólica	89
V.1.b.3 T3 disminuye los niveles de muerte celular en las DCs	91
V.1.b.4 T3 aumenta la capacidad migratoria de DCs a nódulos linfáticos	94
V.1.b.5 DCs estimuladas con T3 en presencia de un antígeno tumoral son capaces de inducir una respuesta inmune antitumoral	96
V.1.b.6 El tratamiento con DCs estimuladas con T3 induce un incremento del porcentaje de linfocitos T CD8+ en el tumor	98
V.1.b.7 La inoculación de DCs estimuladas con T3 promueve la inducción de una respuesta antígeno-específica, mediada por INF- γ	99
V.2 DISCUSIÓN 2	102
VI. CONCLUSIÓN GENERAL	112
VII. BIBLIOGRAFÍA	113
VIII. ABREVIATURAS	125

IX. PRESENTACIONES EN CONGRESOS	128
X. PUBLICACIONES	131
XI. AGRADECIMIENTOS	163

RESUMEN

Numerosos estudios demuestran que 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. A pesar de los importantes avances en la comprensión de la interacción entre las distintas hormonas y el sistema inmune, el papel de las hormonas tiroideas (HTs) en el inicio de la inmunidad adaptativa era incierto hasta hace algunos años. En este sentido, el laboratorio en el que se desarrolló 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, células dendríticas (DCs) derivadas de médula ósea de ratón. Se demostró que niveles fisiológicos de triiodotironina (T3) inducen la maduración de DCs y la secreción de IL-12. Además, DCs estimuladas con T3 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.

Por otra parte, el laboratorio en donde se desarrolló esta Tesis Doctoral también demostró la característica del mecanismo de acción de las HTs de interactuar con otras hormonas en la expresión final de determinadas acciones metabólicas específicas de T3, entre otras con los glucocorticoides (GCs) a nivel hepático. Si bien el tejido hepático es un importante blanco del efecto metabólico de los GCs, éstos son ampliamente utilizados en clínica médica para suprimir diversos estados inflamatorios.

Por consiguiente, este trabajo de Tesis Doctoral involucró el estudio de la interrelación entre el sistema endócrino y el sistema inmune. En lo particular, este trabajo se dividió en 2 partes: **1-** el estudio de las modificaciones en el mecanismo de acción de las HTs sobre las DCs, inducidas por un GC de síntesis: dexametasona (Dex) y **2-** la profundización del estudio del efecto de las HTs a nivel de las DCs.

1- Los resultados obtenidos en la primera parte del trabajo de Tesis Doctoral indicaron que Dex inhibió la maduración, producción de IL-12 y capacidad aloestimuladora de DCs estimuladas con T3, de manera dependiente del receptor de GCs. Además, los datos revelaron un efecto inhibitorio de los GCs en la maduración y capacidad inmunoestimuladora de DCs inducidas por T3, a través de mecanismos que implican, al menos en parte, vías de señalización dependientes de NF- κ B, Akt y TR β 1. En conclusión, los resultados aquí presentados refuerzan la dinámica interrelación existente entre los GCs y las HTs, sus mecanismos de acción y su regulación tejido-específica, destacando un nuevo mecanismo molecular involucrado en la actividad antiinflamatoria e inmunosupresora de los GCs.

2- Los resultados obtenidos en la segunda parte del trabajo de Tesis Doctoral demuestran que T3 tiene la capacidad de direccionar la respuesta inmune hacia un perfil pro-inflamatorio, ya que aumentó significativamente la producción de las citoquinas TNF- α , IL-6 e IL-23 en las DCs, estimulando la producción de IL-17 en esplenocitos y disminuyendo la población de células T regulatorias. Además, T3 fue capaz de reducir la apoptosis de DCs y aumentar su migración hacia los ganglios linfáticos. En adición, T3 aumentó la capacidad de las DCs para inducir una respuesta inmune citotóxica antígeno-específica *in vivo* y presentación cruzada *in vitro*. En consecuencia, se

desarrolló una vacunación antitumoral basada en DCs estimuladas con T3 en el modelo tumoral B16-OVA, la cual redujo la incidencia de establecimiento tumoral y el crecimiento del mismo en los ratones afectados, prolongando su sobrevida. Estos efectos estuvieron mediados, al menos en parte, por las células T CD8⁺ secretoras de IFN- γ . Los hallazgos obtenidos tienen profundas implicancias en la inmunoterapia del cáncer, ya que sugieren fuertemente propiedades adyuvantes de T3 para su utilización en la vacunación antitumoral basada en DCs, que merece evaluación en otros modelos animales y posteriormente en la clínica humana.

En conjunto, los resultados de este trabajo de tesis profundizan el conocimiento del efecto de las HTs en el sistema inmune y sientan bases moleculares que permiten tanto la elucidación de disfunciones inmunes en la frecuente patología tiroidea, como así también la manipulación de DCs generadoras de perfiles de células T inmunogénicas y/o tolerogénicas en diferentes estados clínicos.

I. INTRODUCCIÓN

I.1 INTERACCIONES INMUNONEUROENDÓCRINAS

Numerosos estudios han demostrado que los sistemas neuroendócrino e inmune no actúan en forma aislada, sino que están regulados entre sí a través de citoquinas, hormonas, neurotransmisores y sus receptores, que son comunes en las células de estos sistemas. En efecto, los mismos están en constante comunicación para mantener la homeostasis y orquestar respuestas coordinadas frente a los distintos desequilibrios y patologías (1) (**Figura 1**). En este sentido, las células inmunes pueden detectar agentes patógenos (virus, bacterias, hongos, células tumorales) y secretar proteínas que modifican las células del sistema neuroendócrino, 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 (2).

Las observaciones iniciales que demostraron los efectos de los factores neuroendócrinos sobre el sistema inmune fueron reportadas por patólogos que descubrieron que alteraciones hormonales podían influir en el tamaño del timo (3). Por su parte, Selye y Fortier demostraron que tanto estresores físicos como psicológicos causaron la activación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA), lo que produjo la contracción del timo y de otros órganos linfáticos (4). Además, varios reportes han demostrado que el tratamiento con hormonas esteroideas produce la modificación de la función celular inmune. La exposición a dichas hormonas conduce a una alteración en la

capacidad de éstas células para responder a agentes infecciosos y otros patógenos (5, 6). La mayoría de los estudios de la interrelación entre los distintos sistemas fueron conducidos para dilucidar el rol de las hormonas del eje HPA: hormona liberadora de adrenocorticotrofina (CRH)/Adrenocorticotrofina (ACTH)/glucocorticoides (GCs), mientras que el conocimiento de las conexiones entre las hormonas tiroideas (HTs) y el sistema inmune ha recibido menor atención.

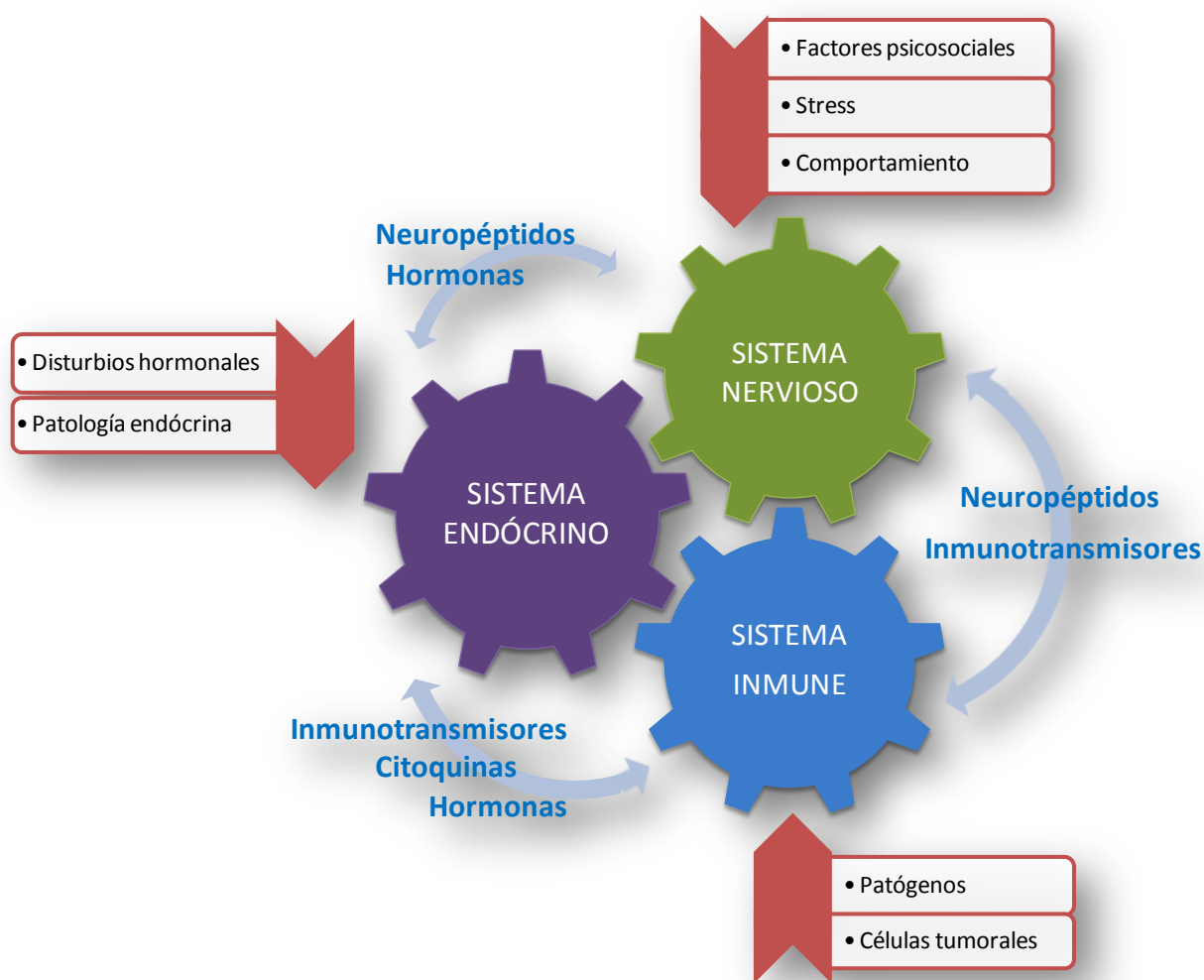


Figura 1: Interacciones inmunoneuroendócrinas

I.2 HORMONAS TIROIDEAS

Las HTs son importantes reguladores de la diferenciación, crecimiento, metabolismo y función de prácticamente todos los tejidos en múltiples especies, incluyendo mamíferos. Las mismas regulan la expresión una gran variedad de genes, siendo sus principales efectos ejercidos sobre el consumo de oxígeno, regulación de la temperatura corporal, frecuencia cardíaca y metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos. En este sentido, afectan virtualmente la función de cada sistema orgánico, por lo cual se requiere de una disponibilidad constante de las hormonas. Además, tanto la síntesis como la secreción de HTs son mantenidas dentro de límites estrechos por una fina regulación hipotálamo-hipofisaria, la cual es muy sensible a pequeños cambios en la concentración de hormona libre circulante. El mecanismo de acción de las HTs es complejo y altamente regulado debido a la expresión de transportadores célula y tejido-específicos, múltiples isoformas de receptores de HTs (TRs) y las interacciones con correpresores y coactivadores (7).

Las HTs: 3, 5, 3', 5'-tetraiodo-L-tironina (T4) y 3, 5, 3'-triiodo-L-tironina (T3) (**Figura 2A**) son producidas en los folículos de la glándula tiroidea, por la yodación de residuos de tirosina en la glicoproteína tiroglobulina. La hormona estimulante de tiroidea (TSH), secretada por la hipófisis anterior en respuesta a la retroalimentación de HTs circulantes, actúa directamente sobre el receptor de TSH (TSH-R) expresado en la membrana basolateral de las células foliculares tiroideas (**Figura 2B**). TSH regula la captación de yoduro y de una serie de pasos necesarios para la normal síntesis y secreción de HTs (8). T4 es la principal hormona secretada por la glándula. Sin embargo,

dentro de la célula blanco, T3 es la hormona más potente ya que une los TRs con una afinidad 10 veces mayor. La principal vía de producción de T3 circulante es por la 5' deiodinación intracelular de T4 producida por selenoproteínas conocidas con el nombre de deiodasas de iodotironinas (DIO) (9) (**Figura 2D**). La DIO tipo I es expresada en tejidos periféricos como hígado y riñón y principalmente convierte la T4 circulante en T3. Por su parte, la DIO tipo II tiene una alta afinidad por T4 (Km en el rango nM) y es expresada primariamente en la glándula pituitaria, cerebro y tejido adiposo marrón, contribuyendo tanto a la conversión periférica como intracelular de T4 a T3. De este modo, tejidos que contienen la DIO tipo II pueden responder potencialmente diferente a una dada concentración de T4 circulante (por conversión intracelular a T3) que aquellos tejidos que sólo pueden responder a T3. La DIO tipo III es expresada fundamentalmente en placenta, cerebro y piel, y junto con la DIO tipo I, convierten T4 a T3 reversa, un metabolito de las HTs inactivo en cuanto a la unión a sus receptores (10).

Debido a que la acción y el metabolismo de las HTs tienen lugar intracelularmente, el transporte de las HTs a través de la membrana plasmática es necesario. Durante mucho tiempo se pensó que las iodotironinas eran capaces de atravesar la membrana plasmática por difusión simple dado su carácter lipofílico, pero numerosas evidencias demuestran claramente que este proceso sería imposible sin la presencia de transportadores (11) (**Figura 2D**). La mayoría de los transportadores de HTs conocidos actualmente aceptan una variedad de compuestos y demuestran una baja afinidad relativa hacia las HTs. Hasta el momento, ha sido reportado que sólo el polipéptido transportador de aniones orgánicos-1C1 (OATP1C1) y los transportadores de monocarboxilatos (MCT) 8 y 10 tienen una alta especificidad por las HTs y relevancia fisiopatológica (12, 13). En este sentido, se demostró la importancia de MCT8 por la asociación de mutaciones en el gen que lo

codifica, con retardo psicomotor severo y niveles alterados de HTs, también conocido como el síndrome de Allan-Herndon-Dudley (14).

Las HTs ejercen la mayoría de sus funciones a través de la unión a sus TRs nucleares, los cuales son factores de transcripción ligando dependientes (7). Además, se comprobó que existen dos isoformas principales de TRs con diferentes patrones de expresión en el desarrollo y en los tejidos adultos. Éstas están codificadas en genes separados: TR A y B, que por procesos de empalme (“splicing”) alternativo o por la elección de diferentes promotores, aumentan esta heterogeneidad (7) (**Figura 2C**). TRA tiene un producto de “splicing” con capacidad de unión a T3, TR α 1, que se expresa predominantemente en cerebro, corazón y músculo esquelético, y otros dos productos sin capacidad de unión a T3, TR α 2 y TR α 3, con varias isoformas 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 Δ β 3. Entre ellas: TR β 1, expresada ampliamente, TR β 2 que se expresa principalmente en cerebro, retina y oído interno y TR β 3, en riñón, hígado y pulmón. Las distintas isoformas de los TRs difieren en longitud en ambos extremos amino y carboxi-terminal y se expresan en forma diferencial en el desarrollo (15). Las diferencias fundamentales en el dominio de unión al ligando, han permitido el diseño de ligandos que interactúan específicamente con TR α ó TR β . Por su parte, 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.

Los TRs se encuentran 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 dirigen al núcleo y allí se unen a sus receptores. El complejo HT-TR interacciona con secuencias

específicas de los genes blanco de su acción, denominadas elementos de respuesta de HTs (TRE), causantes de los cambios conformacionales de la cromatina que dejan a los genes accesibles para que actúe la maquinaria transcripcional (16) (**Figura 2D**). Los productos resultantes de la expresión de genes, 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. Por lo tanto, las acciones genómicas 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 (17). Estas acciones pueden iniciarse tanto en membrana plasmática, 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), proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), quinasas extracelulares reguladas- 1/2 (ERK1/2) y fosfolipasas C y D. En este sentido, se ha demostrado que una proteína estructural de la membrana plasmática, la integrina $\alpha_v\beta_3$, puede actuar como un receptor de superficie celular para HTs (18) (**Figura 2D**). A través de esta proteína, la hormona puede activar tanto las vías de ERK1/2 y de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K). Las consecuencias de dicha activación incluyen el tráfico intracelular de proteínas, angiogénesis y proliferación de células tumorales (19). Por otro lado, entre los efectos no mediados por TRs nucleares, varias acciones rápidas ejercidas por T3 han sido vinculadas con la activación de la vía de PI3K en células alveolares (20) y en fibroblastos humanos (21). A su vez, la activación de Akt, un evento crítico para el crecimiento y la supervivencia celular (22), ha sido demostrado en células pancreáticas β , involucrando la activación de PI3K-p85 dependiente de TR β 1 (23).

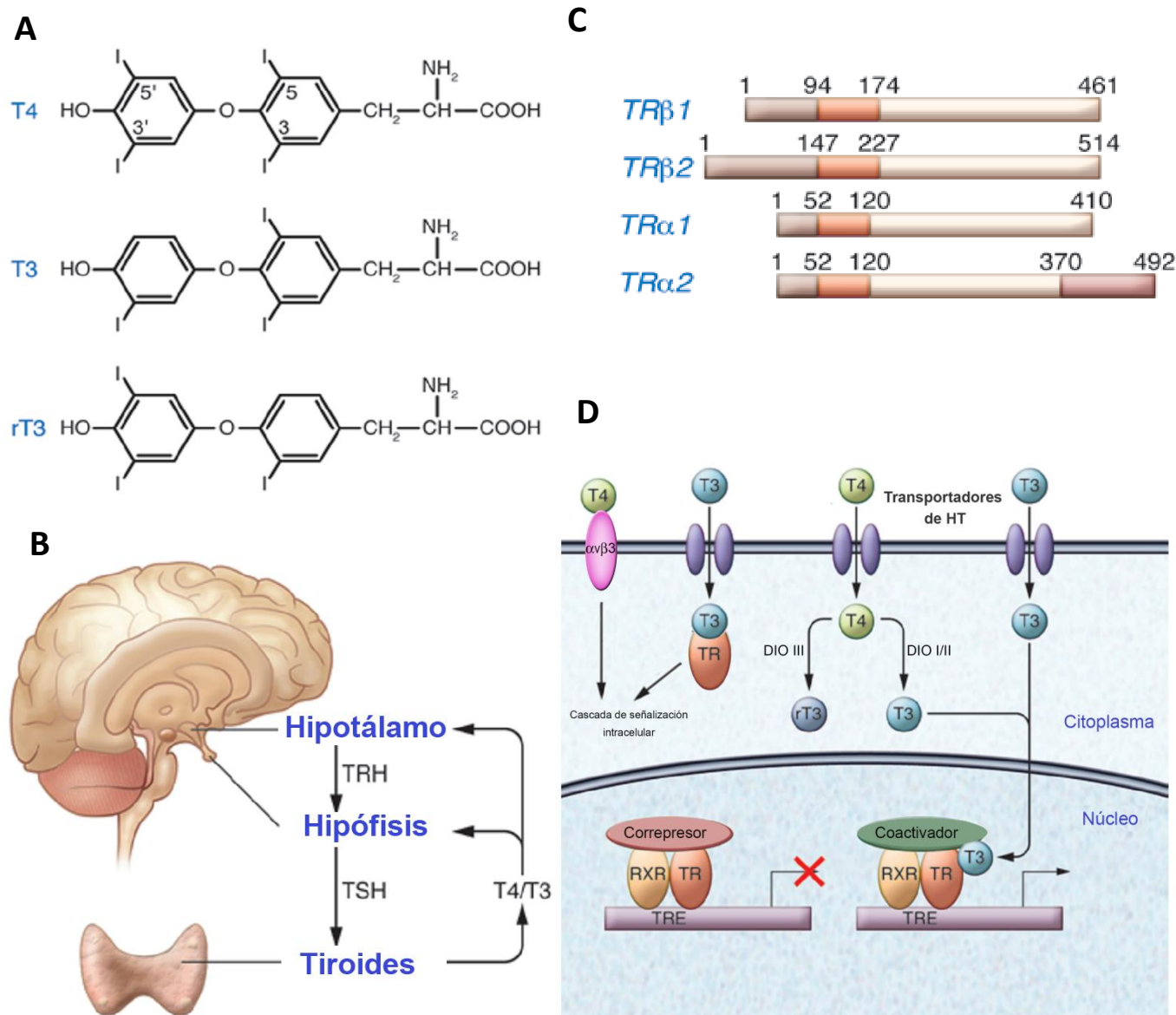


Figura 2: Hormonas Tiroideas (HTs) y su mecanismo de acción. (A) Principales formas de HTs: 3,5,3',5'-tetraiodo-L-tironina (T4), 3,5,3'-triodo-L-tironina (T3) y T3 reversa (rT3). **(B)** Mecanismo de estimulación de la síntesis de HTs y su retroalimentación negativa. **(C)** El gen del receptor de HTs (TR) tiene 2 isoformas principales: TRA y TRB; se muestran las estructuras de sus productos TRα1, TRα2, TRβ1 y TRβ2. **(D)** Mecanismos de acción de HTs genómico y no genómico. En los tejidos específicos, tales como cerebro, los transportadores de HTs transportan T4 y T3 al interior celular. En el mecanismo genómico clásico, TRs no unidos a HTs heterodimerizan con el receptor de ácido retinoico (RXR) y se unen a un elemento de respuesta (TRE) en el DNA y luego a un correpresor, inactivando la expresión génica. La unión de T3 al dominio de unión al ligando, resulta en la interrupción de la unión con el correpresor y promueve la unión a un coactivador, lo que conduce al reclutamiento de la polimerasa III y al inicio de la transcripción de genes. En los mecanismos de acción no genómicos, las HTs ejercen sus efectos a través de la unión a TRs que están localizados en el compartimento citoplasmático o a la integrina de membrana αβ3, activando cascadas de señalización citoplasmáticas. Adaptado con modificaciones de Brent y col. 2012 (7).

En cuanto a los efectos de las HTs, como ya fuera mencionado, éstas son esenciales para el normal desarrollo, crecimiento, diferenciación neuronal y regulación metabólica. Estas acciones son más evidentes en condiciones de deficiencia de HTs durante el desarrollo, tales como la deficiencia materna de yodo o el hipotiroidismo congénito no tratado, que se manifiesta con un profundo déficit neurológico y retraso del crecimiento. Defectos más sutiles y reversibles están presentes cuando la deficiencia se produce en el adulto (24, 25).

I.3 HORMONAS TIROIDEAS Y SISTEMA INMUNE

El volumen de información sobre la relación entre las HTs y la inmunidad es relativamente grande, pero los datos disponibles son a veces difíciles de interpretar o incluso contradictorios. En este sentido, las investigaciones están casi exclusivamente focalizadas en la biología de linfocitos B y T, evidenciando la contribución de las HTs en la modulación de actividades inmunes, tales como quimiotaxis, fagocitosis, explosión respiratoria, actividad citolítica y síntesis de citoquinas (26).

En este aspecto, se ha descrito la participación de las HTs en la linfopoyesis primaria y secundaria (27, 28). Sin embargo, evidencia obtenida del análisis del desarrollo y la función de linfocitos en ratones con defectos genéticos en la expresión de las HTs o sus receptores, sugirió que estas hormonas no son indispensables para el desarrollo de una respuesta inmune normal. De hecho, no se encontraron alteraciones en la inmunidad humoral o mediada por células en ratones enanos con defectos genéticos en los genes que codifican para varias hormonas anabólicas (incluidas las HTs), ni en los ratones “knockout” deficientes de HTs (28). Los autores plantearon la hipótesis de que las HTs están involucradas en el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmune en respuesta a los cambios ambientales o a la inmunosupresión mediada por estrés (29, 30). Aunque los estudios en ratones “knockout” han demostrado que la deficiencia de dichas hormonas no es incompatible con la vida, muchos de los efectos sobre los tejidos periféricos fueron menores en estos animales que los observados en el hipotiroidismo congénito (31).

Por otro lado, 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 (27). En adición, se ha demostrado la presencia de T3 en linfocitos, mastocitos, monocitos, macrófagos y granulocitos de líquido peritoneal y sangre, y en los linfocitos tímicos de rata (32). Esta fuente extratiroidea de T3 está regulada por TSH y es necesaria para el mantenimiento de la proliferación celular y del estado normal en el sistema inmunológico (33).

Para analizar el papel que las HTs ejercen sobre la inmunidad, se ha estudiado el efecto del eje tiroideo sobre la función inmune en individuos y animales con diferente estado tiroideo, pero sin patología autoinmune. El hipotiroidismo en los seres humanos, así como hipotiroidismo experimental inducido por agentes antitiroideos o por tiroidectomía en roedores, se ha relacionado con la disminución de la actividad del timo, involución de bazo y ganglios linfáticos y la supresión de la respuesta inmune humoral y mediada por células (34-36). Las consecuencias inmunológicas del hipotiroidismo incluyen el aumento de la severidad de la infección por el virus sincicial respiratorio (37) y puede contribuir a un mal pronóstico en los pacientes con enfermedades virales, sépticas o graves (38-40). Por otra parte, se ha descrito una deficiencia severa de los niveles séricos de IgA e IgM en niños con hipotiroidismo congénito. En estos pacientes, se observó una correlación significativa entre las concentraciones de IgA e IgM en suero y los niveles de T4 libre, así como con la severidad del hipotiroidismo congénito (41).

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 hipertiroidea

puede conducir tanto a la supresión (42) como a la mejora (43, 44) de las respuestas de anticuerpos (Acs) primarios o en la proliferación de linfocitos T y B (45, 46). En adición a dichos efectos controversiales, el tratamiento crónico con T4, la hormona que habitualmente se utiliza en terapias de reemplazo en hipotiroideos, produjo un incremento en las respuestas de Acs específicos y en los niveles de citoquinas proinflamatorias en ratones (42, 43). Por el contrario, el tratamiento con dosis más altas de T4 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 (47).

En conclusión, se puede generalizar que los bajos niveles de HTs *in vivo* llevan a una disminución de la función inmune, mientras que ocurre lo contrario cuando los niveles circulantes de estas hormonas son altos (26).

Sin embargo, a pesar de los avances obtenidos en el campo de la interacción entre las HTs y el sistema inmune, la bibliografía que aborda el estudio del efecto de las mismas en el inicio de la respuesta inmune es limitada (48).

I.4 CÉLULAS DENDRÍTICAS

Las células dendríticas (DCs) identificadas por el Dr. Ralph Steinman en 1973 (49), 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 primaria. Residen en la mayoría de los tejidos periféricos, particularmente en sitios de interfase con el medio ambiente (piel y mucosas) (50). Constituyen una población heterogénea de células, cuya característica común es su capacidad de captar, procesar y presentar antígenos a los linfocitos T, orientando luego el desarrollo de respuestas inmunes efectoras (51).

Las DCs presentan dos estadios en los cuales difieren sustancialmente en su fenotipo y funcionalidad: DCs inmaduras (iDCs) y DC maduras (mDCs) (**Figura 3**). Las células que se encuentran en su estado inmaduro, en ausencia de procesos inflamatorios y de respuesta inmune, se encuentran recorriendo y sensando los tejidos periféricos, el sistema circulatorio sanguíneo y linfático, y los órganos linfoides secundarios (52). En la periferia, éstas células captan antígenos a través de dos mecanismos: macropinocitosis o endocitosis mediada por receptores. Así, estas iDCs responden incrementando su maquinaria de endocitosis y procesamiento frente al reconocimiento directo de antígenos de patógenos o a través del reconocimiento vía receptores para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas y/o receptores del complemento. Por su parte, las iDCs 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) (53). En respuesta a estas señales, las DCs inician un programa de diferenciación llamado “maduración” a través del cual se convierten en CPA profesionales capaces de activar a 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. Contrariamente a las demás células fagocíticas (monocitos y neutrófilos), las cuales degradan totalmente las moléculas endocitadas, las DCs preservan parcialmente el producto de la endocitosis, mediante la regulación del pH en los compartimentos fagosomales/endosomales (54). Dichos mecanismos son utilizados a los fines de limitar el rango de antígenos que serán presentados y de “preservar” la información endocitada (54). A su vez, las DCs incrementan la expresión del receptor de quimioquinas CCR7, ligando de CCL19 y CCL21, las cuales son expresadas por células endoteliales linfáticas y venas del endotelio alto (HEV) de las zonas T de los órganos linfáticos secundarios, sitios a los cuales se dirigen las DCs que han iniciado su proceso de maduración. Por su parte, las mDCs 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) (**Figura 3**). Este incremento se asocia con una mayor síntesis de las moléculas MHC clase II, pero es fundamentalmente debido a la relocalización de las moléculas de clase II desde el compartimento endosomal a la superficie celular (52). Los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ expresan receptores que reconocen péptidos antigénicos asociados a moléculas del MHC clase II y clase I respectivamente. El MHC está codificado por un grupo de genes caracterizados por ser

poligénicos, polimórficos y codominantes, lo cual asegura que, al menos un péptido derivado de cualquier patógeno será presentado por alguna molécula del MHC (55).

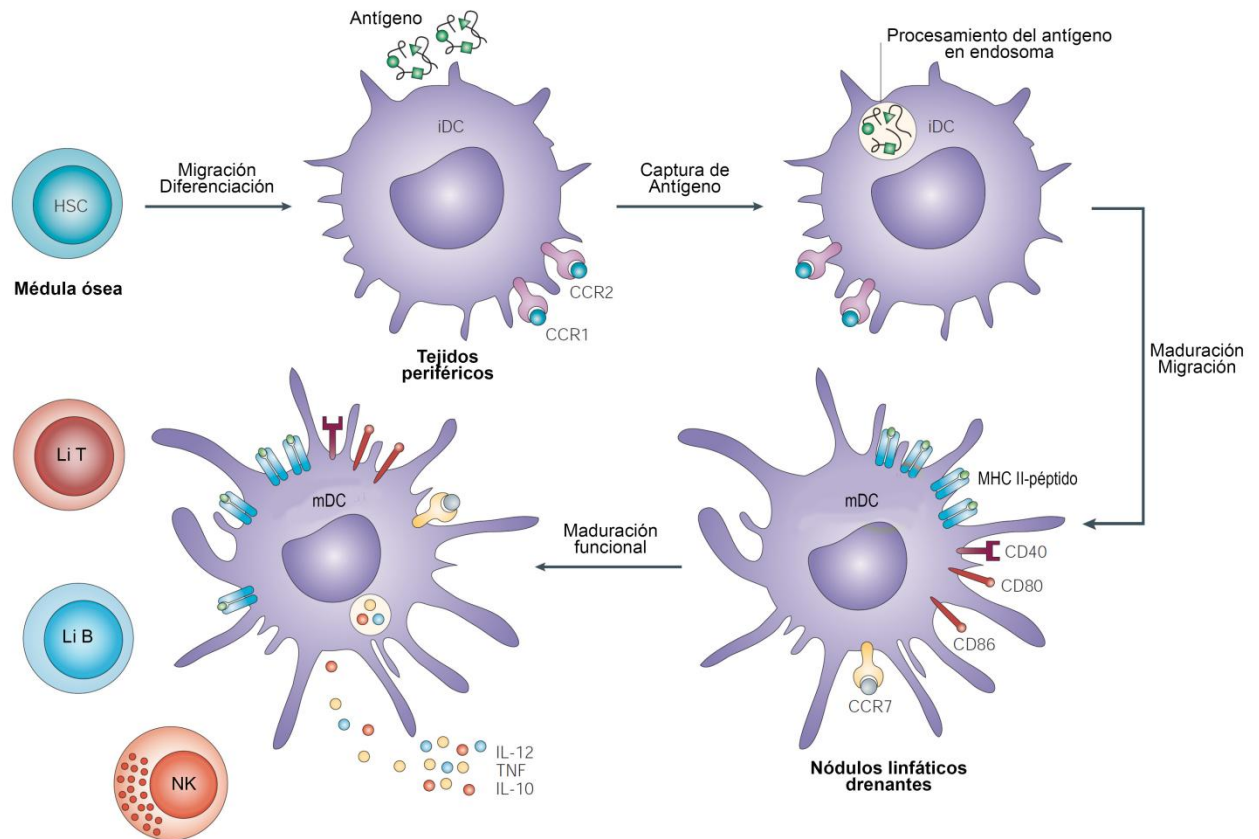


FIGURA 3: Inmunobiología de las células dendríticas (DCs). Las células madre hematopoyéticas (HSC) se diferencian en DCs inmaduras (iDC) que son reclutadas en los tejidos periféricos, donde continuamente internalizan antígenos que son procesados por las diferentes vías de procesamiento. Después de la captura del antígeno, y dependiendo de la naturaleza del mismo, las DCs migran al tejido linfoide drenante y maduran fenotípicamente (mDC), incrementando la expresión de CD40, CD80, CD86, moléculas MHC clase II y el receptor de quimiocinas (CCR)-7. En el tejido linfoide drenante, las DCs presentan complejos MHC clase II-péptido en la superficie celular, interactúan con los linfocitos específicos de antígeno y maduran funcionalmente, generando la activación de las células T (Li T), las células B (Li B) y las células asesinas naturales (NK) y la producción de citoquinas pro-inflamatorias, tales como la interleuquina-12 (IL-12) y el factor de necrosis tumoral (TNF)- α . (Adaptado con modificaciones de Hackstein y Thomson 2004 (56)).

Hasta el presente se conocen tres vías intracelulares de procesamiento antigénico, la vía exógena endocítica, la vía endógena o biosintética y la presentación cruzada (55) (**Figura 4**). En la vía exógena, se procesan los antígenos endocitados. Un conjunto de proteasas se activa a medida que los endosomas disminuyen su pH, las cuales van degradando las proteínas hasta obtener péptidos apropiados para ser ubicados en las moléculas clase II del MHC. Luego de este proceso, el complejo péptido-MHC II puede ser transportado hacia la membrana celular, sitio donde podrá presentar el péptido antigénico a células T CD4⁺. La vía exógena es la utilizada, preferentemente, para la presentación de antígenos provenientes de microorganismos extracelulares, intravesiculares y también para virus con envoltura, que ingresan en el citoplasma luego de transitar por el compartimiento endosomal. Por otra parte, varias proteínas de membrana, sean propias de la célula o codificadas por patógenos intracelulares, también serán procesadas y presentadas por esta vía, al igual que cuerpos apoptóticos y necróticos. Por otro lado, la vía endógena es la que procesa la mayoría de los péptidos a ser presentados a las células T CD8⁺ en el contexto de las moléculas clase I del MHC. Éstos son generados por el proteasoma, el cual degrada proteínas ubiquitinadas; lo que significa que tanto proteínas propias localizadas a nivel intracelular como provenientes de patógenos que se replican en el citosol, son sometidas a esta forma de procesamiento. Los péptidos resultantes se transfieren al lumen del retículo endoplásmico (RE) mediante transportadores especializados y son unidos, con la ayuda de chaperonas (ej. calnexina y calreticulina), a moléculas MHC clase I. Una vez que el péptido se halla asociado al MHC I, el complejo migra a través del aparato de Golgi hacia la membrana plasmática. La tercera vía conocida, la presentación cruzada, surge de la intersección de las vías endógena y exógena. Esta vía se requiere a los fines de iniciar una respuesta inmune citotóxica contra bacterias intravesiculares,

virus, tumores, como también para mantener la tolerancia hacia autoantígenos. Este mecanismo consiste en la presentación de antígenos exógenos por moléculas del MHC clase I (57). Se han reportado principalmente dos vías intracelulares para la presentación cruzada, conocidas como vías “citosólica” y “vacuolar”. La presentación cruzada a través de la vía citosólica es sensible a inhibidores del proteasoma, lo que sugiere que las proteínas internalizadas acceden al citosol, donde son degradadas por el proteasoma. Los péptidos generados pueden ingresar a la vía de procesamiento endógena, lo que implica el transporte de los péptidos al RE donde se asocian a las moléculas MHC clase I. Sin embargo, aún se halla en discusión la vía por la cual los péptidos son unidos al MHC I, si es que éstos son transportados al lumen del RE ó si existen fagosomas con moléculas MHC I y las proteínas necesarias para la translocación del péptido, o ambas. Por lo tanto, nos referimos a la vía citosólica de presentación cruzada como una vía en la que se produce el procesamiento de antígenos en el citosol, independientemente del sitio de la carga de péptido. Por el contrario, la presentación cruzada a través de la vía vacuolar es resistente a los inhibidores del proteasoma, pero sensible a inhibidores de la proteólisis lisosomal (en particular, inhibidores de catepsina S). Esto sugiere que tanto el procesamiento de antígenos, como la asociación a moléculas del MHC clase I ocurren en el compartimiento endocítico en esta vía (58). Por su parte, se ha reportado que existen subpoblaciones de DCs con mayor capacidad de realizar presentación cruzada, como lo son las DCs CD8⁺ (59).

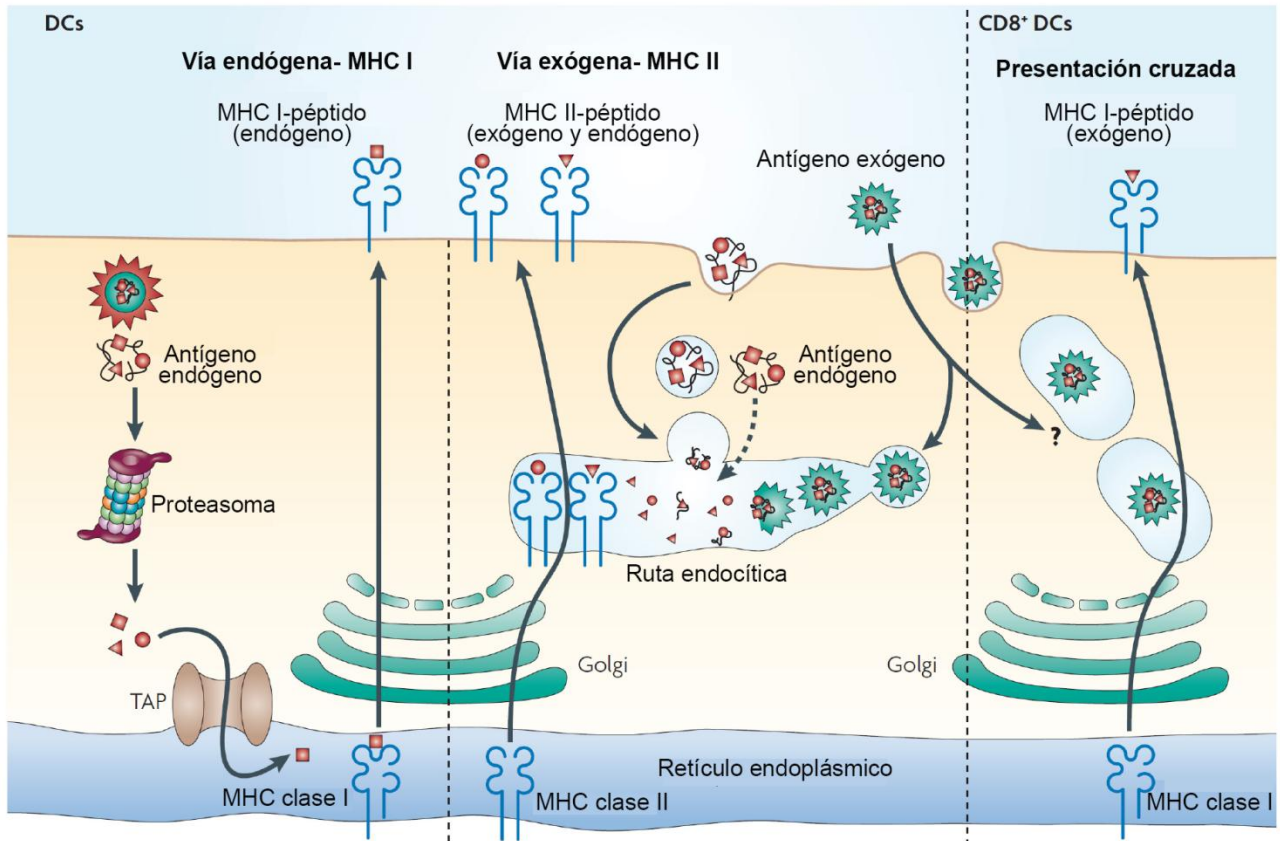


Figura 4: Vías de presentación antigénica en DCs. Todas las DCs tienen vías de presentación de MHC clase I y clase II funcionales. Las moléculas de MHC clase I presentan péptidos que derivan de proteínas degradadas principalmente en el citosol, lo que en la mayoría de las DCs comprende casi exclusivamente a las proteínas endógenas (sintetizadas por la propia célula). Las moléculas de MHC clase II adquieren péptidos que se generan por la degradación proteolítica en compartimentos endosomales. Las proteínas precursoras de estos péptidos incluyen material exógeno que se endocita desde el medio extracelular y también componentes endógenos, tales como proteínas de la membrana plasmática, componentes de la vía endocítica y proteínas citosólicas que acceden a los endosomas por autofagia. Las DCs $CD8^+$ tienen la capacidad de presentar antígenos exógenos a través de moléculas MHC clase I (presentación cruzada). La flecha bifurcada indica que la vía exógena y la presentación cruzada pueden competir por los antígenos exógenos en DCs $CD8^+$, o que el mecanismo de endocitosis implicado en la internalización de un antígeno dado puede determinar el tipo de presentación. TAP, transportador asociado con el procesamiento de antígenos. (Adaptado con modificaciones de Joshi y col. 2012 (60)).

La interacción de DCs con linfocitos T vírgenes puede perfilar la respuesta inmune hacia diferentes fenotipos o incluso inducir tolerancia de linfocitos T. Esto 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 (51). La activación del linfocito T que se encuentra en contacto cercano con la DC, requiere dos señales: señal 1, dada por el reconocimiento del péptido antigénico presentado por las moléculas del MHC, a través del receptor de células T (TCR). Este proceso involucra además, el reconocimiento de sitios no polimórficos de las moléculas MHC I y II por parte de los receptores CD8 y CD4, respectivamente. La señal 2, por otro lado, es provista por moléculas coestimuladoras expresadas en la DC (CD80, CD86), que interactúan con sus ligandos, expresados en el linfocito T (CD28) (61). Si durante el proceso de maduración la DC resulta ser inmunogénica, los clones T se diferenciarán a linfocitos T cooperadores o helper (Th) en el caso de una célula T CD4⁺ y a linfocitos T citotóxicos en el caso de una célula T CD8⁺. Los linfocitos T citotóxicos desempeñan un papel central en la erradicación o control de infecciones virales y en la respuesta inmune antitumoral (62). Los linfocitos Th, a su vez, no constituyen una población homogénea sino que luego de la activación pueden diferenciarse en diversas subpoblaciones efectoras, entre las cuales pueden mencionarse los linfocitos Th1, Th2 y Th17 (**Figura 5**), a las cuales recientemente se ha sumado la población Th9 (63). Estas subpoblaciones difieren en la forma de inducción, los patrones de circulación, el perfil de citoquinas que producen y los mecanismos efectoras que activan. Además, las citoquinas características de cada perfil promueven la diferenciación de la propia subpoblación y en algunos casos pueden inhibir el desarrollo de otras subpoblaciones (64). Si la DC produce IL-12 en ausencia de IL-4 o citoquinas inmunosupresoras, la célula T CD4⁺ se diferenciará hacia un perfil Th1. Estos linfocitos Th1 se

describen como células productoras de interferón (IFN)- γ , IL-2 y linfotóxina- β y son esenciales en la activación de una respuesta inmune mediada por células fagocíticas, especialmente frente a patógenos intravesiculares. El IFN- γ producido por los linfocitos Th1 estimula la actividad microbicida de las células fagocíticas, lo cual favorece la destrucción intracelular de los microorganismos fagocitados. El IFN- γ también estimula la síntesis de Acs IgG opsonizantes y fijadores de complemento, que facilitan la fagocitosis. Asimismo, las células Th1, a través de la interacción CD40-CD40 ligando, aumentan la capacidad de las DCs de estimular células T CD8⁺ facilitando la respuesta citotóxica. A su vez, estas células han sido tradicionalmente asociadas al desarrollo de patologías autoinmunes órgano específicas (65).

Por el contrario, en la diferenciación hacia un perfil Th2 es importante la presencia de IL-4 (producidas por células NKT y en menor grado por mastocitos) y en este caso las DCs estimulan al linfocito T CD4⁺ en ausencia de IL-12. Esta respuesta emerge luego del desafío con helmintos y alérgenos, que generalmente producen una estimulación crónica de los linfocitos T. Los mecanismos efectores asociados a este perfil linfocitario se hallan principalmente asociados a las reacciones inmunes mediadas por IgE, eosinófilos y mastocitos. A su vez, los linfocitos Th2 colaboran con las células B a los fines de promover la diferenciación a células plasmáticas involucradas en la síntesis de Acs y son importantes en la erradicación de parásitos, helmintos y otros patógenos extracelulares. Estas células se encuentran implicadas en el desarrollo de patologías alérgicas (66).

En 2003, se demostró la existencia de una tercera población efectora de células T CD4⁺ que también deriva de células T naive CD4⁺ (67, 68). Estas células se caracterizan por producir IL-17A,

IL-17F e IL-22 (moléculas no producidas por células Th1 o Th2) y se denominan linfocitos Th17 (69). Se ha descrito que poseen un alto potencial patogénico en enfermedades inflamatorias crónicas y autoinmunes (70). Actualmente estas células son objeto de numerosos estudios y la literatura indica que la diferenciación hacia el perfil Th17, depende de la producción de IL-23 e IL-6 por parte de las DCs (70). De este modo, la IL-6 junto con el factor de crecimiento transformante (TGF)- β promueven la inducción de células Th17 mientras que la IL-23 favorece la diferenciación terminal. Las células Th17 actúan ante infecciones por hongos y bacterias extracelulares y son las responsables de perpetuar procesos autoinmunes e inflamatorios crónicos (71).

A pesar de que la mayor parte de la literatura reciente describe a la IL-17 como una citoquina secretada por las células T, gran parte de la que se libera durante una respuesta inflamatoria se produce por las células inmunes innatas (72). La vía inmune mediada por IL-17 se induce dentro de las horas después de una lesión epitelial celular o de la activación de los receptores de patógenos (73), el cual no es tiempo suficiente para el desarrollo de las células Th17. En este sentido, se ha demostrado que las células T $\gamma\delta$ son una importante fuente de IL-17 innata durante la inflamación autoinmune y enfermedades infecciosas (74). Estas células son un pequeño grupo de linfocitos T que poseen un TCR específico en su superficie formado por una cadena " γ " y una cadena " δ " (a diferencia de los linfocitos convencionales que tienen un TCR compuesto por dos cadenas glucoproteicas denominadas " α " y " β "). Este grupo de linfocitos es muy poco frecuente (5% del total), pero son abundantes en la mucosa del intestino, formando parte de una población de linfocitos denominada linfocitos intraepiteliales. Sin embargo, los linfocitos $\gamma\delta$ no presentan restricción MHC y reconocerían proteínas completas en lugar de péptidos (75). Existen muchos reportes que evidencian que las células T $\gamma\delta$ podrían ser la principal fuente de IL-17 en varios

modelos murinos de infección, tales como *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes* (76). Las células T $\gamma\delta$ productoras de IL-17 también están involucradas en la patogénesis de enfermedades autoinmunes tales como encefalomielitis alérgica experimental, artritis inducida por colágeno, enfermedad granulomatosa crónica y en la lesión cerebral isquémica (75). Otras células del sistema inmune innato descritas en la literatura como productoras de IL-17 incluyen a las células T CD3⁺ asesinas naturales (NKT), células asesinas naturales (NK) y células mieloides (77-79). No es sorprendente que cada una de estas poblaciones tenga un papel importante en la vigilancia inmunológica de los tejidos, especialmente en el intestino, pulmón y piel.

Por otra parte, recientemente ha surgido una nueva población potencial denominada Th9 con gran capacidad patogénica durante la respuesta inflamatoria generada en presencia de IL-4 y TGF- β , y productora de altos niveles de IL-9 e IL-10 (63). Dadas las funciones pleiotrópicas de IL-9, las células Th9 podrían actuar tanto como reguladores positivos, como negativos de la respuesta inmune. Estudios en distintos modelos murinos y en pacientes humanos indican que estas células pueden desempeñar un papel protector (en tumores), así como patogénico (alergia, colitis, encefalitis autoinmune experimental) en diferentes enfermedades. Sin embargo, en comparación con los otros tipos de células T cooperadoras, las células Th9 están menos estudiadas.

Finalmente, las DCs pueden inducir la diferenciación a células T de memoria de una parte de los clones activados. Estas células persistirán por períodos de tiempo prolongados, permitiendo responder rápidamente a una futura exposición al antígeno. En este sentido, en ausencia de

colaboración de células T CD4⁺ con DCs, el establecimiento de memoria en las respuestas T CD8⁺ se halla severamente comprometido (80).

Además del papel fundamental que poseen las DCs en el inicio de la respuesta inmune y la generación de memoria inmunológica, también cumplen un papel crítico en la inducción y mantenimiento de la tolerancia, tanto central como periférica. En la tolerancia central, las DCs de la médula del timo, junto a las células del epitelio tímico, cumplen un papel central en la selección negativa, presentando antígenos propios a timocitos en desarrollo (52). Por otro lado, en la tolerancia periférica DCs tolerogénicas inducen la generación de clones de células T regulatorias (Treg: CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) con actividad supresora (81). Las células Treg son capaces de impedir una respuesta producida por células T efectoras por medio de citoquinas supresoras como IL-10 y TGF- β (82).

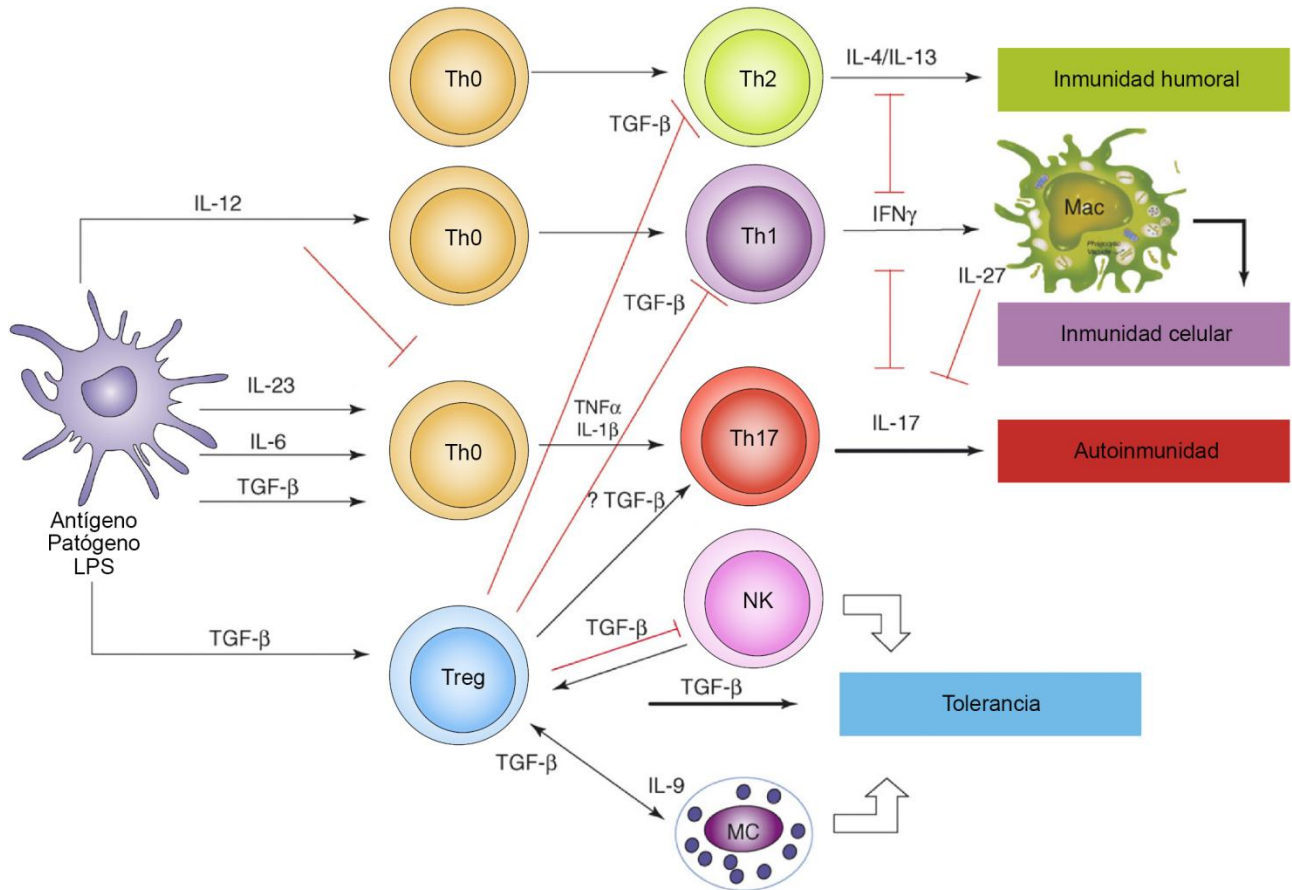


FIGURA 5: Impacto de las interacciones celulares, factores solubles y mediadores regulatorios sobre el compromiso de linaje del linfocito T. Después del encuentro con el antígeno y las moléculas coestimuladoras presentadas por las DCs, las células T CD4⁺ vírgenes pueden diferenciarse en diferentes subpoblaciones. El compromiso de linaje de células T CD4⁺ depende del entorno de citoquinas que acompaña el proceso de activación de células T en órganos linfáticos secundarios. Los diversos subtipos de células T helper (Th) muestran la activación de distintos programas de transcripción y se caracterizan por la secreción diferencial de citoquinas efectoras que les permiten proporcionar protección contra diferentes clases de patógenos o mediar una autoinmunidad. LPS, lipopolisacárido; TGF-β, factor de crecimiento transformante-beta; TNF-α, factor de necrosis tumoral-alfa; IFN-γ, interferón gama; IL, interleuquina; MC, mastocito; Mac, macrófago. (Adaptado con modificaciones de Wahl 2007 (83)).

I.5 CÉLULAS DENDRÍTICAS EN INMUNOTERAPIA

La última década ha sido testigo de enormes avances en nuevas terapias contra el cáncer a través de la focalización en el estudio de las vías intrínsecas de las células tumorales, cuya actividad está relacionada con alteraciones genéticas, y de los factores extrínsecos del tumor, tales como factores de crecimiento. Por otra parte, las inmunoterapias están entrando en la clínica a una velocidad sin precedentes después de la demostración de que las células T pueden rechazar de manera eficiente al tumor y que su actividad antitumoral puede ser mejorada con Acs bloqueantes contra moléculas inmuno-regulatorias. Las estrategias actuales en inmunoterapia incluyen Acs monoclonales contra las células tumorales o moléculas inmuno-regulatorias, terapias basadas en células, tales como la transferencia adoptiva de células T y NK activadas *ex vivo*, y vacunas antitumorales basadas en DCs (84).

En líneas generales, la vacunación constituye uno de los métodos más eficaces en la prevención de enfermedades. Las vacunas preventivas están diseñadas para bloquear la propagación de la infección y su actividad se correlaciona con la inducción de Acs específicos y células B de memoria de larga vida. La inmunidad celular también puede ser inducida, especialmente con las vacunas a microbios atenuados (85). Por otro lado, las vacunas terapéuticas se diseñan para eliminar la causa de una enfermedad dada, por ejemplo para eliminar células cancerosas o células infectadas por un virus, y para el tratamiento de la enfermedad. Su actividad depende principalmente de las células T CD8⁺ específicas de antígeno que generan linfocitos T citotóxicos capaces de rechazar el cáncer o

las células infectadas. Idealmente, las vacunas terapéuticas deben activar tanto a las células T vírgenes como modular a las células T de memoria existentes, es decir, inducir una transición de células CD8⁺ no protectoras a células T CD8⁺ capaces de producir linfocitos T citotóxicos efectivos. De hecho, el cáncer es una enfermedad crónica y, como tal, se asocia con una memoria de células T defectuosa, por ejemplo, células T CD8⁺ activadas crónicamente expresando moléculas características de muerte celular programada y anérgicas. Además, la vacunación debería conducir a la generación de células T de memoria CD8⁺ de larga vida, las cuales serán las responsables de prevenir la recaída (86).

Los numerosos estudios clínicos que evaluaron la vacunación terapéutica en cáncer durante las últimas dos décadas han ayudado a definir las propiedades deseadas en los linfocitos T CD8⁺ asociados con la inmunidad antitumoral (87). Estas incluyen: TCR de alta afinidad y avidéz para los MHC expresados en células tumorales, altas cantidades de granzimas y perforinas, expresión de moléculas de superficie que permiten el tráfico de células T en el tumor y la persistencia en el sitio del tumor, y alta expresión de moléculas coestimutorias o baja expresión de moléculas inhibitorias (87). Los componentes del sistema inmune necesarios para la inducción de tales células T CD8⁺ incluyen (1) la apropiada presentación de antígenos por las CPA (presentación cruzada) (58, 88) y (2) la generación de células T CD4⁺ productoras citoquinas que inducen la proliferación y diferenciación celular de los linfocitos T CD8⁺, como por ejemplo INF- γ e IL-21 (89).

Numerosas vías de vacunación terapéutica contra el cáncer están siendo desarrolladas (1.307 estudios clínicos en julio de 2013, de los cuales 152 se encuentran en ensayos clínicos fase III y 591 en fase II, <http://www.clinicaltrials.gov/>), destacando la actividad clínica en el campo (90). Una

característica común de estos estudios y un paso crítico en la vacunación, es la presentación eficiente de los antígenos tumorales a las células T. Por lo tanto, la explotación de la diversidad de las DCs (teniendo en cuenta su plasticidad) probablemente mejorará el rendimiento de las vacunas terapéuticas ya que son las CPA más eficientes (61). Aunque las iDCs en tejidos periféricos pueden capturar eficazmente antígenos, la presentación de los mismos por lo general resulta en la tolerancia inmune debido a la falta de moléculas coestimuladoras (91). En cambio, las mDCs “cargadas” con antígenos promueven la diferenciación de células T específicas de antígeno en células T efectoras.

Existen distintos tipos de vacunas basadas en DCs que pueden ser utilizadas para la vacunación contra el cáncer: (1) vacunas basadas en péptidos o proteínas y/o ácidos nucleicos capturados por las DCs *in vivo*, (2) vacunas compuestas por antígenos acoplados directamente por Acs a DCs o (3) vacunas compuestas por DCs “cargadas” con antígenos generadas *ex-vivo* (90) (**Figura 6**).

Con respecto a las DCs generadas *ex vivo* “cargadas” con diferentes formas de antígenos, se ha documentado que son capaces de generar una respuesta inmune antitumoral en muchos modelos animales. En este tipo de estrategia, las DCs (o sus precursores) son aisladas y “cargadas” con antígenos tumorales *in vitro*. Posteriormente, dichas DCs activadas son inyectadas nuevamente en animales singénicos o en el propio paciente (**Figura 6**). Ha sido demostrado en estos modelos, que tanto las DCs “cargadas” con lisados tumorales como con péptidos o proteínas enteras derivados de antígenos tumorales, generan respuestas inmunes específicas de tumor y actividad antitumoral (92). Estas observaciones han establecido los fundamentos para evaluar a las DCs generadas *in vitro* como vacunas terapéuticas en diferentes cánceres humanos.

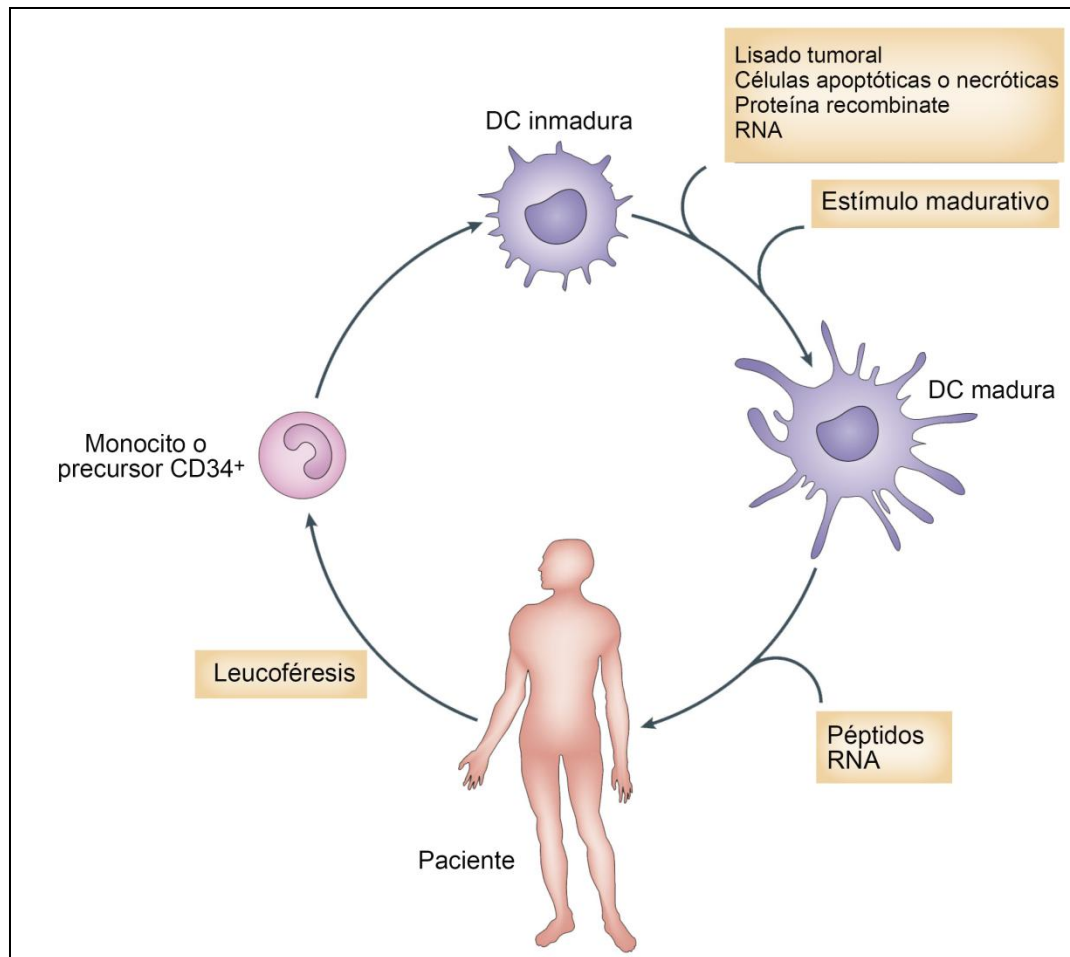


Figura 6: Inmunoterapia basada en DCs. Los precursores de DCs (monocitos o células progenitoras hematopoyéticas $CD34^+$) son aislados de pacientes por leucofóresis. Los monocitos se diferencian a iDC por el tratamiento con GM-CSF + IL-4 y las células hematopoyéticas $CD34^+$ con GM-CSF, Flt3L y TNF- α , por una o más semanas. La adición de citoquinas proinflamatorias, CD40L o agonistas de TLR induce la maduración de las DCs en presencia de antígenos tumorales en forma de proteínas o péptidos. Una vez que las DCs están maduras y "cargadas" con antígenos tumorales son inyectadas en el paciente. Para mejorar aún más su función *in vivo*, las DCs se pueden inyectar en combinación con Acs estimulantes de células inmunes, citoquinas (IL-15, IL-7, IL-12) o agonistas de TLR (CpG, poli-I:C). Las DCs activadas que son inyectadas migran a los tejidos linfoides para activar a linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$ específicos de antígeno. Tras la activación, las células T $CD4^+$ y $CD8^+$ salen de los tejidos linfoides e inhiben el crecimiento del tumor. (Adaptado con modificaciones de Tacken y col. 2007 (93)).

En este sentido, los estudios clínicos de los últimos 15 años han analizado diferentes preparaciones de vacunas basadas en DCs, diferentes activadores de DCs, diferentes formas de preparaciones de antígenos (desde péptidos cortos a complejos híbridos de células tumorales) y diferentes rutas de inyección. Estos estudios concluyeron que las vacunas basadas en DCs son seguras y pueden inducir la expansión de las células T CD8⁺ y CD4⁺ específicas para antígenos tumorales (86). Un gran avance en este campo fue la aprobación por la “*Food and Drug Administration*” (FDA) del tratamiento de cáncer de próstata metastásico con Sipuleucel-T en el año 2010, un producto celular compuesto por sangre enriquecida en CPA cultivadas con una proteína de fusión de fosfatasa ácida prostática (PAP) y el factor estimulante de colonias granulocíticas y monocíticas (GM-CSF). El tratamiento con Sipuleucel-T ha dado lugar a un aumento de cuatro meses en la mediana de supervivencia en sujetos con cáncer de próstata (94).

A pesar de los progresos considerables que se han hecho en estos últimos años, los avances clínicos de la inmunoterapia activa de las enfermedades malignas han sido, hasta el momento, discretos. Aunque las respuestas clínicas objetivas se han observado en algunos individuos afectados, existe una discrepancia entre la respuesta inmunológica en sangre y la tasa de respuesta clínica (92). Entre las múltiples causas que han emergido como puntos críticos en estudio, se encuentran los mecanismos de escape que utilizan las células tumorales para evadir al sistema inmune del hospedador. Estos van desde el concepto clásico de la presión inmunoselectiva que conduce al surgimiento de variantes tumorales resistentes, hasta el concepto demostrado de que los tumores inducen alteraciones supresoras en el sistema inmune de los pacientes (95). Un ejemplo clave lo constituye la inducción de la disfunción de las DCs mediante el bloqueo de su diferenciación completa y la afectación de su maduración y motilidad (96). Además, se promueve

la acumulación de las células mieloides supresoras (97), lo que conduce a una marcada disminución en el número y las funciones de las células más efectivas en la generación de la respuesta. Por su parte, en el compartimiento de las células T existen evidencias de que los tumores refuerzan los mecanismos de tolerancia induciendo anergia, delección clonal y posiblemente, también expandiendo o generando células Treg (98). Para ejercer su efecto inmunosupresor, los tumores utilizan fundamentalmente la secreción de sustancias solubles que actúan como mediadores moleculares. Entre ellos se encuentran algunas citoquinas, formas solubles de moléculas de adhesión, factores de crecimiento y moléculas que se sobreexpresan en los tumores (99). Estos mecanismos de inmunosupresión son múltiples y no están completamente dilucidados. No obstante, está claro que tanto las DCs como los linfocitos B y T son afectados de manera considerable por los tumores.

La comprensión de los mecanismos de evasión de los tumores y particularmente de su efecto sobre el sistema inmune del hospedador, ha traído como resultado que el foco de atención actual de la inmunoterapia del cáncer se centre en el estudio de nuevas estrategias para inducir respuestas específicas de tumor más robustas, así como contrarrestar los mecanismos de escape de los tumores (86).

I.6 CÉLULAS DENDRÍTICAS Y HORMONAS TIROIDEAS

A pesar de los importantes avances en la comprensión de la interacción entre las distintas hormonas y el sistema inmune (26, 48), el papel de las HTs en el inicio de la inmunidad adaptativa era incierto hasta hace algunos años. Un primer reporte en el año 1994 demostró un efecto de dichas hormonas (tanto T3, como T4, y en menor medida T3 reversa) en la diferenciación de los monocitos humanos en DCs (100). En este sentido, en el año 2008 el grupo donde se realizó esta Tesis Doctoral, proporcionó la primera evidencia de la expresión de TR en DCs derivadas de médula ósea de ratón, tanto en iDCs, como maduras con lipopolisacárido (LPS) (101). Estas células presentaron principalmente la isoforma TR β 1, 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, 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 IFN- γ en células T vírgenes alogénicas (perfil de células Th1) (101). Un estudio posterior del análisis de las vías involucradas reveló que este efecto de T3 sobre DCs es mediado, al menos en parte, por un mecanismo de acción dependiente de TR β 1, a través de una vía de señalización intracelular que involucra un mecanismo dependiente de Akt y NF- κ B (102). En este sentido, fue demostrada por primera vez la participación de la vía Akt independiente de la activación de PI3K, como responsable de la acción de T3. Además se describió el rol esencial del 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 (102).

De manera consistente con los resultados iniciales de nuestro grupo, posteriormente se reportó que el estado metabólico tiroideo influye en el fenotipo y función de las DCs humanas *in vivo* (103). Además, los ensayos *in vitro* analizando la influencia directa de las HTs sobre las DCs humanas, demostraron que T3 tuvo la capacidad de incrementar la expresión del marcador de maduración CD86 en las mismas. En adición, en experimentos de cocultivos, T3 en combinación con el factor de maduración de DCs: CD40 ligando (CD40L), aumentó la capacidad de las DCs para incrementar la proliferación y la secreción de IL-12 en células mononucleares de sangre periférica, bajo la estimulación no específica con Concaivalina A (103).

I.7 GLUCOCORTICOIDES

Los GCs son hormonas esteroideas sintetizadas en el organismo, capaces de ser inducidas por estrés, entre otros factores. Circulan en forma sistémica regulando funciones biológicas específicas en una variedad de células, tejidos y órganos. Son reguladores críticos de una amplia variedad de procesos fundamentales, incluyendo la homeostasis metabólica, la proliferación celular, las respuestas inflamatorias e inmunes, el desarrollo, y la reproducción (104).

Los principales GCs naturales son el cortisol (hidrocortisona) y corticosterona (**Figura 7A**). La mayoría de los mamíferos producen ambos esteroides, pero hay diferencias entre las especies con respecto a las proporciones en las que se producen. El cortisol es el GC dominante en los seres humanos, los roedores producen principalmente corticosterona, mientras que las ovejas, cerdo, conejo y perro producen cantidades significativas de ambos compuestos (105, 106). La actividad biológica de los GCs se determina por la presencia del grupo hidroxilo en la posición C11 de las moléculas esteroideas. La oxidación de dicho grupo da como resultado la conversión del compuesto a una forma inactiva. Por lo tanto, el cortisol y la corticosterona son esteroides biológicamente activos, mientras que la cortisona y 11-deshidrocorticosterona son inactivos (107).

Bajo el control del eje hipotálamo-hipofisiario, estas hormonas son sintetizadas en la corteza adrenal, específicamente en la capa fascicular. *In vivo*, los GCs son sintetizados a partir de colesterol por una cascada de reacciones catalizadas por enzimas citocromo P450. La síntesis y secreción de los GCs es controlada por la ACTH hipofisiaria y CRH hipotalámico en una manera

pulsátil y circadiana (108) **(Figura 7B)**. El hipotálamo recibe e integra información de múltiples fuentes neurales y humorales. Por lo tanto, actúa como un sensor de los cambios en el entorno interno y externo, ya sean circunstancias adversas (físicas o emocionales) como los factores circadianos, activando la vía que conduce a la síntesis de GCs. El CRH se libera desde las terminales nerviosas neurosecretoras de la eminencia media y es transportado a la pituitaria anterior a través del sistema portal del tallo hipofisario. Allí, el CRH estimula la secreción de la ACTH almacenada en las células corticotropas. La ACTH se transporta por la sangre a la corteza de la glándula suprarrenal, donde estimula rápidamente la biosíntesis de corticoesteroides, como el cortisol a partir de colesterol. La retroalimentación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal es regulada por los GCs, que inhiben la liberación de CRH del hipotálamo y ACTH desde la parte frontal de la glándula pituitaria (104) **(Figura 7B)**.

Los GCs se liberan bajo la influencia del estrés físico y/o emocional. La respuesta al estrés puede variar dependiendo del tipo, intensidad y duración del estímulo. Por lo tanto, las fluctuaciones observadas en sus niveles van desde concentraciones nanomolares hasta tres órdenes de magnitud superiores, llegando al rango micromolar (109).

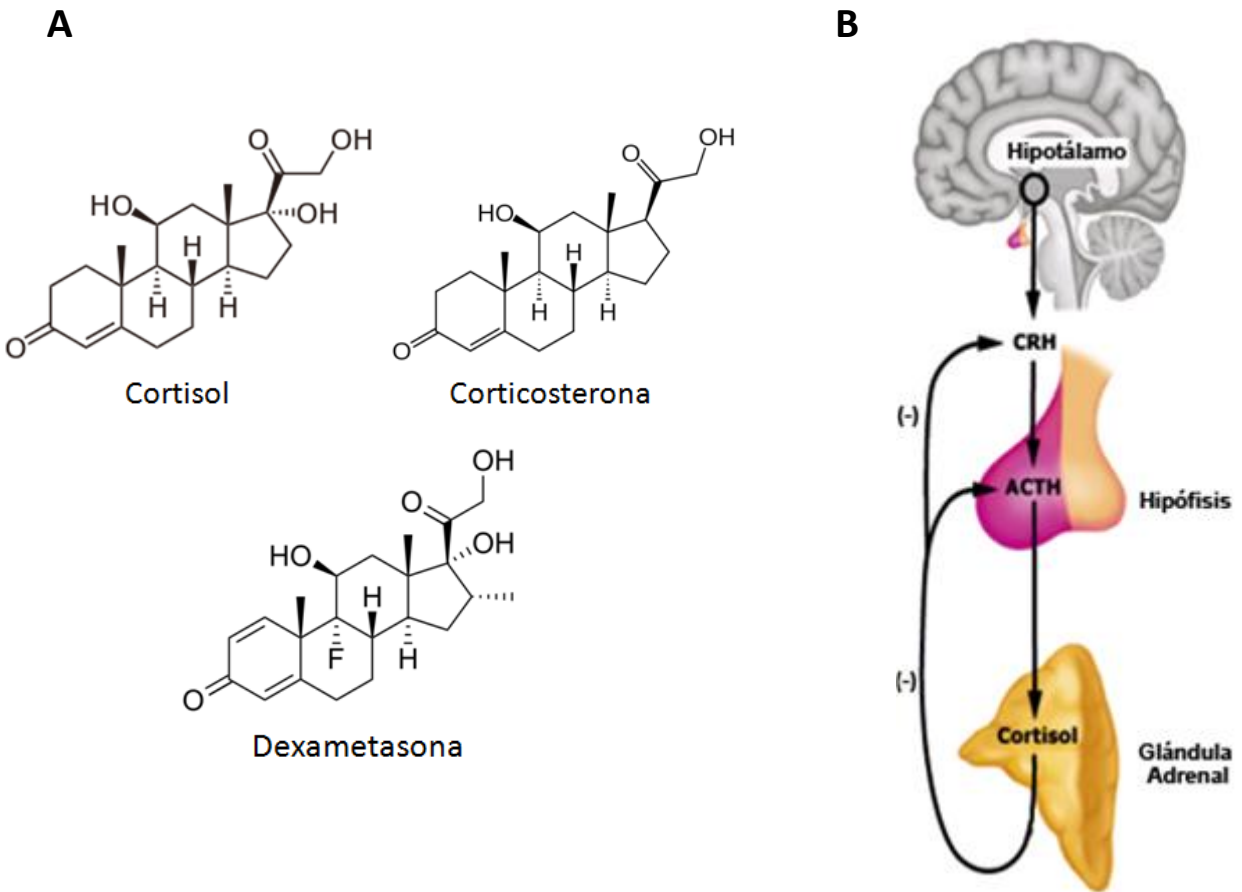


FIGURA 7: Glucocorticoides (GCs): estructura y regulación. (A) Estructura química de los GCs naturales (Cortisol y Corticosterona) y sintéticos (Dexametasona). **(B)** Eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA). CRH, hormona liberadora de corticotrofina; ACTH, adrenocorticotrofina. (Adaptado con modificaciones de Vandevyver y col. 2013 (109)).

Por su parte, el mecanismo de acción de los GCs se basa principalmente en su unión a un receptor intracelular, el receptor de GCs (GR). Junto con los otros receptores de hormonas esteroideas, tales como andrógenos, estrógenos, progesterona y mineralocorticoides, GR forma parte de la subfamilia de receptores nucleares, los cuales actúan como factores de transcripción inducibles por ligando (110).

Se considera que los efectos de los GCs están mediados por cuatro mecanismos de acción diferentes: I. Mecanismo de acción genómico clásico, en el cual participa el GR citosólico (cGR); II. Efectos no genómicos secundarios, los cuales también son iniciados por cGR; III. Efectos no genómicos mediados por GR unido a la membrana (mGR); IV. Efectos no específicos, no genómicos causados por la interacción con membranas celulares (111) (**Figura 8**).

En el mecanismo de acción genómico clásico, en ausencia de ligando, el GR inactivo se encuentra en el citoplasma formando un complejo proteico que incluye proteínas chaperonas (proteínas de shock térmico Hsp90 y Hsp70, inmunofilina FK56, entre otros), formando lo que se conoce como complejo de receptores heteroméricos (112). Luego de la unión con su ligando, GR se libera de sus interacciones con las Hsps induciendo un cambio conformacional del receptor y así su activación. El complejo GC-GR resultante se transporta al núcleo y, a través de su dominio central, se vincula a lugares de unión al ADN (elementos de respuesta a GCs), donde actúa directamente como un factor de transcripción, o interactúa con otros factores de transcripción, regulando la expresión de genes (**Figura 8**). Por lo tanto, los efectos de los GCs tienen un inicio relativamente lento y se mantienen durante algún tiempo después que los GCs son eliminados de la circulación. Además del GR, los GCs también pueden unirse al receptor de mineralocorticoides (MR) (109).

El GR está presente en casi todas las células. La respuesta celular a los GCs es dependiente no sólo de la presencia de la hormona, sino también, por ejemplo, de la concentración del receptor, de los cambios durante el desarrollo, del ciclo celular o de trastornos del sistema endócrino (105). El gen que regula la expresión del GR genera dos isoformas del receptor altamente homólogas entre sí, denominadas α y β . La isoforma GR α reside principalmente en el citoplasma y funciona

como un factor de transcripción dependiente de ligando. El GR β ejerce un efecto dominante negativo sobre la actividad transcripcional de GR α (113).

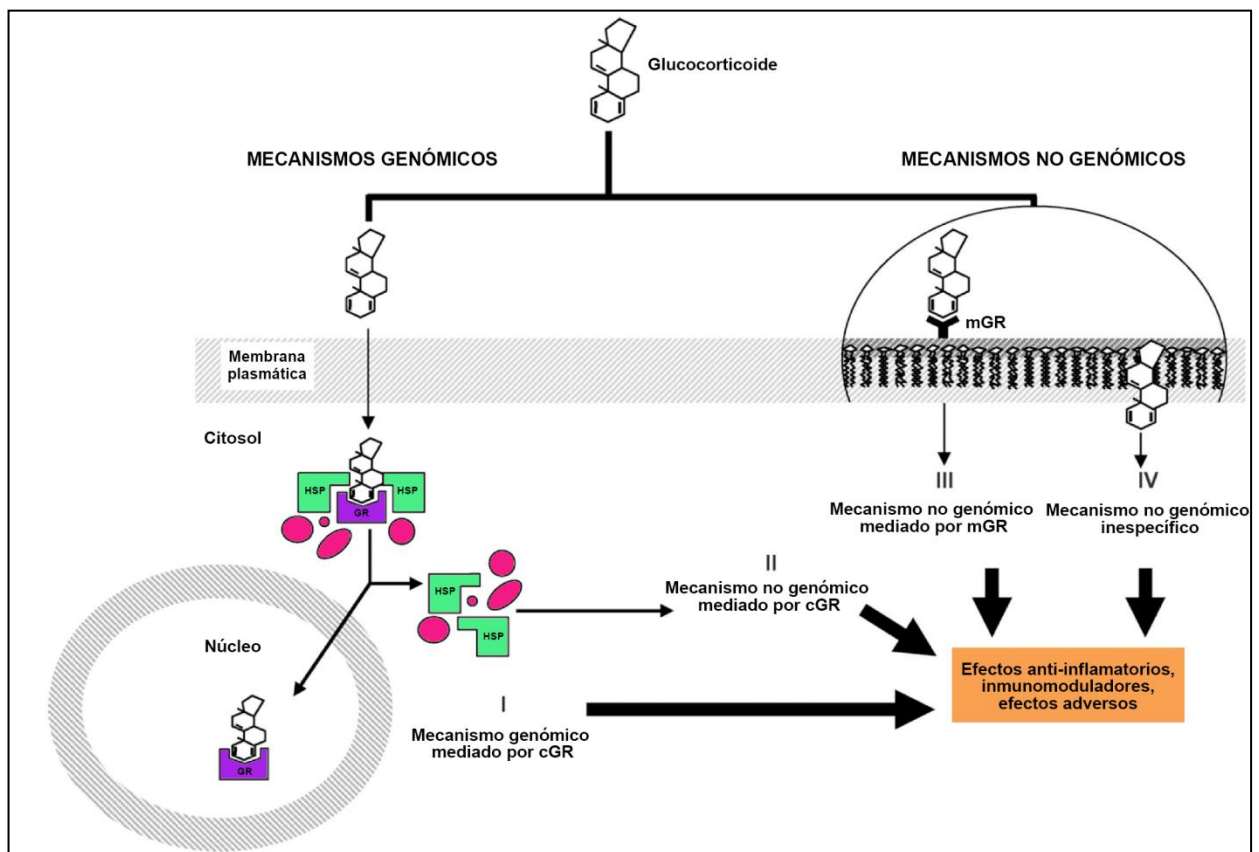


Figura 8: Resumen de los mecanismos de acción genómicos y no genómicos de los GCs. Los GCs son moléculas lipofílicas, por lo que atraviesan fácilmente la membrana plasmática y se unen al GR citosólico, el cual media efectos genómicos (I) y no genómicos (II). Se ha descrito que los efectos no genómicos también son mediados por la unión al GR de membrana (mGR, III) y por la interacción con las membranas celulares (IV). (Adaptado con modificaciones de Stahn y col. 2007 (111)).

Por su parte, estudios realizados en nuestro laboratorio (114-116) y los de otros autores (117) reportaron la interrelación del mecanismo de acción de los GCs y el de las HTs. En este sentido, es bien conocida la interacción funcional de T3 y GCs en sus efectos metabólicos específicos. Resultados obtenidos en células hipofisarias demostraron una acción sinérgica de T3 y GCs sobre la síntesis y secreción de hormona de crecimiento (118, 119). Resultados de *Iwamuro & Tata* (120) indican que la inducción precoz de la metamorfosis en renacuajos por T3 fue potenciada por el tratamiento simultáneo con Dexametasona (Dex, GC de síntesis) (**Figura 7A**) o corticosterona. En estas circunstancias se constató un incremento en la expresión del gen TR que fue potenciado significativamente por Dex (117). La participación del TR en la interacción entre T3 y GCs también fue estudiada en nuestro laboratorio, demostrando que los GCs incrementan las acciones dependientes de T3 en hígado a través del aumento en la expresión de TR β 1, avalando la interacción de este esteroide sobre el mecanismo de acción de las HTs (116).

Si bien el tejido hepático es un blanco muy importante de la acción de los GCs a nivel metabólico, debido a sus efectos en la respuesta inmune son ampliamente utilizados en la clínica terapéutica. Los GCs representan uno de los grupos de drogas más comúnmente prescritas en el mundo. A concentraciones farmacológicas, los GCs muestran efectos antiinflamatorios potentes. Por lo tanto, numerosos trastornos autoinmunes, inflamatorios y alérgicos, como el asma, artritis reumatoidea, colitis ulcerosa, rinitis alérgica y rechazo de trasplante, son a menudo tratados con GCs sintéticos, tales como Dex y la prednisolona (121, 122).

Numerosos estudios indican que los GCs actúan directamente en las células inmunes modificando su respuesta, abordando la mayoría de los mismos el efecto de GCs sobre linfocitos.

Los GCs ejercen sus efectos antiinflamatorios principalmente bloqueando las vías de señalización proinflamatorias mediadas por citoquinas, disminuyendo marcadores de activación y moléculas de adhesión, así como induciendo apoptosis de ciertas células del sistema inmune (123). En este sentido, los GCs regulan la expresión de genes involucrados en procesos inmunológicos. Diferentes estudios han demostrado que dichas acciones antiinflamatorias e inmunosupresoras inducidas por GCs se deben tanto a mecanismos genómicos mediados por GR citoplasmático, como a efectos rápidos no genómicos (111).

La supresión de la respuesta inmune mediada por GCs involucra, entre otros eventos, a aquellos ejercidos por las CPA. En este aspecto, así como es importante comprender los efectos de GCs sobre los linfocitos, es necesario determinar el rol que estas hormonas ejercen sobre células conductoras de la respuesta inmune mediada por linfocitos, incluyendo las DCs. En este sentido, ha sido demostrado que Dex es capaz de prevenir las respuestas inmunes inflamatorias y aumentar las respuestas antiinflamatorias en DCs derivadas de médula ósea y bazo (124). A pesar de que los GCs incrementan la expresión de los receptores de tipo Toll (*Toll-like receptors*, TLR), deterioran severamente la diferenciación y presentación de antígenos por parte de las DCs luego de la activación con diferentes ligandos de dichos receptores como LPS (125). En adición, se ha reportado que los GCs generan DCs capaces de generar linfocitos T con un perfil tolerogénico (125).

II. OBJETIVOS

Considerando que en nuestro laboratorio se demostró previamente el mecanismo de acción según el cual las HTs interactúan con otras hormonas, entre otras los GCs, en la expresión final de determinadas acciones metabólicas específicas de T3, en este trabajo de tesis se planteó el estudio del efecto de los GCs sobre el mecanismo de acción de las HTs a nivel del sistema inmune, en particular sobre las características y funcionalidad de las DCs.

Por otra parte, los hallazgos previos del grupo donde se realizó este trabajo de Tesis Doctoral, abrieron perspectivas para profundizar el estudio del efecto de las HTs a nivel del sistema inmune, más precisamente a nivel de las DCs. Particularmente, el análisis de los perfiles de respuesta inmune adaptativa generados por DCs estimuladas con T3. Consecuentemente con los hallazgos que se fueron obteniendo, se planteó evaluar la manipulación de DCs con fines terapéuticos para patologías crónicas, más precisamente el cáncer.

El **OBJETIVO GENERAL** de esta Tesis Doctoral involucra el estudio de la interrelación entre el sistema endócrino y el sistema inmune. En particular, la investigación de las modificaciones en el mecanismo de acción de las HTs sobre CPA especializadas: DCs, inducidas por un GC de síntesis: Dex y la profundización del estudio del efecto de las HTs a nivel de las DCs.

Con los antecedentes planteados, se propusieron los siguientes **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**:

1. Estudio del efecto de Dex sobre el mecanismo de acción de las HTs a nivel de las DCs.

a. Acción de Dex en la maduración de DCs inducida por T3.

b. Efecto de Dex en el balance de citoquinas pro y antiinflamatorias en DCs estimuladas con T3.

c. Capacidad aloestimuladora de DCs maduras con T3 en presencia de Dex.

d. Acción de Dex en la activación de Akt inducida por T3 en DCs.

e. Efecto de Dex en la expresión de TRB1 en DCs estimuladas con T3. Participación de GR.

f. Acción de Dex en la translocación de NF- κ B desde el citoplasma al núcleo celular inducida por T3 en DCs.

2. Evaluación de la modulación de la respuesta inmune adaptativa por DCs estimuladas con T3

a. Efecto sobre el balance de células Treg y células T efectoras Th17.

1. Acción de T3 en la producción de TNF- α , IL-6 e IL-23 por DCs.

2. Secreción de IL-17 en esplenocitos alogénicos enfrentados a DCs estimuladas con T3.

3. Evaluación de la población celular responsable del aumento de la producción de IL-17 inducido por DCs maduras con T3.

4. Efecto de DCs estimuladas con T3 en la población Treg.

b. Capacidad de estimular una respuesta inmune antitumoral in vivo.

- 1. Habilidad de DCs estimuladas con T3 de estimular una respuesta citotóxica antígeno-específica in vivo.***
- 2. Capacidad de DCs maduras con T3 de inducir la presentación cruzada de antígenos in vitro. Vía involucrada.***
- 3. Efecto de T3 en la muerte celular de las DCs.***
- 4. Acción de T3 en la capacidad migratoria de DCs a nódulos linfáticos.***
- 5. Capacidad de DCs estimuladas con T3 en presencia de un antígeno tumoral para inducir una respuesta inmune antitumoral.***
- 6. Efecto de DCs estimuladas con T3 en las poblaciones de linfocitos infiltrantes de tumor.***
- 7. Habilidad de DCs maduras con T3 de inducir una respuesta antígeno-específica.***

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 Ratones.

Se utilizaron hembras C57BL/6 (B6; H-2b) y BALB/c (H-2d) (Fundación José A. Balseiro, Centro de Energía Atómica Ezeiza, Bs. As., Argentina). Los ratones fueron mantenidos bajo condiciones libre de patógenos específicos 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.

DCs fueron obtenidas a partir de progenitores de médula ósea, que fueron extraídos del fémur de ratones C57BL/6 y cultivados en RPMI 1640 10% suero fetal bovino (SFB) depletado de HTs por tratamiento con resinas AG-1-X8 (Bio-Rad), en presencia de GM-CSF (Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos). Al día 7 de cultivo, más del 85% de las células no adherentes colectadas (iDCs) expresaron MHC II, CD40, CD80 y CD11c pero no Gr-1 (citometría de flujo). Estas células fueron tratadas con 3,3',5-triiodo-L-tironina (T3, 5 nM, DC_{T3}), lipopolisacárido (LPS, 100 ng/mL, E coli cepa 0111:B4, DC_{LPS}), dexametasona (Dex, 10 nM) y/o RU486 (10 nM).

Los tratamientos se realizaron por 18 h a 37 °C. Las reacciones fueron frenadas en los tiempos indicados por el agregado de solución salina fría. Cultivos paralelos fueron mantenidos sin estímulo

y usados como controles ($DC_{Control}$). La concentración final de los diluyentes usados fue idéntica en cada cultivo, independientemente de los tratamientos individuales. T3, LPS, Dex y RU486 fueron adquiridos en Sigma (USA) y preparados de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Para descartar una posible contaminación de T3 con endotoxinas, evaluamos el contenido de LPS luego de la reconstitución de la hormona, el cual arrojó valores inferiores a 0.015 UI/ml (límite de detección), medido por el test de Limulus (Limulus amoebocyte lysate assay, Sigma).

III.3 Análisis del fenotipo de DCs por citometría de flujo.

Luego de los tratamientos, las DCs fueron lavadas dos veces con PBS suplementado con SFB al 2%. Luego, las células fueron incubadas con los siguientes Acs durante 30 min a 4 °C: FITC-anti-CD11c, PE-anti-IA/IE (MHC-II), PE-anti-CD40, PE-anti-CD80, PE-anti-CD86 (BD PharMingen, San Diego, California, USA) para realizar la marcación de superficie. Las células (al menos 10.000 vivas) fueron procesadas en un citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences) y analizadas con el software Flowjo (Tree Star, Ashland, OR).

III.4 Determinación intracelular de citoquinas (citometría de flujo).

La detección intracelular de IL-12, INF- γ , IL-17 y el factor de transcripción Foxp3 (FoxP3) fue realizada por citometría de flujo utilizando Acs monoclonales PE-anti-IL-12, FITC-anti-INF- γ , PE-anti-IL-17A y APC-anti-FoxP3 (BD Biosciences). Brevemente, las células fueron expuestas a brefeldina A (10 μ g/ml; Sigma) durante las últimas 6 h de cultivo, luego levantadas y marcadas con los Acs para las moléculas de superficie (FITC-anti CD11c, PE-anti-CD25, PECy5-anti-CD4, FITC-anti-CD3, APC-anti-TCR $\gamma\delta$, PECy7-anti-NK1.1, BD Biosciences). Posteriormente fueron fijadas con

paraformaldehído al 1%, tratadas con una solución permeabilizante (BD Biosciences) y marcadas con una concentración óptima de un Ac monoclonal anti-citoquina o con un apropiado control de isotipo (BD Biosciences). Las células (al menos 10.000 vivas) fueron procesadas en un citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences) y analizadas con el software Flowjo (Tree Star, Ashland, OR).

III.5 Determinación de citoquinas en sobrenadantes (ELISA).

La detección de IL-12, IL-10, IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-23 e IL-17 fue realizada en los sobrenadantes de cultivos celulares usando ELISA de captura estándar. Los Acs de captura fueron: anti-ratón (producidos en rata) IL-12 p40/p70, IL-10, IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-23 e IL-17. Los Acs de detección incluyeron: anti-ratón (producidos en rata) IL-12 p40/p70, IL-10, IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-23 e IL-17 biotinilados. Streptavidina peroxidasa y ABTS fueron utilizados como enzima y sustrato respectivamente (Kits de BD Biosciences).

III.6 Cultivo alogénico.

Este experimento fue realizado para evaluar la capacidad de DCs tratadas con T3, en presencia o no de Dex, de estimular la proliferación de linfocitos T alogénicos, como fue descrito (101). Brevemente, esplenocitos alogénicos (1×10^5 cél/well) fueron incubados con DCs irradiadas (30 Gy, después del período experimental) durante 3 días, en una relación 1:15 (DC/esplenocitos) en una placa de 96 pocillos de fondo curvo. En el día 2, se agregó 0.5 μ Ci (0.0185 MBq) de 3 H-Timidina (Amersham Life Sciences, Buckinghamshire, UK) en cada pocillo. 18 h más tarde, las células fueron levantadas en papel de fibra de vidrio con un cultivador semiautomático. La proliferación fue determinada como cuentas por minuto (cpm) de determinaciones realizadas por triplicado.

III.7 Preparación de extractos celulares totales, nucleares y citoplasmáticos.

Para obtener lisados celulares totales de DCs, 5×10^6 células fueron resuspendidas en 100 μ l de buffer RIPA e inhibidores de proteasas, e incubadas en hielo por 30 min. Posteriormente, el DNA y el debris celular fueron extraídos por centrifugación a 10.000 x g por 20 min a 4 °C. Los extractos nucleares y citoplasmáticos fueron obtenidos por fraccionamiento subcelular, como previamente fue descrito por Schreiber y col. (126). Brevemente, 6×10^6 células fueron resuspendidas en 200 μ l de buffer (10 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM ditioneitol, 0.5 mM fenilmetilsulfonil fluoruro). Posteriormente, se agregaron 25 μ l de una solución 10% (vol/vol) de Nonidet P-40 y se incubó en hielo por 15 minutos. El sobrenadante conteniendo el citoplasma fue recolectado por centrifugación. El núcleo que se encuentra en el infranadante fue resuspendido en 50 μ l de un buffer frío (20 mM HEPES, pH 7.9, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM ditioneitol, 1 mM fenilmetilsulfonil fluoruro), y mezclado vigorosamente por 15 minutos a 4°C. Los extractos nucleares fueron centrifugados por 5 minutos a 4°C en una microcentrífuga y se recolectaron los sobrenadantes. Los mismos resultantes fueron congelados a -80 °C. La concentración de proteínas fue cuantificada usando la técnica de Bradford (Bio-Rad, Laboratories, Hercules, California, USA) (127). Para el estudio de proteínas fosforiladas, las reacciones fueron detenidas utilizando solución salina fría. Posteriormente las DCs fueron colectadas, centrifugadas y resuspendidas en buffer de siembra (60 mM Tris, pH 6.8), 2.3% (peso/vol) SDS, 10% (vol/vol) glicerol, 0.01% (peso/vol) azul de bromofenol y 5% (vol/vol) 2-Mercaptoetanol, hervidas a 96°C durante 5 min y conservadas a -80°C.

III.8 Western Blot.

La electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) y el análisis por inmunomarcación fueron realizados básicamente como se describió previamente (116). Brevemente, los extractos de DCs fueron separados por SDS-PAGE (10 o 12%), transferidas a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad), luego bloqueadas con albúmina sérica bovina al 5% en TBS conteniendo 0.05% (vol/vol) Tween 20. Posteriormente las membranas se incubaron con los Acs primarios, seguido de la incubación con los respectivos Acs secundarios conjugados con peroxidasa de rabanita (HRP). Finalmente las bandas específicas fueron reveladas por electroquimioluminiscencia (ECL, Amersham Biosciences). El control de carga de las muestras fue revelado por la inmunodetección de actina en las mismas membranas.

Los Acs monoclonales anti-TR β_1 , anti-NF κ Bp65, anti- β -actina y los secundarios anti-mouse o anti-rabbit conjugados con HRP, fueron adquiridos en Santa Cruz Biotechnology, CA, USA. El Ac monoclonal dirigido contra p-Akt fue adquirido en Cell Signaling, MA, USA. Los Acs monoclonales dirigidos contra I κ B ϵ fueron adquiridos en BD Pharmingen. Los Acs monoclonales anti- α -tubulina y anti-histone deacetylase 1 (HDAC1, monoclonales producidos en ratón) fueron adquiridos en Sigma.

III.9 Ensayo de citotoxicidad *in vivo*.

A fin de determinar la habilidad de T3 de generar DCs capaces de estimular la citotoxicidad antígeno-específica, se realizó un ensayo de citotoxicidad *in vivo*, como fue descrito previamente (128). Para ello, 4 grupos de ratones fueron inmunizados de manera endovenosa (ev) con 5×10^6 DCs incubadas con: 1) medio de cultivo (control), 2) OVA (100 $\mu\text{g/ml}$, Worthington, NJ, USA), 3) OVA + LPS (100 ng/ml , Sigma), 4) OVA +T3 (5 nM, Sigma). Células de bazo de ratones singénicos fueron marcadas incubándolas durante 10 min a 37°C con CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester: colorante fluorescente que tiene la capacidad de ingresar a las células) alternativamente en dos concentraciones: $3 \mu\text{M}$ CFSE (células CFSE^{high}) o $0,5 \mu\text{M}$ CFSE (células CFSE^{low}). Las células CFSE^{high} fueron estimuladas con 10 ng/ml de péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄ (péptido de la proteína OVA con capacidad de unirse a las moléculas MHC I) por 30 minutos a 37°C . Las células CFSE^{low} no fueron pulsadas y sirvieron como control interno. En el día 7, los ratones fueron inyectados ev con una mezcla de 3×10^6 células CFSE^{low} (no pulsadas) y 3×10^6 células CFSE^{high} (pulsadas con el péptido). Los bazos de los ratones fueron extirpados 24 horas más tarde y las suspensiones celulares analizadas por citometría de flujo para cuantificar células marcadas con CFSE^{low} y CFSE^{high} y determinar la habilidad de las DCs de generar citotoxicidad antígeno específica (% de células CFSE^{high}).

III.10 Ensayo de presentación cruzada de antígenos.

Para determinar si T3 genera DCs capaces de realizar presentación cruzada de antígenos (129), DCs se incubaron con 1) medio de cultivo (control), 2) OVA (100 $\mu\text{g/ml}$), 3) OVA₂₅₇₋₂₆₄ (10 ng/ml) o

4) OVA+T3 (5 nM), durante cuatro horas. Las células se lavaron con medio de cultivo y fueron resuspendidas en medio RPMI 1640 suplementado en una concentración de 1×10^6 células/ml. Las células del hibridoma de células T B3Z (1×10^5 , que expresan la enzima LacZ bajo el control transcripcional del promotor de IL-2, la cual se genera cuando hay unión del TCR al complejo OVA₂₅₇₋₂₆₄ /Kb) se colocaron en el primer pocillo de una placa de 96 pocillos (fondo en U) y se realizaron diluciones seriadas para alcanzar distintas relaciones célula efectora: célula target. En algunos experimentos, las DCs fueron pretratadas durante 1 h con MG-132 (1,3 a 3,3 mM), un potente inhibidor de proteasoma reversible, y co-incubadas durante toda la noche con el hibridoma de células T B3Z (relación 1:1). Después de la co-incubación con el hibridoma B3Z, las células se lavaron dos veces con PBS (pH 7,4) y fueron lisadas por la adición de 125 μ l de una solución 5 mM o-nitrofenil-PD-galactósido (ONPG) en PBS/0,5% NP-40. Después de la incubación por 4 horas a 37 °C, la cantidad de enzima lacZ se cuantificó mediante la hidrólisis de ONPG por medición de la densidad óptica a 415 nm.

III.11 Determinación de muerte celular.

Luego del tratamiento con T3 (5 nM), Dex (10^{-6} M) o ambas por 18 horas, las DCs fueron marcadas con Anexina V y 7-aminoactinomicina D (7-AAD, BD Biosciences), y analizadas por citometría de flujo (FACSCanto II, BD), como fue descrito (130). Las células Anexina V⁺/7-AAD⁻ son consideradas en apoptosis temprana, mientras que las Anexina V⁺/7-AAD⁺ son células en fases tardías de apoptosis o necróticas.

III.12 Migración de DCs *in vivo*.

DCs control y estimuladas con T3 fueron marcadas con CFSE (5 μ M). Luego se lavaron 3 veces en PBS y 1.5×10^6 DCs fueron resuspendidas en 250 μ l de PBS e inyectadas subcutáneamente (sc) en ratones. Veinticuatro horas después, se obtuvieron los ganglios linfáticos axilares, inguinales y poplíteos. Por medio de citometría de flujo se obtuvo el porcentaje de DCs (CD11c⁺) CFSE⁺ que fueron capaces de migrar a los ganglios.

III.13 Extracción de ARN.

La extracción de ARN fue realizada acorde al protocolo basado en el método de Chomczynski y Sacchi como se describió previamente (131). Luego del tratamiento con T3 (5 nM) o LPS (100 ng/ml), las DCs fueron homogeneizadas con Trizol (Invitrogen, Bs As, Argentina) y se adicionó 0,2 mL de cloroformo por mL de lisado. La mezcla se agitó vigorosamente, se incubó 5 min a temperatura ambiente y fue centrifugada a 12.000 xg durante 15 min a 4°C. El ARN presente en la fase acuosa superior fue recuperado, precipitado con isopropanol y centrifugado a 12.000 xg a 4°C por 15 min. El precipitado se lavó con etanol 75 %, se centrifugó a 8000 xg por 15 min a 4°C, fue secado en estufa a 37°C y finalmente disuelto 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. Se determinó la relación de absorbancia entre 260 y 280 nm para evaluar la calidad de la muestra obtenida. Posteriormente se evaluó la integridad del material extraído mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

III.14 Transcripción reversa.

El ARN mensajero (3µg de ARN total) fue transcrito reversamente a cDNA por incubación con 0.25 µM de primers degenerados oligo dT12VG, 20 U de inhibidor de RNAasa, 4 µl of 5 × RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH= 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂ y 10 mM DTT), 0.5 mM de cada dNTP y 1U M-MLV RT (transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Molones) durante 1h a 37°C. La M-MLV RT remanente fue inactivada a 95 °C por 5 min. La expresión del ARNm de CCR7 fue normalizada con ARNm de GADPH, evaluados conjuntamente.

III.15 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).

La amplificación mediante PCR en tiempo real (qPCR) se realizó utilizando “SYBR green” como reportero. Las reacciones de amplificación se realizaron por triplicado en el termociclador ABI Prism 7500 detection system (Applied Biosystem, Foster City, CA) 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, 1:40000 SYBR green (Molecular Probes), 30 nM Rox (Roche Applied Science, Indianápolis, IN) y 1 µl de ADNc. El perfil térmico fue: 94°C 4 min; 94°C 32 seg, 60°C 32 seg (“annealing”), 72°C 32 seg (40 ciclos). La medición de la señal emitida por SYBR green y Rox en cada ciclo fue realizada en la etapa de “annealing”. 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 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (132). Para cada par de “primers” bajo las condiciones ensayadas se observó la presencia de un solo pico en 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 mediante electroforesis en gel de agarosa. Los reactivos utilizados en reacciones de RT y PCR fueron obtenidos en Promega (Madison, WI), mientras que los “primers” fueron adquiridos en Sigma-Genosys (Houston, TX).

Gen	Secuencia sentido	Secuencia antisentido	Tamaño (pb)
CCR7	5'-GGCTCTCCTTGTCATTTCCAG-3'	5'-AATACATGAGAGGCAGGAACCAG-3'	230
β -actina	5'-GGCACCACACTTTCTACAATG-3'	5'-TGGCTGGGGTGTGAAGGT-3'	138

III.16 Modelo tumoral B16-OVA.

La línea singénica de melanoma B16.F1-OVA (donación del Doctor P. Dellabona, Fondazione Centro San Raffaele Monte Tabor-San Raffaele Scientific Institute, Milán, Italia) fue utilizada para inducir melanoma en ratones (133). Las células se mantuvieron en cultivo en RPMI 1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino inactivado por calor, 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina y 2 mM de glutamina. Para levantar las células de la placa, se utilizó PBS y 0,05 % de tripsina-EDTA (incubación de 5 min a 37 °C). Las células se repicaron cada 2-3 días y para generar los tumores se utilizaron cultivos en crecimiento en el mismo número de pasaje, o con diferencia de uno. La línea fue periódicamente testada para micoplasma. Para la inducción de tumores, las células B16.F1-OVA se lavaron tres veces en PBS; se contaron las células viables y 2×10^4 células fueron administradas sc en 250 μ l de PBS en el flanco izquierdo de ratones C57BL/6 de 6-8 semanas de edad. El crecimiento tumoral fue controlado mediante palpación y el tamaño del tumor se midió cada 2-3 días con un calibre Vernier (volumen tumoral= $L \times W^2/2$, L=longitud,

W=ancho). La sobrevida de los animales se define como el tiempo en días entre la inoculación de células tumorales y el día del sacrificio (20 mm de diámetro del tumor, (134)).

III.17 Inmunoterapia basada en DCs.

Las DCs fueron tratadas con OVA (10 mg/ml, DC+OVA), OVA y T3 (5 nM, DC+OVA+T3) o medio de cultivo (control). Luego de 18 horas, se lavaron 3 veces con PBS y 1.5×10^6 DCs fueron resuspendidas en 250 μ l de PBS e inyectadas s.c. en el flanco contralateral en los ratones inoculados con tumor. Estas inmunizaciones se llevaron a cabo los días 1, 3, 5 y 8 post-inyección de las células tumorales.

III.18 Obtención y determinación del linaje de linfocitos infiltrantes de tumor.

Los tumores fueron extirpados y las suspensiones celulares se obtuvieron mediante digestión enzimática (135). Resumidamente, los tumores obtenidos se pesaron, disgregaron en pequeñas piezas con un bisturí ($1-2 \text{ mm}^3$) y se resuspendieron en 10 ml de una solución de digestión [5% de SFB en medio RPMI 1640 y 0,5 mg/ml de colagenasa A (Roche Diagnostic, Mannheim, Alemania) por 0,25 mg de tejido tumoral]. La mezcla se incubó a 37°C durante 45 min en una plataforma giratoria. Las suspensiones celulares resultantes se filtraron secuencialmente a través de filtros de 70 y 40 μ m (BD Falcon), se lavaron con 5% de SFB en medio RPMI 1640 y se sometieron a un gradiente de centrifugación con Ficoll-Hypaque (Sigma). Las células mononucleares fueron marcadas para determinar las distintas subpoblaciones (linfocitos T CD8⁺, CD4⁺, células NK) por citometría de flujo. Las células se incubaron con Acs PECy5-anti-CD4, PE-anti-CD8 y FITC-anti-NK1.1

mAb (BD Biosciences) durante 30 min a 4 °C. Posteriormente se analizaron por citometría de flujo (citómetro FACS Canto II, BD Biosciences) utilizando el software FlowJo (Tree Star).

III.19 Producción de INF- γ por esplenocitos de ratones portadores de tumor.

Diez días después de la última dosis de la vacunación de DCs en los ratones, los mismos fueron sacrificados y se les extirpó el bazo asépticamente. Se preparó una suspensión de esplenocitos a partir de cada bazo. Las células fueron colocadas en una placa de cultivo de 96 pocillos (2×10^5 células/pocillo, por triplicado) y se estimularon con OVA₂₅₇₋₂₆₄ (10 ng/ml). Después de 72 h, se recogieron los sobrenadantes de cultivo y se cuantificó la cantidad de IFN- γ producido por los linfocitos específicos de tumor, utilizando kits comerciales de ELISA (BD Biosciences). La cantidad de INF- γ intracelular y las poblaciones de linfocitos responsables del mismo se determinaron por citometría de flujo. Para ello, los esplenocitos fueron expuestos a Brefeldina A (10 μ g/ml, Sigma) en las últimas 4 h de cultivo y después fueron fijados con una solución de paraformaldehído 1 % (vol/vol). Posteriormente se trataron con una solución permeabilizante y se marcaron con Acs PECy5-anti-CD4, FITC-anti-CD8 y PE-anti-INF- γ (BD Bioscience) durante 30 min a 4°C. Las células se analizaron por citometría de flujo (citómetro FACS Canto II, BD Biosciences) utilizando el software FlowJo (Tree Star).

III.20 Análisis Estadístico.

El análisis de las diferencias múltiples entre grupos fue realizado por Análisis de Varianza (ANOVA). Como post-test se utilizó el Test de Comparaciones Múltiples Student-Newman Keuls. Las comparaciones entre dos grupos fueron analizadas usando el test t de Student para muestras no apareadas. El test no paramétrico Gehan-Bislow-Wilcoxon para datos apareados fue usado para determinar la significancia de las curvas de sobrevida y velocidad de crecimiento tumoral.

Los test estadísticos fueron realizados con la utilización del software Prism 3.0 (GraphPad 588 Software, San Diego, CA). Valores de $P < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos. Todos los experimentos fueron realizados al menos por triplicado.

IV. RESULTADOS 1

IV.1 Efecto de dexametasona (Dex) sobre el mecanismo de acción de las hormonas tiroideas (HTs) a nivel de las células dendríticas (DCs).

IV.1.1 Dex inhibe la maduración de DCs inducida por T3

Con el fin de determinar el efecto de Dex sobre aquellos registrados previamente en nuestro laboratorio por T3 sobre las características y función de las DCs (101, 102), se cultivaron iDCs derivadas de médula ósea de ratón, obtenidas de acuerdo a lo previamente descrito por nuestro grupo (101), con T3 (5 nM, DC_{T3}) o LPS (100 ng/ml, DC_{LPS}, control positivo) en ausencia o presencia de Dex ($1 \cdot 10^{-8}$ M, DC_{Dex}) por 18 horas. Posteriormente se evaluaron los niveles de los marcadores fenotípicos de superficie (MHCII, CD40, CD80 y CD86) por medio de citometría de flujo. Como se muestra en las **Figuras 9A y B**, el tratamiento de DCs con Dex no modificó el nivel de CD40 y MHCII pero disminuyó significativamente los de CD80 y CD86. Por su parte, y como ya fue demostrado, T3 y LPS indujeron la maduración de DCs, como lo demuestra el aumento de los niveles de MHC II, CD40, CD80 y CD86 en la superficie de las DCs (101). La adición de Dex a DCs en presencia de T3 resultó en una disminución de la expresión de MHCII y moléculas co-estimuladoras en la superficie de las DCs. Por su parte y como ya fue reportado (136), DCs maduras con LPS mostraron una disminución en la expresión de MHCII, CD40, CD80 y CD86 cuando fueron tratadas con Dex. Estos resultados indican un papel inhibitorio de los GCs en la maduración fenotípica de las DCs inducida por T3.

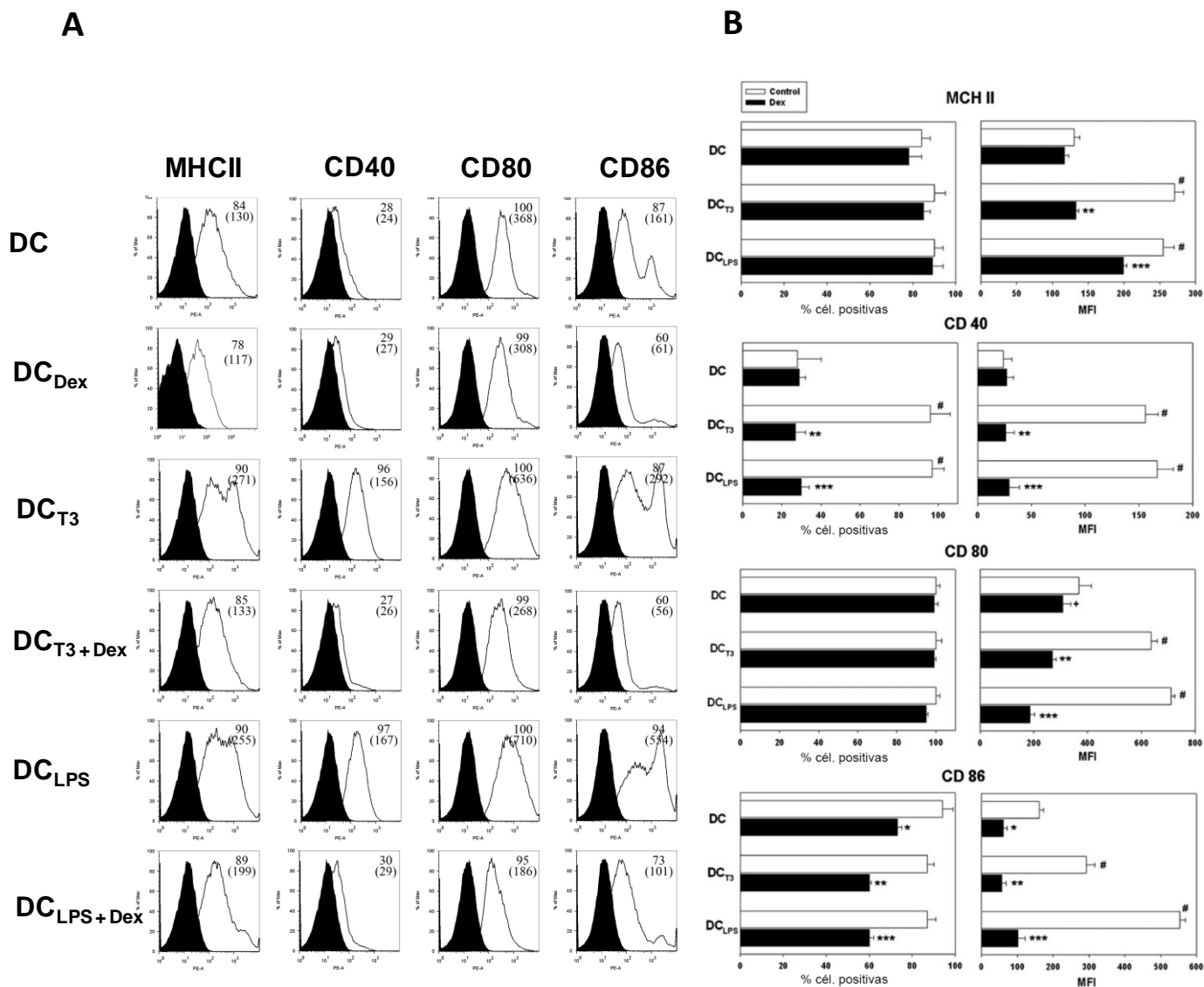
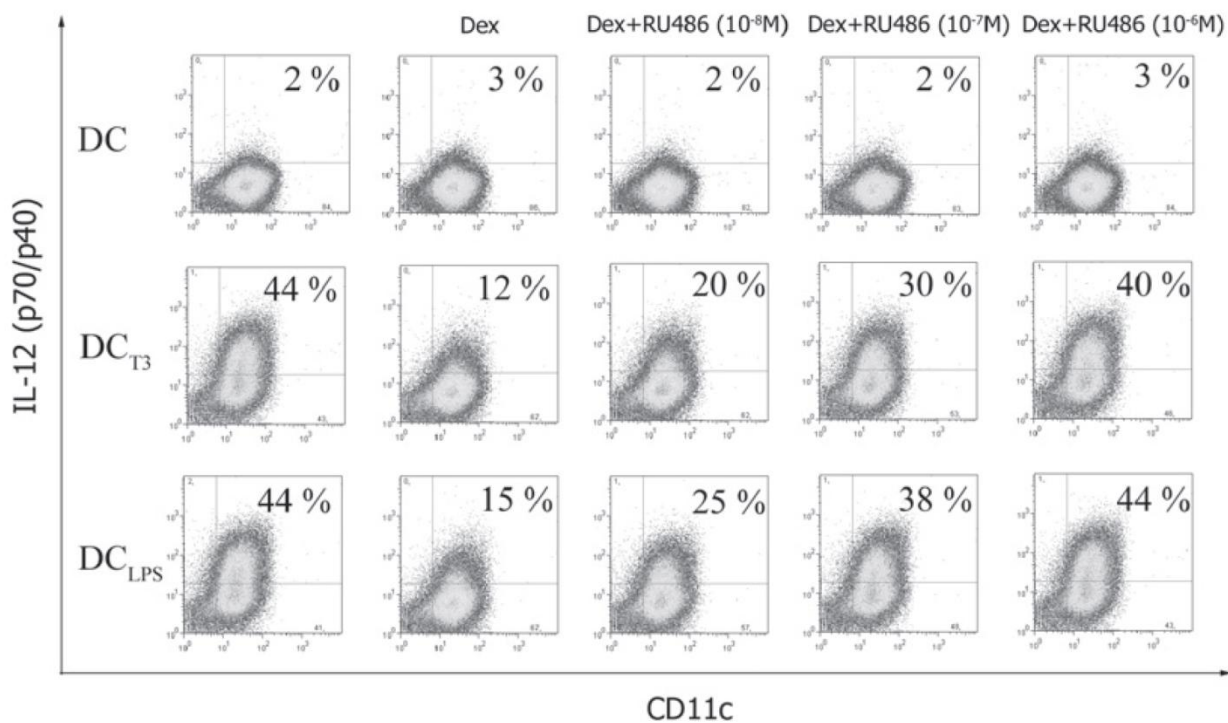


Figura 9: Efecto de Dex en los marcadores fenotípicos de superficie en DCs maduras con T3. iDCs derivadas de médula ósea de ratón (DC) fueron maduras con T3 (5 nM, DC_{T3}) o LPS (100 ng/ml, DC_{LPS}, control positivo) en presencia o ausencia de Dex (10 nM, DC_{Dex}) durante 18 h. El fenotipo de superficie celular de DCs fue analizado mediante citometría de flujo a través de Acs anti-MHC II (IA/IE), anti-CD40, anti-CD80 y anti-CD86. **(A)** Histogramas representativos de tres experimentos con resultados similares, en los cuales se seleccionaron las células CD11c⁺. Los valores superiores representan los porcentajes de células positivas, mientras que los inferiores, la intensidad de fluorescencia media (MFI). Los histogramas negros indican la unión no específica determinada con Acs de control de isotipo; los histogramas blancos, marcadores fenotípicos. **(B)** Los resultados se expresan como el porcentaje de células positivas (izquierda) y MFI (derecha) dentro de la población CD11c⁺. Los datos se expresan como media \pm DE y son de un experimento representativo de un total de tres con resultados similares, # $p < 0.001$, * $p < 0.001$, + $p < 0.05$ vs DC Control; ** $p < 0.001$ frente a DC_{T3}; *** $p < 0.001$ frente a DC_{LPS}.

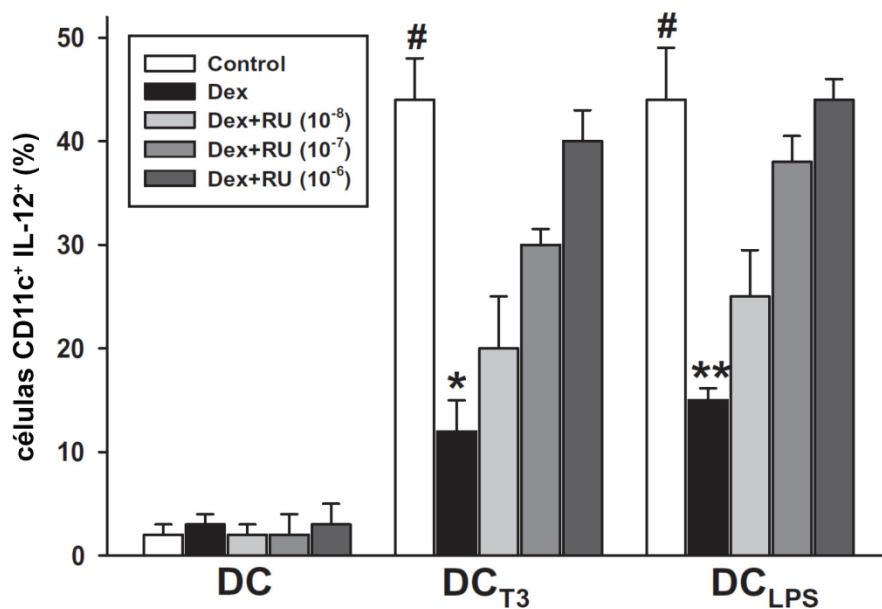
IV.1.2 Dex controla el balance entre las citoquinas pro y antiinflamatorias en DCs estimuladas con T3.

Para investigar si la inhibición en la maduración fenotípica inducida por Dex en DCs maduras con T3 estaba asociada con un perfil de citoquinas modificado, se analizó la capacidad de Dex para modular la producción de citoquinas inducida por T3 en estas células. Utilizando un esquema experimental como el descrito precedentemente y como era esperado (101), DCs expuestas a T3 ó LPS mostraron un aumento significativo en la frecuencia de DCs CD11c⁺ productoras de IL-12 (**Figuras 10A y B**). El tratamiento de DCs con Dex suprimió la capacidad de T3 o LPS de producir IL-12. Con el fin de determinar si este efecto era mediado a través del receptor de hormonas esteroideas GR, las células maduras con T3 o LPS fueron tratadas previamente con el antagonista de GR: RU486. Como se muestra en las **Figuras 10A y B**, la inhibición de la producción de citoquinas pro-inflamatorias inducida por Dex fue, al menos en parte, mediada a través de GR, ya que RU486 redujo significativamente la supresión producida por Dex de la producción de IL-12 en DCs maduras con T3 ó LPS. Consistentemente, el tratamiento con Dex indujo una disminución significativa en la secreción de IL-12 en sobrenadantes de cultivo de DCs en presencia de T3 ó LPS (**Figura 10C**). Por el contrario, los niveles de la citoquina antiinflamatoria IL-10 fueron mayores en DCs maduras con T3 ó LPS tratadas con Dex, en comparación con sus respectivos controles (**Figura 10D**).

A



B



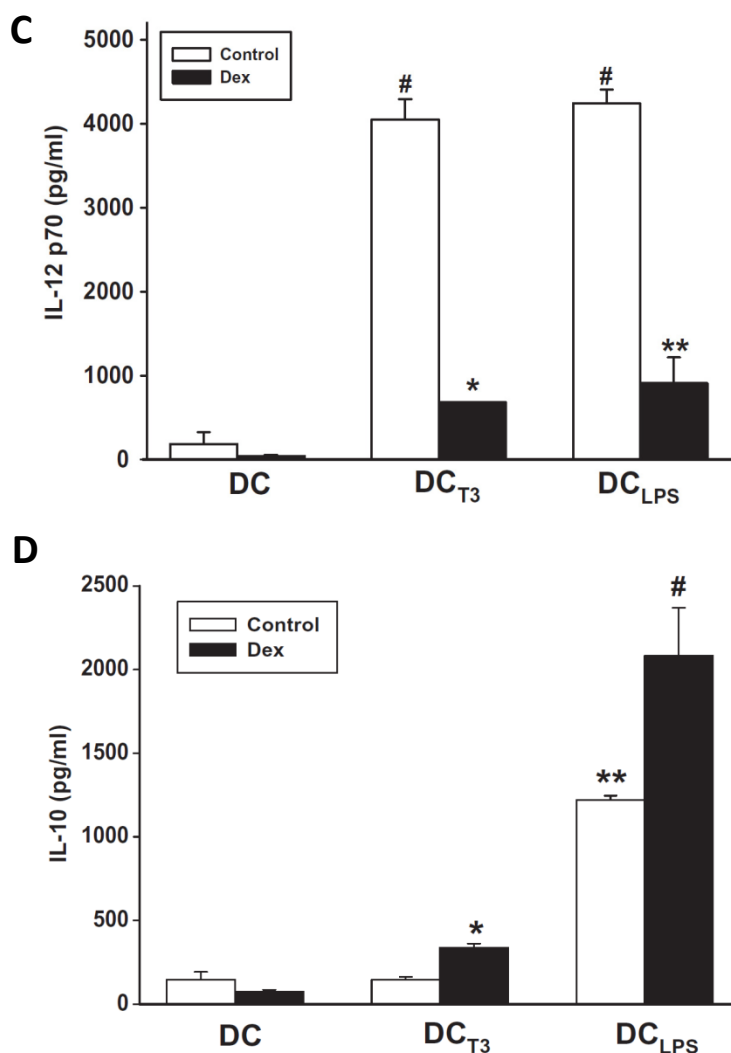


Figura 10: Efecto de Dex en el balance entre IL-12/IL-10 en DCs maduras con T3. iDCs derivadas de médula ósea de ratón (DC) fueron maduras con T3 (5 nM, DC_{T3}) o LPS (100 ng/ml, DC_{LPS}, control positivo) en presencia o ausencia de Dex (10 nM, DC_{Dex}) o Dex + RU486 (antagonista del receptor de hormonas esteroideas, 10^{-8} a 10^{-6} M) durante 18 h. **(A,B)** Para la tinción intracitoplásmica de citoquinas, las células se incubaron con brefeldina A durante 4 h, se marcaron para CD11c, fijaron, permeabilizaron y después se las marcó con Ac anti-IL-12p70, como fue descrito en la Figura 9. La frecuencia de células CD11c⁺ IL-12⁺ se determinó por citometría de flujo. **(A)** Figuras representativas del análisis de citometría de flujo de IL-12 intracitoplásmica. **(B)** Los valores se expresan como el porcentaje de células CD11c⁺ productoras de IL-12. Los datos se expresan como media \pm DE y son de un experimento representativo de un total de tres con resultados similares, $\#p < 0.001$ vs DC control; $*p < 0.001$ vs DC_{T3}; $**p < 0.001$ vs DC_{LPS}. **(C)** La producción de IL-12p70 se determinó en sobrenadantes de cultivo mediante ensayos de ELISA. Los datos se expresan como media \pm DE (pg/ml) y son de un experimento representativo de un total de tres con resultados similares, $\#p < 0.001$ vs DC control; $*p < 0.001$ vs DC_{T3}; $**p < 0.001$ vs DC_{LPS}. **(D)** La producción de IL-10 se determinó en sobrenadantes de cultivo mediante ensayos de ELISA. Los datos se expresan como media \pm DE (pg/ml) y son de un experimento representativo de un total de tres con resultados similares, $**p < 0.01$ vs DC control; $*p < 0.01$ vs DC_{T3}; $\#p < 0.01$ vs DC_{LPS}.

IV.1.3 Dex reduce la capacidad aloestimuladora de DCs maduras con T3.

Dado que el tratamiento con Dex en DCs maduras con T3 o LPS indujo una disminución en la expresión de MHC II y moléculas co-estimuladoras, así como de los niveles de IL-12 y a su vez, produjo un aumento de la producción de IL-10, se propuso evaluar el efecto de Dex en la capacidad aloestimuladora de DCs estimuladas con T3. Tal como fue demostrado por el laboratorio en donde se realizó esta Tesis Doctoral (101), la proliferación de esplenocitos de ratones BALB/c (H-2d) estuvo significativamente incrementada en respuesta a los co-cultivos con DCs alogénicas (C57BL/6) irradiadas maduras con T3 y LPS (**Figura 11**). A su vez, la incubación con DCs alogénicas tratadas con Dex no modificó la proliferación de esplenocitos con respecto a DCs Control. Por el contrario, la presencia de Dex redujo significativamente la capacidad de DCs maduras con T3 o LPS para inducir la proliferación de los esplenocitos (**Figura 11**).

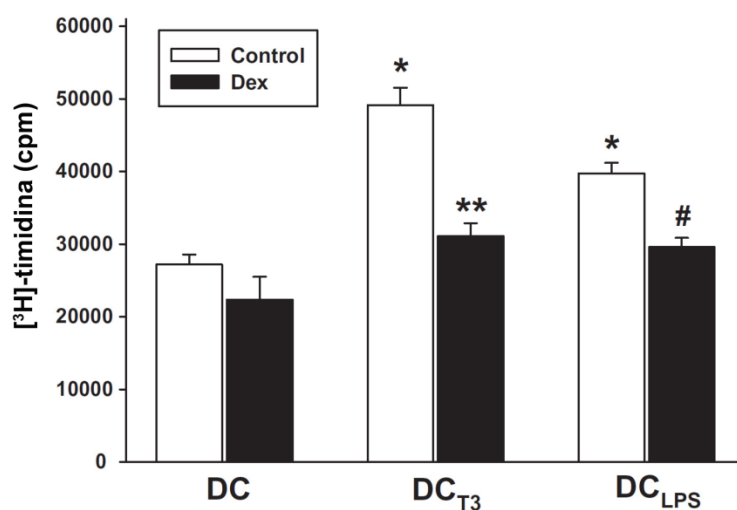


Figura 11: Impacto de Dex sobre la capacidad aloestimuladora de DCs: efectos sobre la proliferación de esplenocitos. iDCs derivadas de médula ósea de ratón (DC) fueron estimuladas con T3 (5 nM, DC_{T3}) o LPS (100 ng/ml, DC_{LPS}, control positivo) en presencia o ausencia de Dex (10 nM). Después de 18 h, las DCs fueron lavadas exhaustivamente, irradiadas y cultivadas con esplenocitos alogénicos durante 3 días en una relación 1:15 células estimuladoras/respondedoras (DC/esplenocitos). La proliferación de esplenocitos alogénicos se cuantificó por un ensayo de incorporación de [³H]-timidina. Los datos se expresan como media ± DE (cpm) y son de un experimento representativo de un total de tres con resultados similares. *p<0.001 vs DC control; **p<0.001 vs DC_{T3}; #p<0.01 vs DC_{LPS}.

Teniendo en cuenta que ha sido reportado que los GCs son capaces de inducir apoptosis de DCs bajo ciertas condiciones (137), y con el fin de excluir que el efecto observado fuese el resultado de la muerte inducida por Dex en DCs, se determinó la muerte celular en DCs tratadas con Dex. Para ello, iDCs y DCs maduras con T3, en presencia o ausencia de Dex, fueron marcadas con anexina V y 7-actinomicina D (7-AAD), para detectar células en fases tempranas, tardías de apoptosis o necróticas. Los resultados obtenidos muestran que la concentración de Dex utilizada no aumentó el porcentaje de dichas células durante el período de tratamiento de 18 h examinado (**Figura 12**), lo que sugiere que la disminución de la proliferación observada cuando esplenocitos se enfrentan a DCs alogénicas tratadas con T3 en presencia de Dex, no fue causada por un aumento de la apoptosis o muerte de DCs.

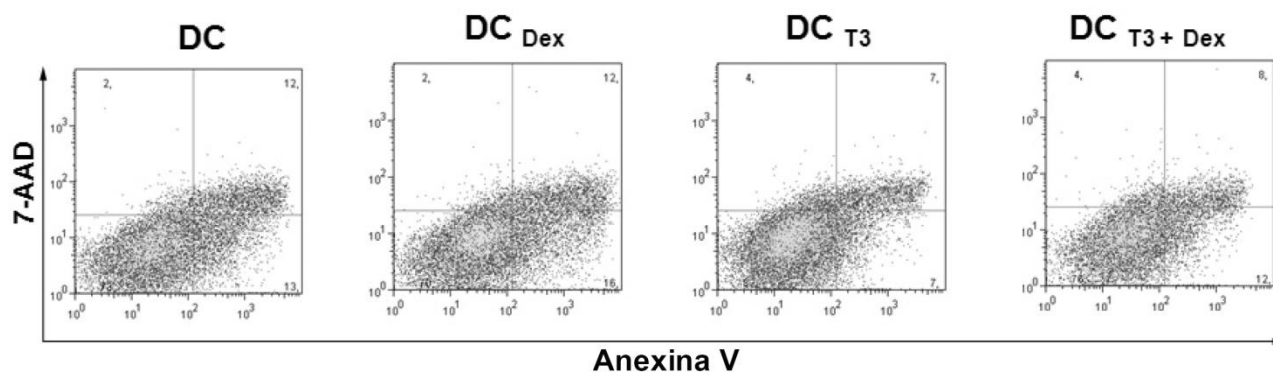


Figura 12: Efecto de Dex en la muerte de DCs. iDCs derivadas de médula ósea de ratón (DC) fueron estimuladas con T3 (5 nM, DC_{T3}) en presencia o ausencia de Dex (10 nM). Después de 18 h, se analizó la muerte celular mediante citometría de flujo utilizando los Ac anti-CD11c, anexina V y 7-Aminoactinomicina D (7-AAD) como se describe en " Materiales y Métodos". Las células CD11c⁺ fueron seleccionadas y se analizó en las mismas la marcación con anexina V y 7-AAD por citometría de flujo. Los números representan el porcentaje de células en cada cuadrante. Las células en fases tempranas de apoptosis son anexina V⁺/7-AAD⁻, en cambio las células en fases tardías o necróticas son anexina V⁺/7-AAD⁺. Experimento representativo de un total de tres con resultados similares.

Por su parte, la reducción de la capacidad aloestimuladora de DCs estimuladas con T3 ó LPS por Dex fue también evidenciada por la menor producción de la citoquina efectora IFN- γ en el sobrenadante de cultivo de esplenocitos co-cultivados con DCs maduras con T3 o LPS y tratadas con Dex (**Figura 13A**). En consonancia, la producción de IL-10 por las células T fue incrementada significativamente en las mismas condiciones experimentales (**Figura 13B**).

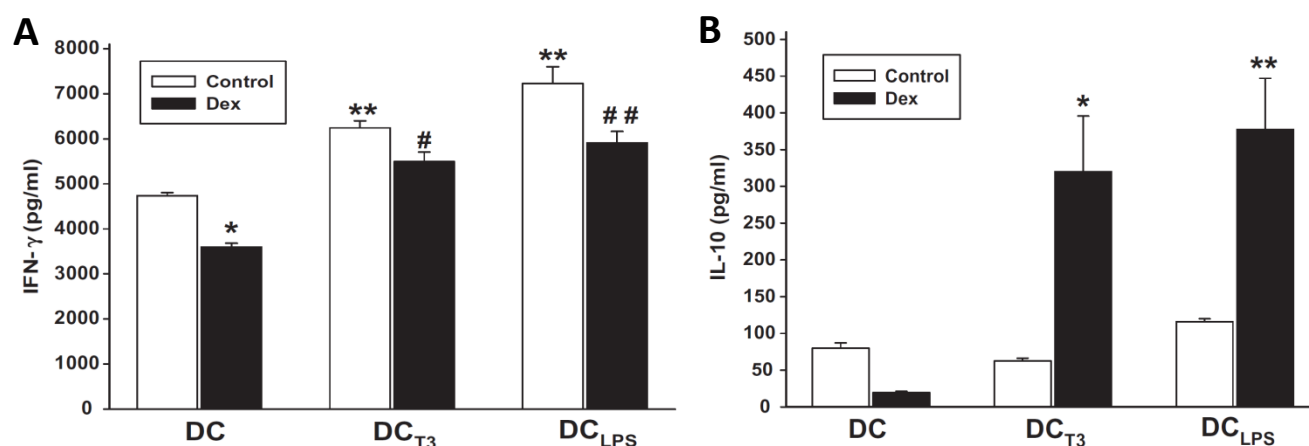


Figura 13: Influencia de Dex en la capacidad aloestimuladora de las DCs estimuladas con T3: efecto sobre la secreción de citoquinas por los esplenocitos. iDCs derivadas de médula ósea de ratón (DC) fueron estimuladas con T3 (5 nM, DC_{T3}) o LPS (100 ng/ml, DC_{LPS}, control positivo) en presencia o ausencia de Dex (10 nM). Después de 18 h, las DCs fueron lavadas exhaustivamente, irradiadas y cultivadas con esplenocitos alogénicos durante 3 días en una relación 1:15 células estimuladoras/respondedoras (DC/esplenocitos). La producción de IFN- γ (**A**) e IL-10 (**B**) se midieron en los sobrenadantes de cultivo mediante ensayos de ELISA. (**A**) Los resultados se expresan como media \pm DE (pg/ml) a partir de un experimento representativo de un total de tres con resultados similares, * $p < 0.01$, ** $p < 0.01$ vs DC control; # $p < 0.05$ vs DC_{T3}; ## $p < 0.01$ vs DC_{LPS}. (**B**) Los resultados se expresan como media \pm DE (pg/ml) a partir de un experimento representativo de un total de tres, con resultados similares, * $p < 0.001$ vs DC_{T3}; ** $p < 0.001$ vs DC_{LPS}.

IV.1.4 Dex inhibe la activación de Akt inducida por T3 en DCs.

Teniendo en cuenta que el aumento significativo en la fosforilación de Akt inducido por T3 que fue demostrado previamente por nuestro grupo, está involucrado en la maduración y función de las DCs (102), y considerando que –como demostramos en los resultados precedentes- Dex contrarresta los efectos inducidos por T3 en DCs, se investigó el efecto de Dex en la activación de Akt inducida por T3 en DCs. La fosforilación de Akt fue examinada en extractos celulares totales de DCs a distintos tiempos (5, 15, 30, 60 min y 18 h) luego de la estimulación con T3, en presencia o ausencia de Dex. Como reportamos previamente (102), se detectó un aumento significativo en la fosforilación de Akt en la Ser 473 a los 5 min de la exposición con T3 en DCs, con un pico máximo a los 15 min de incubación, que persistió incluso a las 18 h de la adición de la HT (**Figuras 14A y B**). Por su parte, la presencia de Dex no sólo retrasó la cinética de la fosforilación de Akt inducida por T3 con un pico detectado a los 30 minutos, sino que también reveló niveles más bajos en todos los tiempos evaluados, en comparación con DCs tratadas con T3. Además, la activación de Akt alcanzó los niveles de DCs Control en DCs estimuladas con T3 en presencia de Dex a las 18 h.

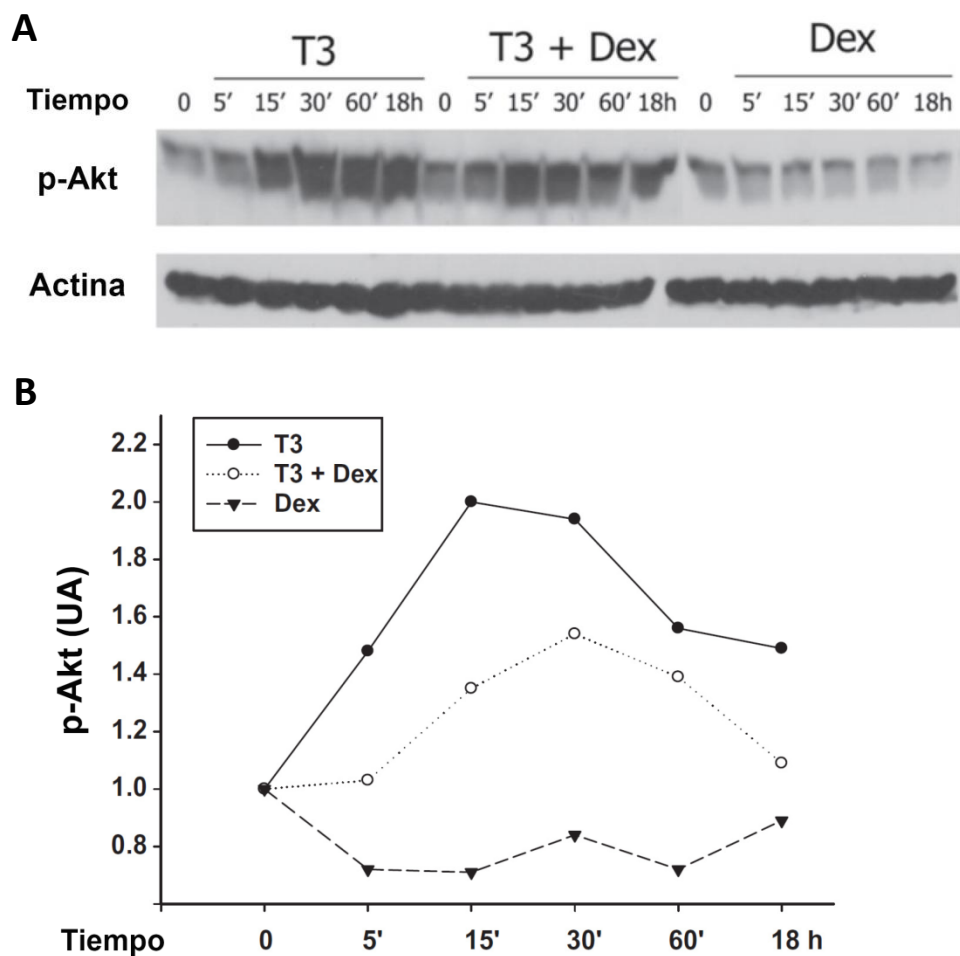


Figura 14: Efecto de Dex en la fosforilación de Akt inducida por T3 en DCs. iDCs derivadas de médula ósea de ratón fueron estimuladas con T3 (5 nM) en presencia o ausencia de Dex (10 nM). Después de diferentes períodos de tiempo, se recogieron las células y se prepararon lisados que posteriormente se analizaron por Western blot para evaluar los niveles de Akt fosforilado (p-Akt). **(A)** Imagen representativa de una membrana del ensayo de western blot para la determinación de p-Akt. El panel inferior muestra la misma membrana revelada para actina para comprobar la igualdad de carga en las muestras. **(B)** Los resultados se expresan como unidades arbitrarias (UA) obtenidas a partir del análisis densitométrico de cada señal de p-Akt normalizada a la señal de actina en el mismo carril en un experimento representativo de un total de tres ensayos independientes con resultados similares.

IV.1.5 Dex reduce la expresión de TR β 1 en DCs de manera dependiente de GR.

Teniendo en cuenta la capacidad de los GCs para modular el mecanismo de acción de las HTs a través de la modulación de los TRs (116), el aumento de la expresión de TR β 1 en DCs inducido por T3, así como el papel fundamental de TR β 1 en los efectos estimulatorios y en la fosforilación de Akt mediados por T3 en DCs (102), se planteó evaluar el efecto de la exposición a Dex de DCs maduras con T3 en la expresión de TR β 1. Utilizando un esquema experimental como el descrito precedentemente, se demostró que el tratamiento con Dex, tanto de iDCs (DC) y DCs maduras con LPS (DC_{LPS}) condujo a una disminución significativa en la expresión de TR β 1 (**Figuras 15A y B**). Además, la disminución de la expresión de TR β 1 inducida por Dex en DCs y DC_{LPS} fue contrarrestada por RU486, lo que sugiere la participación de GR en la acción de los GCs a este nivel. Del mismo modo, Dex fue capaz de disminuir el incremento en la expresión de TR β 1 inducidas por T3 en DCs, de manera dependiente de GR.

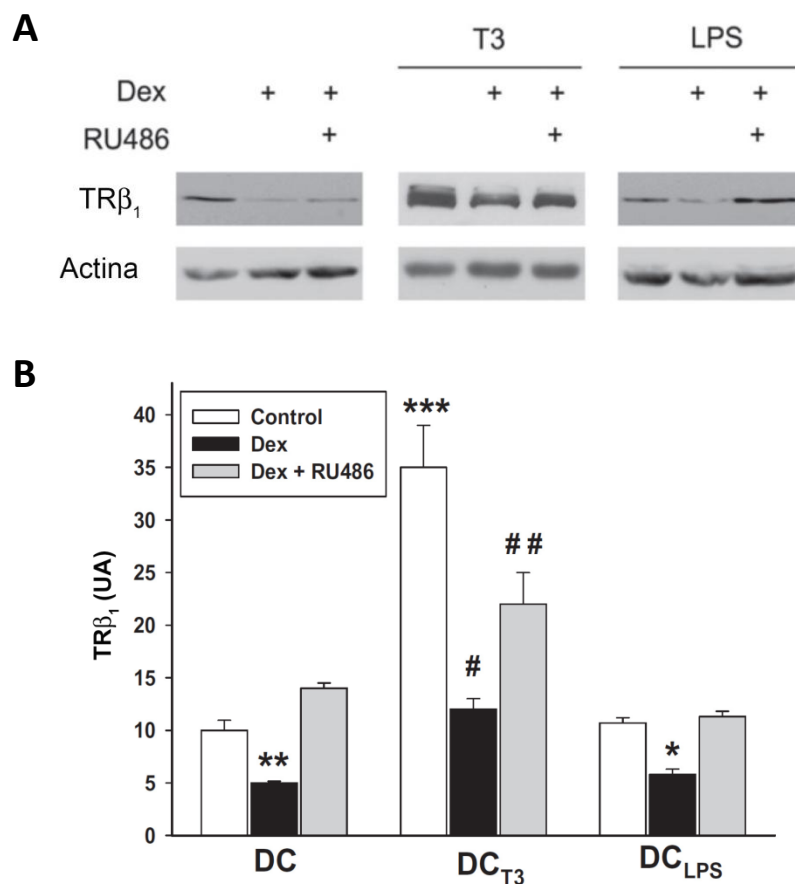


Figura 15: Efecto de Dex en la expresión de TR β_1 en DCs. iDCs derivadas de médula ósea de ratón (DC) fueron estimuladas con T3 (5 nM, DC_{T3}) o LPS (100 ng/ml, DC_{LPS}, control positivo) en presencia o ausencia de Dex (10 nM) o Dex + RU486 (10 nM, antagonista de hormona esteroideas) durante 24 h. **(A)** Western blot de extractos proteicos (40 μ g) para la inmunodetección de TR β_1 . **(B)** Análisis densitométrico de las bandas de proteínas inmunorreactivas. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias (UA), calculadas a partir del análisis densitométrico de cada señal de TR β_1 normalizada con la señal de actina en el mismo carril. Los datos se expresan como media \pm DE y son de un experimento representativo de un total de tres, con resultados similares. * $P < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs DC control; # $p < 0.001$ vs DC_{T3}; ## $p < 0.05$ vs DC_{T3} + Dex.

IV.1.6 Dex reduce la translocación de NF- κ B desde el citoplasma al núcleo celular inducida por T3 en DCs.

Considerando que resultados previos del laboratorio donde se realizó esta Tesis Doctoral mostraron que el aumento de la translocación citoplasma-núcleo de NF- κ B luego de la exposición de DCs a T3 estuvo involucrado en los efectos estimulatorios de T3 en DCs (101) y que este aumento de la actividad de la vía de NF κ B estimuló directamente la expresión de TR β 1 (102), se planteó evaluar el efecto de Dex en los niveles de NF κ B citoplasmático y nuclear, así como en los niveles de I κ B en DCs maduras con T3. En consonancia con los resultados mencionados, T3 fue capaz de aumentar los niveles nucleares de NF κ B y reducirlos a nivel citoplasmático (**Figuras 16A y B**). La adición de Dex suprimió este efecto, lo que indica que la actividad inhibitoria de Dex en los efectos de T3 a nivel de las DCs son ejercidos por un mecanismo que implica, al menos en parte, la modulación de la vía de NF κ B.

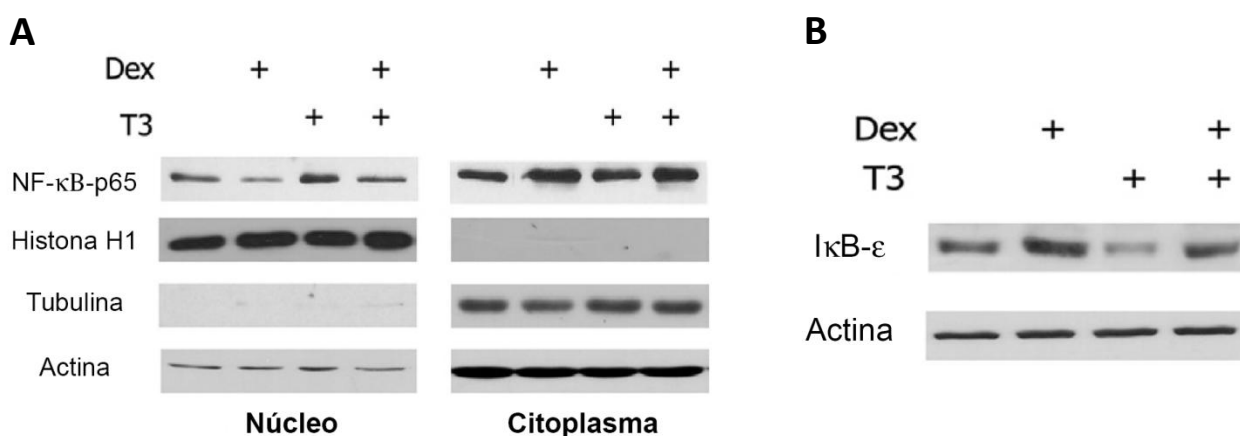


Figura 16: Efecto de Dex en la traslocación citoplasma-núcleo de NF- κ B-p65 y en los niveles de I κ B ϵ en DCs maduras con T3. iDCs derivadas de médula ósea de ratón fueron estimuladas con T3 (5 nM) en presencia o ausencia de Dex (10 nM) durante 18 h. **(A)** Western blot representativo de extractos nucleares y citoplasmáticos de DCs (40 μ g) para la inmunodetección de NF- κ B-p65. Anti-histona H1 y tubulina fueron determinadas para controlar de la pureza de las fracciones subcelulares. Se utilizó actina como control de carga en las muestras (panel inferior). **(B)** Western blot representativo de extractos proteicos (40 μ g) para la inmunodetección de I κ B ϵ . Se utilizó actina como control de carga en las muestras (panel inferior).

IV.2 DISCUSIÓN 1

En este trabajo de Tesis Doctoral se investigó el efecto de uno de los GCs más ampliamente utilizados en la clínica, Dex, en la acción de T3 sobre múltiples características de las DCs, como su maduración, activación de células T, polarización de la respuesta inmune y el mecanismo involucrado. A pesar de su amplia utilización en el control de muchas enfermedades autoinmunes, inflamatorias y alérgicas (121, 122), los complejos mecanismos celulares y moleculares que subyacen a los efectos de los GCs aún no se conocen completamente.

Por su parte, las HTs son reguladores primarios de procesos metabólicos y endócrinos, pero también tienen un papel muy importante en las respuestas inflamatorias e inmunes (26, 48, 101). Consistentemente, nuestro grupo reportó previamente que las DCs derivadas de médula ósea de ratón expresan TR β 1 y que niveles fisiológicos de la HT activa (T3) 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. En este sentido, en este trabajo de Tesis Doctoral, demostramos que la exposición de iDCs a Dex contrarresta considerablemente la capacidad de T3 de promover la maduración de las mismas, la activación de células T y la polarización Th1 de la respuesta inmune. De hecho, cuando DCs son expuestas a Dex, éstas reducen el aumento en la expresión de moléculas co-estimuladoras y del MHC de tipo II inducido por T3. Este efecto también se refleja en la reducción de la frecuencia de DCs CD11c⁺ productoras de IL-12, una potente citoquina pro-inflamatoria responsable de la generación de células Th1, involucradas en la inmunidad contra patógenos intravesiculares y tumores, pero también del inicio de los trastornos

autoinmunes (138). Por su parte, y de manera similar a T3, la activación de los TLR en DCs por sus ligandos específicos, conduce a la producción de citoquinas proinflamatorias y polarizantes Th1, e induce la expresión de moléculas coestimuladoras. Esto inicia el proceso de maduración de las DCs y, posteriormente, conduce a eficientes respuestas inmunes adaptativas (139). De manera consistente con los resultados de esta primera parte de la Tesis Doctoral, Rozkova y col. reportaron que los GCs como Dex, prednisolona y metilprednisolona, tuvieron un efecto inhibitorio sobre el fenotipo y función de las DCs diferenciadas en presencia de ligandos de TLR 2, 3 y 4 (140). Cuando las mismas fueron tratadas con dichos GCs, resultaron incapaces de estimular la proliferación de células T y, aunque conservaron parcialmente su capacidad de madurar en presencia de los ligandos de TLR, su capacidad para hacerlo fue significativamente menor en todos los aspectos (tanto en su expresión de marcadores asociados a la maduración, como en la producción de citoquinas y capacidad estimuladora de células T) en comparación a DCs control. En adición, otro estudio comprobó que la presencia de GCs conduce a la alteración de la función de las DCs en dos niveles: en primer lugar, durante su diferenciación, la presencia de GCs sesga el desarrollo hacia una población cualitativamente distinta, incapaz de inducir una respuesta inmune eficiente, y en segundo lugar, durante el proceso de maduración, afecta la cantidad, es decir, la extensión de este proceso (141).

Por su parte, la capacidad del antagonista de hormonas esteroideas RU486 para contrarrestar los efectos inhibitorios de Dex observados, sugiere fuertemente la participación de GR en estos efectos, desestimando la participación de acciones no específicas de membrana (111, 112, 142). De manera similar, RU486 impidió la inhibición de la producción de TNF- α e IL-1 β inducida por Dex, tanto en DCs esplénicas, como en las derivadas de médula ósea de rata, maduras con LPS, lo que

indica que dichos efectos de los GCs en DCs estarían mediados por GR (124). En concordancia, corticosterona, el principal GC endógeno murino, impidió la maduración y producción de citoquinas y redujo la capacidad de las DCs para estimular células T CD8⁺ *in vivo*. Esta inhibición fue producida de manera dependiente de GR y con concentraciones de corticosterona similares a las observadas en animales sometidos a estrés (143).

Resultados previos del laboratorio donde se realizó esta Tesis Doctoral demostraron que, a diferencia de LPS, T3 no fue capaz de inducir la síntesis de IL-10 por las DCs (101). Aunque Dex por sí sola no modifica la síntesis de IL-10 en DCs, la producción de esta citoquina antiinflamatoria aumenta en las DCs estimuladas con T3, de manera similar a las DCs maduras con LPS, después del tratamiento con Dex, en concordancia con trabajos de otros autores (124, 140). Estos resultados confirman el papel regulatorio de los GCs en la atenuación de los efectos proinflamatorios dependientes de T3. Consistentemente, reportamos un balance de citoquinas alterado en presencia de Dex, con una mayor relación IL-10/IFN- γ en los co-cultivos de células T alogénicas con DCs estimuladas con T3 (DC_{T3}). En conjunto, estos datos demuestran que las DCs tratadas con Dex mantienen un estado inmaduro o tolerogénico, incluso en presencia de T3, secretando preferentemente la citoquina inmunomoduladora IL-10, en relación a su contraparte pro-inflamatoria IL-12, favoreciendo de esta forma la generación de tolerancia por parte de las células T y la supresión de la inmunidad del hospedador (101). En este sentido, el tratamiento de DCs en desarrollo con IL-10 promueve la generación de DCs inmaduras tolerogénicas que inducen células T CD4⁺ y CD8⁺ anérgicas *in vitro* y células T CD4⁺ regulatorias *in vivo* (144, 145). En adición, otros grupos han informado un perfil de citoquinas alterado en DCs en presencia de Dex y otros corticosteroides, con aumento de producción de IL-10 (146-148) y un estado inmaduro duradero,

lo que podría ser el resultado de la alta producción endógena de IL-10 (149). Consistentemente, otro estudio en cultivos primarios de DCs humanas demostró que tras el tratamiento combinado con Dex y LPS, disminuyó la capacidad de las mismas para estimular la producción de citoquinas Th1, pero adquirieron la habilidad de promover la producción de IL-10 en células T (150). Lo más probable, es que las DCs tratadas con LPS y Dex hayan generado un perfil de células Treg, productoras de IL-10 (151, 152). Es importante destacar que estas DCs tolerogénicas transferidas en ratones pueden suprimir las respuestas Th1 *in vivo* y prevenir el rechazo de aloinjertos (153, 154), la enfermedad de injerto contra huésped (155) y protege contra las enfermedades autoinmunes inducidas experimentalmente (156). En otro aspecto, Woltman y col. han demostrado que los estados de hiporrespuesta y estados anérgicos podrían revertirse mediante el bloqueo de IL-10 y de la molécula inhibidora de la muerte celular programada-ligando 1 (PD-L1) en DCs (157). Sin embargo, otros estudios demostraron que los Acs bloqueantes de IL-10 no fueron capaces de reducir la inducción de células Treg por DCs, lo que sugiere que existen mecanismos alternativos que participan en este efecto (158). En este aspecto, se ha identificado un circuito tolerogénico propagado a partir de las DCs a los linfocitos T, por el cual galectina-1, una lectina de unión a β -galactósidos, impulsa la diferenciación de DCs tolerogénicas a través de mecanismos que involucran IL-27 e IL-10 (159).

Por otra parte y en consonancia con nuestros resultados anteriores (102), la exposición de DCs a T3 resulta en un aumento rápido y sostenido de la fosforilación de Akt, la cual es esencial para la maduración y producción de IL-12 inducidas por T3. En el presente trabajo de Tesis Doctoral, la fosforilación de Akt estimulada por T3 fue inhibida rápidamente y por un período de tiempo considerable (18 h), en presencia de Dex. Estos resultados podrían ser la consecuencia de una

activación no genómica rápida y una regulación genómica paralela de mecanismos dependientes de GR (160). De manera concordante con nuestros hallazgos, otros autores han informado de la participación de la activación de Akt en los efectos de los GCs sobre distintas células. En este sentido, se han descrito varios mecanismos por los cuales Dex causa apoptosis en diferentes líneas celulares, incluyendo la inhibición de la vía PI3K y la disminución de la fosforilación de Akt (161-163). Chrysis y col. demostraron claramente que Dex induce apoptosis en una línea celular de condrocitos humanos por la inhibición de la fosforilación de Akt (164). En adición, se reportó que otro GC, la Rimexolona, inhibe la proliferación de células T CD4⁺, así como la producción de citoquinas en las mismas, por una supresión rápida no genómica de la fosforilación de Akt, p38 y ERK (165).

En otro aspecto, teniendo en cuenta que se ha reportado que los GCs son capaces de inducir apoptosis en distintos tipos celulares, entre ellos DCs (137), y como demostramos en este trabajo de Tesis Doctoral que Dex disminuye la fosforilación de Akt, un regulador crítico de la vida útil de las DCs (22), nos preguntamos si los efectos de Dex observados serían por la inducción de muerte celular en las DCs. Con experimentos de doble marcación con anexina V y 7-AAD pudimos comprobar que la dosis de Dex utilizada en nuestros experimentos no fue capaz de inducir la muerte celular en las mismas. Por lo que comprobamos que los efectos observados son intrínsecos a la acción de Dex sobre la actividad de T3 en DCs.

Por otra parte, en el laboratorio donde se realizó esta Tesis Doctoral se ha reportado una interacción física de GR con un sitio consenso para el elemento de respuesta a GCs, presente en el promotor de TR β 1, que es responsable del aumento de la expresión de TR β 1 inducida por Dex en el hígado (116). Contrariamente, en el presente estudio demostramos que Dex disminuye la

expresión de TR β 1 en iDCs y en DCs maduras con T3 ó LPS. Esta discordancia en las respuestas tisulares a T3 puede ser el resultado de las diferencias en abundancia y/o afinidad de los TRs, ya que es posible que alteraciones en el número o en la afinidad de los TRs debidas a estímulos fisiológicos o patológicos, puedan modificar la respuesta de diferentes tipos celulares a las HTs (166). En este sentido, la inhibición de la expresión de TR β 1 inducida por Dex en DCs podría estar involucrada, al menos en parte, en los defectos en la capacidad inmunoestimuladora de DCs estimuladas con T3 generados por el GC. La regulación opuesta de TR β 1 por Dex en el hígado y en DCs refuerza la idea de que las acciones de los GCs son tejido-específicas (34, 167). En este mismo sentido, estudios anteriores reportaron un aumento en el receptor de vitamina D (un receptor con similares características y mecanismo de acción que TR) inducido por GCs en líneas celulares de riñón, adipocitos, carcinoma de células escamosas y cáncer de mama humano, mientras que se observó una significativa disminución del mismo en la mucosa intestinal (168, 169). A su vez, la sensibilidad y la especificidad de las respuestas a GCs están determinadas por las acciones complementarias de las distintas isoformas de GR, que contribuyen a que los efectos de los GCs sean específicos de células y tejidos. El gen GR produce dos ARNm diferentes por splicing alternativo, lo que genera dos isoformas de GR: GR α y GR β . GR β no se une a GCs, se encuentra constitutivamente en el núcleo de las células y actúa como un inhibidor dominante negativo de GR α sobre los genes regulados por GCs tanto positiva como negativamente. Estas isoformas de GR muestran una amplia distribución tisular, pero sus niveles relativos difieren entre los distintos tejidos, como así también dentro de los mismos (167). Aunque se ha reportado una expresión proteica y de ARNm de GR α similar tanto en monocitos como en iDCs humanas, los niveles de ARNm de GR β se mantienen constantes y muy bajos (3-4 órdenes de magnitud menores que GR α)

durante la diferenciación y maduración de las DCs (170). Sin embargo, la funcionalidad de GR es modulada a múltiples niveles que exceden el perfil de isoformas de GR (171).

Anteriormente, el laboratorio donde se realizó esta Tesis Doctoral demostró un aumento en la traslocación a núcleo de NF- κ B-p65 en DCs tratadas con T3; este efecto estuvo asociado con una actividad incrementada de la vía de NF- κ B durante la maduración de las DCs y la consecuente producción de IL-12, inducidas por T3 (101). Por otra parte, los efectos inmunoestimulatorios inducidos por T3 fueron significativamente atenuados por inhibidores específicos de NF- κ B y por ARN de interferencia (siARN) para NF- κ B (102). Se ha observado que la transcripción de citoquinas pro-inflamatorias, incluyendo IL-12p70, es regulada, al menos en parte, por el factor de transcripción NF- κ B en DCs (172). En este sentido, varios estudios han reportado la represión de los blancos transcripcionales de NF- κ B mediante una asociación física directa entre GR y NF- κ B en el núcleo (173-175). Por otra parte, ha sido propuesto que la inhibición de la actividad de NF- κ B por GCs se debe a un aumento en la síntesis de I κ Bs, los cuales secuestran NF- κ B en una forma inactiva localizada en citoplasma (176). Por lo tanto, la inhibición de los efectos de T3 sobre DCs mediada por Dex podría ser llevada a cabo, al menos en parte, a través de la inhibición de la señalización de NF- κ B. Además, la reducción de la expresión de TR β 1 puede ser explicada por la presencia de un sitio consenso funcional para NF- κ B, situado entre las bases 644 y 652 “río arriba” del punto de inicio de la transcripción del gen, sitio recientemente reportado por nuestro grupo (102). Así, la inhibición de la vía NF- κ B producida por Dex, tanto a nivel citoplasmático como nuclear, podría conducir a la reducción de la expresión de TR β 1 dependiente de NF- κ B. En este aspecto, otros receptores nucleares parecen estar regulados por NF- κ B, incluyendo al receptor de andrógenos, al

cual NF- κ B se une específicamente entre las bases 574 y 565 de la región promotora y media la represión de su actividad transcripcional (177).

En conclusión, los resultados aquí presentados refuerzan la dinámica interrelación existente entre los GCs y las HTs, sus mecanismos de acción y su regulación tejido-específica, destacando un nuevo mecanismo molecular involucrado en la actividad antiinflamatoria e inmunosupresora de los GCs. En particular, nuestros datos revelan un efecto inhibitorio de los GCs en la maduración y capacidad inmunoestimuladora de DCs inducidas por T3, a través de mecanismos que implican, al menos en parte, vías de señalización dependientes de NF- κ B y TR β 1. Debido a que estos resultados se obtuvieron en presencia de concentraciones fisiológicas de T3, estos hallazgos son relevantes dado el rol fundamental de las HTs en el inicio de las respuestas inmunes, el uso generalizado de terapias basadas en GCs y la prevalencia de patologías hipotiroideas.

Los resultados de esta primera parte de la Tesis Doctoral fueron publicados en el año 2012 con otros realizados en colaboración de la Dra. María del Mar Montesinos, por lo que ambas autoras deben considerarse como primeras autoras, tal como se consigna en la publicación a la que se hace referencia (178).

V. RESULTADOS 2

V.1.a Efecto de células dendríticas estimuladas con T3 sobre el balance de células T regulatorias y células T efectoras Th17.

V.1.a.1 T3 estimula la producción de TNF- α , IL-6 e IL-23 en DCs.

Previamente en el laboratorio donde se realizó esta Tesis Doctoral, fue demostrado que niveles fisiológicos de T3 estimulan la maduración y la producción de IL-12 en DCs derivadas de médula ósea de ratón, direccionando la respuesta inmune hacia un perfil Th1 (101). Con el fin de evaluar un perfil de citoquinas pro-inflamatorias más amplio generado por la acción de T3 sobre las DCs, se utilizó un esquema experimental como el citado en la sección 1, brevemente iDCs derivadas de médula ósea de ratón se cultivaron con T3 (5 nM) o LPS (100 ng/ml, control) por 18 horas. Posteriormente se midió la producción de TNF- α , IL-6 e IL-23 en los sobrenadantes de cultivo por ensayos de ELISA. Como se observa en la **Figura 17**, T3 fue capaz de incrementar significativamente los niveles de producción de dichas citoquinas proinflamatorias en las DCs, las cuales son fundamentales para el direccionamiento hacia una respuesta inmune efectora.

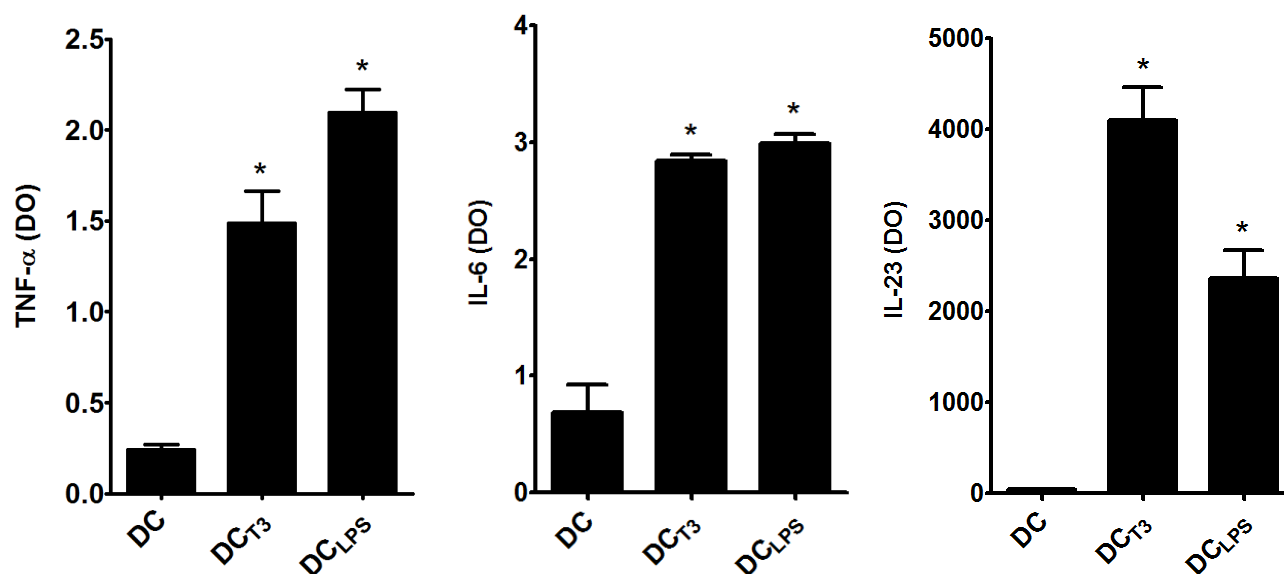
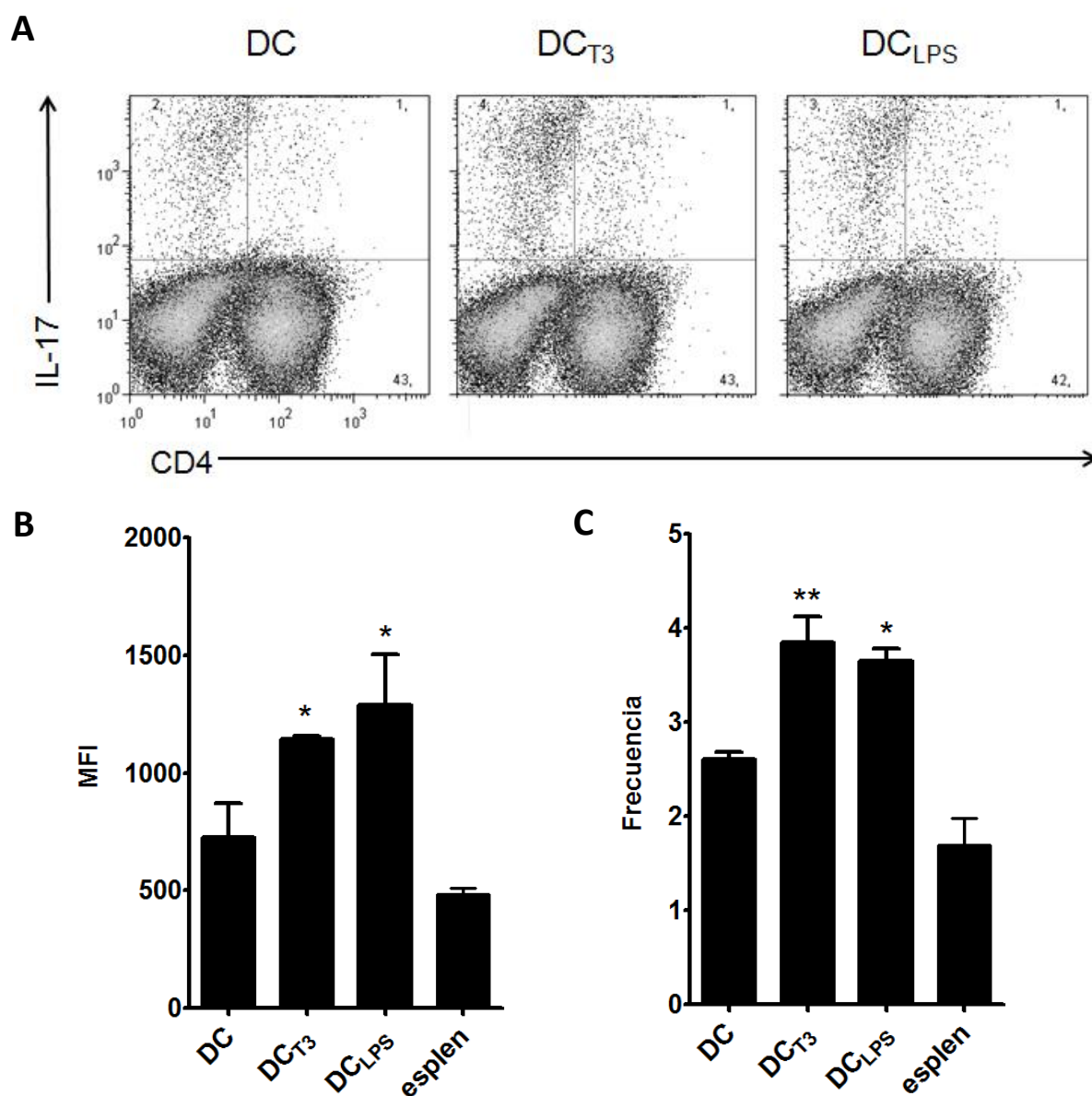


Figura 17: Perfil de citoquinas pro-inflamatorias en DCs estimuladas con T3. iDCs derivadas de médula ósea de ratón (DC) fueron maduras con T3 (5 nM, DC_{T3}) o LPS (100 ng/ml, DC_{LPS}, control positivo) durante 18 h. La producción de TNF- α , IL-6 e IL-23 fue determinada en sobrenadantes de cultivo mediante ensayos de ELISA. Los datos se expresan como media \pm DE (densidad óptica, DO) y son de un experimento representativo de un total de tres con resultados similares, * $p < 0.001$ vs DC control.

V.1.a.2 DCs estimuladas con T3 inducen la secreción de IL-17 en esplenocitos alogénicos.

Teniendo en cuenta que T3 tuvo la capacidad de aumentar la producción y secreción de citoquinas pro-inflamatorias, como lo son TNF- α , IL-6 e IL-23, en DCs (**Figura 17**) y conociendo que estas moléculas secretadas por las DCs son cruciales en el direccionamiento de la respuesta inmune efectora, se realizó un cultivo alogénico. El mismo consistió en enfrentar DCs (C57BL/6) irradiadas estimuladas con T3 con esplenocitos alogénicos (BALB/c). Con el objetivo de evaluar la capacidad de las DCs estimuladas con T3 de generar una respuesta inmune efectora, se evaluó la secreción de IL-17 en dichos esplenocitos mediante ensayos de citometría de flujo y ELISA. Como

se observa en las **Figuras 18A-C**, se registró un aumento significativo de la producción de IL-17 a nivel intracelular en los esplenocitos estimulados con DCs maduras con T3, indicado tanto por el incremento de la Intensidad de fluorescencia media (MFI, **Figura 18B**), como por el porcentaje de células que la expresan (frecuencia, **Figura 18C**). Estos resultados fueron confirmados también por la cuantificación de dicha citoquina en sobrenadantes de cultivo por un ensayo de ELISA (**Figura 18D**). Este incremento en la producción de IL-17 se observó principalmente en las células CD4⁺ (**Figura 18A**).



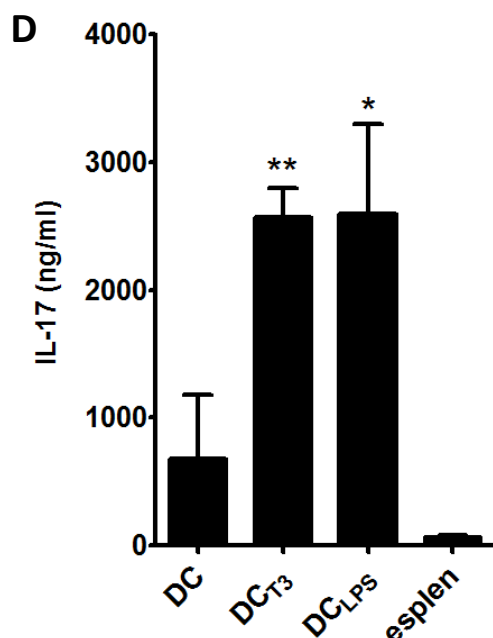
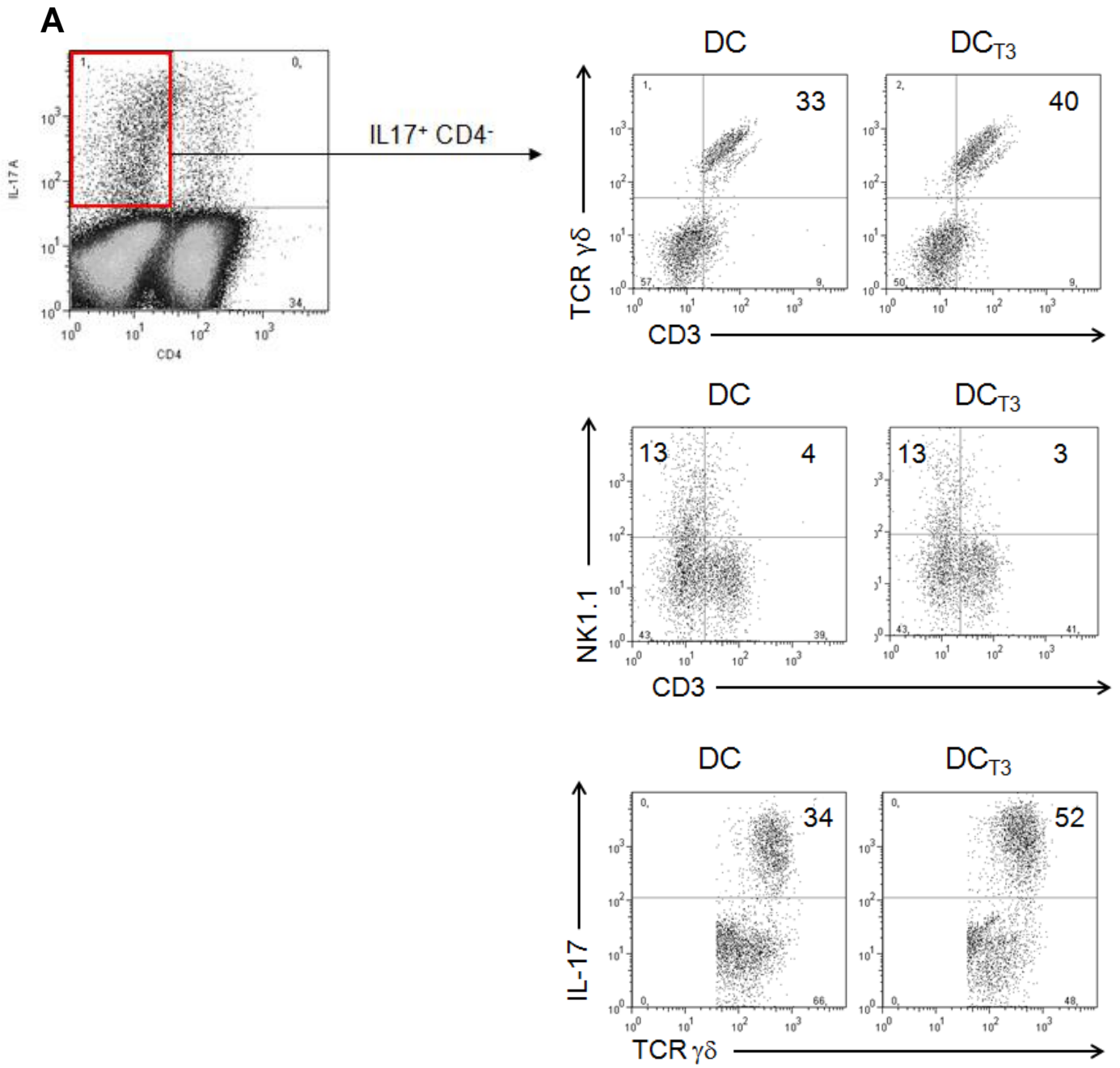


Figura 18: Efecto de DCs estimuladas con T3 en la producción de IL-17 por esplenocitos allogénicos. iDCs derivadas de médula ósea de ratón (DC) fueron estimuladas con T3 (5 nM, DC_{T3}) o LPS (100 ng/ml, DC_{LPS}, control positivo). Después de 18 h, las DCs fueron lavadas exhaustivamente, irradiadas y cultivadas con esplenocitos (esplen) allogénicos durante 3 días en una relación 1:15 células estimuladoras/respondedoras (DC/esplenocitos). La producción de IL-17 se midió intracelularmente por citometría de flujo (**A-C**) y en los sobrenadantes de cultivo mediante ensayos de ELISA (**D**). Para la tinción intracitoplásmica de IL-17, las células se incubaron con brefeldina A durante 4 h, se marcaron para CD4, fijaron, permeabilizaron y después se las marcó con Ac anti-IL-17. La intensidad de fluorescencia media (MFI) y frecuencia de células IL-17⁺ se determinaron por citometría de flujo. (**A**) Figuras representativas del análisis de citometría de flujo de IL-17 intracitoplásmica. (**B,C**) Análisis comparativo de MFI y frecuencia (porcentaje de células productoras de IL-17). Los datos se expresan como media \pm DE y son de un experimento representativo de un total de tres con resultados similares, * $p < 0.01$, * $p < 0.001$ vs DC control. (**D**) La producción de IL-17 se determinó en sobrenadantes de cultivo mediante ensayos de ELISA. Los datos se expresan como media \pm DE (ng/ml) y son de un experimento representativo de un total de tres con resultados similares, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs DC control.

V.1.a.3 Los linfocitos T $\gamma\delta$ son los principales responsables del aumento de producción de IL-17 inducido por DCs maduras con T3.

Como ya fuese mencionado, es ampliamente conocido que la IL-17 es producida por linfocitos T $CD4^+$ (Th17), pero hay evidencia que células del sistema inmune innato como NK, NKT y linfocitos T $\gamma\delta$ también son capaces de secretarla. Para investigar qué tipos celulares son los responsables del incremento de IL-17 inducido por DCs estimuladas con T3, se determinaron las distintas poblaciones celulares productoras de esta citoquina con marcadores específicos de superficie y mediante citometría de flujo. Los resultados obtenidos mostraron que DCs maduras con T3 produjeron un aumento del número de linfocitos T $\gamma\delta$ que expresan IL-17 (células $CD3^+$, TCR $\gamma\delta^+$, IL-17 $^+$), pero no tuvieron ningún efecto en las poblaciones celulares NK (células NK 1.1 $^+$, $CD3^-$) y NKT (células NK 1.1 $^+$, $CD3^+$) (**Figura 19A y B**). Por su parte y aunque el porcentaje de células Th17 ($CD4^+$, IL-17 $^+$) no se vio aumentado, se observó un incremento significativo en la cantidad de la citoquina producida por dichas células, evidenciado por la MFI (**Figura 19C**).



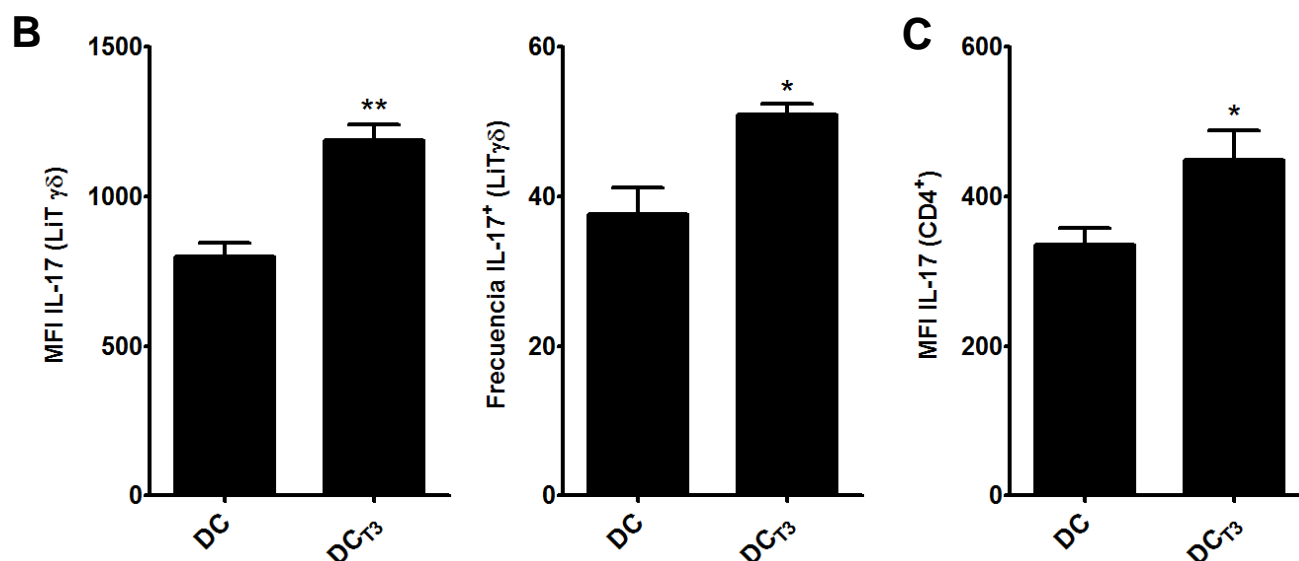


Figura 19: Caracterización de las poblaciones celulares productoras de IL-17 en esplenocitos allogénicos enfrentados a DCs estimuladas con T3. iDCs derivadas de médula ósea de ratón (DC) fueron estimuladas con T3 (5 nM, DC_{T3}). Después de 18 h, las DCs fueron lavadas exhaustivamente, irradiadas y cultivadas con esplenocitos allogénicos durante 3 días en una relación 1:15 células estimuladoras/respondedoras (DC/esplenocitos). La caracterización de las poblaciones celulares productoras de IL-17 se realizó por un ensayo de citometría de flujo. Para ello, las células se incubaron con brefeldina A durante 4 h, se marcaron con los Acs correspondientes, linfocitos T $\gamma\delta$ (TCR $\gamma\delta^+$, CD3⁺), células NK (NK1.1⁺, CD3⁺), células NKT (NK1.1⁺, CD3⁺) y linfocitos T CD4 (CD4⁺). Luego se fijaron, permeabilizaron y marcaron con Ac anti-IL-17. **(A)** Figuras representativas del análisis de células T CD4⁺ productoras de IL-17. **(B)** Intensidad de fluorescencia media (MFI) y frecuencia de linfocitos T $\gamma\delta$ IL-17⁺ determinadas por citometría de flujo. **(C)** Intensidad de fluorescencia media de linfocitos T CD4⁺ IL17⁺ (Th17). Los datos se expresan como media \pm DE y son de un experimento representativo de un total de tres con resultados similares, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs DC control.

V.1.a.4 DCs maduras con T3 disminuyen el porcentaje de linfocitos T regulatorios (Treg).

Considerando que las células Treg son claves en la modulación del sistema inmune, y a los fines de profundizar el estudio del perfil de respuesta inmune inducido por DCs estimuladas con T3, se evaluó la capacidad de la HT de generar DCs con habilidad para estimular la producción de células Treg. Esta población fue evaluada en experimentos realizados con un esquema experimental como

el determinado precedentemente (2.a.3), a través de sus marcadores específicos de linaje ($CD4^+$, $CD25^+$, $FoxP3^+$), observándose una reducción significativa en el número de dichas células cuando fueron enfrentadas a DCs estimuladas con T3 (**Figura 20**).

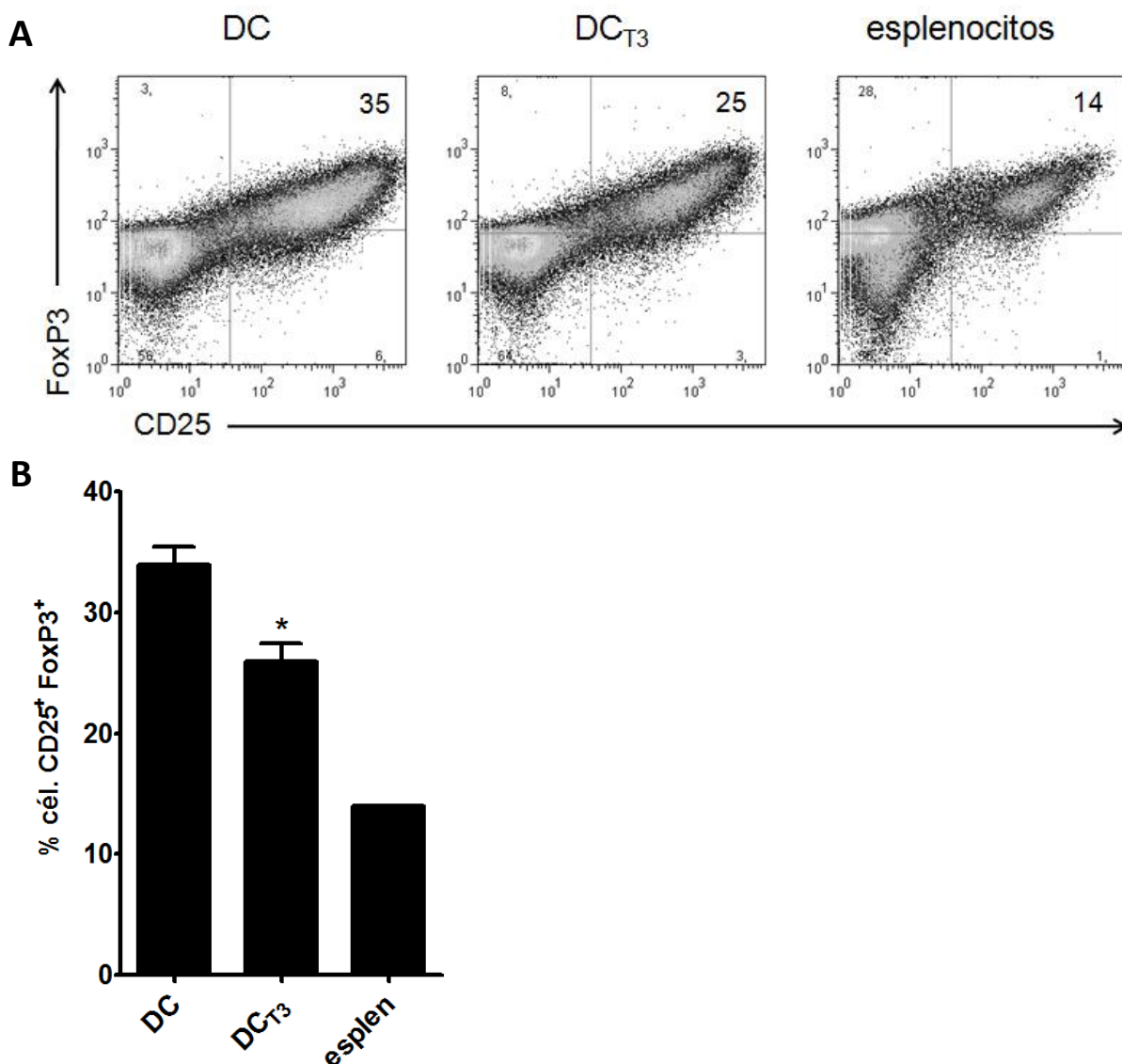


Figura 20: Análisis de linfocitos Treg en esplenocitos (esplen) alogénicos enfrentados a DCs maduras con T3. iDCs derivadas de médula ósea de ratón (DC) fueron estimuladas con T3 (5 nM, DC_{T3}). Después de 18 h, las DCs fueron lavadas exhaustivamente, irradiadas y cultivadas con esplenocitos alogénicos durante 3 días siguiendo el diseño experimental de la Figura 19. La caracterización de la población de linfocitos Treg ($CD4^+$, $CD25^+$, $FoxP3^+$) se realizó por un ensayo de citometría de flujo. Para ello, las células se marcaron con los Acs anti-CD25 y CD4. Luego se fijaron, permeabilizaron y marcaron con Ac anti-FoxP3. **(A)** Figuras representativas del análisis de células T $CD4^+$, $CD25^+$, $FoxP3^+$. **(B)** Porcentaje de células $CD25^+$, $FoxP3^+$ del total de células $CD4^+$. Los datos se expresan como media \pm DE y son de un experimento representativo de un total de tres con resultados similares, * $p < 0.05$ vs DC control.

V.1.b Capacidad de células dendríticas maduras con T3 de estimular una respuesta inmune antitumoral *in vivo*.

V.1.b.1 T3 aumenta significativamente la habilidad de las DCs de estimular una respuesta citotóxica antígeno-específica *in vivo*.

Como ya fue mencionado, los antecedentes del grupo de trabajo donde se realizó esta Tesis Doctoral demostraron que T3 estimula la maduración de las DCs y la producción de IL-12, direccionando la respuesta inmune hacia un perfil Th1, con aumento de la producción de IFN- γ tanto en linfocitos T CD4⁺ como CD8⁺ (101). En este sentido, el IFN- γ estimula reacciones proinflamatorias (179, 180) y también induce la sobreexpresión de moléculas de MHC I (181) y MHC II (179), promoviendo de esa forma la presentación de antígenos a los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos. Es por esto que nos planteamos evaluar la capacidad de DCs estimuladas con T3 de modular la citotoxicidad antígeno específica *in vivo*. Para este propósito se realizó el “Ensayo de Citotoxicidad *in vivo*” de acuerdo a Calbo y col. (128). Brevemente, ratones fueron inmunizados de manera endovenosa (ev) con DCs incubadas con: 1) medio de cultivo (control), 2) OVA, 3) OVA + LPS ó 4) OVA +T3. En el día 7 posterior a la inmunización, los ratones fueron inyectados ev con una mezcla con igual proporción de esplenocitos singénicos marcados con una baja concentración de CFSE (CFSE^{low}) no pulsados y alta concentración (CFSE^{high}) pulsados con el péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄. Los bazo de los ratones fueron extirpados 24 horas más tarde y las suspensiones celulares fueron analizadas por cuantificación de las células marcadas con CFSE. Mediante el análisis de la abundancia de células esplénicas marcadas con diferentes concentraciones de CFSE (**Figura 20**), se observó que tanto los ratones inmunizados con DC control como con DC+OVA fueron incapaces de montar una respuesta citotóxica específica (similar proporción CFSE^{high}/CFSE^{low}, actividad citolítica

media: 37,95%). En contraste, la inmunización con DCs estimuladas con OVA+T3 generó una respuesta citotóxica anti- OVA que fue capaz de eliminar casi la mayoría de las células pulsadas con el péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄ (actividad citolítica media: 87,41%), de la misma forma que lo hizo el control positivo (LPS, actividad citolítica media: 100,00%) (182). Estos resultados revelaron que DCs maduras con T3 tienen la capacidad para diferenciar *in vivo* a las células T CD8⁺ en efectores citotóxicos.

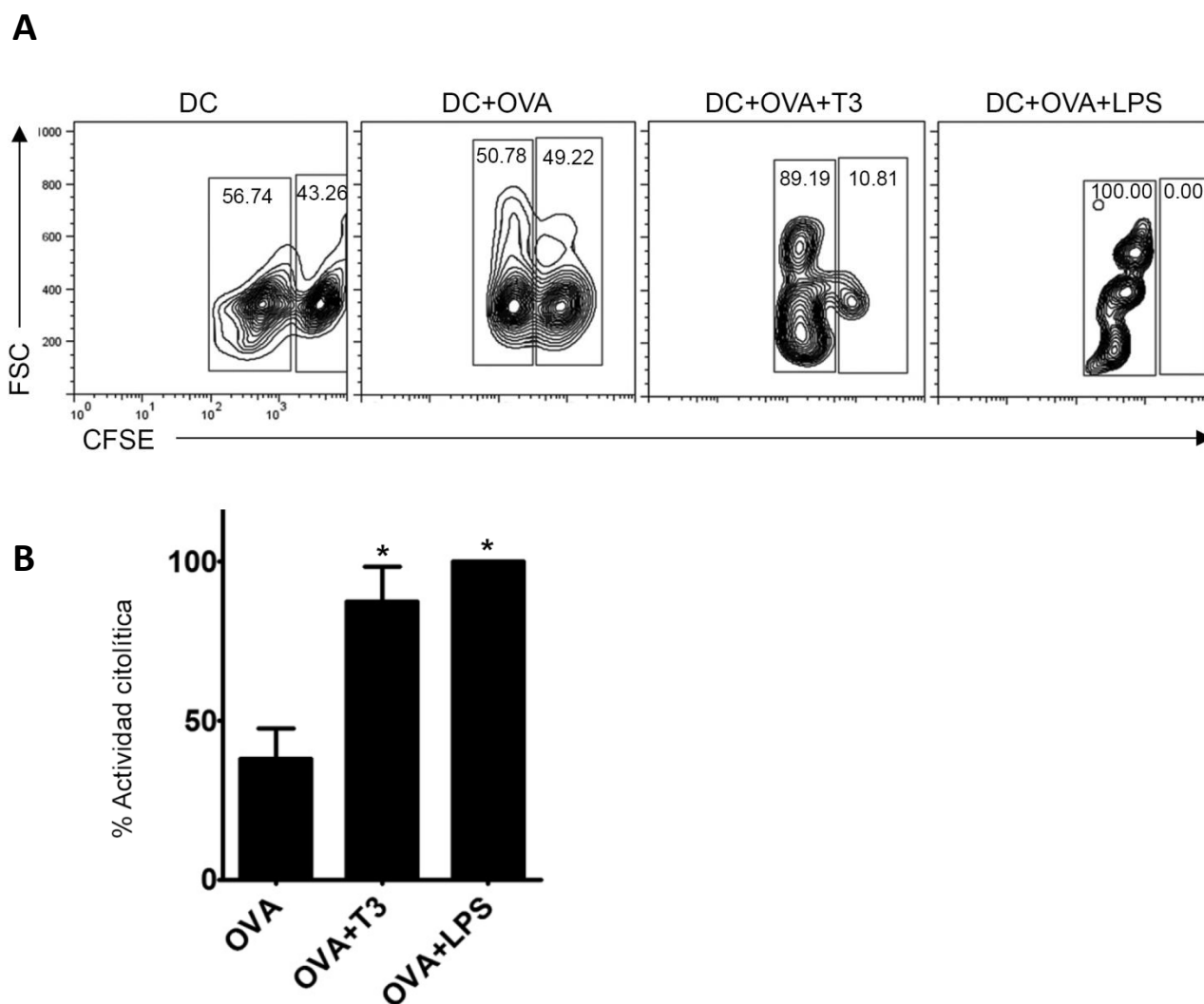


Figura 20: T3 aumentó la capacidad de DCs para estimular una respuesta citotóxica específica de antígeno. iDCs derivadas de médula ósea de ratón (DC) se diferenciaron con GM-CSF durante 8 días. Se

realizó un ensayo de citotoxicidad *in vivo*. Cuatro grupos de ratones fueron inmunizados ev con 5×10^6 DCs incubadas durante 18 h con: 1) medio de cultivo (control), 2) OVA (10 mg/ml), 3) OVA+LPS (100 ng/ml), 4) OVA+T3 (5 nM). Las células de bazo fueron marcadas con CFSE $3 \mu\text{M}$ (células CFSE^{high}) o CFSE $0,5 \mu\text{M}$ (células CFSE^{low}). Las células CFSE^{high} fueron pulsadas con el péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄ (10 g/ml), las células CFSE^{low} no fueron pulsadas y sirven como control interno. En el día 7 posterior a la inmunización, los ratones fueron inyectados ev con una mezcla de 3×10^6 células CFSE^{low} no pulsadas y 3×10^6 células CFSE^{high} pulsadas con el péptido. A las 24 h, los bazos fueron extirpados y las suspensiones de células obtenidas se analizaron para la cuantificación de células marcadas con CFSE por citometría de flujo. **(A)** Los gráficos de densidad representan el porcentaje de células CFSE^{low} (izquierda) y CFSE^{high} (derecha). El número en cada cuadrante indica el porcentaje de células CFSE^{low} y CFSE^{high}. **(B)** La actividad citolítica se determinó mediante el cálculo del porcentaje de lisis específica de las células CFSE^{high} pulsadas con péptido obtenida mediante la fórmula: $100 - ((\% \text{ de células CFSE}^{\text{high}} / \% \text{ de células CFSE}^{\text{low}} \text{ en ratones inmunizados}) / (\% \text{ de células CFSE}^{\text{high}} / \% \text{ de células CFSE}^{\text{low}} \text{ en ratones control}) \times 100)$. Los datos se expresan como media \pm DE y son de un experimento representativo de un total de tres, con resultados similares, * $p < 0.001$ vs DC+OVA.

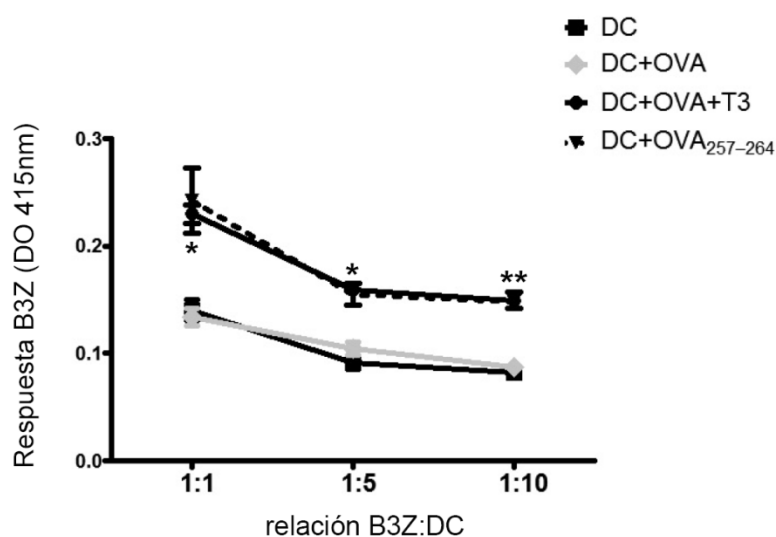
V.1.b.2 T3 aumenta la capacidad de DCs de inducir la Presentación Cruzada de antígenos *in vitro*, a través de la vía citosólica.

Como ya fuese mencionado, los antígenos capturados del microambiente por las CPA generalmente son presentados en las moléculas de MHC II (55). Por lo tanto, la generación de linfocitos T citotóxicos contra antígenos exógenos requiere de la presentación de los mismos por las moléculas del MHC I, lo que se denomina: “Presentación Cruzada de antígenos” (58). Considerando lo observado previamente (**Figura 20**), DCs estimuladas con T3 tuvieron la capacidad de generar linfocitos T citotóxicos para un antígeno exógeno (OVA), por lo cual nos planteamos evaluar si T3 tiene la capacidad de inducir presentación cruzada de antígenos en las DCs. Para ello y de acuerdo a lo descrito por Joffre y col. (58) (y detallado en Materiales y Métodos), DCs se incubaron con 1) medio de cultivo (control), 2) OVA, 3) OVA₂₅₇₋₂₆₄ ó 4) OVA+T3, durante 4 h. Posteriormente, las DCs se co-incubaron con el hibridoma de células T B3Z en diferentes proporciones B3Z/DC. Finalmente, la capacidad de las DCs de realizar la presentación cruzada de antígenos se determinó por la actividad de la enzima LacZ. Como se muestra en la **Figura 21A**, las

DCs estimuladas con OVA+T3 aumentaron significativamente la actividad LacZ en comparación con DCs no estimuladas o estimuladas con OVA, en todas las relaciones B3Z/DC analizadas. Este efecto de T3 fue comparable al inducido por el control positivo OVA₂₅₇₋₂₆₄, lo que revela el aumento de la inducción del proceso de presentación cruzada de antígenos en las DCs tratadas con T3.

Por otra parte, para conocer la vía intracelular de presentación cruzada inducida, se realizó el ensayo de presentación cruzada descrito anteriormente, en presencia del inhibidor de proteasoma MG-132. Como es evidenciado en la **Figura 21B**, MG-132 fue capaz de inhibir completamente la presentación cruzada de antígeno inducida por T3. Estos experimentos demuestran que la presentación cruzada producida por T3 en DCs sería proteasoma-dependiente, es decir, a través de la vía citosólica.

A



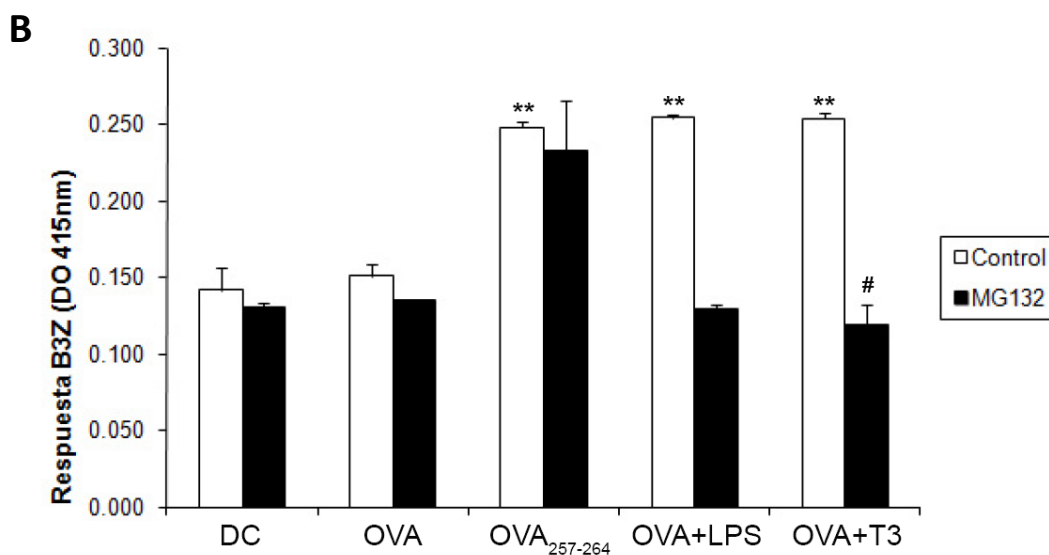
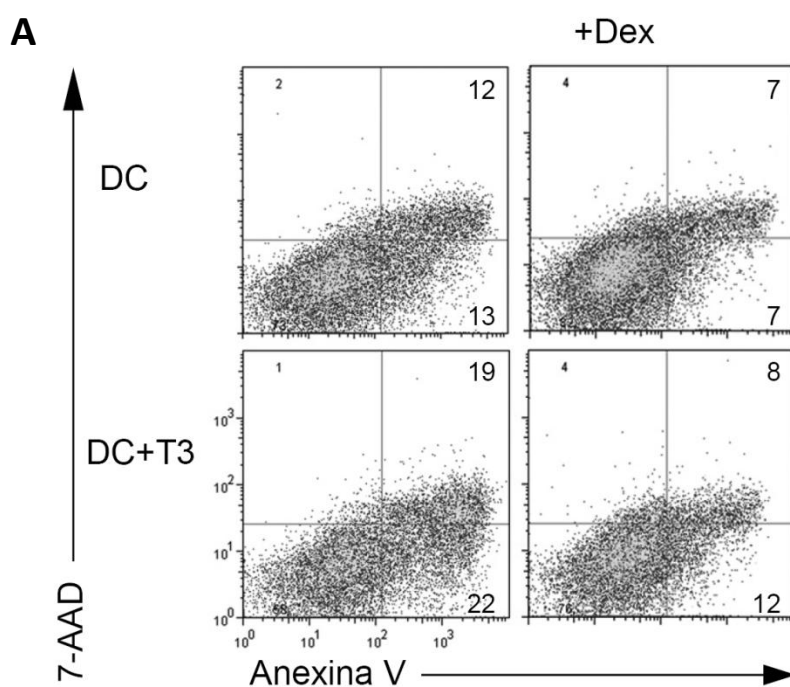


Figura 21: DCs maduras con T3 indujeron la presentación cruzada de antígenos por la vía citosólica. iDCs derivadas de médula ósea de ratón (DC) se diferenciaron con GM-CSF durante 8 días. Se realizó un ensayo de “presentación cruzada de antígenos”. **(A)** DCs se incubaron durante 4 h con 1) medio de cultivo (control), 2) OVA (10 mg/ml), 3) OVA₂₅₇₋₂₆₄ (10 g/ml) ó 4) OVA+T3 (5 nM). A continuación, las DCs se co-incubaron durante toda la noche con el hibridoma de células T, B3Z en diferentes proporciones B3Z/DC. Después de la co-incubación, la cantidad de enzima LacZ se cuantificó por hidrólisis de su sustrato ONPG, midiendo la DO a 415 nm. **(B)** Se realizó el ensayo de presentación cruzada en presencia del inhibidor de proteasoma MG-132 (3μM). DCs se incubaron durante 4 h con 1) medio de cultivo (control), 2) OVA (10 mg/ml), 3) OVA₂₅₇₋₂₆₄ (10 g/ml), OVA+LPS (10ng/ml) ó 4) OVA+T3 (5 nM). Posteriormente se incubaron con células del hibridoma B3Z en una relación B3Z/DC: 1/5. Los datos se expresan como media ± DE y son de un experimento representativo de un total de tres, con resultados similares, *p<0.01, **p<0.001 vs DC+OVA; #p<0.001 vs DC+OVA+T3.

V.1.b.3 T3 disminuye los niveles de muerte celular en las DCs.

La apoptosis de las DCs es un evento de suma importancia en la regulación del equilibrio entre la tolerancia y la inmunidad, y ha sido registrada en muchos tipos de cánceres, tanto sólidos como sanguíneos (183-185). Este proceso genera microambientes inmunosupresivos, ya que se promueve la generación de células Treg y el deterioro funcional de las DCs (186). Por lo tanto, se propuso determinar el efecto de T3 en la supervivencia de las DCs. Para ello, se evaluó la muerte

celular por procesos de apoptosis y necrosis en DCs control, tratadas con Dexametasona (Dex, estímulo pro-apoptótico (140)) en presencia o ausencia de T3. Como se observa en las **Figuras 22A y B**, T3 fue capaz de disminuir el número de células apoptóticas (Anexina V⁺/7AAD⁻) y necróticas (Annexin V⁺/7AAD⁺) con respecto al control. Además, T3 contrarrestó el conocido efecto pro-apoptótico de Dex en DCs. Considerando que Bcl 2 juega un rol crítico en la regulación de la apoptosis de diferentes tipos celulares (187), también evaluamos sus niveles en DCs maduras con T3. Luego de 30 minutos de estimulación con T3, la expresión proteica de Bcl 2 aumentó significativamente (**Figura 22C**), persistiendo incluso hasta las 18 h. De acuerdo con los resultados anteriores, la regulación positiva de Bcl-2 inducida por T3 se correlacionaría con el incremento en la supervivencia de las DCs (**Figuras 22A, B**) (187). En conjunto, estos resultados indican que las DCs estimuladas con T3 muestran mayor supervivencia y resistencia a la apoptosis, eventos que favorecen la “vida útil” de la DC.



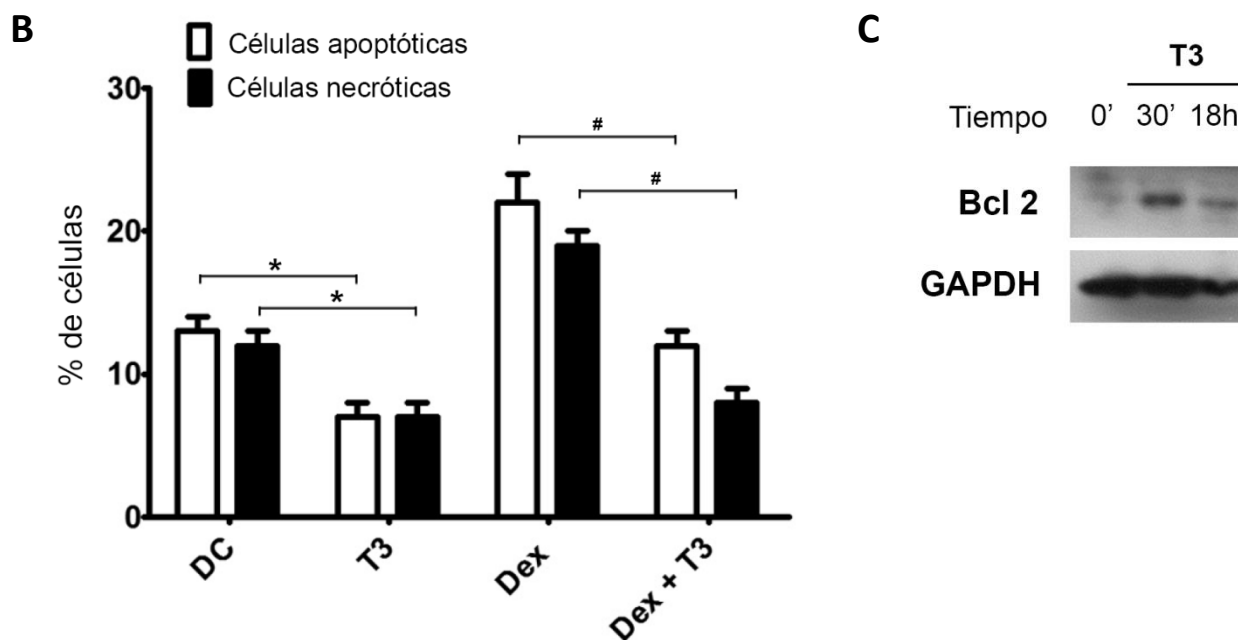


Figura 22: T3 disminuye los niveles de muerte celular en DCs. iDCs derivadas de médula ósea de ratón (DC) fueron estimuladas por 18 h con dexametasona (Dex, 10^{-6} M) en presencia o ausencia de T3 (5 nM). **(A,B)** Determinación de muerte celular en DCs. Luego del tratamiento, se analizaron los niveles de muerte celular a través de un ensayo de citometría de flujo utilizando Acs anti-CD11c, anexina V y aminoactinomicina D (7-AAD), tal como se describe en “Materiales y Métodos”. Se seleccionaron las células CD11c⁺ y se analizaron para anexina V y 7-AAD. **(A)** Los números representan el porcentaje de células en cada cuadrante. Las células en fases tempranas de apoptosis son anexina V⁺/7-AAD⁻ y las células en fases tardías de apoptosis y células necróticas son anexina V⁺/7AAD⁺. **(B)** Los valores se expresan como el porcentaje de células apoptóticas y necróticas del total de células CD11c⁺. Los datos se expresan como media \pm DE y son de un experimento representativo de un total de tres, con resultados similares, * $p < 0.001$ vs DC control apoptóticas y necróticas respectivamente, # $p < 0.001$ vs DC+Dex apoptóticas y necróticas respectivamente. **(C)** Análisis de expresión de Bcl 2: después de diferentes períodos de tiempo de tratamiento con T3, se recogieron las células, se prepararon lisados y se analizaron por Western Blot para determinación de Bcl 2. Western blot representativo mostrando expresión de Bcl 2. La evaluación de GAPDH (panel inferior) se utilizó como control de carga. Experimento representativo de un total de tres, con resultados similares.

V.1.b.4 T3 aumenta la capacidad migratoria de DCs a nódulos linfáticos.

Para inducir una respuesta inmune adaptativa determinada, las DCs tienen que madurar y migrar a los nódulos linfáticos, en donde son capaces de contactar y activar a los linfocitos T (188). Por lo tanto, nos propusimos evaluar la capacidad de T3 de inducir la migración de DCs a los nódulos linfáticos. DCs control y estimuladas con T3 fueron marcadas con CFSE e inyectadas subcutáneamente (sc) en ratones “naive”. A las 24 h, se extirparon los ganglios linfáticos drenantes del sitio de inyección y se disgregaron mecánicamente. La capacidad migratoria de las DCs se evaluó midiendo la cantidad de DCs marcadas con CFSE (células CD11c⁺/CFSE⁺) en los ganglios linfáticos por citometría de flujo. Aunque el porcentaje de las células doble positivas en los ganglios linfáticos drenantes fue baja, se obtuvo un porcentaje significativamente mayor cuando las DCs inyectadas fueron maduras con T3 (**Figuras 23A y B**).

La migración de las DCs en los tejidos depende de una cascada de eventos discretos, incluyendo la producción de quimioquinas y la regulación de sus receptores (189). En este sentido, los receptores de quimioquinas (CCR) son importantes para la regulación de la localización de las DCs y su “homing”. Teniendo en cuenta que CCR7 (receptor para quimioquinas 19 y 21) tiene un papel esencial en la migración de las DCs de los tejidos a los ganglios linfáticos (190), hipotetizamos que el tratamiento con T3 regularía positivamente la expresión de CCR7, lo que a su vez aumentaría la capacidad migratoria de las mismas. Como se muestra en las **Figuras 23C-E**, T3 indujo un aumento altamente significativo en la expresión de CCR7, tanto a nivel de ARNm (qRT-PCR, **Figura 23C**), como a nivel proteico (citometría de flujo, **Figuras 23D, E**), de la misma manera que lo hizo el control positivo (LPS, (191)).

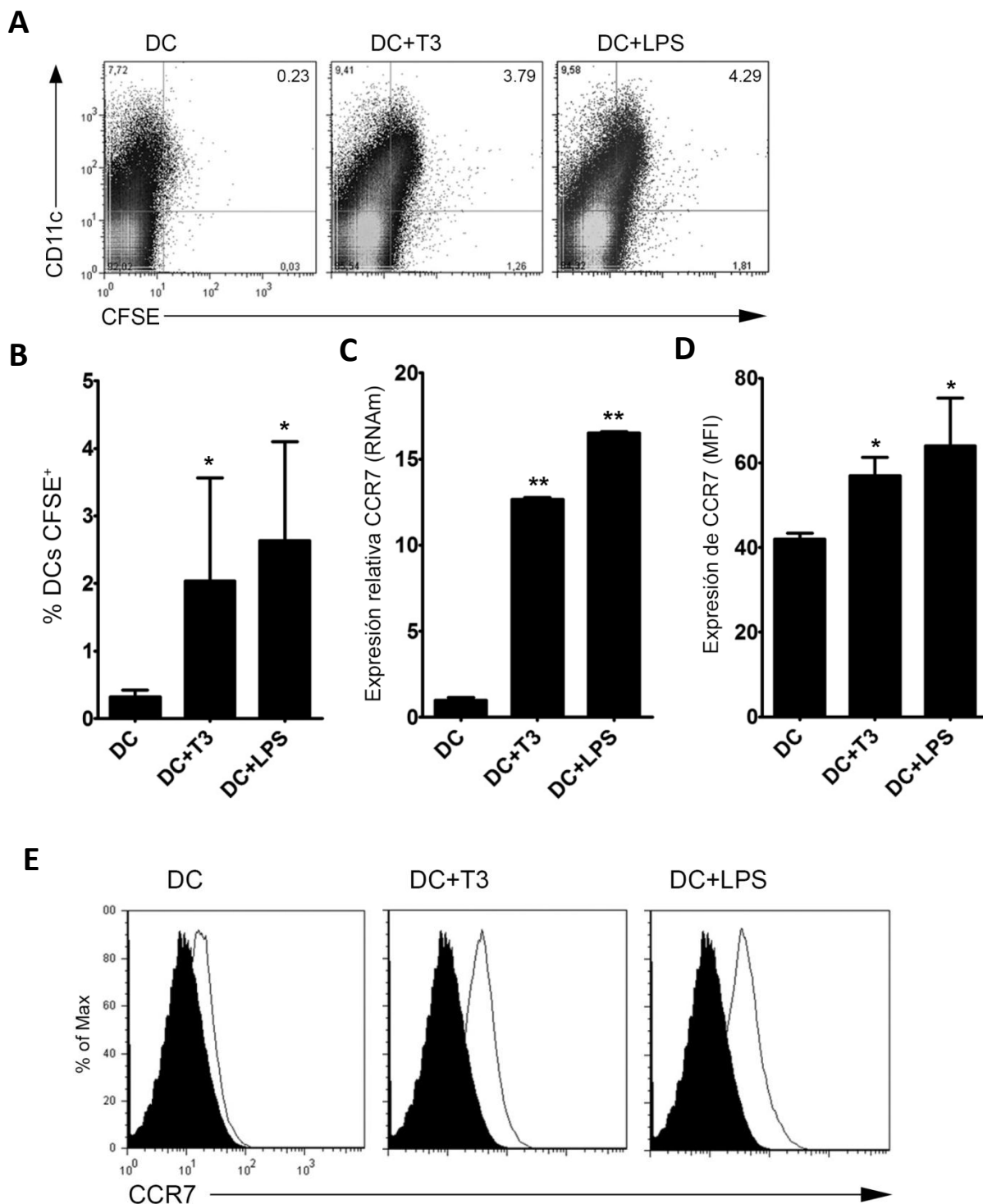


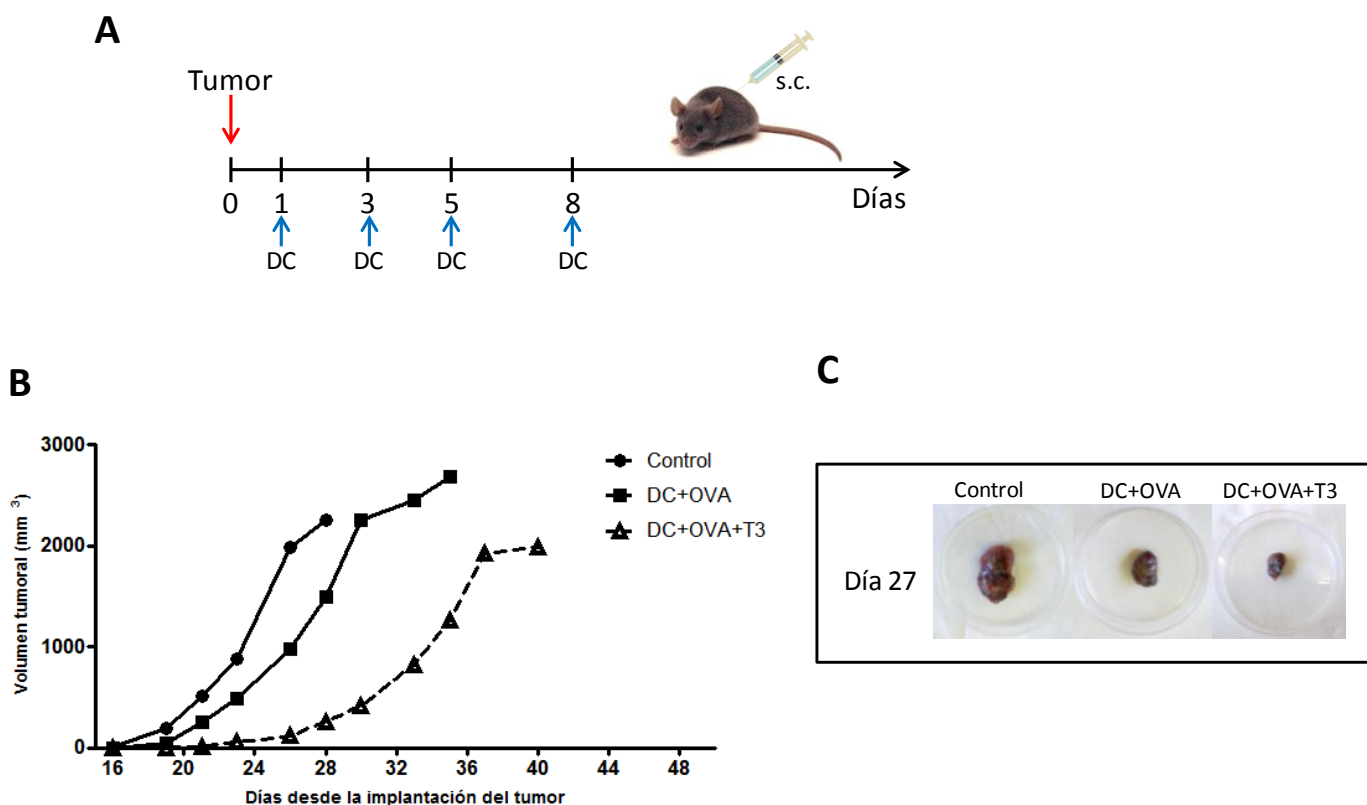
Figura 23: T3 aumenta la capacidad migratoria de DCs a los ganglios linfáticos. iDCs derivadas de médula ósea de ratón (DC) fueron estimuladas por 18 h con T3 (5 nM) o LPS (10 ng/ml). **(A, B)** Ensayo de migración de DCs *in vivo*. DC control y estimuladas con T3 o LPS se marcaron con CFSE (5 μ M) y fueron inyectadas sc en ratones. 24 h más tarde, se extirparon los ganglios linfáticos y por disgregación mecánica se obtuvieron suspensiones celulares, las cuales se analizaron por citometría de flujo para la cuantificación de DCs (CD11c⁺) marcadas con CFSE. **(A)** Los números representan el porcentaje de células en cada cuadrante. **(B)**

Los valores se expresan como el porcentaje de células CD11c⁺/CFSE⁺ del total de células en los ganglios linfáticos. **(C, D, E)** Expresión de CCR7. **(C)** Después del tratamiento, se aisló ARN y se evaluó la expresión génica de CCR7 mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). Los resultados se indican como veces de cambio en los niveles de expresión respecto a los obtenidos en células sin tratamiento (DC), considerada arbitrariamente como 1. **(D, E)** La expresión de CCR7 se analizó por un ensayo de citometría de flujo utilizando Ac anti-CCR7. **(D)** Histogramas representativos de tres experimentos independientes, fueron seleccionadas las células CD11c⁺. Los histogramas negros representan la unión no específica, determinada con Acs para control de isotipo; los histogramas blancos representan la expresión de CCR7. **(E)** Los resultados se expresan como intensidad media de fluorescencia (MFI) de CCR7 dentro de la población CD11c⁺. Los datos se expresan como media \pm DE y son de un experimento representativo de un total de tres, con resultados similares, *p<0.05, **p<0.001 vs DC.

V.1.b.5 DCs estimuladas con T3 en presencia de un antígeno tumoral son capaces de inducir una respuesta inmune antitumoral.

Teniendo en cuenta los resultados previos del laboratorio donde se realizó esta Tesis Doctoral (101), y los descriptos anteriormente, que le asignan a T3 la capacidad de generar DCs capaces de mediar una respuesta citotóxica específica, con mayor resistencia a la apoptosis y capacidad migratoria, se planteó explorar si T3 es capaz de mejorar el potencial terapéutico *in vivo* de las vacunas de DCs. Para dicho objetivo, se estableció un modelo de melanoma B16 en ratones C57BL/6 por implantación sc de $2 \cdot 10^4$ células B16-OVA (células B16 transfectadas establemente con la proteína ovalbúmina [OVA]), de acuerdo a Bellone y col. (133). Posteriormente, se administró a los mismos una terapia antitumoral basada en la vacunación con DCs estimuladas con T3 en presencia del antígeno tumoral (OVA) en los días 1, 3, 5 y 8 (**Figura 24A**). Para ello, después de la implantación del tumor, los ratones fueron divididos aleatoriamente en tres grupos, a los cuales se les administró: 1) PBS (Control), 2) DCs enfrentadas a OVA (DC+OVA) y 3) DCs estimuladas con T3 en presencia de OVA (DC+OVA+T3). Como se muestra en la **Figura 24B**, los ratones que recibieron la inmunización con DC+OVA+T3 mostraron un retraso significativo en la aparición del tumor, así

como una disminución en el tamaño del mismo, medido en el día 27 (**Figura 24C**), aunque la tasa de crecimiento tumoral una vez que el tumor fue establecido no presentó diferencias entre los 3 grupos experimentales. A su vez, la administración sc de DCs estimuladas con T3 (DC+OVA+T3) dio como resultado un significativo aumento de la supervivencia, en comparación con los ratones que recibieron DC+OVA (**Figura 24D**). Como se puede observar, a los 40 días después de la inoculación del tumor, un 60% de los ratones inoculados con DC+OVA+T3 sobrevivieron, en comparación con un 20% en el caso de los que recibieron DC+OVA. Por otra parte, todos los ratones tratados con solución salina murieron dentro de los 40 días posteriores a la implantación de células B16-OVA. En consecuencia, también hubo un significativo aumento en el número de ratones libres de tumor cuando los mismos fueron inyectados con DCs pulsadas con T3 (+OVA+T3) en comparación con DC+OVA y los ratones control (**Figura 24E**).



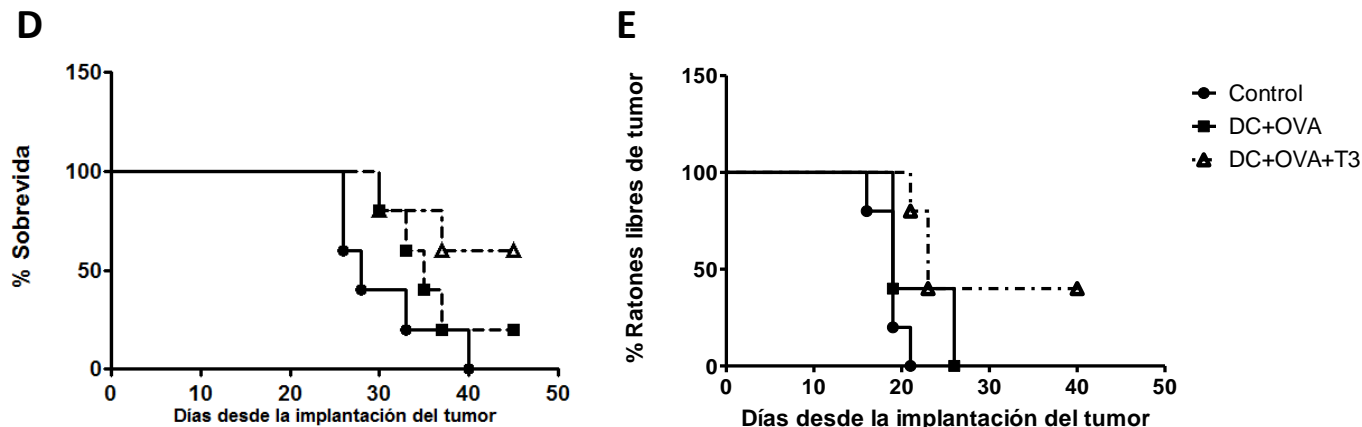


Figura 24: DCs estimuladas con T3 en presencia de un antígeno tumoral fueron capaces de inducir una respuesta inmune antitumoral. (A) Esquema de la terapia antitumoral contra melanoma B16-OVA. iDCs derivadas de médula ósea de ratón (DC) fueron tratadas con OVA (10 mg/ml, DC+OVA), OVA y T3 (5 nM, DC+OVA+T3) durante 18 h. En el día 0, se implantaron sc células B16-OVA en ratones naive. Los ratones portadores de tumor fueron entonces inoculados sc en los días 1, 3, 5 y 8 con DC+OVA, DC+OVA+T3 o PBS (control). **(B, C)** El volumen tumoral se midió utilizando calibres. **(B)** Curva de crecimiento tumoral. **(C)** Fotos de tumores extraídos en el día 27 después de la inyección del tumor. **(D, E)** Curvas de Kaplan-Meier que muestran los porcentajes de supervivencia **(D)** y ratones libres de tumor **(E)** de cada grupo experimental. Los resultados son de un experimento representativo de un total de tres con resultados similares (con un total de 5 ratones por grupo).

V.1.b.6 El tratamiento con DCs estimuladas con T3 induce un incremento del porcentaje de linfocitos T CD8⁺ en el tumor.

Para evaluar la respuesta inmune antitumoral inducida por la vacunación basada en DCs estimuladas con T3, se evaluaron las células T infiltrantes del tumor. Veintisiete días después de la inoculación del tumor, los tejidos tumorales se homogeneizaron, y sometieron a un gradiente de centrifugación para aislar las células mononucleares. Las mismas fueron marcadas para la evaluación de las distintas poblaciones celulares de acuerdo a la expresión de sus marcadores de superficie por citometría de flujo. El análisis posterior reveló que hubo un aumento de la cantidad de células T CD8⁺ intratumorales en los ratones que recibieron DC+OVA+T3 en comparación con DC+OVA (**Figura 25B**). En cambio, no hubo diferencias significativas cuando se compararon las

células T CD4⁺ (**Figura 25B**) y células NK (datos no mostrados) infiltrantes entre los dos grupos experimentales. Estos resultados soportan la idea que DCs estimuladas con T3 inducen la generación de una respuesta citotóxica.

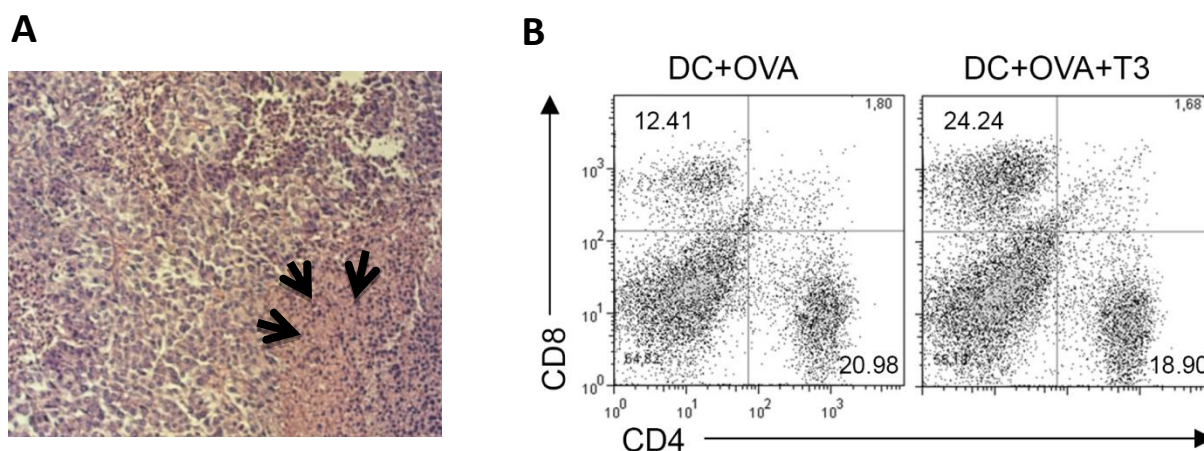
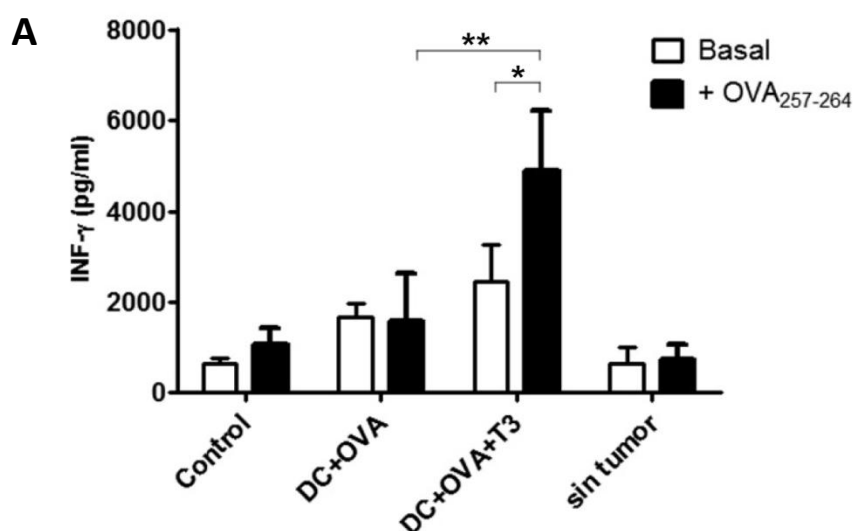


Figura 25: La vacunación con DCs estimuladas con T3 indujo un incremento en los linfocitos T CD8⁺ infiltrantes de tumor. Los animales fueron tratados en los días 1, 3, 5 y 8, como se describe en la Figura 24A. **(A,B)** Los tumores fueron extirpados en el día 27. **(A)** Algunos tumores fueron fijados y procesados para la tinción con hematoxilina-eosina. Las flechas negras indican infiltrados inflamatorios en el parénquima tumoral. **(B)** Por otro lado, se obtuvo una suspensión celular de los tumores extirpados y se sometió a un gradiente de centrifugación en Ficoll-Hypaque. Las células mononucleares se marcaron para la determinación de las poblaciones celulares (CD8⁺ o CD4⁺) por citometría de flujo. Los números representan el porcentaje de células en cada cuadrante.

V.1.b.7 La inoculación de DCs estimuladas con T3 promueve la inducción de una respuesta antígeno-específica, mediada por INF- γ .

Teniendo en cuenta que las DCs estimuladas con T3 en presencia de OVA fueron capaces de inducir un aumento en la sobrevivencia de los ratones afectados por el tumor, una reducción del tamaño tumoral y una mayor infiltración de células T CD8⁺ intratumoral en ratones portadores de tumores B16-OVA, el objetivo fue evaluar si DCs estimuladas con T3 también generan una respuesta inmune sistémica específica para el tumor en estos ratones. Para este propósito, se

extirparon los bazo de los ratones portadores de tumor a los 27 días después de la implantación de las células tumorales. Las células de bazo fueron pulsadas con el antígeno tumoral (OVA₂₅₇₋₂₆₄) y se analizó la producción de IFN- γ en los sobrenadantes de cultivo (**Figura 26A**) e intracelularmente (**Figura 26B**). Como se muestra en la **Figura 26A**, la secreción de IFN- γ por los esplenocitos derivados de ratones inyectados con DC+OVA+T3 fue significativamente mayor en comparación con la de los ratones tratados con DC+OVA (**Figura 26A**, barras blancas). En particular, cuando los esplenocitos de ratones tratados con DCs maduras con T3 fueron re-estimulados con OVA₂₅₇₋₂₆₄ (**Figura 26A**, barras negras), se registró un incremento de 3 veces en la producción de IFN- γ (DC+OVA+T3 vs DC+OVA), lo que indica la generación de una respuesta antígeno-específica antitumoral. Además, la marcación intracelular y posterior análisis de citometría de flujo demostraron que el aumento de la producción de IFN- γ se evidenció principalmente en las células T CD8⁺ (**Figura 26B**). En resumen, estos datos revelan que la inmunoterapia con DCs tratadas *in vitro* con OVA+T3 pueden aumentar la frecuencia de los linfocitos T CD8⁺ secretores de IFN- γ y explica, al menos en parte, la capacidad antitumoral específica de DCs estimuladas con T3.



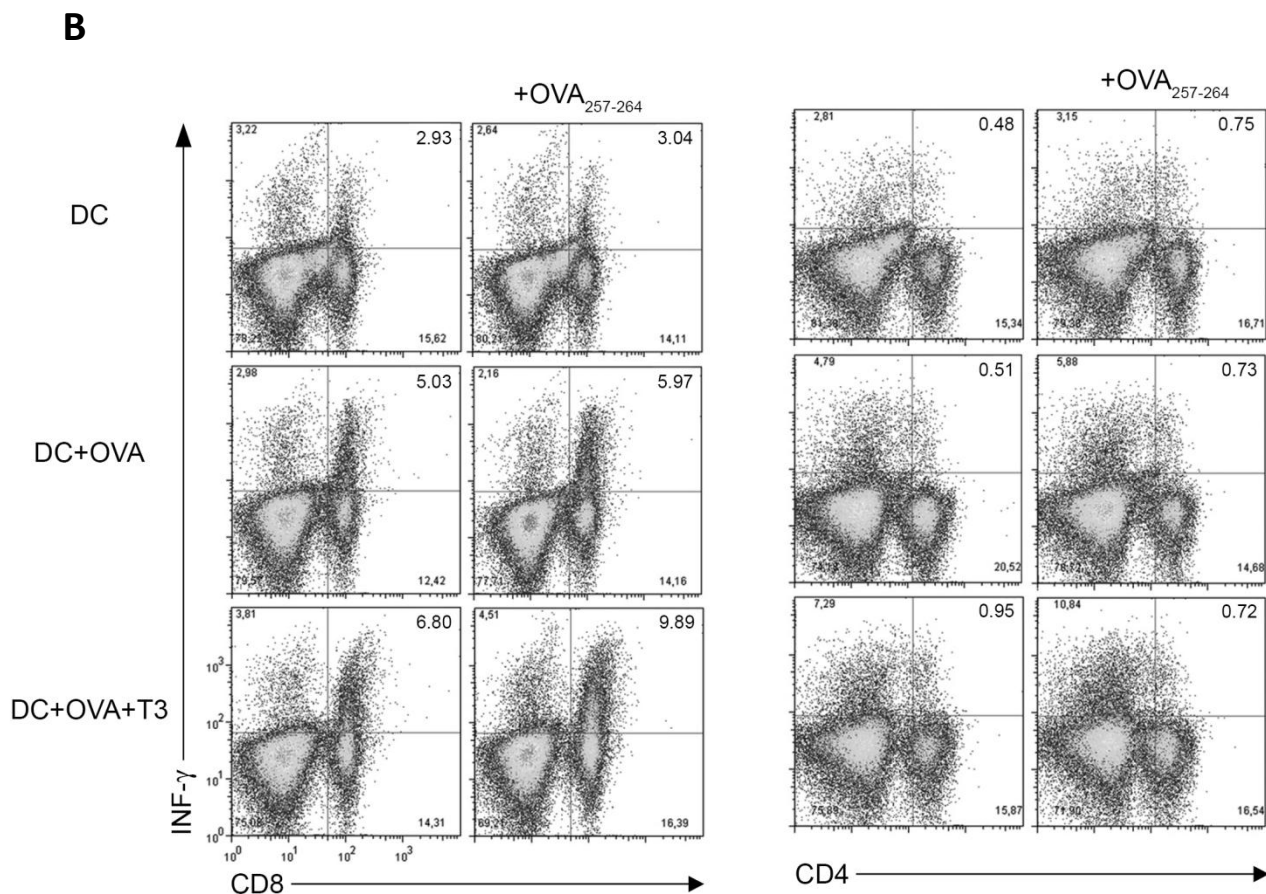


Figura 26: La inmunización con DCs estimuladas con T3 indujo una respuesta específica antitumoral mediada por $\text{INF-}\gamma$. Los animales fueron tratados en los días 1, 3, 5 y 8, como se describe en la figura 24. En el día 27, los ratones portadores de tumor fueron sacrificados y se les extirpó el bazo. Los esplenocitos fueron cultivados y reestimulados o no con el péptido $\text{OVA}_{257-264}$ (10 ng/ml) durante 72 h. **(A)** La producción de $\text{INF-}\gamma$ se determinó en los sobrenadantes de los medios de cultivo por ensayos de ELISA. Los datos se expresan como media \pm DE y son de un experimento representativo de un total de tres, con resultados similares, * $p < 0.001$ vs DC+OVA+T3 basal, ** $p < 0.001$ vs DC+OVA reestimuladas. **(B)** La frecuencia de células CD8^+ y CD4^+ secretoras de $\text{INF-}\gamma$ se determinó mediante la marcación de superficie de las moléculas CD4 y CD8 e $\text{INF-}\gamma$ intracelular. Las células fueron analizadas por citometría de flujo. Los números en cada cuadrante representan porcentaje de células que expresan CD4 o CD8 e $\text{INF-}\gamma$ de los esplenocitos totales. Los resultados son de un experimento representativo de un total de tres, con resultados similares (un total de 5 ratones por grupo).

V.2 DISCUSIÓN 2

Las DCs desempeñan un papel fundamental en la inmunidad, ya que inducen respuestas inmunes adaptativas mediante la adquisición, procesamiento y presentación de antígenos a los linfocitos T. Las señales biológicas que controlan estas células pueden conducir en última instancia la dirección de respuestas inmunes antígeno-específicas (51). En conjunto, los resultados presentados en esta segunda parte del trabajo de Tesis Doctoral destacan el papel clave de T3 a nivel de las DCs tanto *in vitro*, como *in vivo*, demuestran con mayor profundidad los efectos de T3 en la función de las DCs y también su papel como adyuvante en inmunoterapia antitumoral basada en DCs, en un modelo experimental de melanoma B16.

Resultados previos del laboratorio donde se realizó esta Tesis Doctoral demuestran que T3 tiene la capacidad de instruir a la generación de un fenotipo de DCs con una elevada capacidad aloestimuladora de células T y capaz de dirigir el desarrollo de una respuesta de tipo Th1 dominante (101). Estos hallazgos nos llevaron a realizar un análisis más profundo del perfil de citoquinas pro-inflamatorias producidas por DCs estimuladas con T3, su efecto en el balance entre células T efectoras (Th17) y Treg, y a evaluar la capacidad de las mismas para generar una respuesta T citotóxica.

En esta segunda parte del trabajo de Tesis Doctoral se demuestra que T3 aumentó significativamente la producción de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-6, IL-23) en las DCs, estimulando la producción de IL-17 en esplenocitos. En este sentido, es ampliamente conocido que

la IL-17 media la inflamación local de los tejidos por la inducción de la movilización, reclutamiento y activación de los neutrófilos, y desencadena la producción de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas a través de una amplia gama de células blanco, incluyendo células epiteliales, células endoteliales y macrófagos (192). Hasta el momento, la IL-17 se ha visto implicada en la respuesta a patógenos infecciosos y en la autoinmunidad, pero esta citoquina recientemente ha ganado protagonismo en el cáncer (193). El rol de IL-17 en el control del crecimiento tumoral es controvertido, con algunos datos que sugieren un efecto antitumoral (194, 195) y otros que sugieren un papel pro-angiogénico favoreciendo el crecimiento del tumor (196, 197). Aunque la base de estas diferencias no se comprende bien, se ha logrado deducir que IL-17 aumenta la inmunidad antitumoral en ratones inmunocompetentes, pero puede aumentar el crecimiento del tumor en ausencia de una respuesta inmune adaptativa (198). Un estudio revela que las células Th17 protegen contra el cáncer, no sólo mediante la activación de un potente infiltrado inflamatorio intratumoral no antígeno-específico, sino principalmente colaborando, aún en mayor medida que las células Th1, para la eficiente inducción, expansión, diferenciación y migración de las células T CD8⁺ específicas del tumor (195). Teniendo en cuenta lo expresado anteriormente, nuestros hallazgos que demuestran que DCs estimuladas con T3 inducen un aumento significativo de IL-17, tendrían una gran relevancia a nivel fisiológico y patológico, como en el caso del cáncer. Aunque IL-17 es la citoquina característica de las células Th17, también es producida por otras células, como linfocitos T $\gamma\delta$, células NKT, neutrófilos y eosinófilos. En este sentido, este trabajo caracterizó que los principales responsables del aumento de la producción de IL-17, fueron los linfocitos T $\gamma\delta$.

Por otra parte, vasta evidencia demuestra que los linfocitos Treg tienen un activo rol en la tolerancia inmune, son cruciales para la homeostasis inmunológica, en la promoción de la reparación de heridas y en la prevención de las respuestas inmunes contra autoantígenos. Sin embargo, tienen la capacidad de reducir las respuestas inmunes contra patógenos y antígenos tumorales. En este aspecto, se ha observado que hay una prevalencia de células Treg en sangre periférica y en el microambiente tumoral en los pacientes con cáncer. En adición, niveles elevados de estas células son indicadores de la progresión tumoral, metástasis y de un pobre pronóstico (199, 200). Las células Treg asociadas al cáncer suprimen activamente la función de las células inmunes efectoras, tal como NK, CD8⁺ y CD4⁺ (201, 202). Se ha reportado que las fallas en la inmunoterapia pueden ser atribuidas al progresivo aumento de la actividad de las células Treg intratumorales y a la consecuente pérdida de los linfocitos T CD8⁺ específicos de tumor (203). En este aspecto, se ha demostrado que la depleción de células Treg fue suficiente para permitir una respuesta antitumoral y posterior remisión en un modelo de cáncer de mama en ratones (204). Adicionalmente, la combinación de una vacuna con ONTAK (elimina la actividad de las células Treg por eliminación de las células CD25⁺ con la toxina diftérica) está siendo investigada en una prometedora prueba clínica (205, 206). Por lo tanto, la evidencia tanto en modelos animales como en pacientes, sugiere consistentemente un rol crucial de las células Treg en la evasión inmune a tumores y resalta la importancia de que las mismas Treg son un importante blanco para la inmunoterapia. En este sentido, nuestros resultados demuestran que las DCs estimuladas con T3 son capaces de dirigir una respuesta inmune de tipo efectora, disminuyendo la población de células Treg *in vitro*, lo que sugiere que T3 podría tener implicancias en inmunoterapia. Además de

su rol fisiológico en la modulación de las respuestas inmunes, el tratamiento con la HT a DCs inclinaría el balance hacia respuestas de tipo efectoras.

Las DCs tienen características únicas que las convertirían en una opción ideal para ser utilizadas en vacunas antitumorales. En este sentido, se la considera la CPA más eficaz, responsable de la sensibilización inicial de las células T naive a los antígenos, de la inducción de la proliferación de linfocitos T y del establecimiento de la memoria inmunológica (207). En efecto, el resultado de la vacunación terapéutica -el éxito o el fracaso- se correlaciona con la expansión de células T efectoras específicas de antígeno inducida por la vacuna (208); en este sentido, la vacunación basada en DCs ha demostrado gran eficacia en la generación de linfocitos T citotóxicos específicos del tumor (209, 210). El objetivo de las vacunas contra el cáncer es obtener respuestas inmunes específicas de tumor mediadas por células T CD8⁺, que sean lo suficientemente robustas y de larga duración para generar una regresión duradera del tumor y/o su erradicación. Idealmente, los linfocitos T CD8⁺ generados en la vacunación deben ser capaces de reconocer con alta avidéz los complejos MHC de clase I-péptido en las células tumorales y deben expresar altos niveles de granzimas y perforinas, para entrar en el microambiente tumoral y para superar los mecanismos inmunomodulatorios que están presentes en el mismo (84). Además, la evidencia ha demostrado que la presentación cruzada de antígenos es esencial para la inducción de respuestas citotóxicas antitumorales eficaces (211). En concordancia, el presente trabajo de tesis demuestra que T3 aumenta la capacidad de las DCs para estimular una respuesta citotóxica antígeno-específica *in vivo* y la presentación cruzada de antígenos *in vitro*. Estos resultados soportan la idea que la acción de T3 tendría el rol de favorecer las respuestas antitumorales *in vivo*.

En las terapias inmunes contra el cáncer basadas en DCs, estas células generalmente son aisladas *in vitro* y posteriormente pulsadas con los antígenos tumorales. Las DCs cargadas con antígenos son nuevamente inyectadas en el paciente y las mismas se dirigen a los tejidos linfoides, donde activan a las células T específicas de antígeno, las cuales son las encargadas de eliminar el tumor. Las terapias basadas en DCs pulsadas con lisados tumorales, péptidos derivados de antígenos tumorales o proteína entera, han demostrado que son capaces de generar respuestas inmunes específicas y actividad antitumoral (92). Sin embargo, los principales objetivos en la actualidad implican el aumento de la supervivencia de las DCs, ya que son ,intrínsecamente, tipos celulares de vida media corta (187) y la supresión de los efectos secundarios no deseables que pudieran producirse, como la tolerancia inducida por DCs (207). Distintos estudios cinéticos han demostrado que las mDCs sufren apoptosis después de sólo 2-3 días *in vitro* e *in vivo*, incluso en ausencia de un nicho inmunosupresor (212). En el contexto de las infecciones, la corta vida de las DCs es suficiente para permitir la erradicación de la mayoría de los patógenos, debido a la gran cantidad de clones de células T específicos de patógenos en la periferia, de hecho, la corta vida útil de las DCs probablemente fue desarrollada para evitar la autoinmunidad. Sin embargo, en el contexto de la inmunoterapia, las vacunas a DCs modificadas *ex vivo* de corta vida probablemente sufren apoptosis antes de encontrar y de activar de manera óptima a los clones de células T reactivas contra antígenos tumorales. Por lo tanto, la baja sobrevivencia de las DCs podría ser un factor a tener en cuenta en los resultados relativamente decepcionantes hasta la fecha de muchos ensayos clínicos con vacunas basadas en DCs y puede ser un obstáculo importante a la hora de montar respuestas inmunes potentes para producir regresiones objetivas del cáncer (213). En este aspecto, Yoshikawa y col. demostraron que la inmunización de ratones con DCs infectadas con un

adenovirus codificando Bcl-XL generó efectivamente una inmunidad antitumoral más potente (214). Adicionalmente, Park y col. informaron que Akt es un regulador crítico de la vida útil de las DCs y su regulación se utiliza para prolongar la supervivencia de las mismas (22). En dicho estudio se demuestra que el mismo opera a través de la modulación de Bcl 2 y que las vacunas de DCs de larga vida media fueron lo suficientemente potentes para suprimir el crecimiento tumoral en un contexto terapéutico y para aumentar significativamente la supervivencia de los ratones. En este sentido, nuestros resultados demuestran la capacidad de T3 de aumentar la sobrevivencia de las DCs y están en concordancia con nuestros reportes previos que indican un aumento de la fosforilación de Akt en DCs estimuladas con T3 (102). Este resultado, así como el aumento de los niveles de Bcl 2 en las DCs maduras con T3 demostrado en este trabajo, sugieren que el aumento de sobrevivencia y la resistencia a la apoptosis de DCs inducida por el tratamiento con T3, puede ser una herramienta poderosa para aumentar la eficacia de las vacunas basadas en DCs.

Se están considerando diversos factores para optimizar la vacunación basada en DCs, incluyendo el linaje de las DCs, la naturaleza del estímulo de maduración, la ruta, frecuencia y dosis de inyección, el número de DCs inyectadas, y en última instancia, el número de DCs que alcanzan finalmente la zona de células T, lo cual impacta directamente en la activación de los linfocitos T (215). En este aspecto, CCR7 es un receptor de quimioquinas que impulsa la migración de las DCs a los ganglios linfáticos y ha sido demostrado que las DCs CCR7⁺ con capacidad de migrar a ganglios linfáticos drenantes, a diferencia de las DCs CCR7⁻, inducen de manera eficiente un rápido aumento en la celularidad de los nódulos linfáticos, observada previamente a la proliferación de células T (216). También se informó de que la migración de las DCs podría ser aumentada hasta en 10 veces por una pre-inyección de citoquinas inflamatorias, las cuales incrementan la expresión del

ligando de CCR7: CCL21 en las células endoteliales linfáticas. En consecuencia, la magnitud y calidad de la respuesta de células T CD4⁺ fue proporcional al número de DCs cargadas con antígenos que llegaron a los ganglios linfáticos (217). En tal sentido, en este trabajo de Tesis Doctoral hemos demostrado que el tratamiento con T3 a DCs aumenta su expresión de CCR7 y, en consecuencia, la migración a ganglios linfáticos, el cual es un evento crítico para la activación de los linfocitos T. Además, ha sido reportado que la expresión de CCR7 aumenta la sobrevivencia de las DCs por un mecanismo que implica la activación de Akt (218), también en consistencia con los resultados presentados que demuestran un aumento concomitante de la activación de Akt, expresión de CCR7 y extensión de la vida útil de las DCs.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores de nuestro grupo de trabajo (101, 102), así como el efecto de T3 en la inducción de respuestas citotóxicas antígeno-específicas *in vivo*; presentación cruzada de antígenos *in vitro*; sobrevivencia de DCs, capacidad migratoria y expresión de CCR7; se sugiere fuertemente un papel potencial de T3 en la inmunización antitumoral basada en DCs. Para probar esta hipótesis, se estableció una estrategia de vacunación antitumoral basada en DCs en un modelo tumoral de melanoma B16-OVA en ratones. Este es un modelo atractivo para la investigación de terapias antitumorales debido a sus múltiples y bien establecidos mecanismos de escape y su tolerancia inmunológica (133, 134, 219). En este sentido, la vacunación consistió en DCs estimuladas *ex vivo* con T3 en presencia de un antígeno tumoral (OVA). La misma fue capaz de aumentar el porcentaje de animales libres de tumor, retrasar la aparición de tumores y el crecimiento de los mismos en los ratones afectados, y aumentar la supervivencia de los animales. Por otra parte, la mencionada vacunación produjo una robusta infiltración de células T CD8⁺ intratumorales. Estos hallazgos son de particular interés, ya que se ha demostrado que los

linfocitos infiltrantes de tumor median efectos antitumorales potentes *in vivo* después de una transferencia adoptiva (220). La infiltración de células T en el tumor se ha asociado con una mayor supervivencia libre de enfermedad y/o supervivencia general en diversos tipos de tumor (221). Nuestros resultados también están en consonancia con los que demostraron que la inyección intracraneal de DCs transfectadas para sobre-expresar IL-23 en ratones portadores de glioma generó una importante infiltración de células T CD8⁺ y CD4⁺ en el cerebro portador de tumor (222). Además, hemos demostrado que los linfocitos de bazo de los ratones portadores de tumor tratados con DC+OVA+T3 presentaron mayores niveles de secreción de IFN- γ , lo cual podría contribuir a los efectos antitumorales que se registraron *in vivo*. Consistentemente con nuestros hallazgos, la administración terapéutica de DCs pulsadas *in vitro* con la proteína de shock térmico 70 (Hsp70) en presencia de un inhibidor de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), redujo significativamente la progresión de tumores B16 en ratones y mejoró significativamente la supervivencia, asociado a un aumento de los linfocitos T CD8⁺ productores de IFN- γ (223).

La mayoría de los ensayos clínicos basados en la utilización de DCs utilizan cócteles de citoquinas proinflamatorias para madurarlas. Estos incluyen TNF- α , IL-1 β , IL-6 y PGE2, los cuales inducen una sobre-expresión de las moléculas de MHC clase I y II, CD40, CD80, CD86 y CCR7 después de 2 días de cultivo, pero no IL-12p70 (224). A pesar de la falta de producción de IL-12p70, cuando se compara con otros estímulos de maduración de DCs (trímero CD40L, poli I:C y LPS), el cóctel de citoquinas induce un aumento más uniforme de los marcadores de maduración en las DCs, un mejor rendimiento y recuperación, mayores niveles de proliferación alogénica de células T, producción de citoquinas y mayor inducción de respuestas Th1 (224). Sin embargo, otros autores exploraron el uso de métodos alternativos de maduración de DCs, tales como el CD40L (225) y

agonistas de TLR que estimulan diferencialmente las respuestas inmunes innatas tanto sistémicas como locales *in vivo* (226). De acuerdo a esta información, a los hallazgos anteriores del laboratorio en donde se realizó esta Tesis Doctoral (101, 102) y a los presentados en esta segunda parte, T3 posee el potencial para inducir la generación de DCs óptimas para estimular respuestas inmunes celulares eficaces, con las citoquinas adecuadas para eliminar a las células tumorales. Por otra parte, T3 presenta una gran ventaja sobre otros adyuvantes para la vacunación antitumoral, ya que es una molécula de origen fisiológico.

En cuanto a la acción de T3 en DCs dirigiendo una respuesta antitumoral, vale la pena señalar que los resultados obtenidos en este trabajo contribuyen a la noción de una función antitumoral del mecanismo de acción de las HTs, en adición al efecto ampliamente demostrado de TR β 1 como represor tumoral. En este sentido, se ha encontrado que los ratones TR β PV, los cuales poseen una mutación en el sitio de unión a T3, desarrollan carcinoma folicular de tiroides, similar al cáncer humano, y TSHomas (227). Además, varios reportes han sugerido que TRs mutados se asocian con varios cánceres humanos, incluyendo hígado (228), riñón (229), hipófisis (230) y tiroides (231). En este sentido, nuestros resultados relacionados con la acción de T3 en la capacidad de DCs para llevar a cabo una respuesta T citotóxica antígeno-específica y sus efectos antitumorales, podría ser responsable -al menos en parte- del desarrollo tumoral registrado en ratones y en humanos con TRs mutados, ya que el fracaso de la acción normal de T3 a nivel de las DCs en ausencia de TRs normales podría estar implicado en la capacidad de las células cancerosas para evadir el reconocimiento inmune.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que la inmunoterapia basada en DCs estimuladas con T3 en presencia de un antígeno tumoral proporciona un enfoque alternativo a las terapias

convencionales contra el cáncer. Además, el presente trabajo de tesis destaca la importancia fisiológica de T3 en la respuesta inmune antitumoral. Este es un enfoque prometedor para la terapia del cáncer, que merece una evaluación exhaustiva en otros modelos tumorales animales y posteriormente en oncología humana. Esta nueva estrategia podría ser la clave para la mejora de la inmunidad antitumoral *in vivo*, que puede, en un futuro, ser trasladada en resultados clínicos significativos.

Los resultados de esta segunda parte del trabajo de Tesis Doctoral se están preparando a los fines de ser considerados para su publicación (se adjunta una copia del manuscrito al final de la Tesis Doctoral).

VI. CONCLUSIÓN GENERAL

En conjunto, los hallazgos presentados en este trabajo de tesis amplían el conocimiento de las interacciones entre los sistemas endócrino e inmune, proveyendo un nuevo vínculo entre las HTs y la generación de respuestas de células T. Además evidencian las modificaciones en el mecanismo de acción de las HTs, inducidas por GCs.

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.

En adición, estos resultados proveen evidencia de la eficacia de la utilización de T3 para la manipulación de las propiedades inmunogénicas de las DCs, regulando positivamente el desarrollo de inmunidad protectora. En este sentido, los hallazgos obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral sugieren también que la inmunoterapia basada en DCs estimuladas con T3 en presencia de un antígeno tumoral proporcionaría un tratamiento alternativo a las terapias convencionales antitumorales. Es un enfoque prometedor para la terapia del cáncer, que merecería posterior evaluación en la clínica.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Verburg-van Kemenade L, Schreck C. Immune and endocrine interactions. *Gen Comp Endocrinol* 2007; 152: 352.
2. Butts CL, Sternberg EM. Neuroendocrine factors alter host defense by modulating immune function. *Cell Immunol* 2008; 252: 7-15.
3. Selye H. Variations in organ size caused by chronic treatment with adrenal cortical compounds: An example of a dissociated adaptation to a hormone. *J Anat* 1941; 76: 94-9.
4. Selye H, Fortier C. Adaptive reactions to stress. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* 1949; 29: 3-18.
5. Webster EL, Barrientos RM, Contoreggi C, y col. Corticotropin releasing hormone (CRH) antagonist attenuates adjuvant induced arthritis: role of CRH in peripheral inflammation. *J Rheumatol* 2002; 29: 1252-61.
6. Butts CL, Shukair SA, Duncan KM, y col. Progesterone inhibits mature rat dendritic cells in a receptor-mediated fashion. *Int Immunol* 2007; 19: 287-96.
7. Brent GA. Mechanisms of thyroid hormone action. *J Clin Invest* 2012; 122: 3035-43.
8. Chiamolera MI, Wondisford FE. Minireview: Thyrotropin-releasing hormone and the thyroid hormone feedback mechanism. *Endocrinology* 2009; 150: 1091-6.
9. Gereben B, Zavacki AM, Ribich S, y col. Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocr Rev* 2008; 29: 898-938.
10. Bianco AC. Minireview: cracking the metabolic code for thyroid hormone signaling. *Endocrinology* 2011; 152: 3306-11.
11. Visser WE, Friesema EC, Visser TJ. Minireview: thyroid hormone transporters: the knowns and the unknowns. *Mol Endocrinol* 2011; 25: 1-14.
12. Visser WE, Friesema EC, Visser TJ. Minireview: thyroid hormone transporters: the knowns and the unknowns. *Mol Endocrinol* 2010; 25: 1-14.
13. Kinne A, Schulein R, Krause G. Primary and secondary thyroid hormone transporters. *Thyroid Res* 2011; 4 Suppl 1: S7.
14. Friesema EC, Grueters A, Biebermann H, y col. Association between mutations in a thyroid hormone transporter and severe X-linked psychomotor retardation. *Lancet* 2004; 364: 1435-7.
15. Flamant F, Gauthier K. Thyroid hormone receptors: the challenge of elucidating isotype-specific functions and cell-specific response. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1830: 3900-7.
16. Phan TQ, Jow MM, Privalsky ML. DNA recognition by thyroid hormone and retinoic acid receptors: 3,4,5 rule modified. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 319: 88-98.
17. Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev* 2010; 31: 139-70.
18. Bergh JJ, Lin HY, Lansing L, y col. Integrin α V β 3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology* 2005; 146: 2864-71.
19. Davis PJ, Davis FB, Lin HY, Mousa SA, Zhou M, Luidens MK. Translational implications of nongenomic actions of thyroid hormone initiated at its integrin receptor. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; 297: E1238-46.
20. Lei J, Mariash CN, Bhargava M, Wattenberg EV, Ingbar DH. 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* 2008; 294: L749-54.

21. Cao X, Kambe F, Moeller LC, Refetoff S, Seo H. 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* 2005; 19: 102-12.
22. Park D, Lapteva N, Seethammagari M, Slawin KM, Spencer DM. An essential role for Akt1 in dendritic cell function and tumor immunotherapy. *Nat Biotechnol* 2006; 24: 1581-90.
23. Verga Falzacappa C, Petrucci E, Patriarca V, y col. Thyroid hormone receptor TRbeta1 mediates Akt activation by T3 in pancreatic beta cells. *J Mol Endocrinol* 2007; 38: 221-33.
24. Zimmermann MB. Iodine deficiency. *Endocr Rev* 2009; 30: 376-408.
25. Zimmermann MB. Iodine deficiency in pregnancy and the effects of maternal iodine supplementation on the offspring: a review. *Am J Clin Nutr* 2009; 89: 668S-72S.
26. De Vito P, Incerpi S, Pedersen JZ, Luly P, Davis FB, Davis PJ. Thyroid hormones as modulators of immune activities at the cellular level. *Thyroid* 2011; 21: 879-90.
27. Fabris N, Mocchegiani E, Provinciali M. Pituitary-thyroid axis and immune system: a reciprocal neuroendocrine-immune interaction. *Horm Res* 1995; 43: 29-38.
28. Foster MP, Jensen ER, Montecino-Rodriguez E, Leathers H, Horseman N, Dorshkind K. Humoral and cell-mediated immunity in mice with genetic deficiencies of prolactin, growth hormone, insulin-like growth factor-I, and thyroid hormone. *Clin Immunol* 2000; 96: 140-9.
29. Davis SL. Environmental modulation of the immune system via the endocrine system. *Domest Anim Endocrinol* 1998; 15: 283-9.
30. Dorshkind K, Horseman ND. The roles of prolactin, growth hormone, insulin-like growth factor-I, and thyroid hormones in lymphocyte development and function: insights from genetic models of hormone and hormone receptor deficiency. *Endocr Rev* 2000; 21: 292-312.
31. Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev* 2001; 81: 1097-142.
32. Csaba G, Kovacs P, Pallinger E. Immunologically demonstrable hormones and hormone-like molecules in rat white blood cells and mast cells. *Cell Biol Int* 2004; 28: 487-90.
33. Csaba G, Pallinger E. Thyrotropic hormone (TSH) regulation of triiodothyronine (T(3)) concentration in immune cells. *Inflamm Res* 2009; 58: 151-4.
34. Chatterjee S, Chandel AS. Immunomodulatory role of thyroid hormones: in vivo effect of thyroid hormones on the blastogenic response of lymphoid tissues. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1983; 103: 95-100.
35. Silberstein S, Vogl AM, Bonfiglio JJ, y col. Immunology, signal transduction, and behavior in hypothalamic-pituitary-adrenal axis-related genetic mouse models. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1153: 120-30.
36. Ohashi H, Itoh M. Effects of thyroid hormones on the lymphocyte phenotypes in rats: changes in lymphocyte subsets related to thyroid function. *Endocr Regul* 1994; 28: 117-23.
37. Watanabe W, Shimizu T, Hino A, Kurokawa M. A new assay system for evaluation of developmental immunotoxicity of chemical compounds using respiratory syncytial virus infection to offspring mice. *Environ Toxicol Pharmacol* 2008; 25: 69-74.
38. Afhami S, Haghpanah V, Heshmat R, y col. Assessment of the factors involving in the development of hypothyroidism in HIV-infected patients: a case-control study. *Infection* 2007; 35: 334-8.
39. Ho HC, Chapital AD, Yu M. Hypothyroidism and adrenal insufficiency in sepsis and hemorrhagic shock. *Arch Surg* 2004; 139: 1199-203.
40. Golombek SG. Nonthyroidal illness syndrome and euthyroid sick syndrome in intensive care patients. *Semin Perinatol* 2008; 32: 413-8.
41. Stagi S, Azzari C, Bindi G, y col. Undetectable serum IgA and low IgM concentration in children with congenital hypothyroidism. *Clin Immunol* 2005; 116: 94-8.

42. Bittencourt CS, Azzolini AE, Ferreira DA, Assis-Pandochi AI. Antibody responses in hyperthyroid rats. *Int Immunopharmacol* 2007; 7: 989-93.
43. Vinayagamoorthi R, Koner BC, Kavitha S, Nandakumar DN, Padma Priya P, Goswami K. Potentiation of humoral immune response and activation of NF-kappaB pathway in lymphocytes in experimentally induced hyperthyroid rats. *Cell Immunol* 2005; 238: 56-60.
44. Nandakumar DN, Koner BC, Vinayagamoorthi R, y col. Activation of NF-kappaB in lymphocytes and increase in serum immunoglobulin in hyperthyroidism: possible role of oxidative stress. *Immunobiology* 2008; 213: 409-15.
45. Klecha AJ, Genaro AM, Gorelik G, y col. 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* 2006; 189: 45-55.
46. Klecha AJ, Genaro AM, Lysionek AE, Caro RA, Coluccia AG, Cremaschi GA. Experimental evidence pointing to the bidirectional interaction between the immune system and the thyroid axis. *Int J Immunopharmacol* 2000; 22: 491-500.
47. Yao C, Zhang J, Wang L, Guo Y, Tian Z. Inhibitory effects of thyroxine on cytokine production by T cells in mice. *Int Immunopharmacol* 2007; 7: 1747-54.
48. De Vito P, Balducci V, Leone S, y col. Nongenomic effects of thyroid hormones on the immune system cells: New targets, old players. *Steroids* 2012; 77: 988-95.
49. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 1973; 137: 1142-62.
50. Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 621-67.
51. Satpathy AT, Wu X, Albring JC, Murphy KM. Re(de)fining the dendritic cell lineage. *Nat Immunol* 2012; 13: 1145-54.
52. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol* 2013; 31: 563-604.
53. Gallo PM, Gallucci S. The dendritic cell response to classic, emerging, and homeostatic danger signals. Implications for autoimmunity. *Front Immunol* 2013; 4: 138.
54. Savina A, Amigorena S. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol Rev* 2007; 219: 143-56.
55. Blum JS, Wearsch PA, Cresswell P. Pathways of antigen processing. *Annu Rev Immunol* 2013; 31: 443-73.
56. Hackstein H, Thomson AW. Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 24-34.
57. Amigorena S, Savina A. Intracellular mechanisms of antigen cross presentation in dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 2010; 22: 109-17.
58. Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 2012; 12: 557-69.
59. den Haan JM, Lehar SM, Bevan MJ. CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J Exp Med* 2000; 192: 1685-96.
60. Joshi MD, Unger WJ, Storm G, van Kooyk Y, Mastrobattista E. Targeting tumor antigens to dendritic cells using particulate carriers. *J Control Release* 2012; 161: 25-37.
61. Banchereau J, Briere F, Caux C, y col. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 767-811.
62. Yee C, Thompson JA, Byrd D, y col. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 16168-73.

63. Schmitt E, Klein M, Bopp T. Th9 cells, new players in adaptive immunity. *Trends Immunol* 2013.
64. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol* 2010; 28: 445-89.
65. Gravano DM, Hoyer KK. Promotion and prevention of autoimmune disease by CD8+ T cells. *J Autoimmun* 2013.
66. Licona-Limon P, Kim LK, Palm NW, Flavell RA. TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells. *Nat Immunol* 2013; 14: 536-42.
67. Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* 2003; 278: 1910-4.
68. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, y col. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 2003; 421: 744-8.
69. Park H, Li Z, Yang XO, y col. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005; 6: 1133-41.
70. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 2006; 24: 677-88.
71. McGeachy MJ, Cua DJ. Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity* 2008; 28: 445-53.
72. Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 479-89.
73. Zheng Y, Valdez PA, Danilenko DM, y col. Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat Med* 2008; 14: 282-9.
74. Sutton CE, Lalor SJ, Sweeney CM, Brereton CF, Lavelle EC, Mills KH. Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity* 2009; 31: 331-41.
75. Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 467-78.
76. Matsuzaki G, Umemura M. Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections. *Microbiol Immunol* 2007; 51: 1139-47.
77. Cella M, Fuchs A, Vermi W, y col. A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature* 2009; 457: 722-5.
78. Michel ML, Keller AC, Paget C, y col. Identification of an IL-17-producing NK1.1(neg) iNKT cell population involved in airway neutrophilia. *J Exp Med* 2007; 204: 995-1001.
79. Passos ST, Silver JS, O'Hara AC, Sehy D, Stumhofer JS, Hunter CA. IL-6 promotes NK cell production of IL-17 during toxoplasmosis. *J Immunol* 2010; 184: 1776-83.
80. Badovinac VP, Harty JT. Programming, demarcating, and manipulating CD8+ T-cell memory. *Immunol Rev* 2006; 211: 67-80.
81. Ohkura N, Kitagawa Y, Sakaguchi S. Development and maintenance of regulatory T cells. *Immunity* 2013; 38: 414-23.
82. Lehtimäki S, Laheesmaa R. Regulatory T Cells Control Immune Responses through Their Non-Redundant Tissue Specific Features. *Front Immunol* 2013; 4: 294.
83. Wahl SM. Transforming growth factor-beta: innately bipolar. *Curr Opin Immunol* 2007; 19: 55-62.
84. Palucka K, Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat Rev Cancer* 2012; 12: 265-77.
85. Pulendran B, Ahmed R. Immunological mechanisms of vaccination. *Nat Immunol* 2011; 12: 509-17.
86. Kirkwood JM, Butterfield LH, Tarhini AA, Zarour H, Kalinski P, Ferrone S. Immunotherapy of cancer in 2012. *CA Cancer J Clin* 2012; 62: 309-35.

87. Appay V, Douek DC, Price DA. CD8+ T cell efficacy in vaccination and disease. *Nat Med* 2008; 14: 623-8.
88. Lizee G, Overwijk WW, Radvanyi L, Gao J, Sharma P, Hwu P. Harnessing the power of the immune system to target cancer. *Annu Rev Med* 2013; 64: 71-90.
89. Oh S, Hodge JW, Ahlers JD, Burke DS, Schlom J, Berzofsky JA. Selective induction of high avidity CTL by altering the balance of signals from APC. *J Immunol* 2003; 170: 2523-30.
90. Palucka K, Banchereau J. Dendritic-cell-based therapeutic cancer vaccines. *Immunity* 2013; 39: 38-48.
91. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 685-711.
92. Bonaccorsi I, Pezzino G, Morandi B, Ferlazzo G. Novel perspectives on dendritic cell-based immunotherapy of cancer. *Immunol Lett* 2013.
93. Tacke PJ, de Vries IJ, Torensma R, Figdor CG. Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 790-802.
94. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, y col. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med* 2010; 363: 411-22.
95. Pawelec G. Tumour escape from the immune response. *Cancer Immunol Immunother* 2004; 53: 843.
96. Orsini E, Guarini A, Chiaretti S, Mauro FR, Foa R. The circulating dendritic cell compartment in patients with chronic lymphocytic leukemia is severely defective and unable to stimulate an effective T-cell response. *Cancer Res* 2003; 63: 4497-506.
97. Almand B, Clark JI, Nikitina E, y col. Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol* 2001; 166: 678-89.
98. Pasare C, Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 2003; 299: 1033-6.
99. Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 2007; 121: 1-14.
100. Mooij P, Simons PJ, de Haan-Meulman M, de Wit HJ, Drexhage HA. 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* 1994; 140: 503-12.
101. Mascanfroni I, Montesinos Mdel M, Susperreguy S, y col. Control of dendritic cell maturation and function by triiodothyronine. *FASEB J* 2008; 22: 1032-42.
102. Mascanfroni ID, Montesinos Mdel M, Alamino VA, y col. Nuclear factor (NF)-kappaB-dependent thyroid hormone receptor beta1 expression controls dendritic cell function via Akt signaling. *J Biol Chem* 2010; 285: 9569-82.
103. Dedecjus M, Stasiolek M, Brzezinski J, Selmaj K, Lewinski A. Thyroid hormones influence human dendritic cells' phenotype, function, and subsets distribution. *Thyroid* 2011; 21: 533-40.
104. Zhou J, Cidlowski JA. The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses. *Steroids* 2005; 70: 407-17.
105. Buckingham JC. Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking. *Br J Pharmacol* 2006; 147 Suppl 1: S258-68.
106. Szeto A, Gonzales JA, Spitzer SB, y col. Circulating levels of glucocorticoid hormones in WHHL and NZW rabbits: circadian cycle and response to repeated social encounter. *Psychoneuroendocrinology* 2004; 29: 861-6.
107. Draper N, Stewart PM. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase and the pre-receptor regulation of corticosteroid hormone action. *J Endocrinol* 2005; 186: 251-71.

108. Ramamoorthy S, Cidlowski JA. Exploring the molecular mechanisms of glucocorticoid receptor action from sensitivity to resistance. *Endocr Dev* 2013; 24: 41-56.
109. Vandevyver S, Dejager L, Tuckermann J, Libert C. New insights into the anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids: an emerging role for glucocorticoid-receptor-mediated transactivation. *Endocrinology* 2013; 154: 993-1007.
110. Germain P, Staels B, Dacquet C, Spedding M, Laudet V. Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev* 2006; 58: 685-704.
111. Stahn C, Lowenberg M, Hommes DW, Buttgerit F. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 275: 71-8.
112. Samarasinghe RA, Witchell SF, DeFranco DB. Cooperativity and complementarity: synergies in non-classical and classical glucocorticoid signaling. *Cell Cycle* 2012; 11: 2819-27.
113. Yudit MR, Cidlowski JA. The glucocorticoid receptor: coding a diversity of proteins and responses through a single gene. *Mol Endocrinol* 2002; 16: 1719-26.
114. Recupero AR, Coleoni AH, Cherubini O, Oviedo A. Selective alterations in hepatic nuclear T3-receptors and enzyme responses by glucocorticoid deficit or excess. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1983; 104: 485-9.
115. Recupero AR, Coleoni AH, Cherubini O, Oviedo A. Relationship between the increase in liver nuclear triiodothyronine-receptor sites and malic enzyme activation by dexamethasone. *Acta Physiol Pharmacol Latinoam* 1986; 36: 93-103.
116. Montesinos MM, Pellizas CG, Velez ML, Susperreguy S, Masini-Repiso AM, Coleoni AH. Thyroid hormone receptor beta1 gene expression is increased by Dexamethasone at transcriptional level in rat liver. *Life Sci* 2006; 78: 2584-94.
117. Krain LP, Denver RJ. Developmental expression and hormonal regulation of glucocorticoid and thyroid hormone receptors during metamorphosis in *Xenopus laevis*. *J Endocrinol* 2004; 181: 91-104.
118. Samuels HH, Horwitz ZD, Stanley F, Casanova J, Shapiro LE. Thyroid hormone controls glucocorticoid action in cultured GH1 cells. *Nature* 1977; 268: 254-7.
119. Martial JA, Seeburg PH, Guenzi D, Goodman HM, Baxter JD. Regulation of growth hormone gene expression: synergistic effects of thyroid and glucocorticoid hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74: 4293-5.
120. Iwamuro S, Tata JR. Contrasting patterns of expression of thyroid hormone and retinoid X receptor genes during hormonal manipulation of *Xenopus* tadpole tail regression in culture. *Mol Cell Endocrinol* 1995; 113: 235-43.
121. Prigent H, Maxime V, Annane D. Clinical review: corticotherapy in sepsis. *Crit Care* 2004; 8: 122-9.
122. Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med* 2005; 353: 1711-23.
123. Smoak KA, Cidlowski JA. Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mech Ageing Dev* 2004; 125: 697-706.
124. Butts CL, Shukair SA, Duncan KM, Harris CW, Belyavskaya E, Sternberg EM. Effects of dexamethasone on rat dendritic cell function. *Horm Metab Res* 2007; 39: 404-12.
125. Baschant U, Tuckermann J. The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010; 120: 69-75.
126. Schreiber E, Matthias P, Muller MM, Schaffner W. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 6419.
127. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
128. Calbo S, Delagreverie H, Arnoult C, Authier FJ, Tron F, Boyer O. Functional tolerance of CD8+ T cells induced by muscle-specific antigen expression. *J Immunol* 2008; 181: 408-17.

129. Guernonprez P, Saveanu L, Kleijmeer M, Davoust J, Van Endert P, Amigorena S. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 2003; 425: 397-402.
130. van Genderen H, Kenis H, Lux P, y col. In vitro measurement of cell death with the annexin A5 affinity assay. *Nat Protoc* 2006; 1: 363-7.
131. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156-9.
132. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25: 402-8.
133. Bellone M, Cantarella D, Castiglioni P, y col. Relevance of the tumor antigen in the validation of three vaccination strategies for melanoma. *J Immunol* 2000; 165: 2651-6.
134. Hokey DA, Larregina AT, Erdos G, Watkins SC, Falo LD, Jr. Tumor cell loaded type-1 polarized dendritic cells induce Th1-mediated tumor immunity. *Cancer Res* 2005; 65: 10059-67.
135. Andreani V, Gatti G, Simonella L, Rivero V, Maccioni M. Activation of Toll-like receptor 4 on tumor cells in vitro inhibits subsequent tumor growth in vivo. *Cancer Res* 2007; 67: 10519-27.
136. van Duivenvoorde LM, Han WG, Bakker AM, y col. Immunomodulatory dendritic cells inhibit Th1 responses and arthritis via different mechanisms. *J Immunol* 2007; 179: 1506-15.
137. Abe M, Thomson AW. Influence of immunosuppressive drugs on dendritic cells. *Transpl Immunol* 2003; 11: 357-65.
138. Sundquist M, Johansson C, Wick MJ. Dendritic cells as inducers of antimicrobial immunity in vivo. *APMIS* 2003; 111: 715-24.
139. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124: 783-801.
140. Rozkova D, Horvath R, Bartunkova J, Spisek R. Glucocorticoids severely impair differentiation and antigen presenting function of dendritic cells despite upregulation of Toll-like receptors. *Clin Immunol* 2006; 120: 260-71.
141. Vieira PL, Kalinski P, Wierenga EA, Kapsenberg ML, de Jong EC. Glucocorticoids inhibit bioactive IL-12p70 production by in vitro-generated human dendritic cells without affecting their T cell stimulatory potential. *J Immunol* 1998; 161: 5245-51.
142. Nagalski A, Kiersztan A. [Physiology and molecular mechanism of glucocorticoid action]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2010; 64: 133-45.
143. Elftman MD, Norbury CC, Bonneau RH, Truckenmiller ME. Corticosterone impairs dendritic cell maturation and function. *Immunology* 2007; 122: 279-90.
144. Steinbrink K, Graulich E, Kubsch S, Knop J, Enk AH. CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood* 2002; 99: 2468-76.
145. Muller G, Muller A, Tuting T, y col. Interleukin-10-treated dendritic cells modulate immune responses of naive and sensitized T cells in vivo. *J Invest Dermatol* 2002; 119: 836-41.
146. Woltman AM, de Fijter JW, Kamerling SW, Paul LC, Daha MR, van Kooten C. The effect of calcineurin inhibitors and corticosteroids on the differentiation of human dendritic cells. *Eur J Immunol* 2000; 30: 1807-12.
147. Rea D, van Kooten C, van Meijgaarden KE, Ottenhoff TH, Melief CJ, Offringa R. Glucocorticoids transform CD40-triggering of dendritic cells into an alternative activation pathway resulting in antigen-presenting cells that secrete IL-10. *Blood* 2000; 95: 3162-7.
148. Piemonti L, Monti P, Allavena P, y col. Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. *J Immunol* 1999; 162: 6473-81.
149. Xia CQ, Peng R, Beato F, Clare-Salzler MJ. Dexamethasone induces IL-10-producing monocyte-derived dendritic cells with durable immaturity. *Scand J Immunol* 2005; 62: 45-54.

150. Bosma BM, Metselaar HJ, Nagtzaam NM, y col. Dexamethasone transforms lipopolysaccharide-stimulated human blood myeloid dendritic cells into myeloid dendritic cells that prime interleukin-10 production in T cells. *Immunology* 2008; 125: 91-100.
151. Levings MK, Sangregorio R, Galbiati F, Squadrone S, de Waal Malefyt R, Roncarolo MG. IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *J Immunol* 2001; 166: 5530-9.
152. Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A, y col. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med* 2002; 195: 603-16.
153. Roelen DL, Schuurhuis DH, van den Boogaardt DE, y col. Prolongation of skin graft survival by modulation of the alloimmune response with alternatively activated dendritic cells. *Transplantation* 2003; 76: 1608-15.
154. Emmer PM, van der Vlag J, Adema GJ, Hilbrands LB. Dendritic cells activated by lipopolysaccharide after dexamethasone treatment induce donor-specific allograft hyporesponsiveness. *Transplantation* 2006; 81: 1451-9.
155. Sato K, Yamashita N, Baba M, Matsuyama T. Modified myeloid dendritic cells act as regulatory dendritic cells to induce anergic and regulatory T cells. *Blood* 2003; 101: 3581-9.
156. Menges M, Rossner S, Voigtlander C, y col. Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *J Exp Med* 2002; 195: 15-21.
157. Woltman AM, van der Kooij SW, de Fijter JW, van Kooten C. Maturation-resistant dendritic cells induce hyporesponsiveness in alloreactive CD45RA+ and CD45RO+ T-cell populations. *Am J Transplant* 2006; 6: 2580-91.
158. Roelen DL, van den Boogaardt DE, van Miert PP, Koekkoek K, Offringa R, Claas FH. Differentially modulated dendritic cells induce regulatory T cells with different characteristics. *Transpl Immunol* 2008; 19: 220-8.
159. Ilarregui JM, Croci DO, Bianco GA, y col. Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10. *Nat Immunol* 2009; 10: 981-91.
160. Buttgereit F, Scheffold A. Rapid glucocorticoid effects on immune cells. *Steroids* 2002; 67: 529-34.
161. Leis H, Page A, Ramirez A, y col. Glucocorticoid Receptor Counteracts Tumorigenic Activity of Akt in Skin through Interference with the Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling Pathway. *Mol Endocrinol* 2004; 18: 303-11.
162. Singleton JR, Baker BL, Thorburn A. Dexamethasone inhibits insulin-like growth factor signaling and potentiates myoblast apoptosis. *Endocrinology* 2000; 141: 2945-50.
163. Distelhorst CW. Recent insights into the mechanism of glucocorticosteroid-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 2002; 9: 6-19.
164. Chrysis D, Zaman F, Chagin AS, Takigawa M, Savendahl L. Dexamethasone induces apoptosis in proliferative chondrocytes through activation of caspases and suppression of the Akt-phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathway. *Endocrinology* 2005; 146: 1391-7.
165. Spies CM, Gaber T, Hahne M, y col. Rimexolone inhibits proliferation, cytokine expression and signal transduction of human CD4+ T-cells. *Immunol Lett* 2010; 131: 24-32.
166. Hodin RA, Lazar MA, Chin WW. Differential and tissue-specific regulation of the multiple rat c-erbA messenger RNA species by thyroid hormone. *J Clin Invest* 1990; 85: 101-5.
167. Oakley RH, Cidlowski JA. Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. *J Biol Chem* 2011; 286: 3177-84.

168. Hidalgo AA, Trump DL, Johnson CS. Glucocorticoid regulation of the vitamin D receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010; 121: 372-5.
169. Sun X, Zemel MB. 1 α , 25-dihydroxyvitamin D and corticosteroid regulate adipocyte nuclear vitamin D receptor. *Int J Obes (Lond)* 2008; 32: 1305-11.
170. Freeman L, Hewison M, Hughes SV, y col. Expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 permits regulation of glucocorticoid bioavailability by human dendritic cells. *Blood* 2005; 106: 2042-9.
171. De Bosscher K, Van Craenenbroeck K, Meijer OC, Haegeman G. Selective transrepression versus transactivation mechanisms by glucocorticoid receptor modulators in stress and immune systems. *Eur J Pharmacol* 2008; 583: 290-302.
172. Laderach D, Compagno D, Danos O, Vainchenker W, Galy A. RNA interference shows critical requirement for NF-kappa B p50 in the production of IL-12 by human dendritic cells. *J Immunol* 2003; 171: 1750-7.
173. Ray A, Prefontaine KE. Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 752-6.
174. Scheinman RI, Cogswell PC, Lofquist AK, Baldwin AS, Jr. Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* 1995; 270: 283-6.
175. De Bosscher K, Schmitz ML, Vanden Berghe W, Plaisance S, Fiers W, Haegeman G. Glucocorticoid-mediated repression of nuclear factor-kappaB-dependent transcription involves direct interference with transactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 13504-9.
176. Almawi WY, Melemedjian OK. Negative regulation of nuclear factor-kappaB activation and function by glucocorticoids. *J Mol Endocrinol* 2002; 28: 69-78.
177. Supakar PC, Jung MH, Song CS, Chatterjee B, Roy AK. Nuclear factor kappa B functions as a negative regulator for the rat androgen receptor gene and NF-kappa B activity increases during the age-dependent desensitization of the liver. *J Biol Chem* 1995; 270: 837-42.
178. Montesinos MM, Alamino VA, Mascanfroni ID, y col. Dexamethasone counteracts the immunostimulatory effects of triiodothyronine (T3) on dendritic cells. *Steroids* 2012; 77: 67-76.
179. Spellberg B, Edwards JE, Jr. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 76-102.
180. Dellacasagrande J, Capo C, Raoult D, Mege JL. IFN-gamma-mediated control of *Coxiella burnetii* survival in monocytes: the role of cell apoptosis and TNF. *J Immunol* 1999; 162: 2259-65.
181. Johnson DR, Pober JS. Tumor necrosis factor and immune interferon synergistically increase transcription of HLA class I heavy- and light-chain genes in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 5183-7.
182. Kono M, Nakamura Y, Suda T, y col. Enhancement of protective immunity against intracellular bacteria using type-1 polarized dendritic cell (DC) vaccine. *Vaccine* 2012; 30: 2633-9.
183. Pinzon-Charry A, Maxwell T, McGuckin MA, Schmidt C, Furnival C, Lopez JA. Spontaneous apoptosis of blood dendritic cells in patients with breast cancer. *Breast Cancer Res* 2006; 8: R5.
184. Um SH, Mulhall C, Alisa A, y col. Alpha-fetoprotein impairs APC function and induces their apoptosis. *J Immunol* 2004; 173: 1772-8.
185. Peguet-Navarro J, Sportouch M, Popa I, Berthier O, Schmitt D, Portoukalian J. Gangliosides from human melanoma tumors impair dendritic cell differentiation from monocytes and induce their apoptosis. *J Immunol* 2003; 170: 3488-94.
186. Kushwah R, Hu J. Dendritic cell apoptosis: regulation of tolerance versus immunity. *J Immunol* 2010; 185: 795-802.
187. Hou WS, Van Parijs L. A Bcl-2-dependent molecular timer regulates the lifespan and immunogenicity of dendritic cells. *Nat Immunol* 2004; 5: 583-9.

188. Randolph GJ, Angeli V, Swartz MA. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 617-28.
189. Cavanagh LL, Von Andrian UH. Travellers in many guises: the origins and destinations of dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 2002; 80: 448-62.
190. Sallusto F, Lanzavecchia A. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunol Rev* 2000; 177: 134-40.
191. Jung ID, Lee JS, Kim YJ, y col. Sphingosine kinase inhibitor suppresses dendritic cell migration by regulating chemokine receptor expression and impairing p38 mitogen-activated protein kinase. *Immunology* 2007; 121: 533-44.
192. Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 2004; 21: 467-76.
193. Canderan G, Dellabona P. T helper 17 T cells do good for cancer immunotherapy. *Immunotherapy* 2010; 2: 21-4.
194. Kryczek I, Wei S, Szeliga W, Vatan L, Zou W. Endogenous IL-17 contributes to reduced tumor growth and metastasis. *Blood* 2009; 114: 357-9.
195. Martin-Orozco N, Muranski P, Chung Y, y col. T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. *Immunity* 2009; 31: 787-98.
196. Maniati E, Soper R, Hagemann T. Up for Mischief? IL-17/Th17 in the tumour microenvironment. *Oncogene* 2010; 29: 5653-62.
197. He D, Li H, Yusuf N, y col. IL-17 promotes tumor development through the induction of tumor promoting microenvironments at tumor sites and myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol* 2010; 184: 2281-8.
198. Martin-Orozco N, Dong C. The IL-17/IL-23 axis of inflammation in cancer: friend or foe? *Curr Opin Investig Drugs* 2009; 10: 543-9.
199. Yamaguchi T, Sakaguchi S. Regulatory T cells in immune surveillance and treatment of cancer. *Semin Cancer Biol* 2006; 16: 115-23.
200. Wang HY, Wang RF. Regulatory T cells and cancer. *Curr Opin Immunol* 2007; 19: 217-23.
201. Wolf AM, Wolf D, Steurer M, Gastl G, Gunsilius E, Grubeck-Loebenstien B. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 606-12.
202. Leong PP, Mohammad R, Ibrahim N, y col. Phenotyping of lymphocytes expressing regulatory and effector markers in infiltrating ductal carcinoma of the breast. *Immunol Lett* 2006; 102: 229-36.
203. Nair RE, Kilinc MO, Jones SA, Egilmez NK. Chronic immune therapy induces a progressive increase in intratumoral T suppressor activity and a concurrent loss of tumor-specific CD8+ T effectors in her-2/neu transgenic mice bearing advanced spontaneous tumors. *J Immunol* 2006; 176: 7325-34.
204. Knutson KL, Dang Y, Lu H, y col. IL-2 immunotoxin therapy modulates tumor-associated regulatory T cells and leads to lasting immune-mediated rejection of breast cancers in neu-transgenic mice. *J Immunol* 2006; 177: 84-91.
205. Emens LA, Reilly RT, Jaffee EM. Breast cancer vaccines: maximizing cancer treatment by tapping into host immunity. *Endocr Relat Cancer* 2005; 12: 1-17.
206. Duvic M, Geskin L, Prince HM. Duration of response in cutaneous T-cell lymphoma patients treated with denileukin diftitox: results from 3 phase III studies. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2013; 13: 377-84.
207. Cintolo JA, Datta J, Mathew SJ, Czerniecki BJ. Dendritic cell-based vaccines: barriers and opportunities. *Future Oncol* 2012; 8: 1273-99.
208. Welters MJ, Kenter GG, de Vos van Steenwijk PJ, y col. Success or failure of vaccination for HPV16-positive vulvar lesions correlates with kinetics and phenotype of induced T-cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 11895-9.

209. Goldszmid RS, Idoyaga J, Bravo AI, Steinman R, Mordoh J, Wainstok R. Dendritic cells charged with apoptotic tumor cells induce long-lived protective CD4+ and CD8+ T cell immunity against B16 melanoma. *J Immunol* 2003; 171: 5940-7.
210. Berhanu A, Huang J, Alber SM, Watkins SC, Storkus WJ. Combinational Flt3 ligand and granulocyte macrophage colony-stimulating factor treatment promotes enhanced tumor infiltration by dendritic cells and antitumor CD8(+) T-cell cross-priming but is ineffective as a therapy. *Cancer Res* 2006; 66: 4895-903.
211. Hildner K, Edelson BT, Purtha WE, y col. Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* 2008; 322: 1097-100.
212. Hon H, Jacob J. Tracking dendritic cells in vivo: insights into DC biology and function. *Immunol Res* 2004; 29: 69-80.
213. Ridgway D. The first 1000 dendritic cell vaccinees. *Cancer Invest* 2003; 21: 873-86.
214. Yoshikawa T, Niwa T, Mizuguchi H, Okada N, Nakagawa S. Engineering of highly immunogenic long-lived DC vaccines by antiapoptotic protein gene transfer to enhance cancer vaccine potency. *Gene Ther* 2008; 15: 1321-9.
215. MartIn-Fontecha A, Sebastiani S, Hopken UE, y col. Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming. *J Exp Med* 2003; 198: 615-21.
216. Forster R, Schubel A, Breitfeld D, y col. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 1999; 99: 23-33.
217. Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P, y col. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 1998; 28: 2760-9.
218. Escribano C, Delgado-Martin C, Rodriguez-Fernandez JL. CCR7-dependent stimulation of survival in dendritic cells involves inhibition of GSK3beta. *J Immunol* 2009; 183: 6282-95.
219. Rubinstein N, Alvarez M, Zwirner NW, y col. Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer Cell* 2004; 5: 241-51.
220. Barth RJ, Jr., Mule JJ, Spiess PJ, Rosenberg SA. Interferon gamma and tumor necrosis factor have a role in tumor regressions mediated by murine CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 1991; 173: 647-58.
221. Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2012; 12: 298-306.
222. Hu J, Yuan X, Belladonna ML, y col. Induction of potent antitumor immunity by intratumoral injection of interleukin 23-transduced dendritic cells. *Cancer Res* 2006; 66: 8887-96.
223. Toomey D, Conroy H, Jarnicki AG, Higgins SC, Sutton C, Mills KH. Therapeutic vaccination with dendritic cells pulsed with tumor-derived Hsp70 and a COX-2 inhibitor induces protective immunity against B16 melanoma. *Vaccine* 2008; 26: 3540-9.
224. Lee AW, Truong T, Bickham K, y col. A clinical grade cocktail of cytokines and PGE2 results in uniform maturation of human monocyte-derived dendritic cells: implications for immunotherapy. *Vaccine* 2002; 20 Suppl 4: A8-A22.
225. Palucka AK, Ueno H, Connolly J, y col. Dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells can induce objective clinical responses and MART-1 specific CD8+ T-cell immunity. *J Immunother* 2006; 29: 545-57.
226. Kwissa M, Nakaya HI, Oluoch H, Pulendran B. Distinct TLR adjuvants differentially stimulate systemic and local innate immune responses in nonhuman primates. *Blood* 2012; 119: 2044-55.
227. Suzuki H, Willingham MC, Cheng SY. Mice with a mutation in the thyroid hormone receptor beta gene spontaneously develop thyroid carcinoma: a mouse model of thyroid carcinogenesis. *Thyroid* 2002; 12: 963-9.

228. Lin KH, Shieh HY, Chen SL, Hsu HC. Expression of mutant thyroid hormone nuclear receptors in human hepatocellular carcinoma cells. *Mol Carcinog* 1999; 26: 53-61.
229. Kamiya Y, Puzianowska-Kuznicka M, McPhie P, Nauman J, Cheng SY, Nauman A. Expression of mutant thyroid hormone nuclear receptors is associated with human renal clear cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2002; 23: 25-33.
230. Safer JD, Colan SD, Fraser LM, Wondisford FE. A pituitary tumor in a patient with thyroid hormone resistance: a diagnostic dilemma. *Thyroid* 2001; 11: 281-91.
231. Puzianowska-Kuznicka M, Krystyniak A, Madej A, Cheng SY, Nauman J. Functionally impaired TR mutants are present in thyroid papillary cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 1120-8.

VIII. ABREVIATURAS

ACTH: Adrenocorticotrofina

ARN: Ácido ribonucleico

CCR: Receptor de quimiocinas

CD: Cluster de diferenciación (del inglés "*Cluster differentiation*")

CD40L: CD40 ligando

CFSE: Carboxyfluorescein succinimidyl ester

cGR: Receptor de glucocorticoides citosólico

CPA: Célula presentadora de antígeno

CRH: Hormona liberadora de adrenocorticotrofina

DC: Célula dendrítica (del inglés "*dendritic cell*")

Dex: Dexametasona

DIO: Deiodasa de iodotironinas

ELISA: Enzimoinmunoensayo en fase sólida (del inglés "*Enzyme linked immunosorbent assay*")

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

ev: endovenosa

FDA: Agencia de alimentos y medicamentos (del inglés "*Food and Drug Administration*")

FITC: Isotiocianato de fluoresceína (del inglés "*Fluorescein isothiocyanate*")

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GC: Glucocorticoide

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (del inglés "*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*")

GR: Receptor de glucocorticoides (del inglés "*glucocorticoid receptor*")

HDAC1: Histona deacetilasa clase 1

HEV: Venas del endotelio alto (del inglés *“high endothelial venules”*)

HPA: Eje hipotalámico-pituitario-adrenal

HRP: peroxidasa de rabanito

HSC: Célula madre hematopoyética (del inglés *“hematopoietic stem cell”*)

Hsp: Proteína de shock térmico (del inglés *“heat shock protein”*)

HT: Hormona tiroidea

iDC: Célula dendrítica inmadura

IL: Interleuquina

INF: Interferón

LPS: Lipopolisacárido

MAPK: Proteín kinasa activada por mitógenos (del inglés *“Mitogen activated protein kinase”*)

MCT: Transportador de monocarboxilatos (del inglés *“monocarboxylate transporter”*)

mDC: Célula dendrítica madura

mGR: Receptor de glucocorticoides unido a la membrana

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés *“major histocompatibility complex”*)

MR: Receptor de mineralocorticoides (del inglés *“mineralocorticoid receptor”*)

NF-κB: Factor Nuclear-κB

NK: Células asesinas naturales (del inglés *“natural killer cells”*)

NKT: Células T asesinas naturales

OATP: Polipéptido transportador de aniones orgánicos (del inglés *“organic anion-transporting polypeptide”*)

OVA: Ovalbúmina

PAP: Fosfatasa ácida prostática (del inglés *“prostatic acid phosphatase”*)

PBS: Solución tampón de fosfatos (del inglés *“Phosphate balanced solution”*)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PG: Prostaglandina

PI3K: Fosfatidilinositol 3-kinasa (del inglés "*Phosphoinositide 3-kinase*")

PKA: Proteín kinasa A

PKC: Proteín kinasa C

RE: Retículo endoplásmico

rT3: T3 reversa

RXR: Receptor de ácido retinoico

sc: subcutánea

SDS: Dodecil sulfato de sodio

SFB: Suero fetal bovino

T3: 3, 5, 3'-triodo-L-tironina

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

TCR: Receptor de células T (del inglés "*T cell receptor*")

TGF: Factor de crecimiento transformante (del inglés "*transforming growth factor*")

Th: Linfocitos T cooperadores (del inglés "*T helper*")

TLR: Receptor de tipo Toll (del inglés "*Toll-like receptors*")

TNF: Factor de necrosis tumoral (del inglés "*Tumor Necrosis Factor*")

TR: Receptor de hormonas tiroideas (del inglés "*Thyroid Receptor*")

TRE: Elementos de respuesta de hormonas tiroideas (del inglés "*Thyroid response elements*")

Treg: Células T regulatorias

TSH: Hormona tirotrófica

TSH-R: Receptor de la hormona tirotrófica

IX. PRESENTACIONES EN CONGRESOS

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

Alamino VA, Mascanfroni ID, Montesinos MM, Susperreguy S, Masini-Repiso AM, Rabinovich GA, Pellizas CG. **“Triiodothyronine (T3) promotes the development of an antigen-specific cytotoxic response through modulation of dendritic cell (DC) function.”** XIII Congreso de la Sociedad Latinoamericana de Tiroides. Gramado, Brasil. Abril, 2009. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia y metabologia, 2009. 53 (2): S163.**

Alamino VA, Mascanfroni ID, Montesinos MM, Susperreguy S, Morón VG, Masini-Repiso AM, Rabinovich GA, Pellizas CG. **“Triiodotironina (T3) promueve el desarrollo de una respuesta citotóxica antígeno-específica a través de la modulación de la función de las células dendríticas.”** LIV Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica y LVII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. Mar del Plata. Noviembre, 2009. **Medicina, 2009. 69 (1):84.**

Alamino VA, Mascanfroni ID, Montesinos MM, Susperreguy S, Masini-Repiso AM, Rabinovich GA, Pellizas CG. **“Triiodothyronine promotes the development of an antigen-specific cytotoxic response through modulation of dendritic cell function.”** 11th International Symposium on Dendritic Cells in Fundamental and Clinical Immunology. Lugano, Suiza. Septiembre, 2010. **(Travel Award)**

Alamino VA, Mascanfroni ID, Montesinos MM, Susperreguy S, Morón VG, Masini-Repiso AM, Rabinovich GA, Pellizas CG. **“Triiodotironina promueve el desarrollo de una respuesta citotóxica antígeno-específica a través de la modulación de la función de las células dendríticas.”** XVIII Jornadas de jóvenes investigadores asociación de universidades grupo montevideo (AUGM). Santa Fe. Octubre, 2010.

Alamino VA, Mascanfroni ID, Montesinos MM, Susperreguy S, Masini-Repiso AM, Rabinovich GA, Pellizas CG. **“Rol de las hormonas tiroideas en la generación de una respuesta citotóxica específica de antígeno a través de la regulación de la función de células dendríticas.”** Congreso FASEN 2010, Federación Argentina de Sociedades de Endocrinología. Mar del Plata. Noviembre, 2010. **Revista Argentina de endocrinología y metabolismo, 2010. 47:90.**

Alamino VA, Mascanfroni ID, Montesinos MM, Susperreguy S, Masini-Repiso AM, Rabinovich GA, Pellizas CG. **“Triiodotironina (T3) promueve el desarrollo de una respuesta citotóxica antígeno-específica protectora antitumoral a través de la modulación de la función de las células dendríticas: rol esencial del receptor de T3.”** XII Jornadas de la Sociedad de Endocrinología y Metabolismo de Córdoba (SEMCO). Córdoba. Noviembre, 2010.

Alamino VA, Montesinos MM, Mascanfroni ID, Gigena N, Masini-Repiso AM, Rabinovich GA & Pellizas CG. **“New insights into thyroid hormone action on dendritic cell (DC) function.”** XIV Congreso de la Sociedad Latinoamericana de Tiroides. Lima, Perú. Agosto, 2011. **(Travel Grant)**

Alamino VA, Montesinos MM, Mascanfroni I, Gigena N, Masini-Repiso AM, Rabinovich GA, Pellizas CG. **“Avances en el conocimiento del efecto de las hormonas tiroideas sobre la función de las células dendríticas.”** LIX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. San Miguel de Tucumán. Octubre, 2011.

Alamino VA, Montesinos MM, Mascanfroni ID, Gigena N, Masini-Repiso AM, Rabinovich GA, Pellizas CG. **“Triiodotironina tiene un rol crítico en el balance de células T efectoras y regulatorias a través de su acción sobre células dendríticas”**. XIII Jornadas de la Sociedad de Endocrinología y Metabolismo de Córdoba (SEMCO). Córdoba. Noviembre, 2011. **(Mención Especial)**

Alamino VA. **“Rol de las hormonas tiroideas en la respuesta inmune adaptativa”**. SIMPOSIO. Congreso FASEN 2012, Federación Argentina de Sociedades de Endocrinología. Salta. Octubre, 2012.

Alamino VA, Gigena N, Montesinos MM, Masini-Repiso AM, Rabinovich GA, Pellizas CG. **“Células dendríticas (DC) estimuladas con hormona tiroidea en presencia de antígenos tumorales inducen una potente respuesta antitumoral: rol de T3 como adyuvante en la vacunación antitumoral a base de DC”**. XIV Jornadas de la Sociedad de Endocrinología y Metabolismo de Córdoba (SEMCO). Córdoba. Diciembre, 2012. **(Primer premio)**

Alamino VA, Gigena N, Montesinos MM, Donadio AC, Milotich SI, Masini-Repiso AM, Rabinovich GA, Pellizas CG. **“Dendritic cells (DC) matured with triiodothyronine (T3) in the presence of tumor antigens induce a potent antitumoral response: role of T3 as adjuvant in DC-based cancer vaccines”**. XV Congreso de la Sociedad Latinoamericana de Tiroides. Florianópolis, Brasil. Marzo, 2013. **(Primer premio: LATS Prize [MERK] Young Investigator)**

Alamino VA; Gigena N; Montesinos MM; Donadio AC; Milotich S; Masini-Repiso AM; Rabinovich GA; Pellizas CG. **“Dendritic cells (DC) pulsed with thyroid hormone in the presence of tumor antigens induce a potent antitumor response: role of triiodothyronine as adjuvant in DC-based cancer vaccines”**. The Endocrine Society’s 95th annual meeting and expo. San Francisco, Estados Unidos. Junio, 2013. **(Reconocimiento: Featured Poster presentation)**

X. PUBLICACIONES

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, se publicaron (como autor o co-autor) los trabajos que se mencionan a continuación:

*** “NUCLEAR FACTOR (NF)- κ B-DEPENDENT THYROID HORMONE RECEPTOR β 1 EXPRESSION CONTROLS DENDRITIC CELL FUNCTION VIA AKT SIGNALING”.**

Iván D. Mascanfroni, María del Mar Montesinos, Vanina A. Alamino, Sebastián Susperreguy, Juan P. Nicola, Juan M. Illarregui, Ana M. Masini-Repiso, Gabriel A. Rabinovich and Claudia G. Pellizas.

J Biol Chem. 2010 Mar 26;285 (13):9569-82

*** “GROWTH HORMONE TREATMENT IN CHILDREN WITH IDIOPATHIC SHORT STATURE: CORRELATION OF GROWTH RESPONSE WITH PERIPHERAL THYROID HORMONE ACTION”**

Sebastián Susperreguy, Liliana Muñoz, Natalia Y. Tkalenko, Ivan D. Mascanfroni, Vanina A. Alamino, María M. Montesinos, Ana M. Masini-Repiso, Mirta B. Miras, Claudia G. Pellizas.

Clin Endocrinol (Oxf). 2011 Mar;74 (3):346-53

*** “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.

¹These authors contributed equally to this work and should be considered as first authors.

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

(se adjunta una copia de este manuscrito al final de la Tesis Doctoral)

* **“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.

Manuscrito en preparación para ser enviado a publicar.

(se adjunta una copia de este manuscrito al final de la Tesis Doctoral)



Dexamethasone counteracts the immunostimulatory effects of triiodothyronine (T3) on dendritic cells

María M. Montesinos^{a,1}, Vanina A. Alamino^{a,1}, Iván D. Mascanfroni^{a,b}, Sebastián Susperreguy^a, Nicolás Gigena^a, Ana M. Masini-Repiso^a, Gabriel A. Rabinovich^{b,c}, Claudia G. Pellizas^{a,*}

^a Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI-CONICET), Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina

^b Laboratorio de Inmunopatología, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET), Buenos Aires, Argentina

^c Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 June 2011

Received in revised form 13 October 2011

Accepted 17 October 2011

Available online 25 October 2011

Keywords:

Dexamethasone

Thyroid hormone action

Dendritic cells

ABSTRACT

Glucocorticoids (GCs) are widely used as anti-inflammatory and immunosuppressive agents. Several studies have indicated the important role of dendritic cells (DCs), highly specialized antigen-presenting and immunomodulatory cells, in GC-mediated suppression of adaptive immune responses. Recently, we demonstrated that triiodothyronine (T3) has potent immunostimulatory effects on bone marrow-derived mouse DCs through a mechanism involving T3 binding to cytosolic thyroid hormone receptor (TR) β 1, rapid and sustained Akt activation and IL-12 production. Here we explored the impact of GCs on T3-mediated DC maturation and function and the intracellular events underlying these effects. Dexamethasone (Dex), a synthetic GC, potently inhibited T3-induced stimulation of DCs by preventing the augmented expression of maturation markers and the enhanced IL-12 secretion through mechanisms involving the GC receptor. These effects were accompanied by increased IL-10 levels following exposure of T3-conditioned DCs to Dex. Accordingly, Dex inhibited the immunostimulatory capacity of T3-matured DCs on naive T-cell proliferation and IFN- γ production while increased IL-10 synthesis by allogeneic T cell cultures. A mechanistic analysis revealed the ability of Dex to dampen T3 responses through modulation of Akt phosphorylation and cytoplasmic-nuclear shuttling of nuclear factor- κ B (NF- κ B). In addition, Dex decreased TR β 1 expression in both immature and T3-matured DCs through mechanisms involving the GC receptor. Thus GCs, which are increased during the resolution of inflammatory responses, counteract the immunostimulatory effects of T3 on DCs and their ability to polarize adaptive immune responses toward a T helper (Th)-1-type through mechanisms involving, at least in part, NF- κ B- and TR β 1-dependent pathways. Our data provide an alternative mechanism for the anti-inflammatory effects of GCs with critical implications in immunopathology at the cross-roads of the immune-endocrine circuits.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Glucocorticoids (GCs) are widely used as anti-inflammatory and immunosuppressive agents in many autoimmune and allergic diseases and in transplantation to prevent rejection. These steroid hormones are biological mediators naturally released during the course of inflammatory or stress responses [1]. Synthesis of GCs

provokes a crucial negative feedback that limits the magnitude of immune responses, thus preventing potential damage to the host.

GCs affect growth, differentiation and function of many immune cell types, including T cells, macrophages, monocytes and dendritic cells (DCs). Most of their immunosuppressive effects are mediated through cytosolic ligand-inducible receptors [2]. Inactive GC receptors (GRs) are associated with heat shock proteins, which act as chaperones. Upon GC binding, this complex dissociates and the activated GR translocates to the nucleus where it binds to specific DNA motifs (GC-responsive elements) and to transcription factors such as activator protein 1 (AP1) and nuclear factor κ B (NF- κ B), thereby regulating the expression of a number of genes involved in the resolution of immune responses [3,4]. Through regulation of gene expression, GCs attenuate the production of pro-inflammatory mediators, including cytokines (interleukin 1 [IL-1], IL-2, tumor necrosis factor- α [TNF- α], interferon- γ

* Corresponding author. Address: Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI-CONICET), Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Haya de la Torre esq., Medina Allende, Ciudad Universitaria, 5000 Córdoba, Argentina. Tel.: +54 351 4334187; fax: +54 351 4333048.

E-mail address: claudia@mail.fcq.unc.edu.ar (C.G. Pellizas).

¹ These authors contributed equally to this work.

[IFN- γ]), prostaglandins and nitric oxide. Moreover, GCs also inhibit expression of cell adhesion molecules involved in immune cell trafficking and may induce selective death of effector T cells [5–7].

The immunoregulatory activities of GCs have been primarily attributed to their ability to influence the T lymphocyte compartment [8]. However, it is now clear that they can also affect other cells within the immune system network. In this regard, several studies highlighted a main role for antigen-presenting cells (APCs) as mediators of GC-mediated immunosuppression. Among APCs, DCs are believed to be the most efficient cells capable of stimulating naive T lymphocytes and inducing antigen-specific immune responses [9]. Given the remarkable plasticity of these cells, manipulation of their function to favor the induction of DCs with immunogenic or tolerogenic properties could be exploited in order to stimulate or attenuate immune responses [10].

DCs can display two phenotypic stages, being either immature or mature which is eventually reflected by their different functional properties. DCs patrolling peripheral tissues which are in direct contact with the external environment are in an immature state (iDCs), scanning self and foreign antigens. In the absence of inflammatory stimuli, these cells exhibit high endocytic capacity and express low levels of major histocompatibility complex class II (MHC II) and co-stimulatory molecules. iDCs may be activated by inflammatory stimuli derived from tissue injury, necrotic cells or pathogens, leading to the generation of mature DCs (mDCs). During this process DCs up-regulate expression of the MHC II and co-stimulatory molecules, secrete a wide variety of pro-inflammatory cytokines, reduce the ability of taking up antigens, and augment their ability to stimulate T cells [11]. After *in vitro* or *in vivo* exposure to lipopolysaccharides (LPS) or other microbial products, DCs undergo activation and maturation through different signaling pathways including mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MAPKK1)/extracellular signal-regulated kinase (ERK), which favors DC survival, and the Akt- and NF- κ B pathways, which allow for DC maturation [12,13]. Signaling through NF- κ B also determines the increased expression of MHC II and co-stimulatory molecules, release of pro-inflammatory cytokines and chemokines, and DC recruitment to secondary lymphoid organs. This coordinated process leads to sustained T-cell stimulatory capacity and IL-12 production, which results in the induction of protective T helper (Th)-1-type immunity [12].

GCs may influence DCs virtually at all levels of the differentiation or maturation process. While they stimulate antigen uptake, GCs can also suppress T cell activation through inhibition of MHC II, co-stimulatory molecules and cytokine expression. In addition, GCs not only suppress DC activity, they also endow DCs with tolerogenic properties through induction of IL-10 synthesis [14].

Thyroid hormones (THs) are essential for normal growth, development, differentiation and metabolism. The classic genomic actions of THs are mediated by nuclear TH receptors (TRs) that act as hormone-inducible transcription factors. TRs are encoded by two different gene loci, *TRA* and *TRB*. The *TRA* gene, located on chromosome 17, encodes one triiodothyronine (T₃)-binding TR α 1 and two splicing variants (TR α 2 and TR α 3). These TR α 1 variants have no T₃-binding activity. Truncated TRs, transcribed from an internal promoter, give rise to TR $\Delta\alpha$ 1 and TR $\Delta\alpha$ 2 that retain most of the T₃-binding domain. Through alternative promoter usage, the *TRB* gene yields TR β 1, TR β 2, TR β 3 and the truncated variant TR $\Delta\beta$ 3 which is unable to bind the thyroid hormone. The TR α 1, TR α 2, TR β 1 and TR β 3 isoforms are widely expressed, whereas TR β 2 is predominantly restricted to the hypothalamus-pituitary axis. However, the notion of classical or genomic mechanisms as unique actions mediated by TRs has been challenged in the past decade by descriptions of TH actions that involve extranuclear (nongenomic) effects in a variety of cell types. These TH-dependent pathways are associated with extranuclear TRs localized within the

cytoplasm and the plasma membrane and to TH-dependent effects mediated by the cell surface $\alpha\beta\gamma$ 3 integrin. Several cytoplasmic T₃ actions mediated by TRs are linked to activation of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway in alveolar cells and human fibroblasts. Moreover, activation of Akt, a critical component of cell growth and survival, has been detected in islet β cells upon engagement of TR β 1 and activation of PI3K-p85 [15].

A characteristic of T₃ action is the multihormonal interaction in the final expression of a specific metabolic effect. Several reports indicated that T₃ increases rat growth hormone synthesis in rat pituitary cell lines and that GCs synergistically stimulate T₃ action at this level [16]. Diverse reports have also demonstrated that GCs increase the mRNAs of T₃-regulated hepatic genes [17–19]. Dexamethasone (Dex), a synthetic GC, has been reported to potentiate T₃-induced metamorphosis and increase TRs in *Xenopus* tadpole tails [20]. In this regard, we have demonstrated that Dex enhances T₃-dependent actions in the liver through an increase of TR β 1 expression [21].

Recently, we provided the first evidence of the expression of TRs in both immature and LPS-matured bone marrow-derived mouse DCs, showing higher expression of TR β 1 than TR α 1. Strikingly, the expression of cytoplasmic TR β 1 was markedly increased compared with that of nuclear TR β 1. Furthermore, we found that physiological levels of T₃ stimulated the expression of DC maturation markers (MHC II, CD80, CD86 and CD40), markedly increased the secretion of IL-12, and stimulated the ability of DCs to induce naive T cell proliferation and IFN- γ production in allogeneic T cell cultures [22]. Analysis of the mechanisms involved in these effects revealed the ability of T₃ to increase Akt phosphorylation independently of PI3K activation, which was essential for supporting T₃-induced DC maturation and IL-12 production. This effect was dependent on intact TR β 1 signaling as small interfering RNA-mediated silencing of TR β 1 expression prevented T₃-induced DC maturation and IL-12 secretion as well as Akt activation. In turn, T₃ up-regulated TR β 1 expression through mechanisms involving NF- κ B signaling facilitating a positive regulatory loop to control hormone-dependent TR β 1 signaling [23].

In the present study we aim to examine the interplay between THs and GCs within the DC compartment and to analyze the molecular mechanisms underlying these biological effects.

2. Experimental

2.1. Mice

Female C57BL/6 (B6; H-2b) mice were obtained from Ezeiza Atomic Center (Buenos Aires, Argentina). Mice were maintained under specific pathogen-free conditions and used at 6–10 week-old. Animal protocols were in compliance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the NIH and the local institutional animal care committee.

2.2. DC preparation and culture

DCs were obtained as described by Inaba et al. [24]. Briefly, bone marrow progenitors were collected from the femurs of C57BL/6 mice, cultured in RPMI 1640 10% fetal calf serum (FCS) depleted of THs by treatment with resin AG-1-X8 (Bio-Rad), in the presence of GM-CSF from supernatant of J558 cell line and fed every 2 days. At day 8 of cell culture, >85% of the harvested cells expressed MHC II, CD40, CD80 and CD11c, but not Gr-1. iDCs were cultured with T₃ (5 nM, DC_{T₃}), lipopolysaccharides (LPS; 100 ng/mL; *Escherichia coli* strain 0111:B4; Sigma; DC_{LPS}), Dex (10 nM, DC_{Dex}) and RU486 (10⁻⁸ to 10⁻⁶ M, DC_{RU486}) for different time periods. Parallel cultures were maintained without stimuli and used as controls (DC).

T3 (3,3',5-triiodo-L-thyronine), Dex and RU486 were purchased from Sigma Chemical Co. (USA) and prepared according to the manufacturer's recommended protocol.

2.3. Flow cytometric analysis of DC phenotype

DCs were washed twice with PBS supplemented with 2% (vol/vol) FCS and resuspended in 10% (vol/vol) FCS in PBS. Cells were then incubated with the following fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies (mAbs) for 30 min at 4 °C: fluorescein isothiocyanate (FITC)-anti-CD11c, phycoerythrin (PE)-anti-IA/IE (MHC II), PE-anti-CD40, PE-anti-CD80, and PE-anti-CD86 (all from BD PharMingen, San Diego, California, USA). Cells were then processed and analyzed in an FACS canto II flow cytometer (BD Biosciences PharMingen, NJ, USA) using FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR, USA).

2.4. Cytokine determination

Intracellular cytokine detection was assessed by flow cytometry as described [25] using PE-conjugated anti-IL-12 mAb (BD Biosciences PharMingen, New Jersey, USA). Briefly, DCs incubated with T3 or LPS in presence of Dex, were exposed to brefeldin A (10 µg/ml; Sigma) for the last 4 h of cell culture. Cells were then fixed with 1% (vol/vol) paraformaldehyde, treated with FACS permeabilizing solution and stained with an optimal concentration of anti-cytokine mAb or an appropriate isotype control (all from BD Biosciences PharMingen). Cells (at least 10,000 viable cells) were then analyzed in FACS canto II flow cytometer (BD Biosciences PharMingen, New Jersey, USA) using FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR).

IL-12p70, IL-10 and IFN-γ detection was performed in cell culture supernatants using standard capture enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) (BD Biosciences PharMingen, New Jersey, USA). Coating Abs included a rat anti-mouse IL-12p70 mAb (clone C15.6), rat anti-mouse IL-10 mAb (clone JES5-2A5) and rat anti-mouse IFN-γ mAb (clone R4-6A2). Detection Abs included biotinylated rat anti-mouse IL-12p70 mAb (clone C17.8), biotinylated rat anti-mouse IL-10 mAb (clone SXC-1) and biotinylated rat anti-mouse IFN-γ mAb (clone XMG1.2). Streptavidin-horseradish peroxidase and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine were used as enzyme and substrate, respectively.

2.5. Allogeneic T cell cultures

Allogeneic T cell cultures were performed to assess the ability of DCs to stimulate allogeneic splenocytes *in vitro* as described [22]. Briefly, allogeneic splenocytes (1×10^5 cells/well, responder cells) were incubated for 3 days with irradiated DCs (30 Gy, stimulator cells) at a ratio of 1:15 (DC/splenocytes) in 96-well round-bottom plates. On day 2, 0.5 µCi (0.0185 MBq)/well of [³H]-thymidine (Amersham Life Sciences, Buckinghamshire, UK) was incorporated into each well for 18 h. Proliferation was determined as counts per minute of triplicate determinations.

2.6. Apoptosis assay

DC apoptosis was analyzed by flow cytometry following double labeling of cells with FITC-conjugated annexin V Ab and 7-amino-actinomycin D (7-AAD) as described [26].

2.7. Preparation of total, nuclear and cytoplasmic extracts

To obtain DC total cell lysates, 5×10^6 cells were resuspended in 100 µl of RIPA buffer and protease inhibitors, and incubated on ice for 30 min, followed by removal of DNA and cell debris by

centrifugation at 10,000g for 20 min at 4 °C. Nuclear and cytoplasmic DC extracts were obtained by subcellular fractionation as described previously [27]. Briefly, 6×10^6 cells were resuspended in 200 µl of buffer (10 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) Then, 25 µl of 10% (vol/vol) Nonidet P-40 were added and the solution was incubated on ice for 15 min. The supernatant containing cytoplasm was collected by centrifugation. The nuclear pellet was resuspended in 50 µl of ice-cold buffer (20 mM HEPES, pH 7.9, 0.4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride), and the tube was vigorously rocked at 4 °C for 15 min on a shaking platform. The nuclear extract was centrifuged for 5 min in a microcentrifuge at 4 °C, and the supernatant was collected. Total protein concentration was measured by the Bradford technique [28]. The reactions which involved Phospho-Akt immunodetection were stopped at the indicated times by adding cold saline solution and samples were centrifuged. Cell pellets were resuspended in loading buffer (60 mM Tris, pH 6.8, 2.3% SDS, 10% glycerol, 0.01% bromophenol blue, and 5% 2-ME) and boiled at 96 °C for 5 min. Aliquots were stored at –80 °C until use for Western blotting.

2.8. Western blotting

Antibodies directed to TRβ₁ (sc-738 mouse monoclonal), NF-κB-p65 (sc-8008 mouse monoclonal), Actin (sc-8432 mouse monoclonal) and HRP-conjugated anti-mouse or anti-rabbit IgG were obtained from Santa Cruz Biotechnology, Inc (Santa Cruz, California, USA). Abs directed to Phospho-Akt (5473, rabbit monoclonal) and IκB-ε (611408, mouse monoclonal) was purchased from Cell Signaling Technology, Inc (Massachusetts, USA) and BD Biosciences (PharMingen, New Jersey, USA), respectively.

DC extracts were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes (Biorad Laboratories, Hercules, California, USA), and then blocked with 5% bovine albumin in PBS containing 0.05% Tween 20. Membranes were then blotted with Abs against TRβ₁, NF-κB-p65, Actin, Phospho-Akt (1:1000 dilution) and IκB-ε (1:500 dilution) followed by HRP-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG. Specific bands were developed by ECL (Amersham Life Sciences, Buckinghamshire, UK). Control of protein loading was revealed by actin immunodetection in the same blots.

2.9. Statistical analysis

Analysis of intergroup differences was conducted by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Student–Newman–Keuls test. *P* values less than 0.05 were considered statistically significant. All experiments were performed at least in triplicate.

3. Results

3.1. Dex prevents T3-induced DC maturation

To analyze the interplay between T3 and GCs in the control of immune cell functions we studied the effects of Dex on T3-induced DC maturation and function. For this, we first cultured iDCs with T3 (DC_{T3}) or LPS (positive control, DC_{LPS}) in the absence or the presence of Dex (DC_{Dex}) and evaluated the cell surface phenotype (MHC II, CD40, CD80 and CD86). As shown in Fig. 1, treatment of DCs with Dex alone (DC_{Dex}) did not alter the levels of CD40 and MHC II expression, yet it significantly inhibited expression of co-stimulatory molecules including CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2). As expected, T3 and LPS both induced DC maturation, as demonstrated by the increased levels of MHC II, CD40, CD80 and CD86 on the

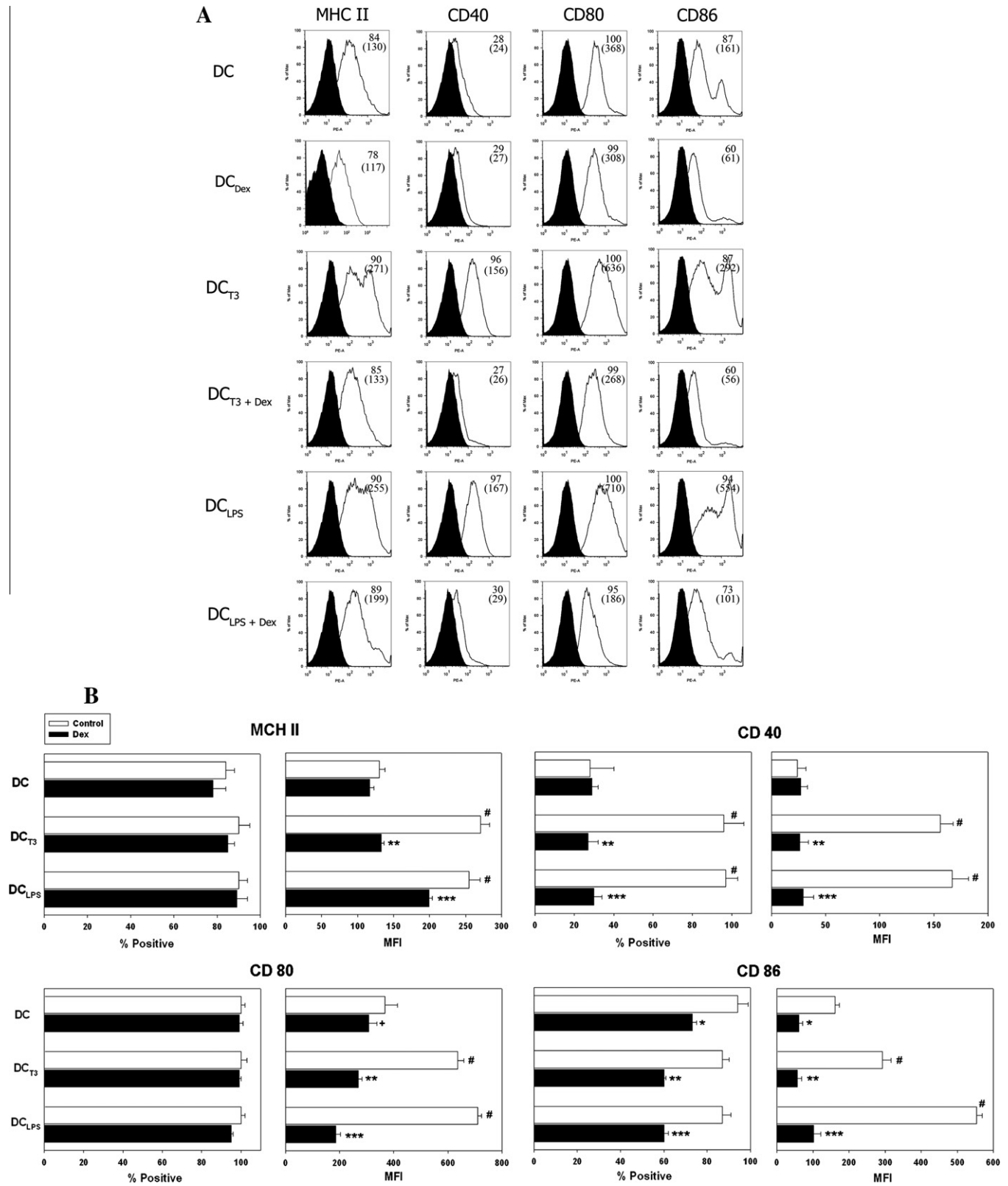


Fig. 1. Effect of Dex on cell surface phenotypic markers of T3-matured DCs. Bone marrow-derived iDCs differentiated with GM-CSF for 8 days (DC) were subjected to maturation with T3 (5 nM, DC_{T3}) or LPS (100 ng/ml, positive control, DC_{LPS}) in the absence or the presence of Dex (10 nM, DC_{Dex}) for 18 h. Cell surface phenotype was analyzed by flow cytometry of DC using PE-conjugated anti-MHC II (IA/IE), anti-CD40, anti-CD80 and anti-CD86 mAbs. (A) Representative histograms of three independent experiments are gated on CD11c⁺ cells. Upper values represent percentages of positive cells, whereas lower values represent mean fluorescence intensity (MFI). Black histograms, nonspecific binding determined with isotype-matched control antibodies; white histograms, phenotypic markers. (B) Results are expressed as the percentage of positive cells (left panel) and MFI (right panel) within the CD11c⁺ population. Data are expressed as mean ± SD and are from a representative experiment from a total of three with similar results, **p* < 0.001, ***p* < 0.001, **p* < 0.05 vs DC Control, ***p* < 0.001 vs DC_{T3} Control; ****p* < 0.001 vs DC_{LPS} Control.

surface of bone marrow-derived DCs. Addition of Dex and T3 to DC cultures resulted in downregulation of MHC II and co-stimulatory molecules. As previously reported, LPS-matured DCs showed decreased expression of MHC II, CD40, CD80 and CD86 when exposed to Dex [29]. These results indicate an inhibitory role of GCs in T3-induced DC maturation.

3.2. Dex controls the balance of pro- and anti-inflammatory cytokines in T3-matured DC

To investigate whether the inhibition in the maturation phenotype induced by Dex in T3-matured DCs was associated with a modified cytokine profile, we examined the ability of Dex to modulate cytokine production induced by T3. As expected, DCs exposed to T3 and LPS showed a significant increase in the frequency of IL-12-producing CD11c⁺ DCs (Fig. 2A and B). Exposure to maturing DCs to Dex significantly suppressed their ability to produce IL-12 in response to T3 or LPS. To determine whether this effect was mediated by the steroid hormone receptor GR, T3 or LPS-matured DCs were pretreated with the GR antagonist RU486. As shown in Fig. 2A and B, Dex-inhibition of pro-inflammatory cytokine production induced by T3 or LPS was mediated through GR as RU486 hin-

dered Dex-suppression of IL-12 production induced by either T3 or LPS. Consistently, Dex treatment induced a significant decrease in IL-12 secretion in DC cultures exposed to both T3 and LPS (Fig. 2C). In contrast, the anti-inflammatory cytokine IL-10 was higher in T3- and LPS- treated DCs incubated with Dex when compared to control DCs or DCs matured with T3 or LPS in the absence of Dex (Fig. 2D).

3.3. Dex abrogates the T-cell allostimulatory capacity of T3-matured DCs

Given the inhibitory effects of Dex on T3- or LPS-matured DCs, we assessed their allostimulatory capacity. As expected, proliferation of BALB/c (H-2d) splenocytes was strongly enhanced in response to co-culture with irradiated T3- and LPS-conditioned DCs (C57BL/6) (Fig. 3). Of note, DC treatment with Dex alone did not alter splenocyte proliferation when compared with control DCs. In contrast, the presence of Dex eliminated the ability of T3- or LPS-matured DCs to induce splenocyte proliferation.

As GCs have been reported to induce DC apoptosis under certain conditions [30] we examined whether the recorded effect was the result of Dex-induced DC death. For this purpose, we stained Dex/

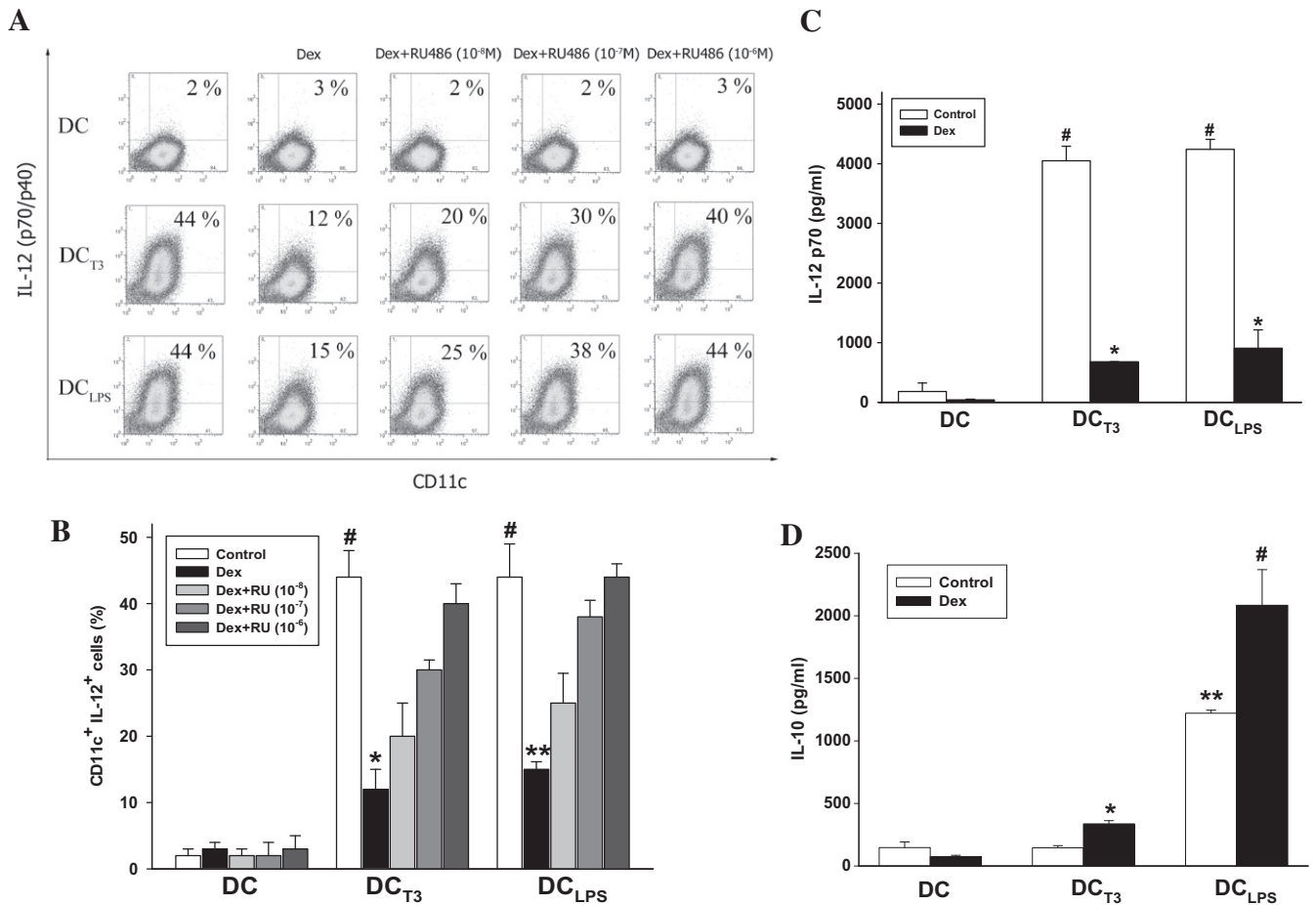


Fig. 2. Effect of Dex in the modulation of IL-12/IL-10 cytokine balance in T3-matured DCs. Bone marrow-derived iDCs differentiated with GM-CSF for 8 days (DC) were subjected to maturation with T3 (5 nM, DC_{T3}) or LPS (positive control, 100 ng/ml, DC_{LPS}) in the absence or the presence of Dex (10 nM, DC_{Dex}) or Dex + RU486 (steroid hormone antagonist, 10⁻⁸ to 10⁻⁶ M) for 18 h. (A and B) For intracytoplasmic cytokine staining, cells were incubated with brefeldin A for 4 h, stained for CD11c, fixed, permeabilized, and then stained with anti-IL-12p70 mAb as described in Section 2. The frequency of CD11c⁺ IL-12⁺ cells was determined by flow cytometry. (A) Representative intracytoplasmic IL-12 flow cytometric analysis. (B) Values are given as the percentage of total CD11c⁺ IL-12⁺ cells. Data are expressed as mean ± SD and are from a representative experiment from a total of three with similar results, [#]*p* < 0.001 vs DC Control, ^{*}*p* < 0.001 vs DC_{T3} Control, ^{**}*p* < 0.001 vs DC_{LPS} Control. (C) IL-12p70 production was determined in culture supernatants by ELISA. Data are expressed as mean ± SD (pg/ml) and are from a representative experiment from a total of three with similar results, [#]*p* < 0.001 vs DC Control; ^{*}*p* < 0.001 vs DC_{T3} Control, ^{**}*p* < 0.001 vs DC_{LPS} Control. (D) IL-10 production was determined in culture supernatants by ELISA. Data are expressed as mean ± SD (pg/ml) and are from a representative experiment from a total of three with similar results, ^{**}*p* < 0.01 vs DC Control; [#]*p* < 0.01 vs DC_{LPS} Control.

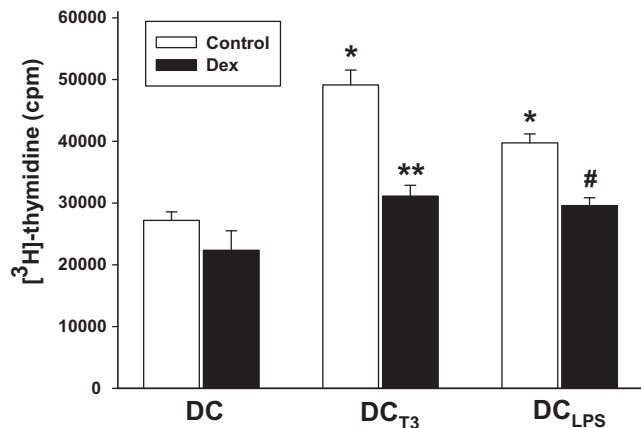


Fig. 3. Impact of Dex on the allostimulatory capacity of T3-matured DCs: effects on splenocyte proliferation. Bone marrow-derived iDCs were stimulated with T3 (5 nM, DC_{T3}) or LPS (positive control, 100 ng/ml, DC_{LPS}) in the absence or the presence of Dex (10 nM). After 18 h, DCs were extensively washed, irradiated, and cultured with allogeneic splenocytes for 3 days at 1:15 stimulator/responder (DC/splenocyte) ratio. Proliferation of allogeneic splenocytes was quantified by [³H-thymidine] uptake. Data are expressed as mean ± SD (cpm) and are from a representative experiment from a total of three experiments with similar results, **p* < 0.001 vs DC Control; ***p* < 0.001 vs DC_{T3} Control; #*p* < 0.01 vs DC_{LPS} Control.

T3-matured DCs with anti-annexin-V Ab and 7-AAD to detect early apoptotic cells. Remarkably, Dex did not increase the percentage of apoptotic cells over the 18 h-treatment period examined (data not shown), suggesting that inhibition of splenocyte proliferation induced by Dex/T3-treated DCs was not due to increased apoptosis or DC death.

In turn, reduction of the allostimulatory capacity of T3- and LPS-matured DCs induced by Dex was also evidenced by the lower production of the effector cytokine IFN- γ in culture supernatants of splenocytes co-cultured with Dex and T3- or LPS-conditioned DCs (Fig. 4A). In agreement, secretion of IL-10 was substantially increased on T cells co-cultured with allogeneic T3- or LPS-conditioned DCs in the presence of Dex (Fig. 4B). These data indicate that Dex counteracts the immunostimulatory capacity of DCs matured in the presence of T3.

3.4. Dex prevents T3-induced Akt activation

As T3 induces Akt phosphorylation which in turn favors maturation and T-cell stimulatory function of DCs [23] and these effects are diminished in the presence of Dex, we then investigated the effects of Dex on T3-induced Akt activation. Phosphorylation of Akt was examined in total cellular extracts from DCs exposed at various time points (5, 15, 30, 60 min and 18 h) to T3 stimulation in the presence or the absence of Dex. As expected, a significant increase in Ser 473 phosphorylation of Akt was detected as early as 5 min following exposure of DCs to T3 with a peak at 15 min of incubation. The increase in Akt phosphorylation persisted even at 18 h following addition of the thyroid hormone (Fig. 5A and B). The presence of Dex not only delayed the kinetics of T3-induced Akt phosphorylation, as the peak was detected at 30 min of incubation (Fig. 5A and B), but it also induced less phosphorylation at all time points analyzed when compared with T3 alone. Interestingly, Akt activation in Dex/T3-stimulated DCs reached levels comparable to control DCs after 18 h of cell culture.

3.5. Dex inhibits TR β_1 expression on DC through a GR-dependent mechanism

Given the ability of GCs to modulate TH actions through TR modulation [21], the positive effects of T3 on TR β_1 expression

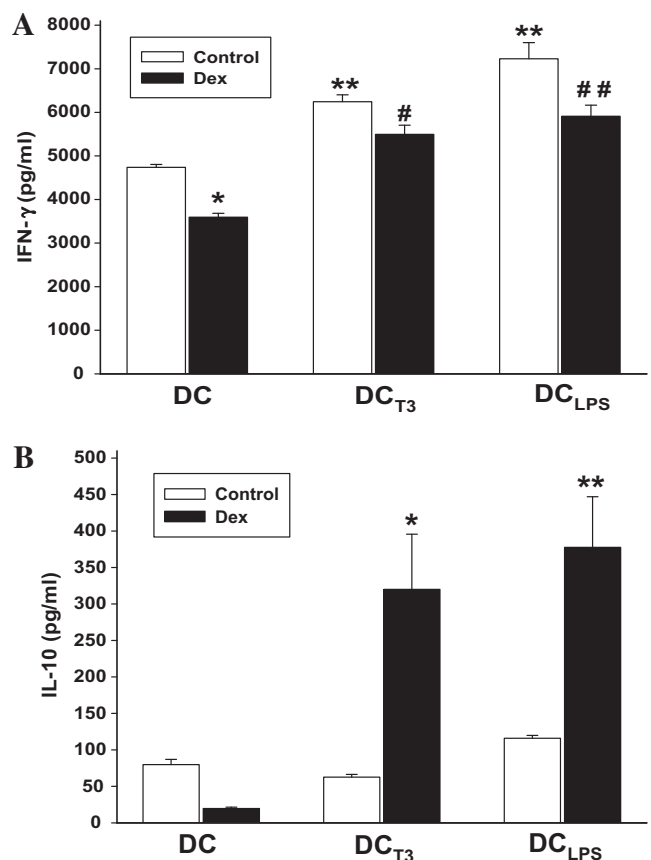


Fig. 4. Influence of Dex on the allostimulatory capacity of T3-conditioned DCs: effects on splenocyte-derived cytokine secretion. Bone marrow-derived iDCs were stimulated with T3 (5 nM, DC_{T3}) or LPS (positive control, 100 ng/ml, DC_{LPS}) in the absence or the presence of Dex (10 nM). After 18 h, DC were extensively washed, irradiated, and cultured with allogeneic splenocytes for 3 days at 1:15 stimulator/responder (DC/splenocyte) ratio. IFN- γ (A) and IL-10 (B) production were measured in culture supernatants by ELISA. (A) Results are expressed as mean ± SD (pg/ml) from a representative experiment from a total of three with similar results, **p* < 0.01; ***p* < 0.01 vs DC Control; #*p* < 0.05 vs DC_{T3} Control; ##*p* < 0.01 vs DC_{LPS} Control. (B) Results are expressed as mean ± SD (pg/ml) from a representative experiment from a total of three with similar results, **p* < 0.001 vs DC_{T3} Control; ***p* < 0.001 vs DC_{LPS} Control.

and the pivotal role of TR β_1 on the stimulatory effects of T3 and Akt phosphorylation [23], we evaluated the effects of Dex on TR β_1 expression in T3-matured DCs. Dex treatment of both iDCs (DC) and DCs matured with LPS (DC_{LPS}) led to a significant decrease in the expression of TR β_1 (Fig. 6A and B). Furthermore, Dex-induced inhibition of TR β_1 expression was abolished by RU486, suggesting involvement of GR leveling this regulatory effect. Likewise, Dex prevented T3-induced up-regulation of TR β_1 through a mechanism involving the GR.

3.6. Dex attenuates T3-induced cytoplasmic-nuclear shuttling of the NF- κ B transcription factor

Since T3 induces cytoplasmic-nuclear shuttling of the NF- κ B transcription factor to modulate DC functionality [22] and the NF- κ B pathway is directly involved in TR β_1 expression [23], we next evaluated the effects of Dex on cytoplasmic and nuclear levels of NF- κ B-p65 and I κ B- ϵ in T3-matured DCs. In agreement with our previous report, T3 increased the presence of NF- κ B-p65 in the nucleus and significantly reduced cytoplasmic NF- κ B-p65 as well as total I κ B- ϵ levels (Fig. 7A and B). Addition of Dex abolished these

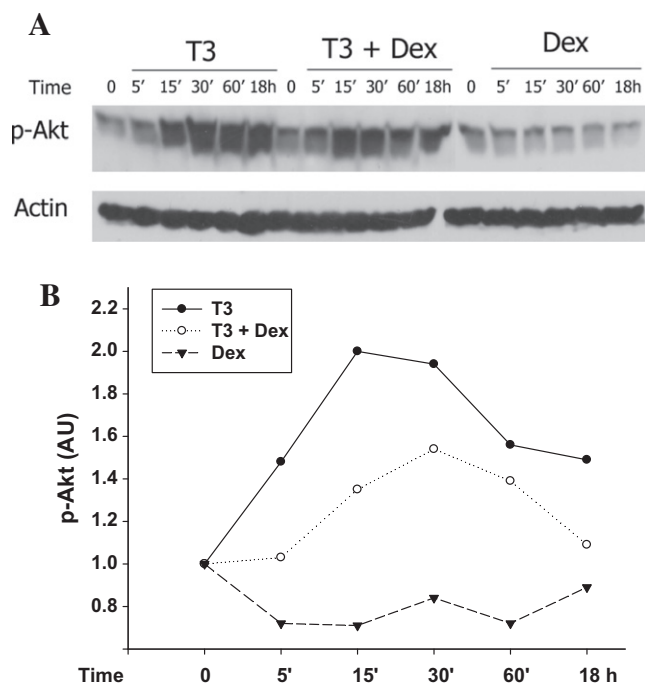


Fig. 5. Effect of Dex on T3-induced Akt phosphorylation on DCs. Bone marrow-derived iDCs differentiated with GM-CSF for 8 days were subjected to maturation with T3 (5 nM) in the absence or the presence of Dex (10 nM). After different time periods, cells were harvested and lysates were prepared and analyzed by Western blot for phosphorylated Akt (p-Akt). (A) Representative Western blot analysis of p-Akt is shown. Lower panel shows the same blot probed for actin to check equal loading of samples. (B) Results are expressed as arbitrary units (AU) obtained from the densitometric analysis of each p-Akt signal normalized to the actin signal in the same lane in one representative experiment from a total of three independent assays with similar results.

effects, indicating that the inhibitory activity of Dex on T3 effects involves, at least in part, modulation of the NF- κ B pathway.

4. Discussion

DCs are critical “decision-making” cells that must integrate signals from several pathways and receptors, including those arising from engagement of uptake and pattern recognition receptors, pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines, chemokines and hormones to determine the type and magnitude of adaptive immune responses [31]. Biological signals that control these cells can ultimately drive the direction of antigen-specific immune responses. GCs and THs are primary regulators of metabolic and endocrine processes, but they also have essential roles in immune and inflammatory responses [32,22]. Our study reports a major inhibitory role of GCs on the immunostimulatory capacity of T3-induced mature DCs and the molecular mechanisms underlying this effect.

Although the effects of Dex on LPS-activated DCs are well established [33,34] and the action of T3 and LPS in DC are exerted in a similar fashion, the mechanisms underlying T3-immunostimulatory effects do not involve the main signaling pathways activated by LPS [23,12,13]. Therefore, the effects of Dex on the biological activities of T3 cannot be predicted in advance. Exposure of iDCs to Dex considerably prevents the ability of T3 to promote DC maturation and drive T-cell activation and Th1 polarization. In fact, the MHC II and co-stimulatory molecules are substantially downregulated when mDCs are exposed to Dex. This effect is also reflected by the reduced frequency of CD11c⁺ DCs producing IL-12, a potent pro-inflammatory cytokine responsible of generating Th1 cells

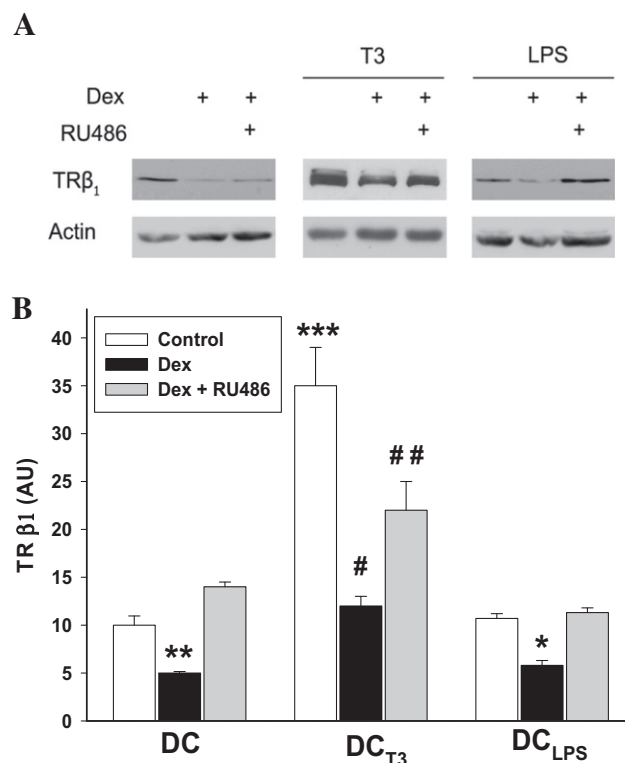


Fig. 6. Effect of Dex on TR β 1 expression on DCs. Bone marrow-derived iDCs differentiated with GM-CSF for 8 days (DC) were matured by T3 (5 nM, DC_{T3}) or LPS (positive control, 100 ng/ml, DC_{LPS}) in the absence or the presence of Dex (10 nM) or Dex + RU486 (10 nM) (steroid hormone antagonist) for 24 h. (A) Representative Western blot analysis of protein extracts (40 μ g) for immunodetection of TR β 1. Actin was used as a control of equal protein loading (lower panel). (B) Densitometric analysis of immunoreactive protein bands. Results are expressed as arbitrary units (AU) calculated from the densitometric analysis of each TR β 1 signal normalized to the actin signal in the same lane. Data are expressed as mean \pm SD and are from one representative experiment from a total of three with similar results. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 vs DC Control, * p < 0.001 vs DC_{T3} Control, ** p < 0.05 vs DC_{T3} + Dex.

which battle against intravesicular pathogens and tumors but also initiate autoimmune disorders. Interestingly, the ability of RU486 to counteract the inhibitory effects of GCs, strongly suggests the involvement of GR, disregarding unspecific membrane effects [35,2,36]. In turn and accordingly to the results presented, it is well known that GCs are potent inhibitors of LPS- or CD40L-induced phenotypic DC maturation and production of the pro-inflammatory cytokines IL-12p70 and TNF- α [37]. Moreover, RU486 prevented Dex-induced inhibition of TNF- α and IL-1 β production by both rat bone marrow-derived and splenic DCs, indicating that GC effects on LPS-matured DCs are mediated through GR [34]. In agreement, corticosterone, the endogenous murine GC, functionally impaired DC maturation and cytokine production and reduced the ability of DC to prime naive CD8⁺ T cells *in vivo*. This inhibition occurred via the GR with concentrations of corticosterone similar to those observed in animals undergoing stress responses [38].

We have previously found that, unlike LPS, T3 was not able to induce the synthesis of IL-10 by DCs [22]. Although Dex alone do not alter the synthesis of IL-10 in cultured DCs, this anti-inflammatory cytokine is increased in T3-conditioned DC cultures similarly to LPS-stimulated DCs following Dex treatment in agreement with previous reports [34,39]. These findings support the regulatory role of GCs in attenuating T3-dependent pro-inflammatory effects. Accordingly, we find an altered cytokine balance in the presence of Dex with an increased IL-10/IFN- γ ratio following co-culture of

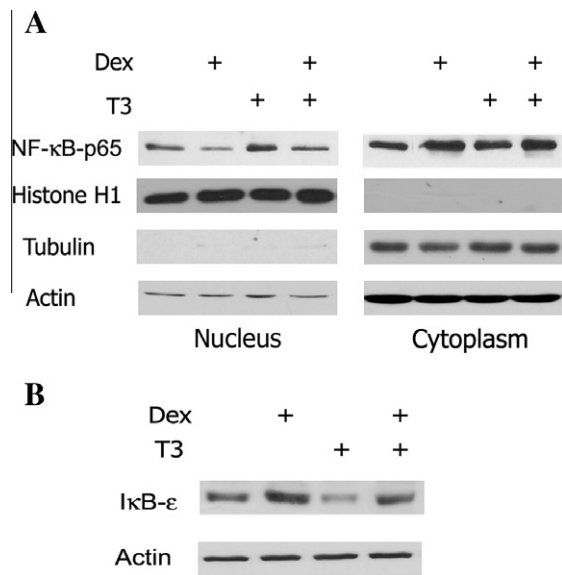


Fig. 7. Effect of Dex on cytoplasmic-nuclear shuttling of NF-κB-p65 and the levels of IκB-ε in T3-matured DCs. Bone marrow-derived iDCs differentiated with GM-CSF for 8 days were matured by T3 (5 nM) in the absence or the presence of Dex (10 nM) for 18 h. **(A)** Representative Western blot analysis of nuclear and cytoplasmic DC extracts (40 μg) for immunodetection of NF-κB-p65. Anti-Histone H1 and tubulin Abs were used to control the purity of subcellular fractions. Actin was used as a control of equal protein loading (lower panel). **(B)** Representative Western blot analysis of protein extracts (40 μg) for immunodetection of IκB-ε. Actin was used as a control of equal protein loading (lower panel).

allogeneic T cells with T3-conditioned DCs (DC_{T3}). Taken together, these data demonstrate that DCs treated with Dex maintain an immature or tolerogenic state even in the presence of T3 where they preferentially secrete the immunomodulatory cytokine IL-10 rather than the pro-inflammatory counterpart IL-12, favoring T cell tolerance and suppression of host immunity [22]. In this regard, treatment of developing DCs with IL-10 promotes the generation of immature tolerogenic DCs that induce anergic CD4⁺ and CD8⁺ T cells *in vitro*, and regulatory CD4⁺ T cells *in vivo* [40,41]. Interestingly, other groups have reported an altered DC-cytokine profile in the presence of Dex and other corticosteroids with increased IL-10 production [42,43,33] and a durable immature state, which could have been the result of high endogenous production of IL-10 [44]. Furthermore, Woltman et al. have shown that hyporesponsiveness and anergic states could be reversed by blocking both IL-10 and the inhibitory molecule programmed cell death ligand-1 (PD-L1) on DCs [45]. However, other studies showed that anti-IL-10 antibodies were unable to reduce DC induction of regulatory T cells [46], suggesting alternative mechanisms involved in this effect. In this regards, we have recently identified a tolerogenic circuit propagated from DCs to T cells by which galectin-1, a β-galactoside-binding lectin, drives the differentiation of tolerogenic DCs through mechanisms involving DC-derived IL-27 and T-cell derived IL-10 [47].

Consistently with our previous findings [23], exposure of DCs to T3 results in a rapid and sustained increase in Akt phosphorylation, which was essential for supporting T3-induced DC maturation and IL-12 production. In the present study, T3-induced Akt phosphorylation is rapidly inhibited in the presence of Dex and this inhibition lasts for several hours. These results may be the result of a rapid non-genomic activation and a parallel prolonged genomic regulation of GR-dependent mechanisms [48]. Accordingly, other authors reported the involvement of Akt activation in GC effects on human CD4⁺ T cells [49] and chondrocytes [50].

Although we have demonstrated a physical interaction of GR with a consensus site for GC response element (GRE) present in

the TRβ1 promoter that is responsible for Dex-induced TRβ1 expression in the liver [21], in the present study we find that Dex decreases TRβ1 expression in iDCs, LPS- and T3-matured DCs. Since the magnitude of the cellular response to THs depends on the abundance and/or affinity of TRs, it is possible that alterations in the number or affinity of TRs as a result of physiologic or pathologic stimuli could modify tissue responses to T3 [51]. In this regard, Dex-induced inhibition of TRβ1 expression in DCs should be involved, at least in part, in GC-mediated impairment of the immunostimulatory capacity of T3-induced DCs. The opposite regulation of TRβ1 by Dex in the liver and DCs reinforces the tissue-specific actions of GCs [52]. Accordingly, previous studies reported an increase in vitamin D receptor (a hormone receptor with similar features and mechanisms of action as TR) by GCs in kidney, adipocytes, squamous cell carcinoma and human breast cancer cell lines whereas a considerable decrease was observed in intestinal mucosa [53,54]. In turn, the sensitivity and specificity of the GC response are determined by the complementary actions of individual GR isoforms that contribute to tissue- and cell-specific effects of GCs. The GR gene yields two distinct mRNAs by alternative splicing that result in the production of two GR isoforms termed GRα and GRβ. GRβ does not bind GCs, resides constitutively in the nucleus of cells, and acts as a dominant-negative inhibitor of GRα on genes both positively and negatively regulated by GCs. These GR isoforms show a widespread tissue distribution, but their relative levels differ both within and among tissues [52]. Although a similar GRα mRNA and protein expression in both human monocytes and iDCs has been reported, GRβ mRNA levels remained constant and very low throughout DC differentiation and maturation at 3–4 logs lower than that of GRα [55]. However, GR functionality is modulated at multiple levels that exceed GR isoform profile [56].

Previously, we have demonstrated an increase in cytoplasmic-nuclear shuttling of NF-κB-p65 after exposure of DCs to T3; this effect was associated with increased activity of the NF-κB pathway during T3-induced DC maturation and IL-12 production [22]. Furthermore, the immunostimulatory effects induced by T3 were significantly prevented by specific NF-κB inhibitors and NF-κB-siRNA [23]. The transcription of pro-inflammatory cytokines including IL-12p70 is controlled, at least in part, by the transcription factor NF-κB [57]. In this regard, GC-dependent repression of NF-κB-dependent transcriptional targets through direct physical association between GR and NF-κB in the nucleus has been consistently reported in several studies [58–60]. Moreover, inhibition of NF-κB activity by GCs has been proposed to be mediated by increased synthesis of IκBs, which sequester NF-κB in an inactive cytoplasmic form [61]. Hence, inhibition of T3-effects by Dex on DCs should be achieved, at least in part, through inhibition of NF-κB signaling. Furthermore, reduction of TRβ1 expression may also be explained by the presence of the functional consensus site for NF-κB located –644 to –652 bp up to the starting ATG transcription site of its gene recently reported by our group [23]. Therefore GC inhibition of the NF-κB pathway both at cytoplasmic and nuclear levels may lead to reduced NF-κB-dependent regulation of TRβ1 expression. Interestingly, other nuclear receptors also appear to be regulated by NF-κB; this includes the androgen receptor to which NF-κB specifically binds the –574/–565 promoter region and mediates repression of its transcriptional activity [62].

In conclusion, the results presented here reinforce the dynamic interrelationship between GCs and THs and their tissue-specific regulation and mechanisms of action, highlighting a novel molecular mechanism for the broad anti-inflammatory and immunosuppressive activities of GCs. In particular, our data reveals an inhibitory effect of GCs in T3-induced DC maturation and immunostimulatory capacity through mechanisms involving, at least in part, NF-κB and TRβ1 dependent signaling pathways. As these results were obtained in the presence of physiological T3

concentrations, these findings are relevant given the main role of THs in the initiation of immune responses, the widespread use of GC-based therapies and the prevalence of hypothyroid pathologies.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the National Agency for Promotion of Science and Technology PICT 2008-0890 (to A.M.M.), Ministerio de Ciencia y Tecnología del Gobierno de Córdoba (to C.G.P.), Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (to C.G.P. and A.M.M.), Cancer Research Institute (to G.A.R.) and Fundación Sales (to G.A.R.). M.M.M., G.A.R. and C.G.P. are members of the research career of CONICET. V.A.A., I.D.M. and S.S. are research fellows of CONICET. N.G. is a research fellow of FONCYT.

References

- [1] Zhou J, Cidlowski JA. The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses. *Steroids* 2005;70:407–17.
- [2] Buttgerit F, Straub RH, Wehling M, Burmester GR. Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases: an update on the mechanisms of action. *Arthritis Rheum* 2004;50:3408–17.
- [3] Franchimont D. Overview of the actions of glucocorticoids on the immune response: a good model to characterize new pathways of immunosuppression for new treatment strategies. *Ann NY Acad Sci* 2004;1024:124–37.
- [4] Pratt WB, Galigniana MD, Morishima Y, Murphy PJ. Role of molecular chaperones in steroid receptor action. *Essays Biochem* 2004;40:41–58.
- [5] Ashwell JD, Lu FW, Vacchio MS. Glucocorticoids in T cell development and function. *Annu Rev Immunol* 2000;18:309–45.
- [6] Barnes PJ, Adcock I. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. *Trends Pharmacol Sci* 1993;14:436–41.
- [7] Cohen JJ, Duke RC. Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J Immunol* 1984;132:38–42.
- [8] Almawi WY, Beyhum HN, Rahme AA, Rieder MJ. Regulation of cytokine and cytokine receptor expression by glucocorticoids. *J Leukoc Biol* 1996;60:563–72.
- [9] Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2002;20:621–67.
- [10] Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 2007;449:419–26.
- [11] Torres-Aguilar H, Blank M, Jara LJ, Shoenfeld Y. Tolerogenic dendritic cells in autoimmune diseases: crucial players in induction and prevention of autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2010;10:8–17.
- [12] Bottero V, Withoff S, Verma IM. NF-kappaB and the regulation of hematopoiesis. *Cell Death Differ* 2006;13:785–97.
- [13] Zhang TY, Daynes RA. Glucocorticoid conditioning of myeloid progenitors enhances TLR4 signaling via negative regulation of the phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt pathway. *J Immunol* 2007;178:2517–26.
- [14] Baschant U, Tuckermann J. The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010;120:69–75.
- [15] Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev* 2010;31:139–70.
- [16] Liu L, Dean CE, Porter TE. Thyroid hormones interact with glucocorticoids to affect somatotroph abundance in chicken embryonic pituitary cells in vitro. *Endocrinology* 2003;144:3836–41.
- [17] Menjo M, Murata Y, Fujii T, Nimura Y, Seo H. Effects of thyroid and glucocorticoid hormones on the level of messenger ribonucleic acid for iodothyronine type I 5'-deiodinase in rat primary hepatocyte cultures grown as spheroids. *Endocrinology* 1993;133:2984–90.
- [18] Molero C, Benito M, Lorenzo M. Regulation of malic enzyme gene expression by nutrients, hormones, and growth factors in fetal hepatocyte primary cultures. *J Cell Physiol* 1993;155:197–203.
- [19] Yamaguchi S, Murata Y, Nagaya T, Hayashi Y, Ohmori S, Nimura Y, et al. Glucocorticoids increase retinoid-X receptor alpha (RXRalpha) expression and enhance thyroid hormone action in primary cultured rat hepatocytes. *J Mol Endocrinol* 1999;22:81–90.
- [20] Iwamuro S, Tata JR. Contrasting patterns of expression of thyroid hormone and retinoid X receptor genes during hormonal manipulation of *Xenopus tadpole tail regression* in culture. *Mol Cell Endocrinol* 1995;113:235–43.
- [21] Montesinos MM, Pellizas CG, Velez ML, Susperreguy S, Masini-Repiso AM, Coleoni AH. Thyroid hormone receptor beta1 gene expression is increased by Dexamethasone at transcriptional level in rat liver. *Life Sci* 2006;78:2584–94.
- [22] Mascanfroni I, Montesinos MM, Susperreguy S, Cervi L, Illarregui JM, Ramseyer VD, et al. Control of dendritic cell maturation and function by triiodothyronine. *FASEB J* 2008;22:1032–42.
- [23] Mascanfroni ID, Montesinos MM, Alamino VA, Susperreguy S, Nicola JP, Illarregui JM, et al. Nuclear Factor (NF)-(kappa)B-dependent thyroid hormone receptor {beta}1 expression controls dendritic cell function via Akt signaling. *J Biol Chem* 2010;285:9569–82.
- [24] Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1992;176:1693–702.
- [25] Straw AD, MacDonald AS, Denkers EY, Pearce EJ. CD154 plays a central role in regulating dendritic cell activation during infections that induce Th1 or Th2 responses. *J Immunol* 2003;170:727–34.
- [26] Van Genderen H, Kenis H, Lux P, Ungeth L, Maassen C, Deckers N, et al. In vitro measurement of cell death with the annexin A5 affinity assay. *Nat Protoc* 2006;1:363–7.
- [27] Schreiber E, Matthias P, Muller MM, Schaffner W. Rapid detection of octamer binding proteins with 'miniextracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 1989;17:6419.
- [28] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- [29] Van Duivenvoorde LM, Han WGH, Bakker AM, Louis-Plence P, Charbonnier LM, Apparailly F, et al. Immunomodulatory dendritic cells inhibit Th1 responses and arthritis via different mechanisms. *J Immunol* 2007;179:1506–15.
- [30] Abe M, Thomson AW. Influence of immunosuppressive drugs on dendritic cells. *Transpl Immunol* 2003;11:357–65.
- [31] Dhodapkar MV, Dhodapkar KM, Palucka AK. Interactions of tumor cells with dendritic cells: balancing immunity and tolerance. *Cell Death Differ* 2008;15:39–50.
- [32] Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory action of glucocorticoids – new mechanisms for old drugs. *N Engl J Med* 2005;353:1711–23.
- [33] Piemonti L, Monti P, Allavena P, Sironi M, Soldini L, Leone BE, et al. Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. *J Immunol* 1999;162:6473–81.
- [34] Butts CL, Shukair SA, Duncan KM, Harris CW, Belyavskaya E, Sternberg EM. Effects of dexamethasone on rat dendritic cell function. *Horm Metab Res* 2007;39:404–12.
- [35] Stahn C, Lowenberg M, Hommes DW, Buttgerit F. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. *Mol Cell Endocrinol* 2007;275:71–8.
- [36] Schmid D, Burmester GR, Tripmacher R, Kuhnke A, Buttgerit F. Bioenergetics of human peripheral blood mononuclear cell metabolism in quiescent, activated, and glucocorticoid-treated states. *Biosci Rep* 2000;20:289–302.
- [37] Hackstein H, Thomson AW. Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. *Nat Rev Immunol* 2004;4:24–34.
- [38] Elftman MD, Norbury CC, Bonneau RH, Truckenmiller ME. Corticosterone impairs dendritic cell maturation and function. *Immunology* 2007;122:279–90.
- [39] Rozkova D, Horvath R, Bartunkova J, Spisek R. Glucocorticoids severely impair differentiation and antigen presenting function of dendritic cells despite upregulation of Toll-like receptors. *Clin Immunol* 2006;120:260–71.
- [40] Muller G, Muller A, Tuting T, Steinbrink K, Saloga J, Szalma C, et al. Interleukin-10-treated dendritic cells modulate immune responses of naive and sensitized T cells in vivo. *J Invest Dermatol* 2002;119:836–41.
- [41] Steinbrink K, Graulich E, Kubsch S, Knop J, Enk AH. CD4+ and CD8+ anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood* 2002;99:2468–76.
- [42] Woltman AM, de Fijter JW, Kamerling SW, Paul LC, Daha MR, van Kooten C. The effect of calcineurin inhibitors and corticosteroids on the differentiation of human dendritic cells. *Eur J Immunol* 2000;30:1807–12.
- [43] Rea D, van Kooten C, van Meijgaarden KE, Ottenhoff THM, Melief CJM, Offringa R. Glucocorticoids transform CD40-triggering of dendritic cells into an alternative activation pathway resulting in antigen-presenting cells that secrete IL-10. *Blood* 2000;95:3162–7.
- [44] Xia CQ, Peng R, Beato F, Clare-Salzler MJ. Dexamethasone induces IL-10-producing monocyte-derived dendritic cells with durable immaturity. *Scand J Immunol* 2005;62:45–54.
- [45] Woltman AM, van der Kooij SW, de Fijter JW, van Kooten C. Maturation-resistant dendritic cells induce hyporesponsiveness in alloreactive CD45RA+ and CD45RO+ T-cell populations. *Am J Transplant* 2006;6:2580–91.
- [46] Roelen DL, van den Boogaardt DE, van Miert PP, Koekkoek K, Offringa R, Claas FH. Differentially modulated dendritic cells induce regulatory T cells with different characteristics. *Transpl Immunol* 2008;19:220–8.
- [47] Illarregui JM, Croci DO, Bianco GA, Toscano MA, Salatino M, Vermeulen ME, et al. Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10. *Nat Immunol* 2009;10:981–91.
- [48] Buttgerit F, Scheffold A. Rapid glucocorticoid effects on immune cells. *Steroids* 2002;67:529–34.
- [49] Spies CM, Gaber T, Hahne M, Naumann L, Tripmacher R, Schellmann S, et al. Rimexolone inhibits proliferation, cytokine expression and signal transduction of human CD4+ T-cells. *Immunol Lett* 2010;131:24–32.
- [50] Chrysis D, Zaman F, Chagin AS, Takigawa M, Savendahl L. Dexamethasone induces apoptosis in proliferative chondrocytes through activation of caspases and suppression of the Akt-phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathway. *Endocrinology* 2005;146:1391–7.
- [51] Hodin RA, Lazar MA, Chin WW. Differential and tissue-specific regulation of the multiple rat c-erbA messenger RNA species by thyroid hormone. *J Clin Invest* 1990;85:101–5.

- [52] Oakley RH, Cidlowski JA. Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: new mechanisms for generating tissue-specific actions of glucocorticoids. *J Biol Chem* 2011;286:3177–84.
- [53] Hidalgo AA, Trump DL, Johnson CS. Glucocorticoid regulation of the vitamin D receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010;121:372–5.
- [54] Sun X, Zemel MB. 1 α , 25-dihydroxyvitamin D and corticosteroid regulate adipocyte nuclear vitamin D receptor. *Int J Obes (Lond)* 2008;32:1305–11.
- [55] Freeman L, Hewison M, Hughes SV, Evans KN, Hardie D, Means TK, Chakraverty R. Expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 permits regulation of glucocorticoid bioavailability by human dendritic cells. *Blood* 2005;106:2042–9.
- [56] De Bosscher K, Van Craenenbroeck K, Meijer OC, Haegeman G. Selective transrepression versus transactivation mechanisms by glucocorticoid receptor modulators in stress and immune systems. *Eur J Pharmacol* 2008;583:290–302.
- [57] Laderach D, Compagno D, Danos O, Vainchenker W, Galy A. RNA interference shows critical requirement for NF-kappa B p50 in the production of IL-12 by human dendritic cells. *J Immunol* 2003;171:1750–7.
- [58] Ray A, Prefontaine KE. Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. *PNAS* 1994;91:752–6.
- [59] Scheinman RI, Cogswell PC, Lofquist AK, Baldwin Jr AS. Role of transcriptional activation of I κ B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* 1995;270:283–6.
- [60] De Bosscher K, Schmitz ML, Vanden Berghe W, Plaisance S, Fiers W, Haegeman G. Glucocorticoid-mediated repression of nuclear factor-kappa B dependent transcription involves direct interference with transactivation. *PNAS* 1997;94:13504–9.
- [61] Almawi WY, Melemedjian OK. Negative regulation of nuclear factor-kappa B activation and function by glucocorticoids. *J Mol Endocrinol* 2002;28:69–78.
- [62] Supakar PC, Jung MH, Song CS, Chatterjee B, Roy AK. Nuclear factor kappaB functions as a negative regulator for the rat androgen receptor gene and NF-kappa B activity increases during the age-dependent desensitization of the liver. *J Biol Chem* 1995;270:837–42.

DENDRITIC CELLS MATURED WITH TRIIODOTHYRONINE INDUCE A POTENT ANTITUMORAL IMMUNE RESPONSE: NOVEL ROLE OF TR β IN CANCER DEVELOPMENT.

Vanina A. Alamino^{a,1}, Iván D. Mascanfroni^{a,1}, María M. Montesinos^a, Nicolás Gigena^a, Ana C. Donadio^a, Sonia I. Milotich^b, Sheue Y. Cheng SY^c, Ana M. Masini-Repiso^a, Gabriel A. Rabinovich^d, Claudia G. Pellizas^{a,2}.

^aCentro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI-CONICET), Dpto. Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, 5000 Córdoba, Argentina.

^bHospital Materno-Neonatal Ramón Carrillo, Sanatorio Allende, Córdoba, Argentina.

^cLaboratory of Molecular Biology, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, United States of America.

^dInstituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET) y Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

¹ These authors contributed equally to this work.

²**Corresponding author:** Claudia Pellizas, CIBICI-CONICET, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Haya de la Torre esq. Medina Allende, Ciudad Universitaria. 5000 Córdoba, Argentina. TE: 54 351 4334187 / FAX: 54 351 4333048; E-mail: claudia@mail.fcq.unc.edu.ar

ABSTRACT

A growing body of evidence demonstrates a bidirectional cross-talk between the neuroendocrine and immune systems, which are in constant communication to maintain homeostasis and to orchestrate coordinated responses to imbalances and pathologies. We previously reported a role of triiodothyronine (T3) in the control of dendritic cell (DC) characteristics and function. Our results demonstrated the expression of thyroid hormone receptors (TRs), mainly the β 1 isoform, in bone marrow-derived murine DCs and the role of physiological levels of T3 in promoting DC maturation and Th1-type cytokine secretion. Moreover, we reported an *in vitro* pivotal role of TR β 1 in T3-induced DC effects. In this study we aimed at disclosing *in vivo* TR β role in T3-dependent actions in DCs from a TR β mutant knockin mice (TR β PV) and further explored T3 effects on DC functionality and on its ability to induce an antigen (Ag)-specific cytotoxic effect. Collectively, the results obtained underscored a key role of TR β signaling *in vivo* in T3-stimulated DCs. In addition, T3 reduced DC apoptosis and increased DC migration to lymph nodes. Moreover, T3 directed the ability of DCs to induce a lymphocyte T-Ag-

specific cytotoxic effect *in vivo* and a cross-presentation *in vitro*. Consequently, an antitumoral T3-stimulated DC-based vaccination for B16-OVA tumor model was developed, which reduced the incidence of tumor establishment and tumor growth in affected mice, prolonging their survival. These effects were mediated, at least in part, by IFN- γ -secreting CD8⁺ T cells. These results strongly suggest Ag-specific adjuvant properties of T3 in DC-based tumor vaccination with profound implications in cancer immunotherapy.

INTRODUCTION

The neuroendocrine and immune systems communicate with each other to promote reciprocal regulation by a cross-talk that maintains homeostasis and orchestrates coordinated responses to imbalances and pathologies. This bidirectional communication is possible because both systems share common ligands (hormones and cytokines) and their specific receptors (1).

Thyroid hormones (THs) are important regulators of differentiation, growth, metabolism and physiological functions of virtually all tissues. Cellular activity of THs is usually classified as genomic (nuclear) and non-genomic (initiated either at cytoplasm or at membrane). The genomic mechanism of TH action requires the participation of the active TH: triiodothyronine (T3) and its nuclear receptors (TRs). TRs are codified by TRA and TRB genes that are expressed in four major isoforms: TR α_1 , TR β_1 , TR β_2 and TR β_3 , whereas other non-T3 binding isoforms are also expressed. Besides, non-genomic actions of THs, those excluding direct regulation of transcription by TRs, have been extensively recognized (2).

Several transgenic mouse models expressing TR mutants were developed to understand whether TR isoforms mediate specific functions *in vivo* (3-5). In particular, a TR β mutant knock-in mice harboring a frame-shift mutation in the last 14 carboxyl-terminal amino acids of TR β_1 (TR β PV) have been developed (3). The TR β PV mutation was initially identified in a patient bearing the syndrome of resistance to TH. *In vitro* characterization of PV mutant showed the completely lost of T3-binding and transactivation activities, interfering also with wild-type (WT) TR activity (6). TR β PV, as well as other mice models, allowed to demonstrate that TRs could function as tumor suppressors, revealing how loss of normal functions of TR by deletion or by mutations contribute to cancer development, progression and metastasis (7).

Despite considerable progress in understanding the interplay between distinct hormones and the immune cell network, the role of THs in the control of immune cell physiology has received scarce attention with studies mostly focused on effector B and T lymphocytes (8). However, the role of TR signaling in the initiation of adaptive immunity was scarcely explored.

Dendritic cells (DCs) are key cells of the innate immune system, endowed with a huge capacity to orchestrate adaptive immunity. They are the main antigen presenting cells (APCs) that recognize, process and present antigens (Ags) to naïve T cells for the induction of Ag-specific immune responses. The recognition of lipopolysaccharide (LPS) or other non self Ags promotes the maturation of DCs. These matured DCs alter the expression of chemokine receptors, enhancing their migration to the T cell zones of secondary lymphoid organs where they present the Ags to naïve T cells (9). Naïve CD8⁺ T cells are stimulated to proliferate and to develop into cytotoxic effector T cells after recognition of short peptides associated with major histocompatibility complex (MHC) class I (MHC-I) molecules on professional APCs. "Endogenous" cytosolic proteins are generally the source of MHC-I-restricted Ags. These proteins are degraded by the proteasome, and peptides are transported to the endoplasmic reticulum where they can bind to newly synthesized MHC-I molecules. In contrast, membrane-associated proteins and endocytosed "exogenous" proteins are mainly presented by MHC-II molecules for recognition by CD4⁺ T cells. However, the division of the endogenous and exogenous pathway is not absolute. APCs can process exogenous cell-associated Ags and present them in the context of MHC-I molecules, a process termed

“cross-presentation”. This phenomenon has a crucial role in all CD8⁺ T cell responses for the induction of protective immunity against viruses or tumors and its manipulation emerges as a promising tool for immune intervention (10).

Cancer immunotherapy has made significant strides in the past years due to huge advances in the understanding of the underlying principles of tumor immunobiology (11). In this regard, it has been explored the use of therapies based on the immunization of patients with their own DCs loaded with tumor-associated Ags *ex vivo*. However, the success is frequently limited at clinical level, e.g. activated DCs have a short half-life in lymph nodes, and Ag processing and presentation from dead DCs may induce tolerance. Therefore, increasing DCs survival and improving their *in vivo* performance is the present challenge in the field (12). Interestingly, increased phosphorylated Akt levels enhance DC survival (13).

During the last years, we have been providing evidences indicating a role for TR in the control of DCs characteristics and function and the impact on adaptive immunity. Our initial results demonstrated the expression of TR, mainly the β_1 isoform, in bone marrow-derived murine DCs and the role of physiological levels of T3 in promoting DC maturation and Th1-type cytokine secretion with an increase of IFN- γ both, in CD4⁺ as well as CD4⁻ T cell compartments (14). Moreover, we reported an *in vitro* pivotal role of TR β in T3 induced DC characteristics and function through intracellular pathways involving selective activation of Akt and NF- κ B pathways (15). In turn, these T3 effects were counteracted by glucocorticoids (16).

In the present study we aimed at disclosing *in vivo* TR β involvement in T3-induced effects at DC level, by evaluating markers of maturation and function in DCs from TR β PV mice. We also evaluated T3-treated DCs effects on *in vivo* cytotoxicity and *in vitro* cross-presentation. Finally, we attempted at exploring the role of T3 on an Ag-specific directed DC-based vaccination in a B16 melanoma cancer model in mice.

MATERIALS AND METHODS

Mice and cell lines

Wild type (WT) female C57BL/6 mice (B6; H-2b) were obtained from Ezeiza Atomic Center (Buenos Aires, Argentina). Homozygous TR β PV C57BL/6 mutant mice (TR β PV) were obtained and genotyped as described (6). Mice were maintained under specific pathogen-free conditions and used at 6–10 weeks old. Animal protocols were in compliance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the National Institutes of Health and the local institutional animal care committee.

Cell Preparation and Culture

Immature bone marrow dendritic cells (iDCs) were obtained from C57BL/6 WT or TR β PV mice as we previously described (14). For primary DCs, spleens and lymph nodes were incubated with 2 mg/ml Collagenase D for 20 min and then mashed through a 70 μ m cell strainer. DCs were sorted as previously described (17) into F4/80⁻ CD11b⁺ CD11c⁺ B220⁻ MHC-II⁺ LY6C⁻ conventional DCs (eBioscience, CA, USA). iDCs were cultured with T3 (5 nM) or LPS (100 ng/ml; Escherichia coli strain 0111:B4; Sigma Chemical Co., USA). Parallel cultures were maintained without stimuli and used as controls. T3 was purchased from Sigma and prepared according to the manufacturer’s recommended protocol. To rule out endotoxin contamination of the T3 preparation, we checked endotoxin content after reconstitution of the hormone, which raised levels lower than 0.03 IU/ml (limit of detection) by using the Limulus amoebocyte lysate assay (Sigma).

Flow cytometric analysis of DC phenotype

DCs were washed twice with PBS supplemented with 2% (vol/vol) FCS and resuspended in 10% (vol/vol) FCS in PBS. Cells were then incubated with the following fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies (mAbs) for 30 min at 4 °C: fluorescein isothiocyanate (FITC)-anti-CD11c, phycoerythrin (PE)-anti-IA/IE (MHC II), PE-anti-CD40, PE-anti-CD80, PE-anti-CD86 and PECy7-anti-CCR7 (all from BD Biosciences PharMingen, NJ, USA). Cells were then processed and analyzed in a FACS canto II flow cytometer (BD Biosciences) using FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR, USA).

Cytokine determination

Intracellular cytokine detection was assessed by flow cytometry as we previously described (14) using PE-conjugated anti-IL-12 mAb (BD Biosciences). IL-10 and IFN- γ detection was performed in cell culture supernatants using standard capture enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA, BD Biosciences) (14).

Allogeneic T cell cultures

Allogeneic T cell cultures were performed as we previously described (14). Briefly, allogeneic splenocytes (BALB/c, 1×10^5 cells/well, responder cells) were stained with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE, 5 μ M) at 37°C for 15 min. After washing, the labeled cells were incubated for 3 days with irradiated DCs (30 Gy, stimulator cells) at a ratio of 1:15 (DC/splenocytes). After 3 days in culture, the cells were analyzed by FACS gating on the CFSE-labeled cells to assess the ability of DCs to induce allogeneic T cell proliferation.

Protein extraction and Western blotting

Total and nuclear protein extracts were obtained as described (14). Abs directed to Phospho-Akt (5473, rabbit monoclonal), Bcl-2 (50E3, rabbit monoclonal) and GAPDH (D16H11, rabbit monoclonal) were purchased from Cell Signaling Technology, Inc (Massachusetts, USA). Western blot analysis was performed as we previously reported (16).

In vivo cytotoxic assay

Cytotoxic assay was conducted as described previously (18). Four groups of mice were intravenously (i.v.) immunized with 5×10^6 DCs incubated for 18 h with: 1) PBS (control), 2) OVA (100 μ g/ml, Worthington, NJ, USA), 3) OVA+LPS (100 ng/ml, Sigma), 4) OVA+T3 (5 nM, Sigma). Spleen cells from syngeneic mice were labeled by incubation for 10 min at 37°C with either 3 μ M CFSE (CFSE^{high} cells) or 0,5 μ M CFSE (CFSE^{low} cells) in HBSS, then washed twice in HBSS 10% FCS. CFSE^{high} cells were pulsed with OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide (10 ng/ml, Sigma) for 30 min at 37°C. CFSE^{low} cells were not pulsed and served as an internal control. On day 7 after immunization, mice were injected i.v. with a mixture of 3×10^6 CFSE^{low} unpulsed cells and 3×10^6 CFSE^{high} peptide-pulsed cells. Spleens were excised 24 h later and single cell suspensions were analyzed for quantification of CFSE-labeled cells by flow cytometry.

Antigen cross-presentation assay:

This assay was conducted as previously described (19). Briefly, DCs were incubated for 4 h with 1) PBS (control), 2) OVA (100 μ g/ml), 3) OVA₂₅₇₋₂₆₄ (10 ng/ml), or 4) OVA+T3 (5 nM). Cells were then washed with normal growth medium and resuspended in supplemented RPMI 1640 at 1×10^6 cells/ml. Besides, B3Z T hybridoma cells (1×10^5) [which express LacZ upon binding of the T cell receptor (TCR) to OVA₂₅₇₋₂₆₄/Kb complex] were placed in the first well of a 96-well plate (U-bottom) and were double diluted over the next five wells to achieve different effector to target cell ratios. After DC co-incubation overnight with B3Z T hybridoma cells, they were washed twice with PBS and lysed by addition of 125 μ l of a solution containing 5 mM o-nitrophenyl-p-D-galactoside (ONPG) in PBS 0,5% NP-40. After 4 h

incubation at 37°C, the amount of LacZ enzyme was quantified by the hydrolysis of ONPG, measuring OD at 415 nm.

DC death determination:

After DC treatment with Dexamethasone (Dex, 10⁻⁶M, Sigma) and/or T3 (5 nM) for 18 h, apoptosis and necrosis were evaluated by flow cytometry following double staining procedure with the FITC-Annexin V binding assay and 7-aminoactinomycin D (7-AAD, BD Biosciences) as we described (16).

Migration of DCs in vivo:

Control and T3-stimulated DCs were labeled with CFSE (5 µM). Then, DCs were washed 3 times in PBS and 1.5 x 10⁶ DCs resuspended in 250 µl PBS were injected subcutaneously (s.c.) into mice. Lymph nodes were excised 24 h later and single cell suspensions mechanically obtained were analyzed by flow cytometry for quantification of DC (CD11c⁺) CFSE-labeled cells.

RNA extraction and reverse transcription/quantitative PCR (qPCR):

Total RNA isolation and cDNA synthesis were performed as described (15). qPCR analysis was carried out using an ABI Prism 7500 detection system (Applied Biosystems, CA, USA) and SYBR green chemistry as described (15). Gene-specific primer sets: 5'-GGCTCTCCTTGTCATTTCCAG-3' (CCR7 forward), 5'-AATACATGAGAGGCAGGAACCAG-3' (CCR7 reverse), 5'-GGCACACACTTTCTACAATG-3' (β-actin forward) and 5'-TGGCTGGGGTGTGAAGGT-3' (β-actin reverse). To quantify changes in CCR7 gene expression, the 2^{-ΔΔCt} method was used to calculate the relative changes normalized against the housekeeping gene β-actin used as internal control. All primers were from Sigma-Genosys.

B16-OVA tumor model:

The syngeneic melanoma B16.F1-OVA line (gift from Dr. P. Dellabona, Fondazione Centro San Raffaele del Monte Tabor- San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy) was used to induce a mice melanoma tumor (20). Cells were maintained in culture in RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 2 mM glutamine. Cells were passaged every 2–3 days and growing cultures were used to generate the tumor either at the same passage number. For tumor induction, 2 x 10⁴ cells B16.F1-OVA cells were administered s.c. in 250 µl PBS in left flank of C57BL/6 mice. Animals were monitored for tumor growth by palpation, and tumor size was measured every 2–3 days with a Vernier caliper (tumor volume= LxW²/2, L= length, W=width). Animal survival was defined as the time in days between tumor cell inoculation and the day of sacrifice (tumor diameter 20mm, (21))

DC-based Immunotherapy:

DCs were treated with OVA (100 µg/ml, DC+OVA), OVA and T3 (5 nM, DC+OVA+T3) or PBS (control). 1.5 x 10⁶ treated DCs were injected s.c. on the contralateral flank of tumor bearing mice at days 1, 3, 5 and 8 post B16.F1-OVA tumor cell inoculation.

Tumor-infiltrating cell lineage:

Tumors were removed from mice and single-cell suspensions were prepared by enzymatic digestion and submitted to Ficoll-Hypaque (Sigma) gradient centrifugation as described (22). Mononuclear cells were stained to determine cell subsets (CD8, CD4 and NK) by flow cytometry. Cells were incubated with PE-Cy5-anti-CD4, PE-anti-CD8 and FITC-anti-NK1.1 mAbs (BD Biosciences) for 30 min at 4°C. Cells were then analyzed in an FACS canto II flow cytometer (BD Biosciences) using FlowJo software (Tree Star).

INF- γ production by splenocytes from tumor bearing mice:

At autopsy, 10 days after the last dose of DC vaccination to mice, the spleen of the animals was aseptically removed. A splenocyte suspension was prepared from each spleen. The cells were stimulated with OVA_{257–264} (10 ng/ml). After 72 h, the culture supernatant was collected and the amount of INF- γ produced by tumor-specific lymphocytes was quantified using commercial ELISA kits as recommended by the manufacturer (BD Biosciences). Intracellular INF- γ was determined by flow cytometry as we previously described (14).

Statistical analysis:

Analysis of intergroup differences was conducted by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Student–Newman–Keuls test. Survival differences and rates of tumor establishment were compared using Gehan-Bislow-Wilcoxon test. P values less than 0.05 were considered statistically significant. All experiments were performed at least in triplicate.

RESULTS

1. Critical role of signaling in T3-induced DC- maturation and function *in vivo*

We previously reported *in vitro* a pivotal role of TR β ₁ in T3-induced DC characteristics and function, demonstrated by small interfering RNA-mediated silencing of TR β ₁ expression in cultured DCs from wild type (WT) mice (15). In order to support TR β ₁ involvement in T3 effects at DC level *in vivo*, we evaluated T3 action on molecular markers of maturation and function of bone marrow-derived DCs from TR β PV mice. For this purpose, DCs from WT (DC^{WT}) and homozygous TR β PV (DC^{PV}) mice were exposed to T3 and analyzed for MHCII and costimulatory molecules, as well as for interleukin (IL)-12 and IL-10 production.

As previously recorded (15), T3 induced DC^{WT} maturation, revealed by increased levels of MHCII, CD40, CD80 and CD86 on the surface of DCs. On the contrary, T3-treated DC^{PV} exhibited an immature phenotype characterized by marked expression of CD11c, but low levels of the mentioned maturation markers (Fig. 1A, left and right panels). Moreover, this immature phenotype of DC^{PV} was associated with a reduced DC functionality since T3 was unable to increase the frequency of IL-12 producing DC^{PV}, in contrast to DC^{WT} (Fig. 1B) (15).

The immature phenotype and the diminished IL-12 production of T3-treated DC^{PV} prompted us to investigate the T cell allostimulatory capacity of these cells. In contrast to what registered in T3-matured DC^{WT} (Fig. 1C, (15)), T3-conditioned DC^{PV} could not enhance the proliferation of BALB/c (H-2d) splenocytes. The deficient allostimulatory capacity was also reflected by the diminished frequency of effector cytokine INF- γ -producing cells as well as INF- γ released to the medium, which in turn leads to responder splenocytes in DC^{WT} (Fig. 1D and E respectively, (15)). These results were comparable with those found in DCs from lymph nodes and spleens from WT and TR β PV mice (Fig. 1F, G respectively).

Remarkably, T3 was unable to induce Akt activation in DC^{PV}, in contrast to the increase in Ser-473 phosphorylation of Akt detected after 30 min in T3-stimulated DC^{WT} (Fig. 1 H) as previously reported (15).

Taken together, these results highlight a critical role of intact TR β expression in the control of DC signaling and function *in vivo*, directing the development to a T1-type cytokine response.

2. T3 significantly increased DC-ability to stimulate a cytotoxic Ag-specific response and Ag cross-presentation

We previously reported that T3 instructs the generation of a DC phenotype able to orchestrate the development of a dominant T1-type response (14) that may promote cellular immunity and collaborate with cytotoxic T cells to direct the immune elimination of cancer. However, T3 failed to exert this effect in DCs from TR β PV mice (Fig. 1), mutation closely associated with cancer development (23). All these evidences prompt us to ascertain the role of T3 in cancer, evaluating the ability of T3-stimulated DCs to modulate Ag-specific cytotoxicity by an *in vivo* cytotoxicity assay. As depicted in Fig. 2A and B, control and OVA-stimulated DCs failed to mount a cytotoxic specific response (similar CFSE^{high}/CFSE^{low} profile, mean cytolytic activity: 37.95%). However, immunization with OVA+T3-stimulated DCs resulted in an anti-OVA cytotoxic response that was able to clear most of OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide-coated target cells (mean cytolytic activity: 87.41%), as the positive control did (LPS, mean cytolytic activity: 100.00%) (24). These results revealed that T3-matured DCs differentiated CD8⁺ T cells into cytotoxic Ag-specific effectors *in vivo*.

Considering that cross-presentation of Ags is an essential event for the responses of cytotoxic T cells to tumors (10), the effect of T3 to mediate DC ability to exert this process was assessed by the *in vitro* cross-presentation assay. As shown in Fig. 2C, OVA+T3-stimulated DCs significantly increased β -Gal activity when compared with OVA stimulated or unstimulated-DCs at all B3Z:DC ratios analyzed. This effect of T3 was comparable to that induced by the positive control OVA₂₅₇₋₂₆₄, revealing the induction of the cross-presentation process.

3. T3 decreased DC-death.

DC apoptosis is a key event in the regulation of the balance between tolerance and immunity and has been registered in several types of solid and blood cancers (25-27). Environments in which the apoptosis of DCs occurs are immunosuppressive since they promote regulatory T cell generation and functional impairment of DCs (28). Therefore, we next evaluated the effect of T3 on DC survival. Cell death was assessed in T3 and dexamethasone (Dex, pro-apoptotic stimulus, (29))-treated DCs or untreated DCs (DC). As shown in Fig. 3A and B, T3 was able to decrease the number of apoptotic (AnnexinV⁺/7AAD⁻) and necrotic cells (AnnexinV⁺/7AAD⁺) compared to control DCs. Besides, T3 counteracted the known pro-apoptotic effect of Dex in DCs. Considering that Bcl-2 plays a critical role in regulating the apoptosis of different types of cells (30), we also tested its levels in T3-stimulated DCs. After 30 min of stimulation, T3 increased the expression of Bcl-2 (Fig. 3C) persisting even at 18 h. Consistent with previous findings, DC-Bcl-2 upregulation induced by T3, correlated with increased DC survival (Fig. 3A and B) (30). All together, these results indicate that T3-stimulated DCs exhibited higher survival capacity and resistance to apoptosis, events that may extend DC lifespan.

4. T3 increased DC-migratory capacity to lymph nodes.

To induce a primary immune response, DCs have to undergo a maturation process and migrate to lymph nodes to contact T cells for activation (31). Therefore, the *in vivo* ability of T3 to induce DC migration to lymph nodes was evaluated by measuring the migration of injected CFSE-labelled DCs (CFSE⁺/CD11c⁺) by flow cytometry. Although the percentage of the drained DCs in lymph nodes that were double-positive (CFSE and CD11c) was low, it was significantly enhanced in T3-treated DCs (Fig. 4A and B).

Migration of DCs into tissues depends on a cascade of discrete events, including chemokine production and regulation of its receptors (32). In this regard and considering that CCR7 has an essential role in DC migration from tissue to lymph nodes (33), CCR7 expression in T3-stimulated DCs was measured. As shown, T3 induced a significant increase in CCR7 expression, at mRNA (qRT-PCR, Fig. 4C) and protein levels (flow cytometry, Fig. 4D, E), as the positive control (LPS, (34)) did.

5. T3-stimulated DCs in the presence of tumor Ag were able to induce an antitumoral immune response.

Considering our previous results (14), and those described above, we next explored whether T3 may enhance the therapeutic potential of DC vaccines *in vivo*. For this purpose, we established a model of B16-OVA melanoma in C57BL/6 mice (B16 cells where OVA protein was stable transfected to serve as a control of specific Ag response induced by DCs). Besides, an antitumoral therapy based on vaccination of T3-stimulated DCs in the presence of tumor Ag (OVA) was administered to those mice (Fig. 5A). Mice receiving DC+OVA+T3 immunization showed a significant delay in tumor onset (Fig. 5B) as well as a decrease in tumor size measured at day 27 (Fig. 5C), although the rate of tumor growth did not differ among the 3 experimental groups when the tumor was established. In turn, s.c. administration of T3-stimulated DCs (+OVA+T3) resulted in a significant prolonged mice survival compared with DC+OVA (Fig. 5D): 60% DC+OVA+T3 vs 20% DC+OVA at 40 days after tumor inoculation. Moreover, all of the saline-treated mice died within 40 days after the B16-OVA implantation. Accordingly, there was also a significant higher number tumor-free mice when they were injected with T3-pulsed DCs (+OVA+T3) in comparison to DC (+OVA) and controls (Fig. 5E).

6. Vaccination with T3-stimulated DCs induced an increase in CD8⁺ T cells in the tumor.

To further disclose the T3-treated DC antitumoral response registered in mice, we evaluated tumor infiltrating T cells by flow cytometry. The FACScan analysis revealed that intratumoral CD8⁺ T cells were enhanced in mice receiving DC+OVA+T3 compared with DC+OVA (Fig. 6A). In turn, there were no significant differences when comparing CD4⁺ T cells (Fig. 6A) and NK cells (data not shown) between both experimental groups. These results support the notion of a cytotoxic response generated by T3-stimulated DCs.

7. T3-stimulated DC promoted an IFN- γ mediated tumor Ag-specific response.

Considering that T3-pulsed DCs in the presence of OVA induced prolonged survival and intratumoral CD8⁺ T cell infiltration in mice bearing B16-OVA tumors, we aimed at evaluating whether a systemic immune response specific for the tumor was also induced by T3-stimulated DC in these mice. As shown in Fig. 6B, IFN- γ secretion by splenic lymphocytes derived from mice injected with DC+OVA+T3 was significantly higher compared with mice treated with DC+OVA (Fig. 6B, white boxes). Notably, when splenocytes of mice treated with T3-stimulated DCs were re-stimulated with OVA₂₅₇₋₂₆₄ (Fig. 6B, black boxes), a 3 fold increment in IFN- γ production was registered (DC+OVA+T3 vs DC+OVA), indicating an antitumoral Ag-specific response. In addition, intracellular staining and FACS analysis demonstrated that the augmented IFN- γ production was mainly evidenced in CD8⁺ T cells (Fig. 6C). To sum up, these data reveals that immunotherapy with DCs treated *in vitro* with T3 and OVA may enhance the frequency of IFN- γ -secreting CD8⁺ T cells and explains, at least in part, T3-treated DC's specific antitumoral ability.

DISCUSSION

Biological signals that control DCs can ultimately drive the direction of adaptive immune responses (9). Sustained by previous results, this study underscored a key role of T3 mechanism of action in cancer by acting at DC level.

In contrast to the reported effects induced by T3 in DCs from mice with normal TR β_1 , the main TR isoform at DC level (14) (DC^{WT}), T3 was unable to exert them on DCs from homozygous TR β PV mice (DC^{PV}), the mutant knock-in mice with a dominant negative TR β_1 mutant. In addition, T3-treated DC^{PV} showed a deficient allostimulatory capacity and Akt activation when compared to the results obtained in DC^{WT} (15). These findings highlight a critical *in vivo* role of intact TR β expression in the control of DC signaling and function, in accordance to results obtained *in vitro* by small interfering RNA-mediated silencing of TR β (15). The well-known relationship of TR β PV with cancer development (7) as well as our previous observations demonstrating that T3 generates a DC1 phenotype with increased T cell stimulatory potential and the ability to direct the development of a T1-type response (14); further led us to suspect a putative role of T3 action directing DC functionality in favor of a T cytotoxic response.

DCs have unique characteristics that made them an ideal choice for antitumor vaccines (35). In this regard, DC-based vaccination effectively generates tumor-specific cytotoxic T lymphocytes (36). However, the goal of cancer vaccinologists is to elicit tumor-specific CD8⁺ T cell-mediated immune responses sufficiently robust and long-lasting to generate durable tumor regression and/or eradication. In particular, cross-presentation of Ag is essential for induction of effective responses of cytotoxic T cells to tumors (37). In consonance, our results demonstrated the effect of T3 towards increased DC ability to stimulate Ag-specific cytotoxic response *in vivo* and Ag cross-presentation *in vitro*. These findings further support *in vivo* a role of T3 action favoring antitumor responses.

In DC-based immune cancer therapies, DCs were usually isolated *in vitro* and loaded with tumor Ag. These Ag-bearing DCs were then injected back into patients, traffic into lymphoid tissues and activate Ag-specific T cells for killing tumor cells. However, the increase of DC survival is a present challenge (35). DC's short lifespan probably evolved to prevent autoimmunity but in the context of immunotherapy, short-lived, *ex vivo*-modified DC vaccines likely undergo apoptosis prior encountering and optimally-activating tumor Ag-reactive T cell clones. Interestingly, it was demonstrated that immunization of mice with DCs infected with a Bcl-XL-encoding adenovirus effectively generated more potent anti-tumor immunity (38) modulating Akt activation, a critical regulator of DC lifespan (13). In agreement, our results demonstrate the ability of T3 to increase DC survival which correlates with our previous report indicating an increase of Akt phosphorylation in T3-stimulated DCs (15). These results as well as the increased Bcl-2 levels in T3-stimulated DCs found in this work, suggest that the registered long-living and resistant to apoptosis DCs induced by T3 treatment *ex vivo* may be a powerful tool to increase the effectiveness of DC-based vaccines.

CCR7 is a chemokine receptor that drives DCs migration to lymph nodes inducing an increase of lymph node cellularity, which was observed before the onset of T cell proliferation (39). It was also reported that DC migration could be increased by preinjection of inflammatory cytokines that increased the expression of the CCR7 ligand CCL21 (40). Accordingly, herein T3 treatment to DCs increases their CCR7 expression and, consequently, DC migration to lymph nodes, the critical event to contact T cells for activation. In addition, it was reported that CCR7 expression extends DC survival by a mechanism that involves activation of Akt (41), finding also in agreement with the results presented showing a concomitant increase of Akt activation, CCR7 expression and extension of DC lifespan.

Regarding our previous (14, 15) and present results, a potential role of T3 on DC-based antitumoral immunization was strongly suggested. To test out this hypothesis, an antitumoral DC-based vaccination

for B16-OVA tumor model in mice was established (20). In this regard, vaccination consisting in T3-activated DCs *ex-vivo* in the presence of a tumor Ag (OVA) was able to increase the percentage of tumor-free animals, to delay the onset of tumor in affected mice and tumor growth, and to increase mice survival. Moreover, the mentioned vaccination resulted in robust infiltration of CD8⁺ T cells within the tumor. These findings are of particular interest since tumor-infiltrating lymphocytes have been shown to mediate potent antitumor effects *in vivo* upon adoptive transfer (42) and to extend disease-free survival (43). Besides, we demonstrated that lymphocytes from spleen of tumor-bearing mice treated with DC+OVA+T3 displayed heightened levels of IFN- γ secretion and this response could contribute to the profound *in vivo* antitumor effects that were registered. In agreement, therapeutic administration of DCs pulsed *in vitro* with the heat shock protein 70 in the presence of a cyclooxygenase-2 inhibitor, reduced progression of B16 tumors in mice and enhanced their survival, associated with an enhancement of IFN- γ -producing CD8⁺ T cells (44).

The majority of clinical trials involving DC-based vaccination used a cocktail of proinflammatory cytokines, including TNF- α , IL-1 β , IL-6 and PGE₂ (45). Besides, other authors explored the use of CD40L (46) and TLR agonists that differentially stimulates systemic and local innate immune responses *in vivo* (47). Considering our previous (14, 15) and present findings, T3 arises as an adjuvant alternative that owns the potential to induce optimal DCs for stimulating Ag-specific effective cellular immune responses in a suitable cytokine milieu to eliminate tumor cells. Moreover, T3 may exhibit advantage over other adjuvants considering its physiological origin.

On the other hand and regarding T3 action in favor of DCs directing an antitumoral response, it is worth noting that the results obtained in this work contribute to the notion of an antitumor role of TH mechanism of action, apart from the tumor suppressor role of TR β ₁ (48). In this sense, TR β PV mice develop follicular thyroid carcinoma and mutated TRs associate with several human cancers including liver, kidney, pituitary and thyroid tumors (7). In turn, reduced expression of TR β mRNA was implicated in the carcinogenesis of papillary thyroid carcinomas, kidney and breast cancers (48). In this regard, the impaired DC immunogenicity registered in TR β PV mice as well as those results related to T3 action on DC ability to conduct an Ag-specific T cytotoxic response and antitumor effects, may also contribute to tumor development registered under the lack of WT TR β . In contrast to the reports that support a role of a normal TH action in tumor evasion and to our findings, other studies sustain the concept that WT TR can enhance carcinogenesis (49). Therefore, TRs could play a dual role in carcinogenesis. Because TR actions are complex and tissue-and time-specific, aberrant expression of the various TR isoforms might have divergent effects in diverse tumor cells or at different stages of tumor development (49). Nevertheless, the findings from this work strongly suggest a new mechanism for T3 involvement through TR β in cancer development.

Taking together, our findings suggest that T3-stimulated DCs in the presence of a tumoral Ag-based immunotherapy provides an alternative approach to conventional anticancer therapies. In addition, the current study underscores the physiological importance of T3 in the antitumor immune response. This is a promising approach to cancer therapy, which deserves a thorough evaluation in other animal tumor models and later in human oncology. This new strategy may be the key to enhancing tumor immunity *in vivo* that may in the future be translated into meaningful clinical outcomes.

REFERENCES

1. Butts CL, Sternberg EM. Neuroendocrine factors alter host defense by modulating immune function. *Cell Immunol* 2008; 252: 7-15.
2. Brent GA. Mechanisms of thyroid hormone action. *J Clin Invest* 2012; 122: 3035-43.
3. Wong R, Vasilyev VV, Ting YT, et al. Transgenic mice bearing a human mutant thyroid hormone beta 1 receptor manifest thyroid function anomalies, weight reduction, and hyperactivity. *Mol Med* 1997; 3: 303-14.
4. Hayashi Y, Xie J, Weiss RE, Pohlenz J, Refetoff S. Selective pituitary resistance to thyroid hormone produced by expression of a mutant thyroid hormone receptor beta gene in the pituitary gland of transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 245: 204-10.
5. Abel ED, Kaulbach HC, Campos-Barros A, et al. Novel insight from transgenic mice into thyroid hormone resistance and the regulation of thyrotropin. *J Clin Invest* 1999; 103: 271-9.
6. Kaneshige M, Kaneshige K, Zhu X, et al. Mice with a targeted mutation in the thyroid hormone beta receptor gene exhibit impaired growth and resistance to thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 13209-14.
7. Kim WG, Cheng SY. Thyroid hormone receptors and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2012.
8. De Vito P, Incerpi S, Pedersen JZ, Luly P, Davis FB, Davis PJ. Thyroid hormones as modulators of immune activities at the cellular level. *Thyroid* 2011; 21: 879-90.
9. Satpathy AT, Wu X, Albring JC, Murphy KM. Re(de)fining the dendritic cell lineage. *Nat Immunol* 2012; 13: 1145-54.
10. Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 2012; 12: 557-69.
11. Kirkwood JM, Butterfield LH, Tarhini AA, Zarour H, Kalinski P, Ferrone S. Immunotherapy of cancer in 2012. *CA Cancer J Clin* 2012; 62: 309-35.
12. Palucka K, Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat Rev Cancer* 2012; 12: 265-77.
13. Park D, Lapteva N, Seethammagari M, Slawin KM, Spencer DM. An essential role for Akt1 in dendritic cell function and tumor immunotherapy. *Nat Biotechnol* 2006; 24: 1581-90.
14. Mascanfroni I, Montesinos Mdel M, Susperreguy S, et al. Control of dendritic cell maturation and function by triiodothyronine. *FASEB J* 2008; 22: 1032-42.
15. Mascanfroni ID, Montesinos Mdel M, Alamino VA, et al. Nuclear factor (NF)-kappaB-dependent thyroid hormone receptor beta1 expression controls dendritic cell function via Akt signaling. *J Biol Chem* 2010; 285: 9569-82.
16. Montesinos MM, Alamino VA, Mascanfroni ID, et al. Dexamethasone counteracts the immunostimulatory effects of triiodothyronine (T3) on dendritic cells. *Steroids* 2012; 77: 67-76.
17. Reizis B, Bunin A, Ghosh HS, Lewis KL, Sisirak V. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annu Rev Immunol* 2011; 29: 163-83.
18. Calbo S, Delagrèverie H, Arnoult C, Authier FJ, Tron F, Boyer O. Functional tolerance of CD8+ T cells induced by muscle-specific antigen expression. *J Immunol* 2008; 181: 408-17.
19. Guermonprez P, Saveanu L, Kleijmeer M, Davoust J, Van Endert P, Amigorena S. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 2003; 425: 397-402.
20. Bellone M, Cantarella D, Castiglioni P, et al. Relevance of the tumor antigen in the validation of three vaccination strategies for melanoma. *J Immunol* 2000; 165: 2651-6.
21. Hokey DA, Larregina AT, Erdos G, Watkins SC, Falo LD, Jr. Tumor cell loaded type-1 polarized dendritic cells induce Th1-mediated tumor immunity. *Cancer Res* 2005; 65: 10059-67.
22. Andreani V, Gatti G, Simonella L, Rivero V, Maccioni M. Activation of Toll-like receptor 4 on tumor cells in vitro inhibits subsequent tumor growth in vivo. *Cancer Res* 2007; 67: 10519-27.
23. Furumoto H, Ying H, Chandramouli GV, et al. An unliganded thyroid hormone beta receptor activates the cyclin D1/cyclin-dependent kinase/retinoblastoma/E2F pathway and induces pituitary tumorigenesis. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 124-35.
24. Kono M, Nakamura Y, Suda T, et al. Enhancement of protective immunity against intracellular bacteria using type-1 polarized dendritic cell (DC) vaccine. *Vaccine* 2012; 30: 2633-9.
25. Pinzon-Charry A, Maxwell T, McGuckin MA, Schmidt C, Furnival C, Lopez JA. Spontaneous apoptosis of blood dendritic cells in patients with breast cancer. *Breast Cancer Res* 2006; 8: R5.
26. Um SH, Mulhall C, Alisa A, et al. Alpha-fetoprotein impairs APC function and induces their apoptosis. *J Immunol* 2004; 173: 1772-8.
27. Peguet-Navarro J, Sportouch M, Popa I, Berthier O, Schmitt D, Portoukalian J. Gangliosides from human melanoma tumors impair dendritic cell differentiation from monocytes and induce their apoptosis. *J Immunol* 2003; 170: 3488-94.
28. Kushwah R, Hu J. Dendritic cell apoptosis: regulation of tolerance versus immunity. *J Immunol* 2010; 185: 795-802.

29. Rozkova D, Horvath R, Bartunkova J, Spisek R. Glucocorticoids severely impair differentiation and antigen presenting function of dendritic cells despite upregulation of Toll-like receptors. *Clin Immunol* 2006; 120: 260-71.
30. Hou WS, Van Parijs L. A Bcl-2-dependent molecular timer regulates the lifespan and immunogenicity of dendritic cells. *Nat Immunol* 2004; 5: 583-9.
31. Randolph GJ, Angeli V, Swartz MA. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 617-28.
32. Cavanagh LL, Von Andrian UH. Travellers in many guises: the origins and destinations of dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 2002; 80: 448-62.
33. Sallusto F, Lanzavecchia A. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunol Rev* 2000; 177: 134-40.
34. Jung ID, Lee JS, Kim YJ, et al. Sphingosine kinase inhibitor suppresses dendritic cell migration by regulating chemokine receptor expression and impairing p38 mitogen-activated protein kinase. *Immunology* 2007; 121: 533-44.
35. Cintolo JA, Datta J, Mathew SJ, Czerniecki BJ. Dendritic cell-based vaccines: barriers and opportunities. *Future Oncol* 2012; 8: 1273-99.
36. Berhanu A, Huang J, Alber SM, Watkins SC, Storkus WJ. Combinational FLT3 ligand and granulocyte macrophage colony-stimulating factor treatment promotes enhanced tumor infiltration by dendritic cells and antitumor CD8(+) T-cell cross-priming but is ineffective as a therapy. *Cancer Res* 2006; 66: 4895-903.
37. Hildner K, Edelson BT, Purtha WE, et al. Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* 2008; 322: 1097-100.
38. Yoshikawa T, Niwa T, Mizuguchi H, Okada N, Nakagawa S. Engineering of highly immunogenic long-lived DC vaccines by antiapoptotic protein gene transfer to enhance cancer vaccine potency. *Gene Ther* 2008; 15: 1321-9.
39. Forster R, Schubel A, Breitfeld D, et al. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 1999; 99: 23-33.
40. Sallusto F, Schaeferli P, Loetscher P, et al. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 1998; 28: 2760-9.
41. Escribano C, Delgado-Martin C, Rodriguez-Fernandez JL. CCR7-dependent stimulation of survival in dendritic cells involves inhibition of GSK3beta. *J Immunol* 2009; 183: 6282-95.
42. Barth RJ, Jr., Mule JJ, Spiess PJ, Rosenberg SA. Interferon gamma and tumor necrosis factor have a role in tumor regressions mediated by murine CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 1991; 173: 647-58.
43. Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2012; 12: 298-306.
44. Toomey D, Conroy H, Jarnicki AG, Higgins SC, Sutton C, Mills KH. Therapeutic vaccination with dendritic cells pulsed with tumor-derived Hsp70 and a COX-2 inhibitor induces protective immunity against B16 melanoma. *Vaccine* 2008; 26: 3540-9.
45. Lee AW, Truong T, Bickham K, et al. A clinical grade cocktail of cytokines and PGE2 results in uniform maturation of human monocyte-derived dendritic cells: implications for immunotherapy. *Vaccine* 2002; 20 Suppl 4: A8-A22.
46. Palucka AK, Ueno H, Connolly J, et al. Dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells can induce objective clinical responses and MART-1 specific CD8+ T-cell immunity. *J Immunother* 2006; 29: 545-57.
47. Kwissa M, Nakaya HI, Oluoch H, Pulendran B. Distinct TLR adjuvants differentially stimulate systemic and local innate immune responses in nonhuman primates. *Blood* 2012; 119: 2044-55.
48. Kato Y, Ying H, Willingham MC, Cheng SY. A tumor suppressor role for thyroid hormone beta receptor in a mouse model of thyroid carcinogenesis. *Endocrinology* 2004; 145: 4430-8.
49. Aranda A, Martinez-Iglesias O, Ruiz-Llorente L, Garcia-Carpizo V, Zambrano A. Thyroid receptor: roles in cancer. *Trends Endocrinol Metab* 2009; 20: 318-24.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Critical role of TR β signaling in T3-induced DC maturation and function *in vivo*.

Bone marrow-derived iDCs from WT (DC^{WT}) and homozygous TR β PV (DC^{PV}) mice, were treated for 18 h with T3 (5 nM) or left untreated and analyzed as described under “Materials and Methods”. **(A)** Flow cytometry analysis of phenotypic markers (MHC II, CD40, CD80 and CD86). Histograms are gated on CD11c⁺ cells (*left panel*). Dotted histograms, nonspecific binding determined with isotype-matched control antibodies (IC); grey histograms, control DC phenotypic markers; black histograms, T3-stimulated DC phenotypic markers. Results are expressed as mean fluorescence intensity (MFI) within the CD11c⁺ population (*right panel*). **(B)** Intracytoplasmic detection of IL-12p70. Values are given as the percentage of total CD11c⁺ IL-12-producing cells. **(C,D,E)** Allostimulatory capacity of DCs. **(C)** Proliferation of allogeneic splenocytes was measured by CFSE dilution. Continuous and dotted lines represent proliferation of allogeneic splenocytes cultured with DC^{WT} and DC^{PV} respectively. **(D)** IFN- γ production was evaluated by flow cytometry. **(E)** IFN- γ production was measured in culture supernatants by ELISA. **(F,G)** IFN- γ and IL-10 production in allogeneic T cell cultures was measured in culture supernatants by ELISA. **(H)** Akt phosphorylation in DCs was evaluated by western blot analysis. Data are expressed as mean \pm SD and are from a representative experiment from a total of three with similar results, * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ vs Control DC^{WT}; # $p < 0.05$ vs T3-stimulated DC^{WT}.

Figure 2: T3 increased DC ability to stimulate a cytotoxic Ag-specific response and Ag cross-presentation.

In vivo cytotoxicity **(A,B)** and *in vitro* antigen cross-presentation **(C)** assays were performed as described under “Materials and Methods”. **(A)** Density graphs represent the amount of CFSE-labeled cells. Number in each plot indicates the percentage of CFSE^{low} and CFSE^{high} cells. **(B)** Cytolytic activity was determined by calculating the percentage of specific lysis of peptide-pulsed CFSE^{high} cells following the formula: 100 - ((percentage of peptide pulsed/percentage of unpulsed in immunized mice)/(percentage of peptide pulsed/percentage of unpulsed in control mice) x 100). Data are expressed as mean \pm SD and are from a representative experiment from a total of three with similar results, * $p < 0.001$ vs DC+OVA. **(C)** OD at 415 nm in each experimental group is shown. Data are expressed as mean \pm SD and are from a representative experiment from a total of three with similar results, * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ vs DC+OVA.

Figure 3: T3 decreased DC death.

Mice bone marrow-derived iDCs were treated for 18 h with T3 (5 nM), dexamethasone (Dex, 10⁻⁶M) or left untreated. **(A,B)** Determination of DC death as described under “Materials and Methods”. Cells were gated on CD11c⁺ cells, and annexin V and 7-AAD were detected. **(A)** Numbers represent the percentage of cells in each quadrant. Cells in early phases of apoptosis are Annexin V⁺/7-AAD⁻ and late-stage apoptotic and necrotic cells are Annexin V⁺/7AAD⁺. **(B)** Values are given as the percentage of apoptotic and necrotic cells of total CD11c⁺ cells. Data are expressed as mean \pm SD and are from a representative experiment from a total of three with similar results, * $p < 0.001$ vs apoptotic and necrotic Control DC respectively; # $p < 0.001$ vs apoptotic and necrotic Dex-DC respectively. **(C)** Analysis of Bcl 2 by western blot. Lower panel shows the same blot probed for GAPDH to check equal loading of samples. Representative experiment from a total of three with similar results.

Figure 4: T3 increased DC migratory capacity to lymph nodes

Mice bone marrow-derived iDCs were treated for 18 h with T3 (5 nM), LPS (100 ng/ml) or left untreated. **(A,B)** Migration of DCs *in vivo* was determined as described under “Materials and Methods”. **(A)** Numbers represent the percentage of cells in each quadrant. **(B)** Values are given as the percentage of

CD11c⁺/CFSE⁺ cells of total lymph nodes cells. **(C,D,E)** CCR7 expression was analyzed by quantitative real-time PCR **(C)** and by flow cytometry **(D,E)**. **(D)** Representative histograms of three independent experiments are gated on CD11c⁺ cells. Black histograms, nonspecific binding determined with isotype-matched control antibodies; white histograms, CCR7. **(E)** Results are expressed as median fluorescence intensity (MFI) within the CD11c⁺ population. Data are expressed as mean ± SD and are from a representative experiment from a total of three with similar results, *p< 0.05, **p< 0.001 vs DC.

Figure 5: T3-stimulated DCs in the presence of tumor Ag were able to induce an antitumor immune response.

(A) Schematic representation of antitumoral therapy for B16-OVA melanoma with Control, OVA (DC+OVA), OVA and T3 (DC+OVA+T3) DCs. **(B)** Tumor growth curve. **(C)** Photos of tumors removed on day 27 post-tumor injection. **(D,E)** Kaplan–Meier plot showing the percentages of survivor **(D)** and tumor-free mice **(E)** from each experimental group. Results are from a representative experiment from a total of three with similar results (total of 5 mice per group).

Figure 6: Vaccination with T3-stimulated DC induced an increase in CD8⁺ T cells in the tumor and an IFN-γ mediated tumor Ag-specific response.

Animals were treated on days 1, 3, 5 and 8 as described in Fig. 5A, and sacrificed on day 27. **(A)** Tumor-infiltrating cell lineage was determined by flow cytometry. Numbers represent the percentage of cells in each quadrant. **(B)** INF-γ production by splenocytes from tumor bearing mice in media supernatants by ELISA. **(C)** The frequency of INF-γ secreting CD4⁺ and CD8⁺ T cells was determined by staining for surface CD4 and CD8 and intracellular INF-γ by flow cytometry. The numbers in each quadrant represent percentage of total cells expressing CD4 or CD8 and INF-γ. Results are from a representative experiment from a total of three with similar results (total of 5 mice per group). Data are expressed as mean ± SD and are from a representative experiment from a total of three with similar results, *p< 0.001 vs basal DC+OVA+T3, **p< 0.001 vs stimulated-DC+OVA.

FIGURE 1

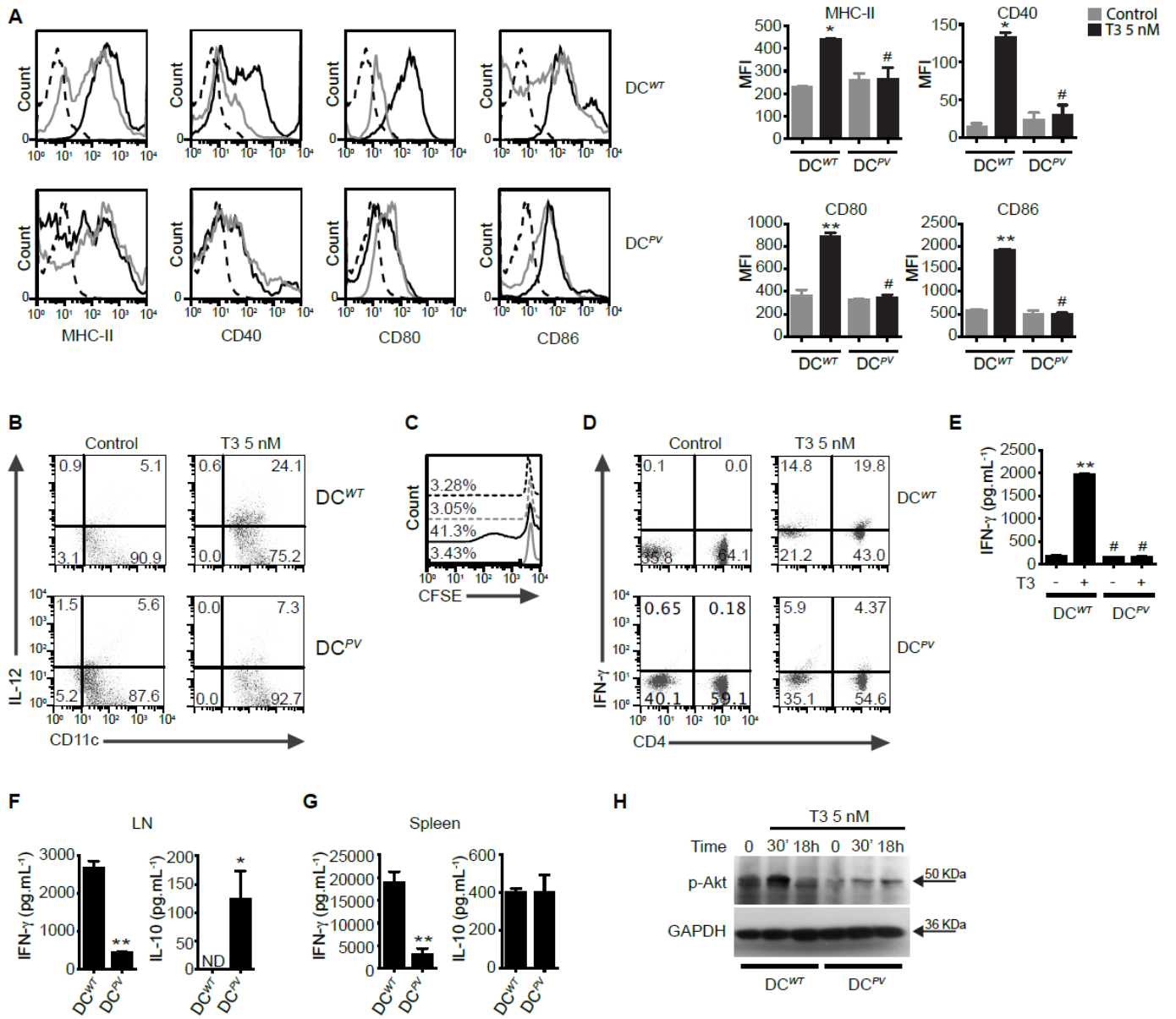
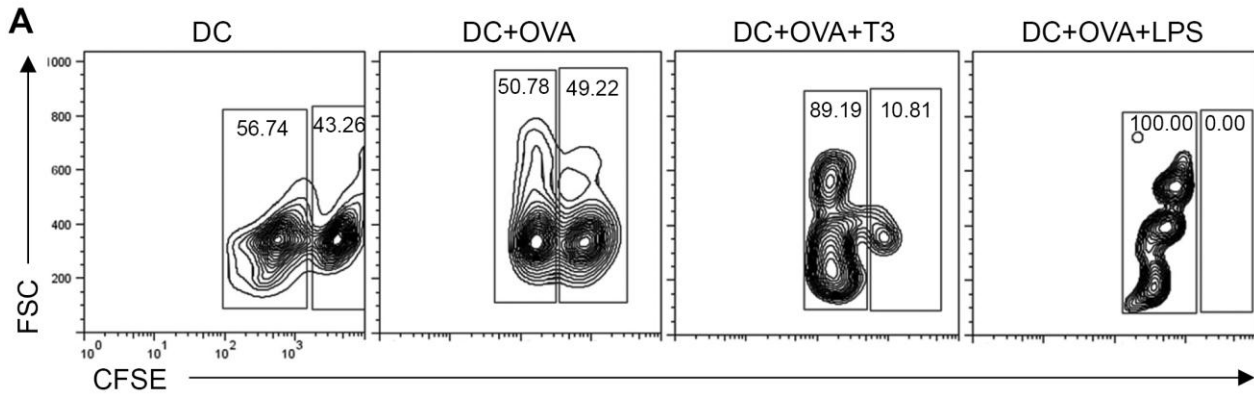
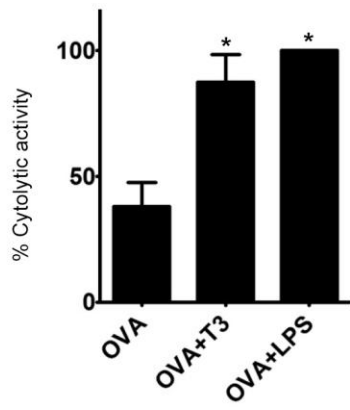


FIGURE 2



B



C

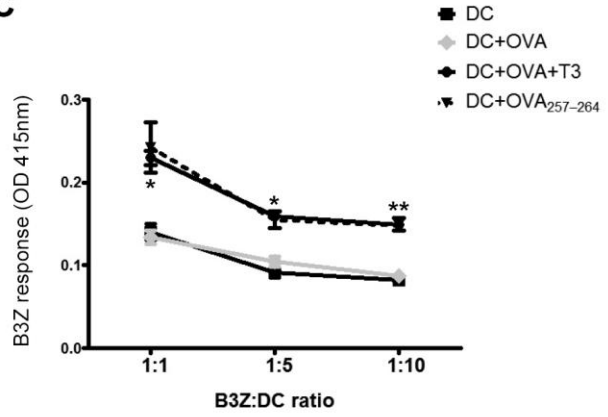


FIGURE 3

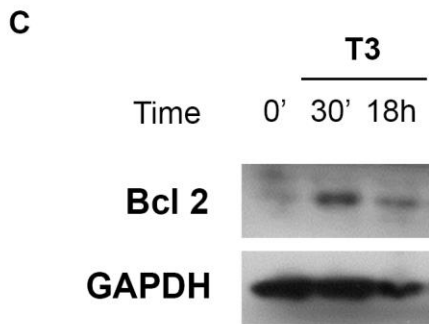
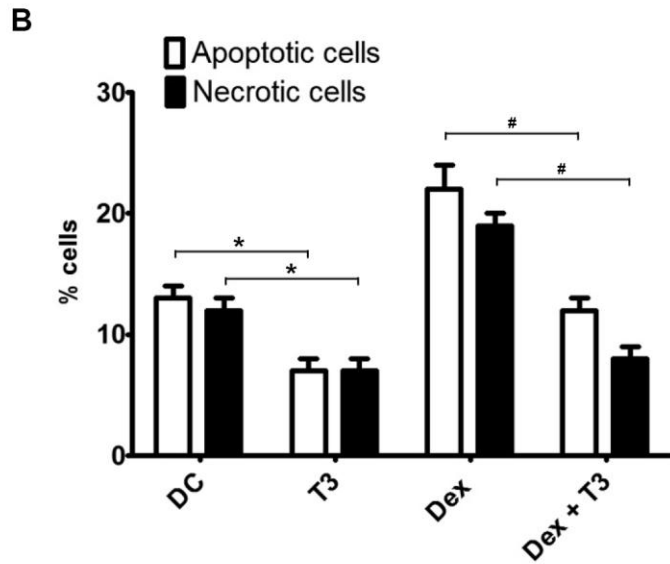
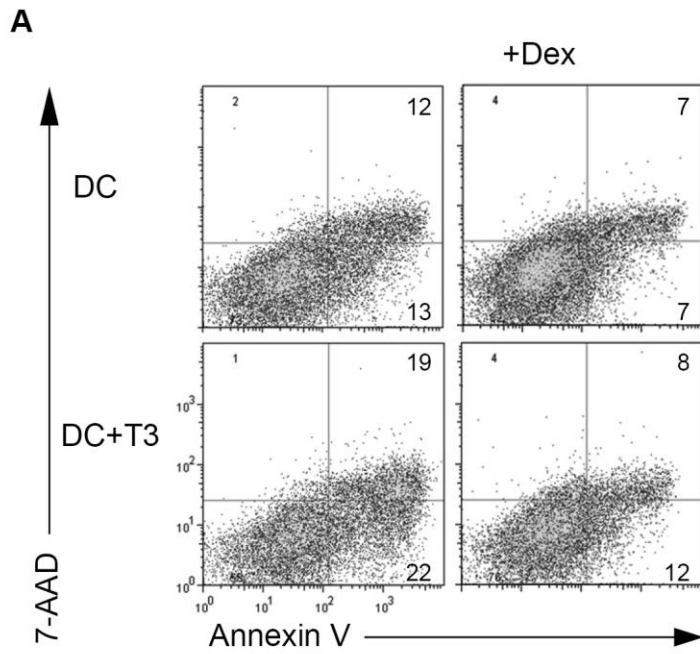


FIGURE 4

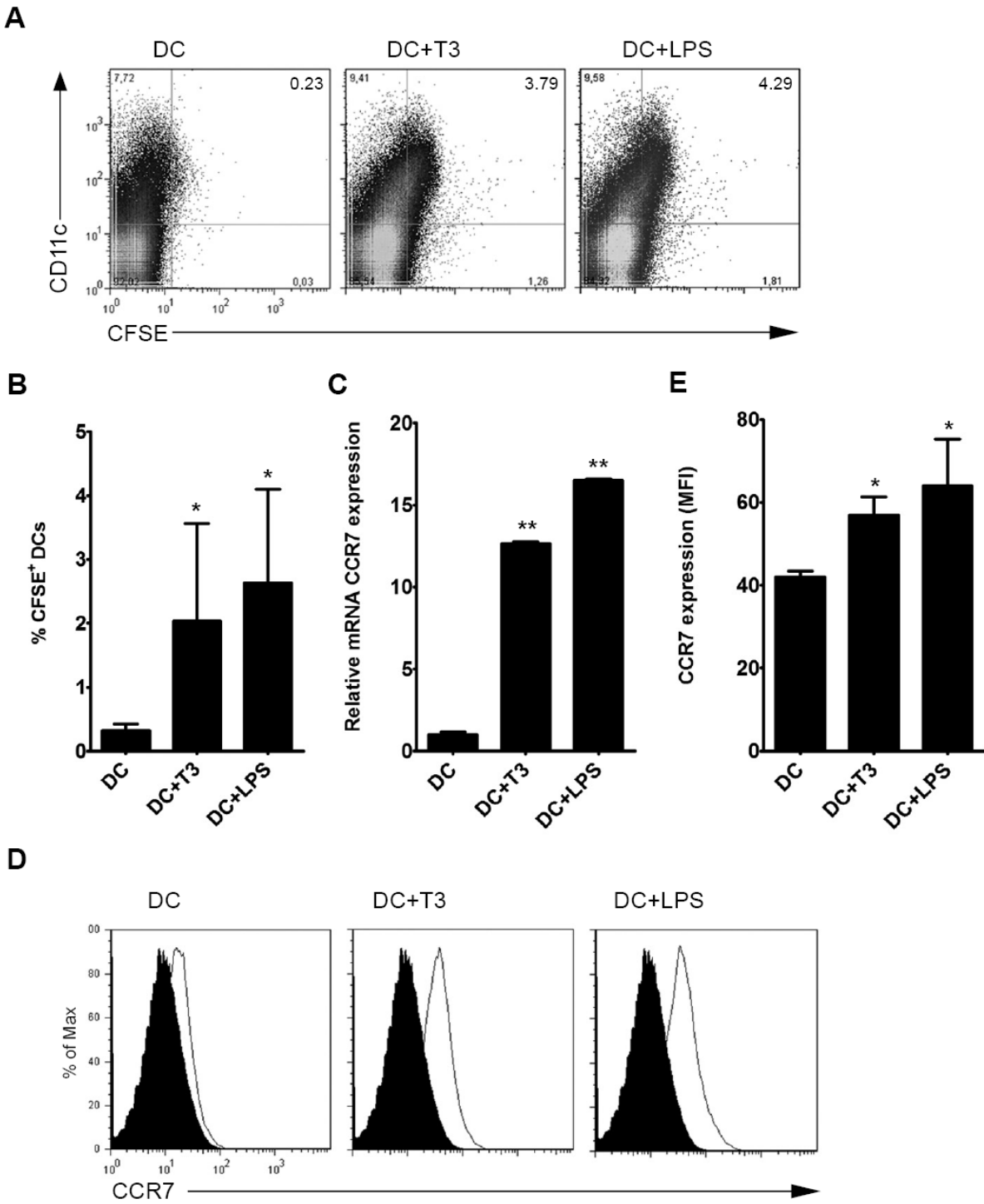


FIGURE 5

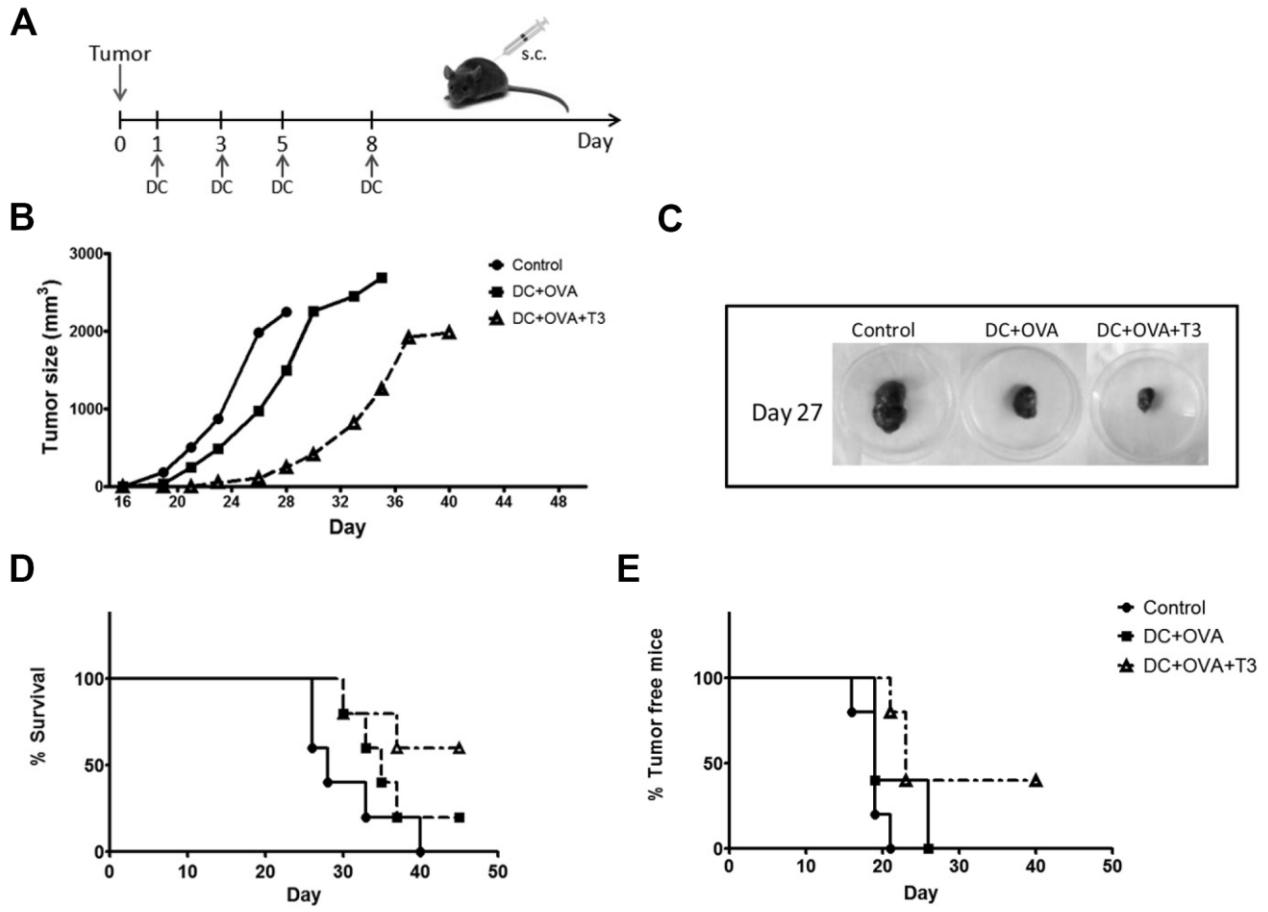
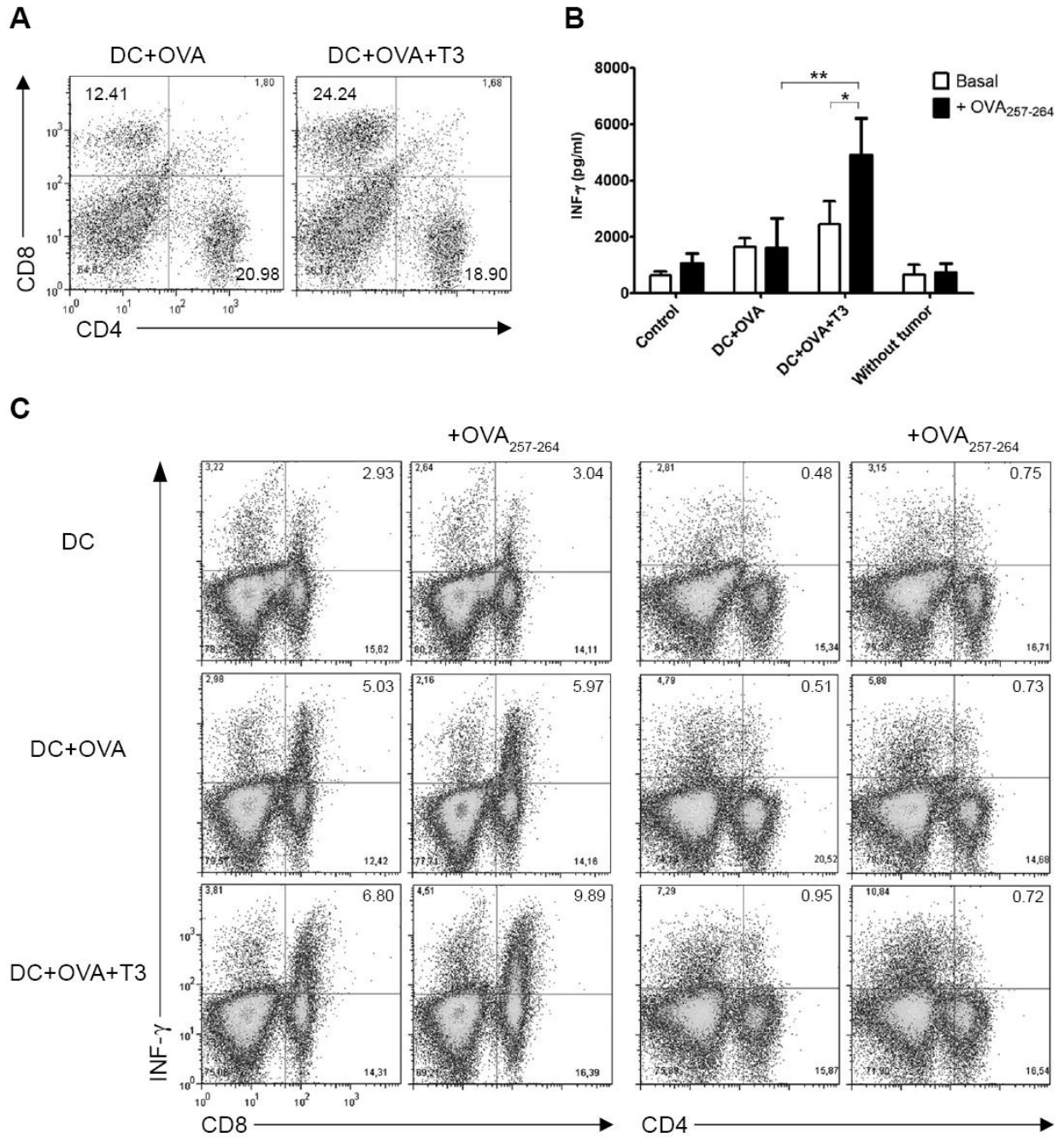


FIGURE 6



XI. AGRADECIMIENTOS

La presente Tesis representa un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron muchas personas, por lo que quiero agradecerles sus consejos, apoyo, ánimo y compañía tanto en los momentos de crisis, como en los de felicidad. Quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y brindan...

A Claudia, por haberme dado la oportunidad y confianza de llevar a cabo este proyecto. Por enseñarme que podemos superar los obstáculos que se nos presentan, y guiarme a lo largo de estos años para hoy poder alcanzar esta meta.

A los miembros de la Comisión de Tesis y al Evaluador Externo por su buena predisposición y por los valiosos aportes que contribuyeron a mi formación académica.

A mis compañeros del Labo 116, los de antes, los de ahora y los de siempre, Maga, Mari, Iván, Nico, Ana Caro, Moni, Anita Belén, Vicky, Lauri's, Juan y Dra. Masini, quienes compartieron conmigo de cerca cada paso de este camino y fueron parte de este trabajo de una u otra manera. Gracias por cada consejo, experimento, charla o mate compartido; simplemente por hacer mejores los días en nuestro "segundo hogar", que es el Labo.

A mis compañeros del CIBICI y de la facu, en especial Jime, Anita, Jesi, Leo, Silvi, Fer, Flor, Estefi y Cristian, por su ayuda, compañerismo, charlas en los pasillos y tantos momentos compartidos a lo largo de estos años.

A la Dra. Graciela Cremaschi y a todo su grupo, por su su calidad humana y ayuda desinteresada, que fueron muy valiosas para mí y para el desarrollo de esta Tesis.

A mis padres, Betty y Jorge, porque gracias a ellos soy quien soy; por la educación que me dieron, el apoyo y el amor de siempre.

A mis hermanas, Daniela, Evelina y María Victoria, por ser las compañeras incondicionales de mi vida.

A mis amigas de y para siempre, Nadia, Fer, Gise, Vane, Beli, Fla y Lara, por compartir cada etapa de mi vida, demostrándome el valor de la verdadera amistad.

A mi “segunda familia”, Mimí, Eduardo, Maga, Eli y Alejo, por estar siempre presentes brindándome su apoyo en lo que necesite.

Finalmente y especialmente, al amor de mi vida, Daniel, por haberme acompañado incondicionalmente a lo largo de estos años. Por apoyarme en cada paso que doy. Por haberme sabido entender y aconsejar en momentos complicados, pero también por ser parte de los más felices. Por todo eso y más, pido a la vida muchos años más siempre juntos, pero ahora acompañados.