

Tesis para optar al Título de Doctor en Ciencias Químicas



# CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA ANTITUMORAL INDUCIDA POR INMUNOTERAPIA CON CÉLULAS DENDRÍTICAS ESTIMULADAS CON TRIIODOTIRONINA

**Bioq. María Florencia Soler**

Departamento de Bioquímica Clínica

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología -  
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

(CIBICI-CONICET)

Facultad de Ciencias Químicas,  
Universidad Nacional de Córdoba.

Córdoba, octubre 2021.

## **DIRECTORA DE TESIS:**

Dra. MARÍA DEL MAR MONTESINOS. Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas (FCQ). Universidad Nacional de Córdoba (UNC). Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI – CONICET – UNC).

## **COMISIÓN ASESORA:**

Dra. ANDREA ROPOLO. Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra (INIMEC – CONICET – UNC).

Dra. CARINA PORPORATTO. Instituto Multidisciplinario de Investigación y Transferencia Agroalimentaria y Biotecnológica (IMITAB, CONICET – UNVM). Universidad Nacional de Villa María (UNVM).

Dra. CLAUDIA PELLIZAS. Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Químicas (FCQ). Universidad Nacional de Córdoba (UNC). Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI – CONICET – UNC).

## **EVALUADOR EXTERNO:**

Dra. MARTA ALICIA TOSCANO. Laboratorio de Biología Molecular y Citogenética. Hospital Doctor Arturo Oñativia. Salta Capital.

# DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

**Lugar y Fecha:**

**Calificación:**

## TRIBUNAL

Firma: ..... Aclaración: .....

Firma: ..... Aclaración: .....

Firma: ..... Aclaración: .....

Firma: ..... Aclaración: .....

El presente trabajo fue realizado en el Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CIBICI-CONICET), Departamento de Bioquímica Clínica de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba (UNC).

El mismo fue llevado a cabo durante el desempeño de la Beca de Doctorado nivel inicial del Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCYT) y de la Beca Interna de Finalización de Doctorado otorgada por el CONICET. Los subsidios que financiaron este trabajo fueron otorgados por SeCyT, el CONICET y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT, FONCYT).

---

# ÍNDICE

---

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>4</b>
<b>CAPÍTULO 1</b>	
1.1.1 Interacciones inmunoneuroendócrinas	4
1.1.2 Hormonas Tiroideas	6
<b>CAPÍTULO 2</b>	
1.2.1 Sistema Inmune	12
1.2.2 Inmunidad Innata	14
1.2.3 Células Dendríticas y polarización de la respuesta inmune	17
1.2.4 Células Dendríticas en inmunoterapia antitumoral	28
<b>CAPÍTULO 3</b>	
1.3.1 Hormonas Tiroideas y Sistema Inmune	37
1.3.2 Hormonas Tiroideas y Células Dendríticas	42
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>46</b>

<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>48</b>
<b>3.1</b> Ratones	<b>48</b>
<b>3.2</b> Preparación y cultivo de las DCs	<b>48</b>
<b>3.3</b> Análisis del fenotipo de DCs murinas	<b>49</b>
<b>3.4</b> Cultivo e inducción de apoptosis de las células tumorales MC38	<b>49</b>
<b>3.5</b> Ensayo de captación de antígenos	<b>50</b>
<b>3.6</b> Estimulación de las DCs con antígenos tumorales	<b>50</b>
<b>3.7</b> Modelo tumoral <i>in vivo</i> y protocolo de inmunoterapia basada en DCs	<b>51</b>
<b>3.8</b> Obtención de esplenocitos y linfocitos del ganglio drenante del tumor de ratones	<b>52</b>
<b>3.9</b> Caracterización de poblaciones celulares y determinación de la producción de citoquinas	<b>52</b>
<b>3.10</b> Determinación de citoquinas en sobrenadantes	<b>53</b>
<b>3.11</b> Ensayo de inmunofluorescencia	<b>53</b>
<b>3.12</b> Aislamiento del Ácido Ribonucleico (ARN)	<b>54</b>
<b>3.13</b> Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR)	<b>54</b>
<b>3.14</b> Generación de Células Dendríticas humanas	<b>55</b>

<b>3.15</b>	<b>Caracterización del fenotipo de DCs humanas</b>	<b>56</b>
<b>3.16</b>	<b>Análisis estadístico</b>	<b>56</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS I</b>	<b>57</b>
<b>4.1</b>	<b>Evaluación de la respuesta de Células Dendríticas (DCs) estimuladas con T3 frente a antígenos tumorales</b>	<b>57</b>
<b>4.1.a</b>	La irradiación con luz UVB induce la muerte celular de las células tumorales MC38	<b>57</b>
<b>4.1.b</b>	Las iDCs y las DCs estimuladas con T3 captan antígenos provenientes de las células tumorales MC38	<b>59</b>
<b>4.2</b>	<b>Efectos de las DCs estimuladas con T3 expuestas a Ags tumorales sobre el balance de la respuesta inmune</b>	<b>60</b>
<b>4.2.a</b>	Las DCs estimuladas con T3 y en presencia de Ags tumorales, revelan una mayor expresión del marcador de maduración CD86	<b>60</b>
<b>4.2.b</b>	T3 favorece la producción de IL-12, IL-6 y TGF- $\beta$ en DCs expuestas a Ags tumorales	<b>62</b>
<b>4.3</b>	<b>Evaluación de la capacidad de las DCs maduras con T3 de estimular una respuesta inmune antitumoral <i>in vivo</i></b>	<b>66</b>
<b>4.3.a</b>	La vacunación con DCs estimuladas con T3 y cargadas con Ags propios del tumor induce una reducción del crecimiento tumoral	<b>66</b>

<b>4.3.b</b> La vacunación con DCs estimuladas con T3 y cargadas con Ags asociados al tumor promueve la inducción de una respuesta antitumoral mediada por IFN- $\gamma$	<b>69</b>
<b>4.3.c</b> T3 aumenta la capacidad de las DCs utilizadas como inmunoterapia antitumoral de polarizar la respuesta inmune hacia un perfil productor de IL-17	<b>73</b>
<b>4.3.d</b> La vacunación con DCs estimuladas con T3 y enfrentadas a Ags propios del tumor, induce una respuesta proinflamatoria con un incremento en la secreción de IFN- $\gamma$ y de IL-17	<b>77</b>
<b>4.3.e</b> Rol esencial de IL-17 como mediador del efecto antitumoral inducido por la inmunoterapia basada en DCs estimuladas con T3 en el modelo de carcinoma de colon	<b>79</b>
<b>4.3.f</b> Vascularización tumoral mediada por IL-17 como respuesta a la inmunoterapia antitumoral de DCs estimuladas con T3 en el modelo de carcinoma de colon	<b>82</b>
<b>5. DISCUSIÓN I</b>	<b>85</b>
<b>6. RESULTADOS II</b>	<b>98</b>
<b>6.1 Evaluación de los efectos de T3 sobre DCs humanas (huDCs)</b>	<b>98</b>
<b>6.1.a</b> T3 promueve la maduración de huDCs	<b>98</b>
<b>6.1.b</b> T3 estimula la activación de huDCs favoreciendo la producción de IL-12	<b>101</b>



<b>7. DISCUSIÓN II</b>	<b>103</b>
<b>8. CONCLUSIÓN GENERAL</b>	<b>107</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>108</b>
<b>10. ABREVIATURAS</b>	<b>140</b>
<b>11. PRESENTACIONES EN CONGRESOS</b>	<b>143</b>
<b>12. PUBLICACIONES</b>	<b>145</b>
<b>13. AGRADECIMIENTOS</b>	<b>146</b>

---

## RESUMEN

---

La evidencia acumulada a lo largo de las últimas décadas demuestra una estrecha interrelación entre los sistemas neuroendócrino e inmune. Con el fin de mantener la homeostasis del organismo y dirigir respuestas coordinadas frente a los distintos desequilibrios y patologías, ambos sistemas se encuentran en constante comunicación a través de una variedad de citoquinas, hormonas, neurotransmisores y sus receptores. En los últimos años el estudio de la relación entre las hormonas tiroideas (HTs) y el sistema inmune ha tomado relevancia. Sin embargo, la comprensión de la conexión entre las HTs y el sistema inmune es todavía incompleta debido a la complejidad de cada sistema y más aún a su interacción.

Actualmente las HTs son reconocidas por desempeñar un rol esencial en las células de la inmunidad innata y adaptativa, y sus respuestas asociadas. El papel de las HTs en el inicio de la respuesta inmune y su efecto en el direccionamiento de la respuesta inmune adaptativa fue abordado hace poco más de una década. En este sentido el laboratorio donde se desarrolló esta tesis doctoral reportó los primeros hallazgos del efecto de triiodotironina (T3) sobre las características y funcionalidad de las Células Dendríticas (DCs), consideradas las principales células presentadoras de antígenos. En este contexto, se evidenció por primera vez la expresión de receptores de HTs (TR) en DCs murinas, principalmente la isoforma  $\beta 1$ . Además, se demostró que niveles fisiológicos de la HT activa, T3, inducen la maduración de DCs y su capacidad de secreción de IL-12. A su vez, las DCs estimuladas con T3 incrementaron la capacidad aloestimuladora de linfocitos T, direccionando la respuesta inmune hacia los perfiles proinflamatorios T *helper* 1 (Th1), Th17 y citotóxicos con aumentada producción de la citoquina efectora IFN- $\gamma$ . Asimismo, el tratamiento de las DCs con T3 aumentó significativamente la producción de las citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-23, involucradas en la producción de IL-17 y disminuyó la población de células T regulatorias. Por otro lado, T3 fue capaz de reducir la apoptosis de DCs y aumentar su migración hacia los ganglios linfáticos. Considerando estos resultados se desarrolló una vacunación antitumoral

basada en DCs estimuladas con T3 en un modelo tumoral de melanoma. Este tratamiento fue capaz de aumentar el porcentaje de animales libres de tumor, retrasar la aparición y disminuir el volumen del tumor en los ratones afectados, aumentando la supervivencia de los mismos.

Sobre la base de los antecedentes presentados, esta tesis doctoral implica la profundización del efecto de las HTs sobre la inducción de respuestas inmunes adaptativas a través de las DCs como objetivo general.

En lo particular, este trabajo abordó 2 objetivos específicos: **1)** Desarrollo de una estrategia de vacunación para el tratamiento antitumoral basada en la manipulación de DCs estimuladas con T3 expuestas a antígenos asociados al tumor (AATs) y **2)** Estudio de los efectos de T3 sobre las características y funcionalidad de las DCs humanas.

**1)** Los resultados obtenidos en la primera parte de este trabajo de tesis doctoral indicaron, por un lado, que el tratamiento con T3 no modifica la capacidad de captación antigénica de las DCs frente a antígenos propios del tumor, sin embargo, esta hormona es capaz de incrementar la expresión del marcador de maduración CD86. Además, se evidenció un marcado aumento por parte de las DCs en la producción de citoquinas proinflamatorias, como IL-12, IL-6 y TGF- $\beta$  luego de ser tratadas con T3. En el modelo murino de carcinoma de colon, T3 potenció los efectos antitumorales de la vacunación a base de DCs cargadas con antígenos tumorales, evidenciados por una reducción en el tamaño tumoral. En efecto, la respuesta inmune generada por la inmunoterapia basada en DCs estimuladas con T3 consistió en un marcado incremento en las poblaciones Th1 (CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>), Th17 (CD4<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup>), como así también en las células T citotóxicas CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, y citotóxicas 17 (Tc17), acompañada por un incremento en la secreción de IFN- $\gamma$  e IL-17. Teniendo en cuenta estos resultados y los antecedentes del grupo que relacionan estrechamente la estimulación de las DCs con T3 con una mayor producción de IL-17, sumado a las controversias bibliográficas relacionadas al papel de esta citoquina en cáncer, decidimos analizar la importancia de IL-17 como mediador de los efectos inmunoterapéuticos en nuestro tratamiento antitumoral. Para ello evaluamos el crecimiento tumoral en ratones IL-17 A/F-doble *Knockout* (IL-17KO), aplicando el mismo esquema de vacunación y comparando dicho crecimiento en ratones *Wild Type* (WT)

como control. De este modo, pudimos evidenciar que la ausencia de IL-17 en los ratones IL-17KO conduce a un mayor crecimiento tumoral, dado que observamos un significativo aumento del volumen del tumor, al comparar los ratones transgénicos que fueron vacunados con DCs cargadas con AATs y tratadas con T3, con aquellos animales WT que recibieron el mismo tratamiento. A su vez, observamos que IL-17 presentaría un rol en la angiogénesis tumoral, lo que favorecería la reducción del tumor por la inmunoterapia basada en DCs estimuladas con T3 en el modelo de carcinoma de colon MC38. En conclusión, los resultados aquí presentados refuerzan los conocimientos de las propiedades adyuvantes de T3 para su utilización en la vacunación antitumoral basada en DCs, y profundizan en los mecanismos involucrados en el desarrollo de una respuesta inmune eficiente luego de la vacunación.

**2)** Los resultados obtenidos en la segunda parte de este trabajo de tesis doctoral demuestran que concentraciones fisiológicas de T3 tienen efectos inmunomoduladores sobre las DCs diferenciadas a partir de monocitos de sangre periférica (huDCs). Esto fue evidenciado por una mayor expresión de la molécula CD86 en la superficie celular y una tendencia a incrementar en el porcentaje de células CD11c<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup> luego del tratamiento con la hormona. Por otro lado, se demostró que la presencia de T3 es capaz de inducir una mayor producción de la citoquina proinflamatoria IL-12 por parte de las huDCs. Estos resultados iniciales aportan en el conocimiento del efecto de T3 sobre la maduración y la activación de DCs humanas, induciendo la liberación de IL-12 por parte de estas células, y probablemente favoreciendo la polarización de la respuesta inmune hacia un perfil proinflamatorio.

Estos hallazgos son prometedores y alientan la profundización del estudio del efecto de T3 sobre DCs humanas, aspecto muy poco explorado y de trascendencia considerando la potencial transferencia de los resultados obtenidos en modelos murinos a la oncología humana.

---

# INTRODUCCIÓN

---

## CAPÍTULO 1

### 1.1.1 Interacciones inmunoneuroendócrinas

La evidencia acumulada a lo largo de las últimas décadas sugiere una regulación bidireccional entre los sistemas neuroendócrino e inmune. Con el fin de mantener la homeostasis del organismo y dirigir respuestas coordinadas frente a los distintos desequilibrios y patologías, ambos sistemas se encuentran en constante comunicación a través de una variedad de citoquinas, hormonas, neurotransmisores y sus receptores.<sup>1</sup> Además, se ha demostrado que las interacciones entre los sistemas endócrino e inmune contribuyen a condiciones fisiopatológicas, que incluyen sepsis, inflamación, enfermedades autoinmunes e infecciones virales.<sup>3</sup> La regulación neuroendócrina de la respuesta inmune es importante para la supervivencia durante el estrés tanto fisiológico como emocional, y se logra localmente a través de neurotransmisores, regionalmente mediante vías nerviosas que inervan órganos linfoides, y en forma sistémica a través de cascadas hormonales. En este sentido, la regulación del sistema inmune mediada por las hormonas involucra al eje Hipotálamo-Pituitario-Adrenal (HPA) a través de la hormona liberadora de adrenocorticotrofina (CRH) / Adrenocorticotrofina (ACTH) / Glucocorticoides (GCs), el eje Hipotálamo-Pituitario-Gonadal (HPG) con la participación de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) / Hormonas foliculoestimulante (FSH) y luteinizante (LH) regulando la liberación de hormonas sexuales como estrógenos, progesterona y testosterona; y el eje Hipotálamo-Pituitario-Tiroideo (HPT) del cual participan la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) / Hormona estimulante de tiroides (TSH) / Tiroxina (T4) y Triiodotironina (T3) (**Figura 1**).

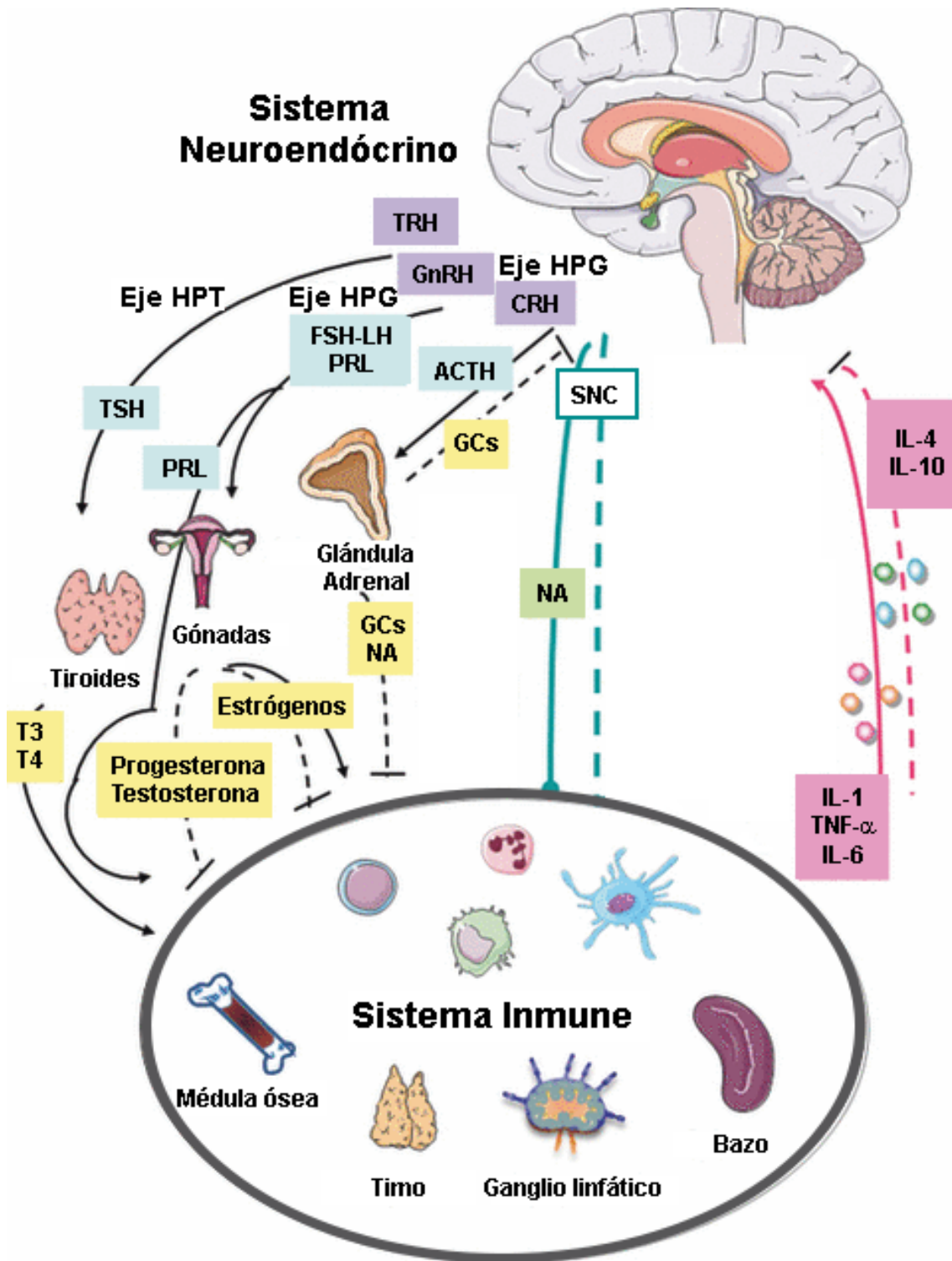


Figura 1. Interrelación y regulación entre los sistemas neuroendócrino e inmune.

Las interacciones entre el sistema inmune y el sistema neuroendócrino son reguladas a nivel sistémico por hormonas y citoquinas, mediadas a través de los ejes Hipotálamo-Pituitaria (HP) Tiroideo (HPT), Gonadal (HPG) y Adrenal (HPA). Por otro lado, los sistemas nerviosos autónomo y periférico participan en el control regional y local del sistema inmune. A su vez, las células inmunes producen citoquinas como interleuquina (IL-6, IL-1, IL-4, IL-10, Factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ); entre otras, capaces de afectar las funciones neuronales. GCs: Glucocorticoides, NA: Noradrenalina, PRL: Prolactina. Adaptado con modificaciones de Miyake, 2012.<sup>1</sup>

La mayoría de los estudios iniciales de la interrelación entre los sistemas neuroendócrino e inmune fueron abordados con el objetivo de dilucidar el rol de las hormonas del eje HPA, fundamentalmente el de los GCs sobre la respuesta inmune. Al respecto, los GCs generalmente presentan propiedades inmunosupresoras y antiinflamatorias mediante la inhibición de la diferenciación, maduración, proliferación y funciones de las células pertenecientes a la inmunidad innata y adaptativa.<sup>4 5 6</sup> En los últimos años el estudio de la relación entre el eje HPT y el sistema inmune ha tomado relevancia.<sup>7</sup> En este aspecto, diversas situaciones que afectan en primera instancia la acción de las Hormonas Tiroideas (HTs) impactan en las características y/o función de las células inmunes, y en consecuencia comprometen las respuestas inmunes en condiciones fisiopatológicas.<sup>8</sup> A su vez, desórdenes inmunes conducen a las disfunciones tiroideas más frecuentes, las cuales presentan un origen autoinmune, como la enfermedad de Graves y la Tiroiditis de Hashimoto.<sup>9 10</sup> Sin embargo, la comprensión de la conexión entre las HTs y el sistema inmune es todavía incompleta debido a la complejidad de cada sistema y más aún a su interacción.

### 1.1.2 Hormonas Tiroideas

Las HTs controlan diversos procesos metabólicos y son indispensables para el desarrollo y crecimiento.<sup>11</sup> Además, regulan la expresión de 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. Estas hormonas son producidas por la glándula tiroides como 3, 5, 3', 5'-tetraiodo-L-tironina o Tiroxina (T4) y 3, 5, 3'-triiodo-L-tironina o Triiodotironina (T3). Ambas hormonas son producidas en los folículos de la glándula tiroides, por la iodación de residuos de tirosina en la glicoproteína tiroglobulina (Tg).<sup>12</sup> La TSH secretada por la hipófisis anterior actúa directamente sobre el receptor de TSH (TSH-R), expresado en la membrana basolateral de las células foliculares tiroideas. La activación de la vía de señalización inducida por TSH regula la captación de yoduro por parte de la glándula y una serie de pasos necesarios para la biosíntesis y secreción de las HTs (**Figura 2 A**).<sup>13</sup> La glándula tiroides produce principalmente T4, la cual es considerada una pro-hormona

que debe convertirse en la hormona funcionalmente activa T3, mediante la eliminación de un átomo de yodo en los tejidos periféricos.<sup>14</sup>

Los niveles circulantes de las HTs se mantienen estables debido a la retroalimentación negativa ejercida por T3 y T4 en el eje HPT.<sup>15</sup> Este circuito de retroalimentación negativa endócrina clásica, consiste en la detección de las HTs circulantes por el hipotálamo, el cual regula la producción de TRH por neuronas hipofisiotróficas en el núcleo paraventricular.<sup>13</sup> La hormona TRH es transportada a la glándula pituitaria donde actúa en las células tirotropas induciendo la síntesis y secreción de TSH, la cual estimula la glándula tiroides para producir y liberar las HTs al torrente sanguíneo (**Figura 2 B**). Por su parte, los tejidos periféricos y el sistema nervioso central controlan la disponibilidad intracelular de las HTs, lo que sugiere que las concentraciones circulantes de estas hormonas no son completamente representativas de lo que detecta cada tipo de célula.<sup>16</sup>

Luego de ser liberadas a circulación, las HTs se dirigirán hacia sus tejidos diana donde T3 debe unirse a sus receptores para poder ejercer su acción (**Figura 2 C**). Asimismo, la HT extracelular debe ingresar a la célula a través de los transportadores de HTs. En este sentido, los principales transportadores de HTs incluyen los transportadores de monocarboxilato 8 y 10 (MCT8 y MCT10), varios miembros de la familia de los polipéptidos transportadores de aniones orgánicos (OATP) y los transportadores heterodiméricos de aminoácidos neutros (LAT).<sup>17</sup> La mayoría de estos transportadores no son específicos de HTs ya que unen diferentes ligandos, con excepción de MCT8 y en menor medida, MCT10 y OATP1C1. Las proteínas MCT8 y MCT10 facilitan el transporte tanto de T4, como de T3, pero con particular preferencia para T3 y se expresan en una variedad de tejidos y células.<sup>18 19</sup> Por su parte, OATP1C1 transporta T4, T3 y T3 reversa (rT3) y se encuentra principalmente expresado en capilares cerebrales.<sup>17</sup> La concentración intracelular de las HTs está regulada por la actividad de selenoproteínas conocidas con el nombre de deiodasas de iodotironinas 1, 2 y 3 (D1, D2 y D3). La eliminación de una molécula de yodo del anillo exterior de T4 por acción de D1 o D2 la convierte en T3, la cual presenta una mayor afinidad por los receptores intracelulares que T4. La enzima D2 es considerada responsable de la producción periférica del 50% al 80% de la reserva corporal de T3 a partir de T4. Por el



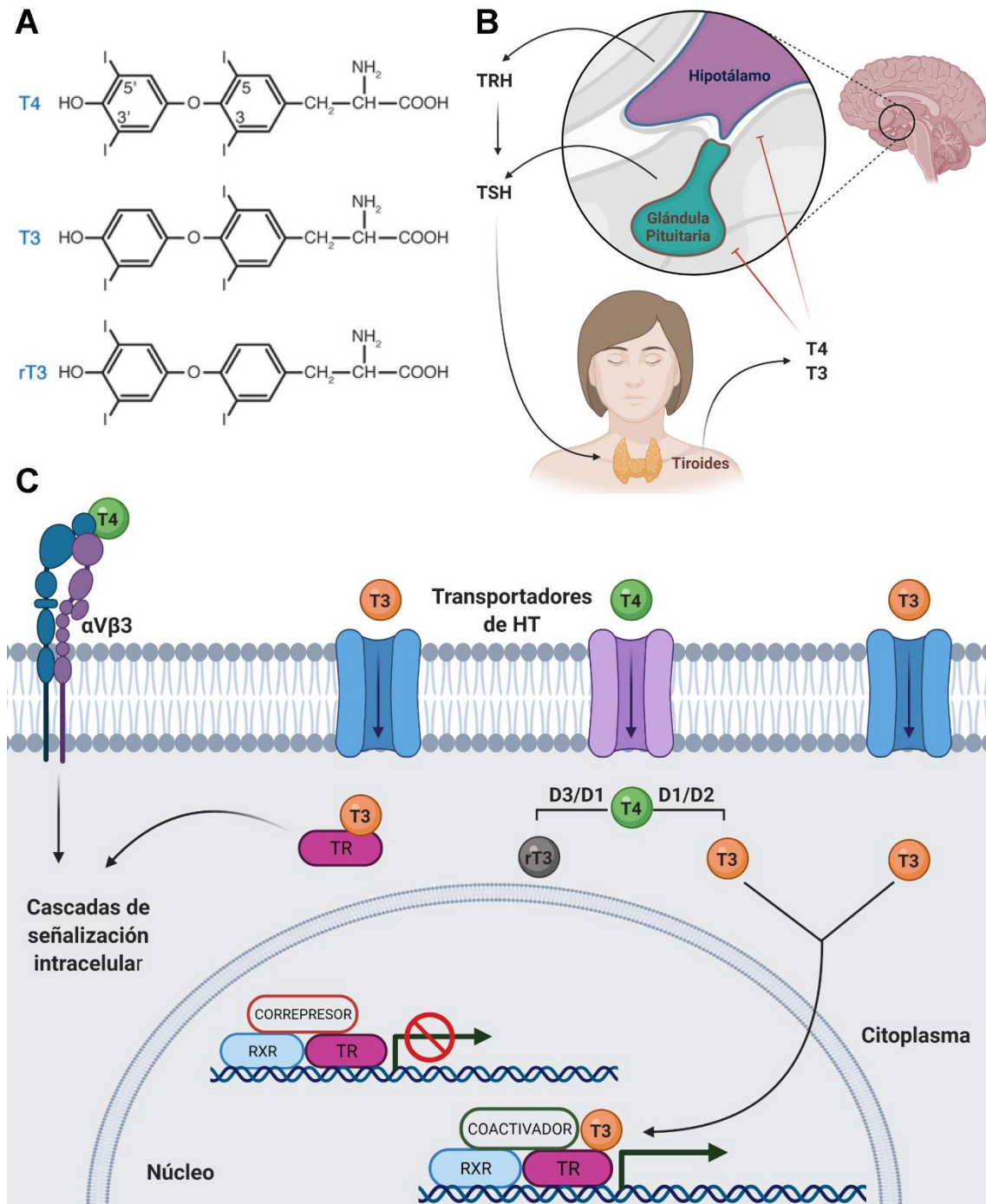
contrario, la deiodinación de un átomo de yodo del anillo interior de T4 produce rT3 la cual se considera un metabolito inactivo en relación con su unión a los receptores. Tanto D1 como D3 restringen la acción de T3, convirtiendo T4 y T3 en metabolitos inactivos.<sup>20</sup> De esta manera, los transportadores de HTs y las deiodasas de iodotironinas son claves para la acción y función de las HTs. Cabe destacar que sus patrones de expresión exhiben un perfil particular que es específico del tipo celular, estado celular y metabólico, y modulan la disponibilidad de las HTs circulantes y periféricas.<sup>21 22</sup>

Las acciones de las HTs pueden ser canónicas o genómicas y no-canónicas o también denominadas no-genómicas (**Figura 2 C**).<sup>23</sup> El mecanismo de acción genómico de las HTs involucra la unión de T3 con los receptores nucleares específicos (TRs), los cuales son definidos como factores de transcripción que regulan la velocidad de transcripción de genes blanco por medio de su unión a los elementos de respuesta a HTs (TRE) ubicados en regiones reguladoras de estos genes. Este mecanismo puede requerir horas para manifestarse e involucra además la interacción de los TRs con otras moléculas proteicas denominadas correguladores que participan activamente en este proceso.<sup>24</sup> Particularmente en genes regulados positivamente por T3, el TR en ausencia de la hormona se encuentra unido al TRE generalmente formando un dímero con el receptor del ácido 9 cis-retinoico (RXR), que a su vez, debido a su asociación con proteínas denominadas “correpresores” se encuentra constitutivamente reprimido. Por su parte, en presencia de T3, se desestabiliza la unión con los correpresores y, por el contrario, el complejo TR-RXR interacciona con otras proteínas llamadas “coactivadores”.<sup>25</sup> La mayoría de las especies de vertebrados poseen dos genes que codifican para los TRs: TR A (NR1A1) y TR B (NR1A2), los cuales fueron mapeados en los cromosomas 17 y 3 respectivamente, dando lugar a cuatro isoformas del receptor capaces de unir T3 (TR $\alpha$ 1, TR $\beta$ 1, TR $\beta$ 2 y TR $\beta$ 3). Los TRs se expresan básicamente en todos los tejidos, aunque su distribución varía entre los diferentes tipos celulares y durante los distintos estadios del desarrollo. Al respecto, TR $\alpha$ 1 se encuentra expresado principalmente en el sistema nervioso central, hueso, intestino, corazón y músculo esquelético; mientras que TR $\beta$ 1 se expresa predominantemente en hígado, cerebro y riñón. Asimismo, la isoforma TR $\beta$ 2 presenta una expresión específica de tejido en la glándula pituitaria anterior y en áreas específicas del hipotálamo, así como en el cerebro

en desarrollo y oído interno.<sup>26</sup> Por otro lado, algunos efectos de las HTs se producen de forma rápida e independiente de las modificaciones en la expresión génica a través de la vía no-canónica. Estas acciones no-genómicas pueden iniciarse tanto en membrana plasmática, citoplasma o incluso en algunas organelas como las mitocondrias (**Figura 2 C**). En este sentido, se ha demostrado que una proteína estructural de la membrana plasmática, la integrina  $\alpha\beta3$ , puede actuar como un receptor de superficie celular para HTs y una gran cantidad de efectos no-genómicos resultaron ser inducidos por la unión de la hormona a dicha integrina. La integrina  $\alpha\beta3$  presenta un sitio específico de unión para T3, así como un sitio en donde ambas hormonas, T4 y T3, pueden interaccionar; aunque T3 lo hace con menor afinidad. La transducción de señales dada por la integrina involucra distintas vías independientes entre sí: Proteína Kinasa C (PKC), Fosfatidilinositol 3-Kinasa (PI3K) /Akt o proteína kinasa activada por mitógenos (MAPK).<sup>27</sup> Cabe destacar que las acciones iniciadas en la membrana plasmática a través de la integrina  $\alpha\beta3$  involucran además la fosforilación específica de TR, translocación de TR y otras proteínas citoplasmáticas al núcleo, culminado en la regulación transcripcional. Por otra parte, los mismos TRs localizados a nivel citoplasmático activan rápidamente las vías de señalización intracelulares dando lugar a efectos que involucran la activación de la vía de PI3K y Akt.<sup>28 29 30</sup>

Asimismo, dado que las HTs son importantes reguladores de la diferenciación, crecimiento, metabolismo y función de prácticamente todos los tejidos; una función alterada de la glándula tiroides o del metabolismo celular de las HTs afecta a una variedad de tejidos y células. Las enfermedades y los desórdenes asociados con la glándula tiroides son trastornos endócrinos frecuentes en la práctica clínica, constituyendo un problema de salud global debido a los efectos adversos importantes que pueden manifestarse si no se diagnostican. En este sentido, la disfunción tiroidea comprende un amplio número de entidades con manifestaciones clínicas diferentes, que pueden ir desde el hipertiroidismo hasta el hipotiroidismo.<sup>31</sup> El hipotiroidismo es una condición clínica resultante de la escasez de HTs. El mismo puede tener un origen congénito por ausencia o grave deterioro funcional de la glándula tiroides, el cual puede manifestarse con un profundo déficit neurológico y retraso del crecimiento. Por otro lado, esta condición puede tener un origen adquirido, ya sea por deficiencia de yodo o

por autoinmunidad como en la Enfermedad de Hashimoto.<sup>32 33</sup> Por el contrario, el hipertiroidismo es principalmente una condición adquirida y es el resultado de un exceso de HTs en la circulación debido a bocio multinodular, adenoma tóxico y con mayor frecuencia a la Enfermedad de Graves.<sup>34</sup>



**Figura 2. Estructura, regulación y mecanismo de acción de las Hormonas Tiroideas (HTs).**

(A) Estructura molecular de las principales formas de HTs: 3,5,3',5'-tetraiodo-L-tironina (T4); 3,5,3'-triiodo-L-tironina (T3) y T3 reversa (rT3). (B) Esquema representativo del eje Hipotálamo-Pituitaria-

## Introducción

Tiroides (HPT), donde se observa la regulación de la síntesis de las HTs y el mecanismo de retroalimentación negativa. **(C)** Mecanismos de acción de las HTs en los tejidos diana. Los transportadores de HTs permiten el ingreso de T4 y T3 al interior celular donde las deiodinasas de iodotironinas (D1, D2 y D3) catalizan la metabolización de las HTs. En el mecanismo canónico o genómico, los TRs en ausencia de T3 heterodimerizan con el receptor del ácido 9-cis retinoico (RXR) y se unen al elemento de respuesta a HT (TRE) en el ADN. En genes regulados positivamente por T3, en ausencia de HT, el heterodímero TR-RXR recluta el complejo de correpresores, inactivando la expresión génica. La unión de T3 al dominio de unión al ligando del TR promueve un cambio conformacional induciendo la liberación de los correpresores, promoviendo el reclutamiento de coactivadores e induciendo la transcripción génica. En los mecanismos de acción no-genómicos, las HTs ejercen sus efectos a través de la unión a TRs localizados en el citoplasma o a la integrina de membrana  $\alpha\beta3$ , activando cascadas de señalización intracitoplasmáticas. Esta figura fue creada usando Biorender, adaptado con modificaciones de *Brent et. al., 2012*.<sup>24</sup>

## CAPÍTULO 2

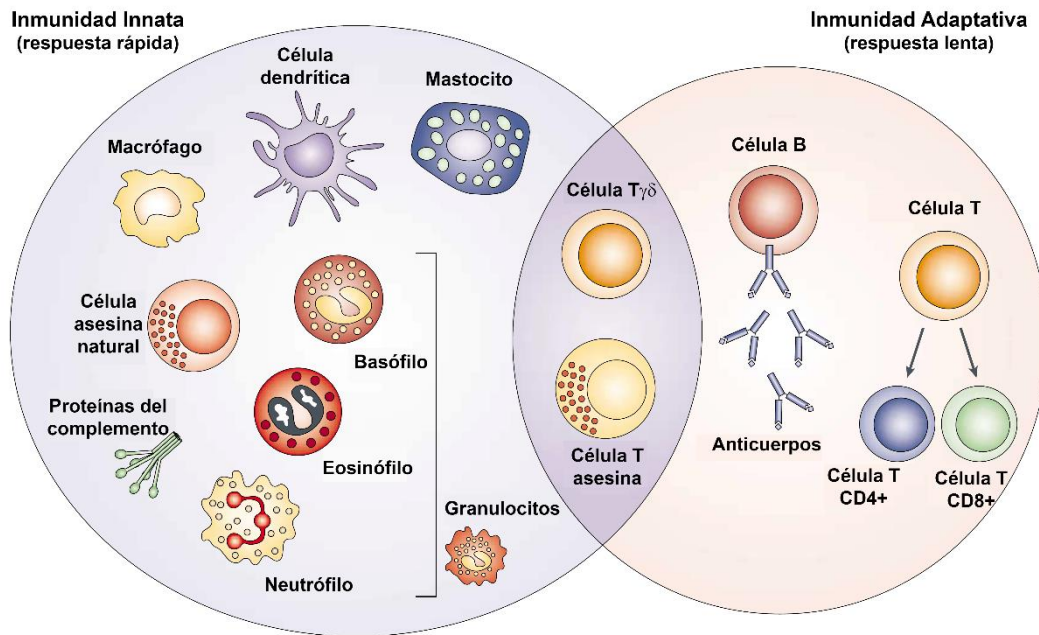
### 1.2.1 Sistema Inmune

El sistema inmune es un conjunto de elementos y procesos biológicos que protegen al huésped frente a agresiones externas ya sean de naturaleza biológica (patógenos), o fisicoquímica (contaminantes, radiaciones, sustancias tóxicas o alergénicas), e incluso agresiones internas (células cancerosas), permitiendo mantener la homeostasis o equilibrio interno del organismo. Además de las barreras anatómicas y fisiológicas, el sistema inmune provee la principal línea de defensa del huésped. Desde una visión simplista se lo puede dividir en inmunidad innata e inmunidad adaptativa. En ambos subconjuntos participan distintos tipos celulares y mecanismos de acción que se encuentran interconectados entre ellos en forma dinámica para alcanzar la respuesta inmune adecuada.<sup>35</sup>

El sistema inmune innato está presente desde el nacimiento, y actúa de forma inmediata frente a una noxa. Las células que participan en la inmunidad innata poseen un sistema de reconocimiento que involucra receptores, conocidos como receptores de reconocimiento de patrones (RRPs). Estos receptores están dirigidos contra estructuras comunes y conservadas, presentes tanto en patógenos, como liberadas durante daño tisular ante un proceso de inflamación estéril, denominados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y patrones moleculares asociados al daño (DAMPs), respectivamente.<sup>36</sup> La interacción de los RRPs con su ligando da lugar a la activación de varias vías de transmisión de señales y a factores de transcripción que inducen la expresión de genes importantes para las respuestas inflamatorias y antimicrobianas.<sup>37</sup>

Por su parte, la inmunidad adaptativa es más lenta para inducirse y se caracteriza por la expresión en la superficie de los linfocitos T y B de receptores de reconocimiento antigénico altamente específicos dirigidos contra estructuras particulares. Además, cada célula de la inmunidad adaptativa expresa un único receptor, lo que conduce a una diversidad de receptores que constituye el repertorio. Luego del encuentro inicial con el antígeno (Ag), las células que expresan estos receptores persisten en el organismo durante toda la vida proporcionando memoria inmunológica y la capacidad de responder en forma más rápida y efectiva ante una reinfección.<sup>38 39</sup>

Una de las funciones de la inmunidad innata es el rápido reclutamiento de las células inmunes a los sitios de infección e inflamación a través de la producción de citoquinas y quimiocinas. La respuesta inmune innata consiste en una serie de procesos biológicos que involucran factores solubles como las proteínas circulantes que integran el sistema de complemento y distintos tipos celulares que difieren notoriamente en su morfología, propiedades y funcionalidad. Las células de la inmunidad innata de mayor relevancia son los leucocitos polimorfonucleares (PMNs: basófilos, eosinófilos y neutrófilos), monocitos, macrófagos, células dendríticas (DCs) y células linfoides innatas (ILCs) que incluyen las células asesinas naturales (*Natural Killer*: NK).<sup>40</sup> Asimismo, las células T asesinas naturales (NKTs) y células T  $\gamma\delta$  son linfocitos T que se encuentran en la intersección de la inmunidad innata y adaptativa.<sup>41</sup> En relación a la respuesta inmune adaptativa, la misma es mediada principalmente por los linfocitos B y T, los cuales interactúan de forma coordinada con las células presentadoras de antígenos, en su mayoría pertenecientes a la inmunidad innata. La activación de los linfocitos B induce su diferenciación a células plasmáticas capaces de secretar anticuerpos. Por su parte, los linfocitos T pueden diferenciarse en células T citotóxicas (CD8<sup>+</sup>) y células T auxiliares o *helper* (Th, CD4<sup>+</sup>), con la capacidad de destruir células tumorales o infectadas por virus, o bien mediar la activación de otras células inmunes (**Figura 3**).<sup>42 43</sup>



**Figura 3. Componentes celulares y humorales del sistema inmune.**

La inmunidad innata provee una respuesta inmediata ante una infección o la presencia de productos endógenos generados por injuria tisular. El sistema inmune innato consiste en factores solubles y proteínas, así como diferentes células que incluyen granulocitos, mastocitos, macrófagos, células dendríticas (DCs) y células asesinas naturales (NKs). La respuesta inmune adaptativa se desarrolla posteriormente y consiste en anticuerpos, linfocitos B y células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> que permiten una respuesta altamente específica contra un antígeno en particular. Las células  $\gamma\delta$  y T asesinas son linfocitos citotóxicos que se superponen en la inmunidad innata y adaptativa. Adaptado con modificaciones de *Dranoff et al., 2014*.<sup>43</sup>

### 1.2.2 Inmunidad Innata

Los organismos multicelulares dependen de gran medida del sistema inmune innato como primera respuesta frente a la exposición diaria a patógenos. Como células efectoras del sistema inmune innato, los neutrófilos desempeñan un papel fundamental en diversos procesos inmunológicos e inflamatorios debido a que son las principales células fagocíticas en sangre periférica. En este sentido, son la primera línea de defensa frente a infecciones bacterianas y micóticas, y también ayudan a combatir parásitos y virus. Los neutrófilos se originan diariamente en la médula ósea, aumentando hasta 10 veces su tasa de producción, y pudiendo alcanzar un valor de  $10^{12}$  células por día durante una infección.<sup>44</sup> Son considerados células con una vida media corta debido a que permanecen un tiempo limitado en circulación. Al detectar patógenos o estímulos inflamatorios, los neutrófilos abandonan la circulación a través de un complejo proceso

de adhesión celular, diapédesis y migración hacia el tejido lesionado, atraídos por un gradiente químico. De este modo, estas células presentan un repertorio de funciones efectoras antimicrobianas que incluyen fagocitosis, formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs, acrónimo del inglés *neutrophil extracellular traps*) y liberación de citoquinas. Además, los neutrófilos cuentan con mecanismos que incluyen la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, acrónimo del inglés *reactive oxygen species*) por la NADPH oxidasa, y la liberación de mieloperoxidasa (MPO), enzimas hidrolíticas (elastasa, lisozima y metaloproteasas de matriz) y otras proteínas antimicrobianas como lactoferrina y defensinas, contenidas en sus gránulos. Cabe señalar que el contenido de los gránulos puede liberarse hacia los fagosomas o al espacio extracelular actuando así sobre patógenos intracelulares o extracelulares, respectivamente. La formación de NETs involucra la liberación del ADN de los neutrófilos activados al espacio extracelular constituyendo una malla que encierra histonas y las moléculas antimicrobianas de los gránulos, las cuales inmovilizan los patógenos previniendo su diseminación, y facilitando su fagocitosis y eliminación.<sup>45</sup>

Otro de los componentes celulares esenciales del sistema inmune innato son los macrófagos, los cuales se distribuyen en tejidos linfoides y no-linfoides por todo el organismo. Los monocitos generados a partir de progenitores en la médula ósea circulan a través del torrente sanguíneo y migran continuamente a diferentes tejidos donde se diferencian en macrófagos derivados de monocitos o DCs derivadas de monocitos (moDCs). A su vez, existen poblaciones de macrófagos establecidas, denominadas macrófagos residentes de tejido, que derivan de progenitores embrionarios. Estos progenitores en una etapa muy temprana de desarrollo fetal dan lugar a macrófagos que persisten y mantienen su reserva en la edad adulta. De acuerdo con su localización tisular, estos macrófagos reciben una denominación en particular como microglia (sistema nervioso central), células de Kupffer (hígado), macrófagos alveolares (pulmón), osteoclastos (hueso), histiocitos (bazo y tejido conectivo) y células de Langerhans (piel).<sup>46</sup>

Los macrófagos son células posicionadas estratégicamente en todos los tejidos, especializadas en reconocer y remover patógenos, toxinas, residuos celulares y células apoptóticas; presentando una función fundamental en los procesos de reparación y



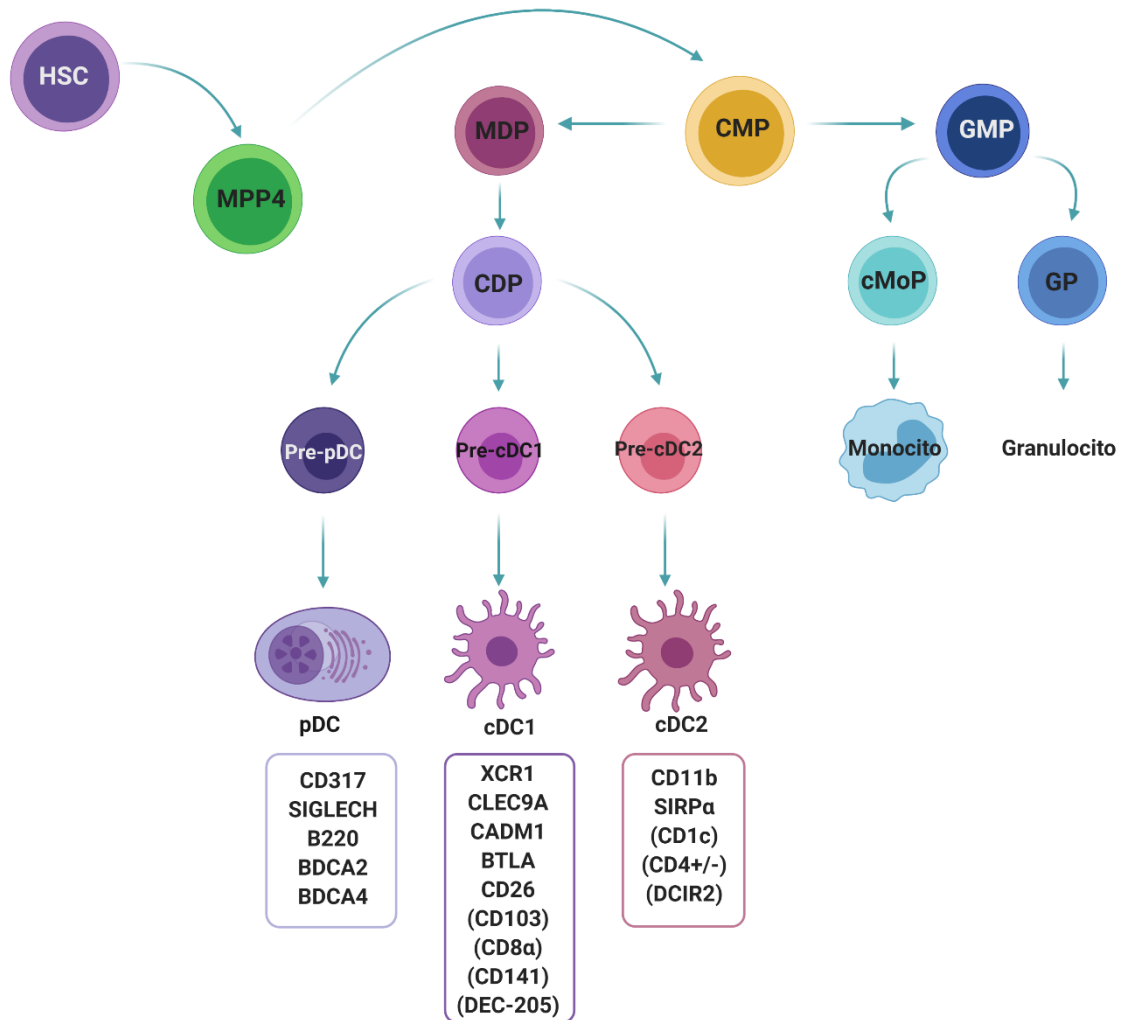
remodelación tisular.<sup>47</sup> Considerando sus múltiples funciones, estas células presentan una notable plasticidad que les permite responder eficientemente a diferentes estímulos y modificar su fenotipo. De esta manera, los macrófagos pueden dividirse en dos subpoblaciones: Macrófagos M1 (activados clásicamente) y Macrófagos M2 (activados alternativamente). Sin embargo, dicha clasificación es considerada actualmente un enfoque demasiado simplificado debido al reconocimiento de un espectro continuo de fenotipos entre M1 y M2 en estudios *in vivo*. Cabe considerar que la estimulación con el factor de necrosis tumoral (TNF) y/o interferón (IFN)  $\gamma$  o lipopolisacárido (LPS) *in vitro* induce la polarización de los macrófagos hacia el perfil M1, el cual presenta incrementado metabolismo glicolítico generando adenosín trifosfato (ATP) a fin de sostener sus funciones fagocíticas y microbicidas. Los macrófagos M1 activados presentan un fenotipo proinflamatorio caracterizado por la mayor expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS, acrónimo del inglés *inducible nitric oxide synthase*), aumento de la producción de óxido nítrico (NO, acrónimo del inglés *nitric oxide*) y ROS, y liberación de citoquinas como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-12, promoviendo una respuesta adaptativa proinflamatoria. Por el contrario, los macrófagos M2 inducidos por estimulación con IL-4 e IL-13 presentan un fenotipo inmunosupresor caracterizado por una disminución en la presentación antigénica a linfocitos T y producción de citoquinas antiinflamatorias. Estos macrófagos exhiben un aumento en la respiración mitocondrial y en el metabolismo de ácidos grasos, regulando de forma positiva las actividades asociadas a la remodelación de la matriz extracelular. En síntesis, los macrófagos M1 fagocitan y destruyen patógenos, eliminan células tumorales y presentan Ags a células T induciendo una respuesta inflamatoria, la cual puede producir daño en el huésped si no es adecuadamente regulada. En cambio, los macrófagos M2 muestran funciones antiinflamatorias, inmunoregulatorias, pro-tumorales y de cicatrización tisular.<sup>48 47</sup>

### 1.2.3 Células Dendríticas y polarización de la respuesta inmune

Los investigadores *Ralph Steinman* y *Zanvil Cohn* en 1973 identificaron una población de células caracterizadas por una morfología estrellada y que eran funcionalmente distintas a los leucocitos del bazo de ratón. Estas células fueron denominadas *Células Dendríticas* (DCs) en referencia a la palabra griega “*dendron*” la cual significa árbol y alude a las prolongaciones citoplasmáticas que se interdigitan entre sí en estas células.<sup>49</sup> En el año 1980, estos autores demostraron que las DCs exhibían una alta expresión de las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) I y II, y además tenían la capacidad de estimular a las células T de una manera inigualable en los cultivos mixtos leucocitarios.<sup>50</sup> El campo de la biología de estas células ha crecido de forma sorprendente desde entonces, considerando en la actualidad a las DCs como reguladores esenciales de las respuestas inmunes tanto innatas como adaptativas.

Las DCs son las Células Presentadoras de Antígenos (CPAs) por excelencia del sistema inmune, responsables de cerrar la brecha entre la inmunidad innata y adaptativa. En efecto, son reconocidas por su capacidad de captar, procesar y presentar Ags a los linfocitos T vírgenes, orientando el desarrollo de respuestas inmunes efectoras. Ha sido establecido en los últimos años que el compartimiento de DCs está organizado en subpoblaciones complejas con diferente ontogenia y funciones particulares.<sup>51 52</sup> Las DCs se originan a partir de progenitores de la médula ósea conocidos como progenitores mieloides comunes (CMPs, acrónimo del inglés *Common Myeloid Progenitors*) como se describe en la **Figura 4**. La expresión diferencial de distintos factores de transcripción impulsa la diferenciación del CMP en dos subtipos celulares: el progenitor de granulocitos-macrófagos (GMP, acrónimo del inglés *Granulocyte-Macrophage Progenitor*) y el progenitor de células dendríticas común (CDP, acrónimo del inglés *Common Dendritic Cells Progenitor*). En el caso del GMP, da origen a los monocitos los cuales tienen la capacidad bajo ciertas condiciones de diferenciarse en moDCs. Por otro lado, a partir del CDP surgen tanto la DC plasmocitoide (pDC) como la DC convencional (cDC).<sup>53</sup> Las pDCs son expertas en la síntesis de IFN tipo I tras la estimulación viral, mientras que las cDCs son células especializadas en la captura, procesamiento y presentación de Ags a los linfocitos T vírgenes, un proceso conocido como cebado de células T (del inglés *T-cell priming*).<sup>51</sup> A su vez, se pueden distinguir dos subpoblaciones de cDCs, cuya distinción se sustenta por modelos genéticos murinos que han sido

esenciales para definir las funciones especializadas de ambas subpoblaciones.<sup>53</sup> Por un lado, se encuentran las cDC1 que se caracterizan principalmente por la dependencia en su desarrollo de los factores de transcripción BATF3 e IRF8, y la expresión de ciertos marcadores de superficie presentes en todas las especies, incluidos XCR1, CLEC9A, CADM1, BTLA y CD26. Sin embargo, estas células se identificaron originalmente por la expresión en su superficie de CD8 $\alpha$  (residentes en órganos linfoides) o CD103 (residentes de tejido periférico) en ratones<sup>54 55</sup> y CD141 (BDCA-3) en humanos.<sup>56 57</sup> Por otro lado, se han identificado las cDC2 caracterizadas por una alta expresión del factor regulador de interferón (IRF4) y las moléculas CD11b, CD1c y SIRP $\alpha$  (CD172a) utilizadas como marcadores de esta población.<sup>58</sup> Además, dentro de la población de cDC2 murina se determinaron dos subconjuntos, uno dependiente del Factor 4 tipo Kruppel (KLF4, acrónimo del inglés *Kruppel-like factor 4*), el cual parece ser esencial para montar respuestas Th2 a ciertos estímulos, y otro subconjunto dependiente de señales específicas del tejido, recibidas a través del receptor Notch2, las cuales pueden informar a las DCs de su entorno y, por lo tanto, guiar su diferenciación y función. Este subconjunto dependiente de Notch ha sido encontrado en bazo, pulmón y tejido linfoide asociado al intestino.<sup>59 60</sup> Curiosamente, cDC1 y cDC2 se localizan en diferentes regiones dentro de los tejidos linfoides y no-linfoides, lo que determina su capacidad de acceso al Ag y a las interacciones con otras poblaciones de células inmunes.<sup>61 62</sup> Esta localización distintiva podría ser el resultado de la expresión diferencial de los receptores de quimiocinas entre los precursores de cDC1 y cDC2, ya que las poblaciones Pre-cDC1 y Pre-cDC2 expresan CXCR3 y CX3CR1, respectivamente.<sup>63 60</sup>

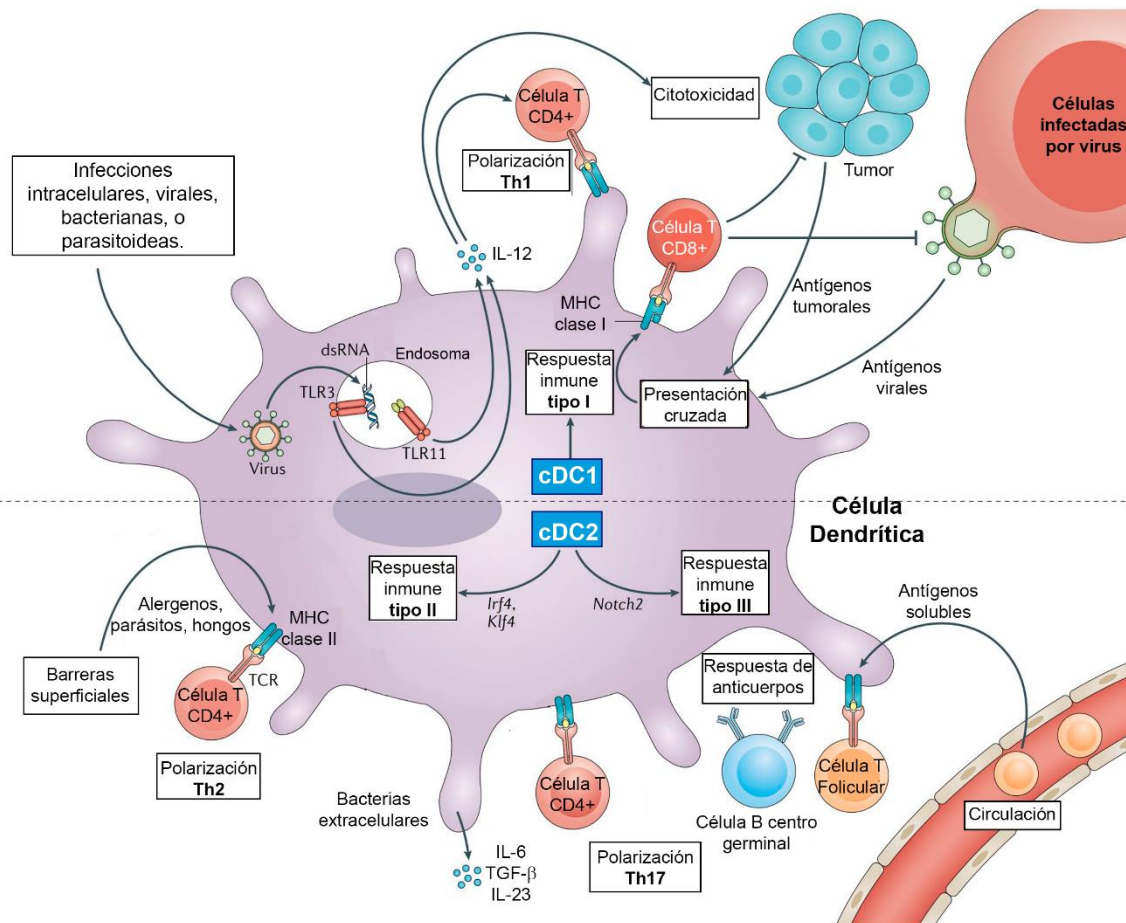


**Figura 4. Desarrollo y linaje de las Células Dendríticas.**

Las células Madre Hematopoyéticas (HSCs: *Haematopoietic Stem Cells*) dan lugar a diversos Progenitores Multipotentes (MPPs: *Multipotent Progenitors*), entre ellos el MPP4. Éste se diferencia en células mieloides de linaje restringido, llamados Progenitores Mieloides Comunes (CMPs: *Common Myeloid Progenitors*). A partir del CMP, divergen dos subtipos de células, el Progenitor de Granulocitos-Macrófagos (GMP: *Granulocyte-Macrophage Progenitor*) que da origen al Progenitor de Monocitos Común (cMoP: *Common Monocyte Progenitor*) del cual derivan los monocitos, que pueden diferenciarse en DCs derivadas de monocitos (moDC), y al Progenitor de Granulocitos (GP: *Granulocyte Progenitor*) Por otro lado, el CMP puede derivar en el Progenitor Monocito-Célula Dendrítica (MDP: *Monocyte-Dendritic Cell Progenitor*), del cual deriva el Precursor de Célula Dendrítica Común (CDP: *Common DC Precursor*). A partir del CDP pueden diferenciarse las DCs plasmocitoides (pDC) y las DC convencionales tipo 1 (cDC1) y tipo 2 (cDC2). En los recuadros se detallan los marcadores de cada población celular. Esta figura fue creada usando Biorender, adaptada de *Anderson et. al., 2020*.<sup>53</sup>

Al contrario de los neutrófilos y macrófagos que destruyen los Ags por fagocitosis y subsecuente proteólisis en compartimientos altamente degradativos, las DCs han desarrollado una vía fagocítica regulada que consiste en el procesamiento del Ag y su presentación en las moléculas del MHC.<sup>64</sup> En relación a su funcionalidad, las cDC1 en términos generales presentan Ags exógenos a los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, mediante un proceso conocido como presentación cruzada (**Figura 5**).<sup>65 66</sup> Este proceso consiste en la captación de Ags exógenos, la carga de péptidos antigénicos procesados en moléculas del MHC clase I y su presentación a células T CD8<sup>+</sup> en tejidos linfoides.<sup>67</sup> Dicho mecanismo se requiere para iniciar una respuesta inmune citotóxica contra bacterias intracelulares, virus y tumores; como también para mantener la tolerancia hacia autoantígenos. La secuencia de eventos en el proceso de presentación antigénica comprende dos vías principales referidas como “vesicular”, involucrada en procesamiento de Ags bacterianos y “citosólica”, implicada en la presentación de Ags virales y tumorales.<sup>68</sup> En los últimos años, numerosos modelos experimentales en ratones, donde evaluaron la función de las cDC1, han resaltado la potencia de estas células en la modulación de la inmunoterapia contra el cáncer a través de la activación de células T CD8<sup>+</sup> específicas de Ags tumorales, conocidas como Linfocitos T Citotóxicos (LTCs).<sup>69 70</sup> En paralelo, las cDC1 son importantes productoras de IL-12, considerada una citoquina clave para la diferenciación de las células T CD4<sup>+</sup> *helper* tipo 1 (Th1). Estas células se asocian con una inmunidad protectora contra patógenos y virus intracelulares por su capacidad de sintetizar IFN- $\gamma$  y el Factor de Necrosis Tumoral (TNF)- $\alpha$ .<sup>71 72 73 74</sup> Además, las células Th1 son las principales responsables de activar y regular el desarrollo y la persistencia de los LTCs, por lo que se han convertido en un blanco importante en las terapias contra el cáncer.<sup>75</sup> En referencia al subconjunto de cDC2, presenta principalmente Ags solubles a las células T CD4<sup>+</sup>, regulando así las respuestas inmunes frente a patógenos extracelulares, parásitos, hongos y alérgenos. En particular, las cDC2 dependientes de Klf4 son más eficientes para el *priming* de las células Th induciendo la polarización hacia el perfil Th2, regulando así la respuesta inmune tipo II contra parásitos y alérgenos. Por otro lado, aquellas cDC2 dependientes de Notch2 modulan la respuesta inmune tipo III, típicamente asociada a linfocitos Th17, dirigida contra patógenos extracelulares, microbiota intestinal, y promotora de respuestas inmunes humorales a Ags solubles que se encuentran en circulación sanguínea.<sup>51 53</sup> (**Figura 5**). Sin embargo, a

pesar del evidente compromiso de los diferentes subconjuntos de DCs con un determinado perfil de respuesta inmune, un número importante de trabajos han demostrado que el tipo de Ag capturado, así como el contexto y el microambiente en el cual es capturado, determinan el fenotipo del subconjunto de DCs encargadas del *priming* de las células T.<sup>76</sup> Por ejemplo, existe suficiente evidencia que involucra a las moDCs en la conducción de respuestas Th1 durante la infección con diversos patógenos o ciertos estímulos inflamatorios.<sup>77 78 79</sup> Además, un estudio reciente ha demostrado el papel de la población cDC2 en la conducción de una respuesta Th1 después de la inmunización intranasal con un adyuvante de mucosa. En estas circunstancias, la eliminación dirigida y específica de esta población de cDC2 redujo la respuesta Th1 de memoria en el pulmón, y anuló la producción de anticuerpos específicos luego de la inmunización.<sup>80</sup> Es importante destacar que las DCs son consideradas una población con una remarcable plasticidad, capaces de modificar su perfil transcripcional de forma específica de acuerdo a los diferentes estímulos con el objetivo de polarizar la respuesta de las células T de manera apropiada. En este sentido, las señales recibidas por las DCs, ya sea directamente del patógeno o de su entorno inmediato, son determinantes importantes de la función de las mismas y del destino final de la respuesta inmune generada.<sup>81 82</sup>

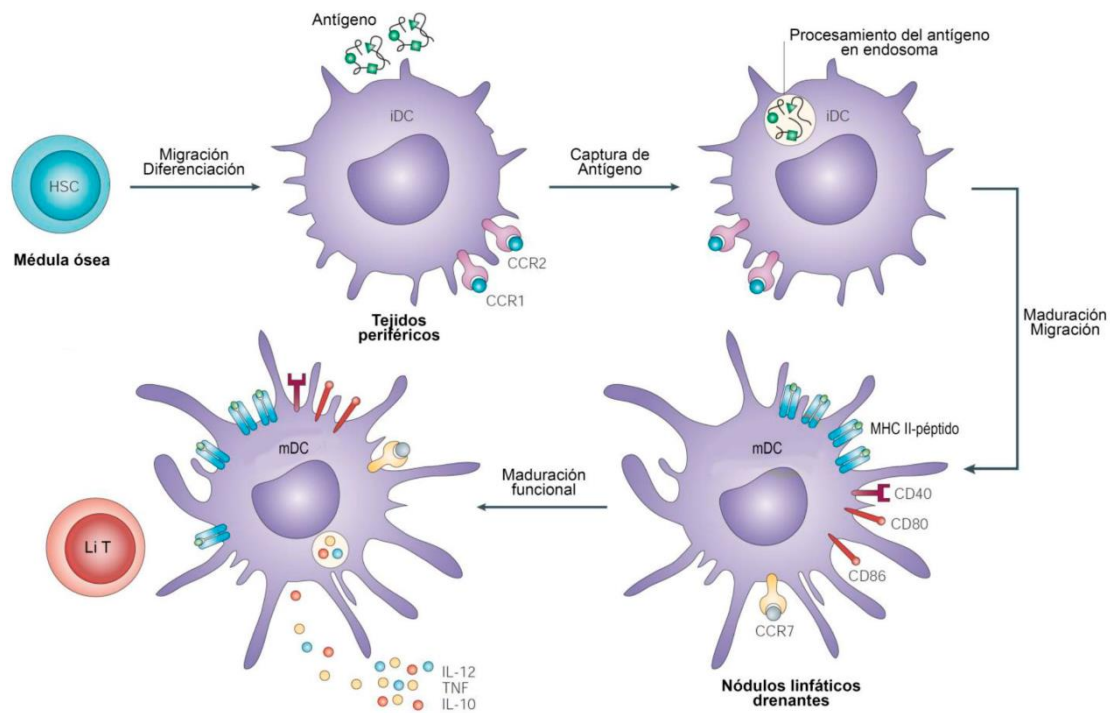


**Figura 5. Funciones especializadas de las Células Dendríticas Convencionales.**

Las Células Dendríticas Convencionales tipo 1 (cDC1) son células especializadas en la regulación de las respuestas inmunes tipo I mediante la activación de las células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas y el *priming* de las células T CD4<sup>+</sup> *helper* 1 (Th1). Estas cDC1 son una fuente indispensable de IL-12 y son necesarias para la inmunidad a infecciones intracelulares tanto virales, como bacterianas y parasitarias. Además, cuentan con la capacidad única de adquirir Ags asociados con las células huésped, a través de la presentación cruzada de Ags, la cual es esencial para la eliminación de patógenos, y las respuestas inmunes antitumorales. Las Células Dendríticas Convencionales tipo 2 (cDC2) regulan las respuestas inmunes tipo II frente a parásitos, hongos y alérgenos, siendo necesarias las cDC2 dependiente de Klf4 para la expansión de las poblaciones de células T CD4<sup>+</sup> *helper* 2 (Th2). A su vez, las cDC2 dependientes de Notch2, controlan las respuestas inmunes tipo III, siendo una fuente necesaria de IL-23, IL-6 y TGF-β, lo que permite la diferenciación de las células T CD4<sup>+</sup> *helper* 17 (Th17). También se ha demostrado que estas cDC2 regulan las respuestas de anticuerpos a través de la inducción de una respuesta centro germinal a Ags solubles en órganos linfoides, favoreciendo además la inducción de células T CD4<sup>+</sup> *helper* foliculares (Tfh). TCR: Receptor de célula T. TLR: Receptor tipo Toll. Adaptado con modificaciones de Anderson *et. al.*, 2020.<sup>53</sup>

Además de su heterogeneidad ontogénica, las DCs presentan gran variabilidad en relación con su estado funcional y fenotípico. Las cDCs son inicialmente inmaduras (iDCs) y requieren de diferentes señales para iniciar su proceso de maduración, el cual es indispensable para mejorar la capacidad de interacción de las DCs con los linfocitos T. La transición entre la iDC y su estado de maduración (mDC) ocurre en condiciones fisiológicas o estables (del inglés *stable steady*) o frente a un proceso inflamatorio en respuesta a diferentes señales como el reconocimiento de PAMPs o DAMPs, o estímulos endógenos como citoquinas inflamatorias, hormonas y células apoptóticas.<sup>83</sup> Las iDCs durante el proceso de maduración (**Figura 6**) no solo modifican su aspecto adquiriendo mayor cantidad de prolongaciones citoplasmáticas, sino que además regulan negativamente la fagocitosis, perdiendo así la capacidad para internalizar y procesar Ags. Asimismo, estas células muestran una mayor migración a los ganglios linfáticos, probablemente impulsada por una mayor expresión del receptor de quimiocinas C-C 7 (CCR7).<sup>84</sup> El receptor CCR7 interacciona con las quimiocinas CCL19 y CCL21, las cuales se expresan en las células endoteliales linfáticas y venas del endotelio alto de las zonas T de los órganos linfáticos secundarios, sitios a los cuales se dirigen las DCs que han iniciado su proceso de maduración. A su vez, las DCs regulan positivamente la expresión de moléculas co-estimuladoras de superficie como CD40, CD80 y CD86, y las moléculas del MHC I y II durante su maduración.<sup>73</sup> Las cDCs maduras en condiciones estables, reciben constantemente señales del tejido donde se encuentran, ya sea Ags propios, citoquinas inmunosupresoras, células apoptóticas, entre otras; y migran a tejidos linfoides donde inducen y mantienen la tolerancia inmune por lo propio.<sup>85 83</sup> En cuanto a las DCs que migran en respuesta a un proceso inflamatorio, éstas reciben diferentes señales de peligro dependiente del contexto, lo que las convierte no solo en mDCs, sino también inicia un proceso de maduración funcional, que termina en la activación de las DCs de manera que puedan dar señales específicas de polarización a los linfocitos T.<sup>76 86</sup>





**Figura 6. Inmunobiología de las Células Dendríticas.**

Una vez diferenciadas, las DCs se encuentran en un estadio inmaduro (iDC) actuando como centinelas en los tejidos periféricos, donde continuamente internalizan antígenos (Ags), tanto propios como extraños. Después de la captura del Ag y de su procesamiento, las DCs migran al tejido linfático drenante e inician un proceso de maduración fenotípica, incrementando la expresión de moléculas coestimuladoras como CD40, CD80 y CD86, moléculas MHC clase II y el receptor de quimiocinas (CCR)-7, convirtiéndose en DCs maduras (mDC). En el tejido linfático, las mDCs presentan complejos MHC clase II-péptido en la superficie celular, y se activan generando la producción de citoquinas, tales como interleuquina-12 (IL-12), el factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$ , IL-10, entre otras. Esto permite la activación de las células T (Li T) y la polarización de la respuesta inmune dependiendo del tipo de Ag capturado y de las señales ambientales recibidas. HSC: Células Madre Hematopoyéticas. Adaptado con modificaciones de *Hackstein & Thomson, 2004*.<sup>86</sup>

Las interacciones entre los linfocitos T vírgenes y las DCs constituyen la piedra angular de la inmunidad adaptativa. Este contacto denominado sinapsis inmune (del inglés *immune synapses*) ocurre principalmente en los nódulos linfáticos secundarios donde las mDCs establecen la exploración hasta interactuar con los linfocitos T, los cuales experimentan la activación y subsecuente amplificación.<sup>87 88</sup> En este contexto, el sistema inmune presenta una notable capacidad de gatillar distintas respuestas inmunes contra diferentes patógenos (**Figura 7**).<sup>89</sup> En efecto, la activación de la DC por diversos ligandos de los TLRs induce la producción de IL-12. Esta citoquina es esencial para la diferenciación de la célula T CD4<sup>+</sup> hacia el perfil Th1, tanto en ratones como en humanos,<sup>90</sup> y la producción de IFN- $\gamma$  a través de un mecanismo dependiente del factor

de transcripción STAT4. En particular, el regulador maestro del perfil Th1 es el factor de transcripción T-bet, el cual es responsable de la inducción de la síntesis de IFN- $\gamma$  y de la cadena  $\beta 2$  del receptor de IL-12 (IL-12R $\beta 2$ ). En este sentido, la presencia de la IL-12 refuerza el programa transcripcional Th1 mediante la inducción de la expresión de T-bet.<sup>91</sup> Así, las células Th1 productoras de IFN- $\gamma$  estimulan la inmunidad contra bacterias intracelulares y virus promoviendo la activación de células NK y la expansión de LTCs que matan las células infectadas.<sup>89</sup>

Aunque existe un amplio conocimiento de los mecanismos implicados en las respuestas Th1 inducidas por las DCs, las señales derivadas de mDCs en el inicio y la regulación de la diferenciación de las respuestas Th2 son menos conocidas en la actualidad.<sup>92</sup> Las células efectoras Th2 producen las citoquinas IL-4, IL-5 e IL-13, que en conjunto instruyen a la respuesta inmune antiparasitaria y humoral, y se encuentran implicadas en el desarrollo de alergias (**Figura 7**). Por lo cual, diversos estímulos microbianos (helmintos, LPS bacterianos, virus) y no microbianos (alérgenos, alimentos, venenos) estimulan las respuestas Th2. Los mecanismos efectores asociados a este perfil de linfocitos involucran principalmente reacciones inmunes mediadas por IgE, mastocitos y eosinófilos, así como la activación de los macrófagos M2 implicados en la reparación del tejido.<sup>93</sup> El factor de transcripción específico de linaje para Th2 es GATA3.<sup>94</sup> En efecto, GATA 3 está presente en bajos niveles en linfocitos T vírgenes y células CD4<sup>+</sup> recientemente activadas, sin embargo, su expresión es inducida en condiciones de ausencia de IL-12 y presencia de IL-10.<sup>95</sup> Asimismo, ha sido demostrado que la señalización mediada por la unión de ligando de OX40 (OX40L), presente en la superficie de varias CPAs (incluidas las cDC2), con OX40 (CD134) expresado en las células T CD4<sup>+</sup>, conduce a la polarización hacia la respuesta inmune Th2.<sup>96</sup>

Las células T *helper* 17 (Th17) identificadas en el año 2005,<sup>97</sup> se caracterizan por la producción de la citoquina IL-17 y expresan los receptores huérfanos relacionados al ácido retinoico (ROR)  $\gamma t$  y ROR $\alpha$  considerados factores de transcripción específicos del linaje Th17 (**Figura 7**).<sup>98</sup> <sup>99</sup> Varias citoquinas han sido relacionadas en los diferentes estadios de la diferenciación Th17 como TGF- $\beta$ , IL-6, IL-1, IL-23 e IL-21. En particular, IL-6 y TGF- $\beta$  actúan en las etapas tempranas de la diferenciación de las células Th17, mientras que IL-23 desempeña un rol destacado en la última etapa de su desarrollo para

su expansión y supervivencia.<sup>100 101</sup> Además, IL-1 sinergiza con IL-6 e IL-23 en la regulación de la diferenciación de Th17 y mantiene la expresión de citoquinas en las células Th17 efectoras.<sup>102</sup> La activación del factor de transcripción STAT3 a través de las vías de señalización mediadas por las citoquinas IL-6, IL-21 e IL-23 es esencial en la regulación de las células Th17. En este sentido, IL-6 regula directamente el balance entre las células Th17 y T reguladoras (Treg) Foxp3<sup>+</sup> mediante la inhibición de la expresión de Foxp3 inducida por TGF- $\beta$  y la inducción de la transcripción de ROR $\gamma$ t.<sup>103</sup>

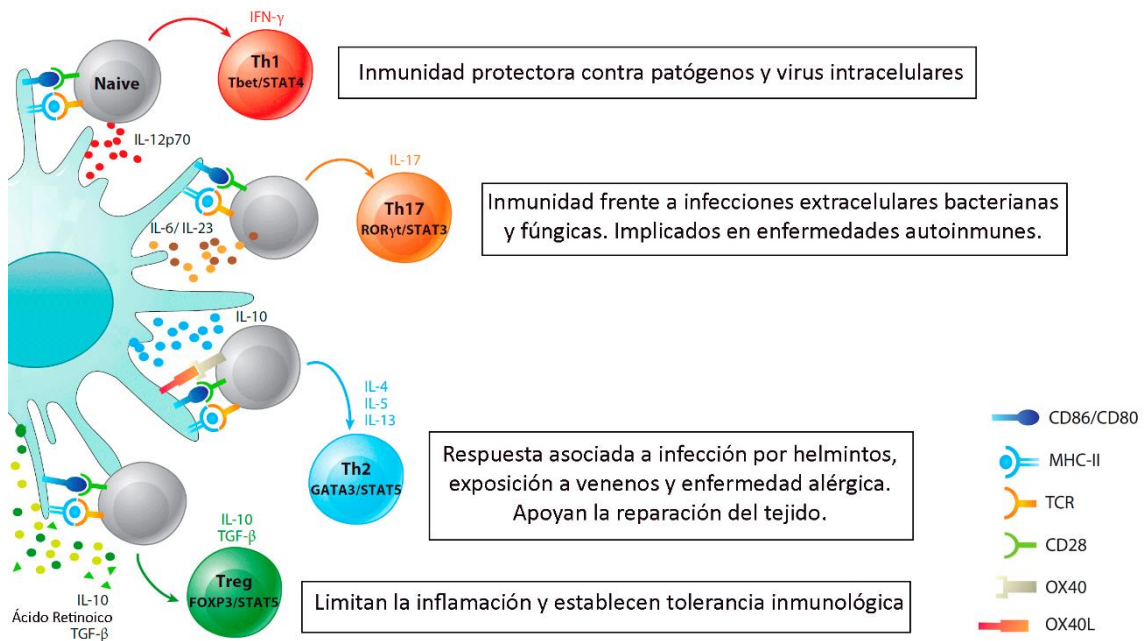
Evidencias recientes sugieren que las células Th17 constituyen una población heterogénea capaz de adoptar dos fenotipos, denominados patogénico (pTH17) y no-patogénico (no-pTH17). Ambos fenotipos, inducidos por factores ambientales y genéticos, presentan un rol esencial en la inmunidad adaptativa, especialmente en la defensa del huésped contra infecciones extracelulares bacterianas y fúngicas, enfermedades autoinmunes y cáncer.<sup>103 104 105</sup> El hecho de que células T vírgenes se conviertan en células pTh17 y no-pTH17 depende de las citoquinas presentes en el medio durante el proceso de diferenciación. En efecto, la estimulación de células T CD4<sup>+</sup> con la combinación de citoquinas TGF- $\beta$ 3/IL-6, IL-1  $\beta$ /IL-6/IL-23 o TGF- $\beta$ 1/IL-6/IL-23 *in vitro* conduce a la diferenciación de células pTh17 que expresan ROR $\gamma$ t y son capaces de secretar citoquinas inflamatorias como IL-17, IL-21, IL-22 y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). Por otra parte, TGF- $\beta$ 1/IL-6 induce no solo la expresión de ROR $\gamma$ t, sino también los factores de transcripción relacionados a IL-10, características de las células no-pTh17.<sup>98</sup>

Por otro lado en la periferia, las células T CD4<sup>+</sup> pueden diferenciarse en células Th reguladoras inducibles (iTreg) que limitan la inflamación y establecen tolerancia inmunológica.<sup>106</sup> Las células iTreg se puede distinguir de las Treg naturales derivadas del timo debido a que estas últimas expresan el factor de transcripción Helios.<sup>107</sup> Sin embargo, ambos tipos de Treg expresan el factor de transcripción Foxp3 y su expresión sostenida es esencial para el mantenimiento del fenotipo Treg y su función supresora (**Figura 7**).<sup>106</sup> La señalización de TGF- $\beta$  e IL-2, secretadas por ejemplo por las DCs, son determinantes importantes de la diferenciación de las iTreg, ya que ambas citoquinas inducen la expresión de Foxp3.<sup>108 109</sup> Además, la expresión del receptor inhibitorio inmune BTLA (atenuador de linfocitos B y T) en las cDCs y el ácido retinoico derivado de

éstas, impulsan la diferenciación de iTreg *in vivo* mediante la regulación negativa de moléculas asociadas a otros subconjuntos de células T efectoras CD4<sup>+</sup>.<sup>110 111 112</sup>

Por último, dentro de los perfiles de células Th más caracterizados, se encuentran las células Th foliculares (Tfh) especializadas en ayudar a los linfocitos B. Estas células se localizan en áreas de linfocitos B dentro de los órganos linfoides secundarios donde se asienta la formación del centro germinal, la maduración de la afinidad y el cambio de isotipos de anticuerpos.<sup>113</sup> La vía de diferenciación de las células Tfh es un proceso que involucra diversos pasos que requieren generalmente señales tanto de los linfocitos B como de las DCs. La señalización a través de IL-6 y el co-estimulador inducible de linfocitos T (ICOS) inician el programa de diferenciación de Tfh al promover la expresión de proteínas que definen este perfil inmune, incluidas las proteínas BCL6 (proteína 6 del linfoma de células B), CXCR5 e IL-21.<sup>114 115</sup>

En definitiva, el entorno tisular en el que las DCs capturan el Ag posee un impacto notable en su capacidad para inducir programas de diferenciación particulares de células Th, condicionando así el tipo de respuesta inmune desarrollado. De manera que las DCs son consideradas el cerebro de la inmunidad, y por ello explorar su capacidad inmunomoduladora resulta una gran oportunidad para el tratamiento del cáncer, las enfermedades autoinmunes y la prevención de los rechazos de trasplantes, así como para aumentar las defensas inmunitarias del hospedador.



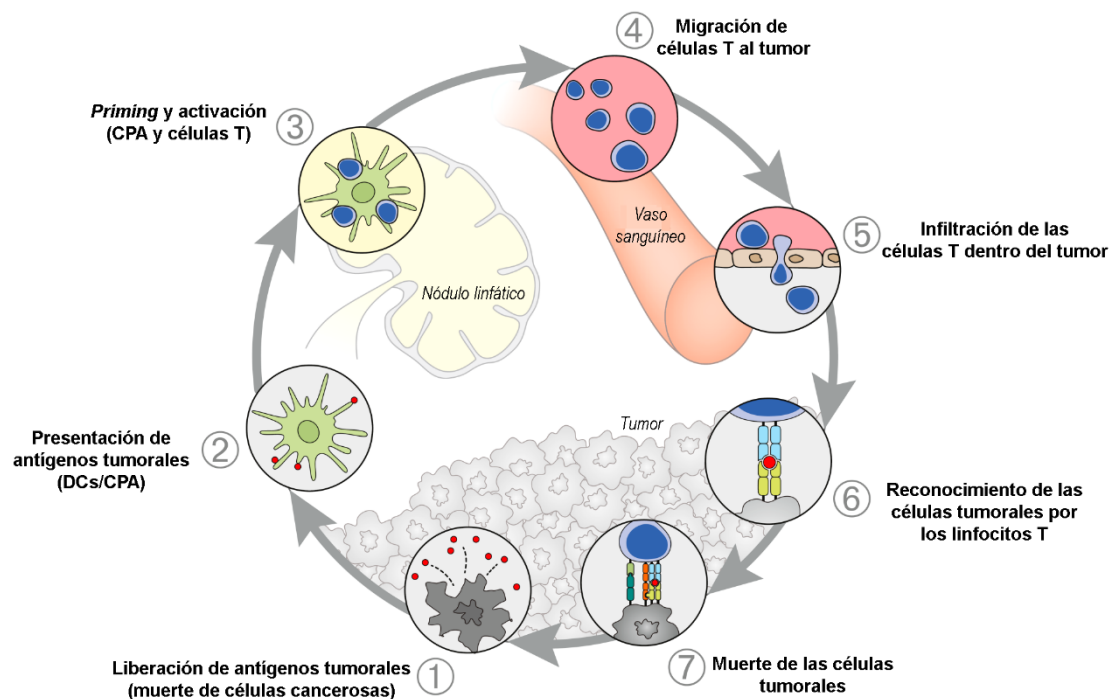
**Figura 7. Polarización de la respuesta inmune por las Células Dendríticas.**

La detección de distintos patógenos o señales provenientes de su entorno inmediato, a través de distintos receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs), programa a las DCs para dirigir distintas clases de respuestas de células CD4<sup>+</sup> T *helper*. La activación y secreción de IL-12p70 induce la polarización de la respuesta inmune a un perfil Th1, productor de IFN-γ. Además, frente a ciertos estímulos, las DCs adquieren la capacidad de producir IL-6, TGF-β e IL-23 favoreciendo la diferenciación de las respuestas Th17, caracterizadas por la secreción de IL-17. Por el contrario, algunas señales inhiben la producción de IL-12p70 por parte de las DCs pero estimulan la secreción de IL-10 y, por lo tanto, sesgan el equilibrio hacia las respuestas Th2 o Treg. TCR: Receptor de células T. Adaptado con modificaciones de *Pulendran, 2015*.<sup>89</sup>

### 1.2.4 Células Dendríticas en inmunoterapia antitumoral

Para que una respuesta inmunitaria contra el cáncer conduzca a la destrucción eficaz de las células tumorales, se debe iniciar una serie de eventos escalonados y permitir que continúen y se expandan de manera iterativa. Estos eventos constituyen el ciclo de inmunidad contra el cáncer integrado por 7 pasos fundamentales (**Figura 8**).<sup>116</sup> En el primer paso del ciclo, los neoantígenos creados por oncogénesis son liberados y luego serán capturados por las DCs para su procesamiento. Para que esto produzca una respuesta de células T efectiva, debe ir acompañado de señales que induzcan el tipo de inmunidad deseada y así evitar la tolerancia periférica a los Ags tumorales. Estas señales inmunogénicas deben incluir citoquinas proinflamatorias y factores liberados por las células tumorales en el proceso de muerte. A continuación, las DCs deben presentar los Ags tumorales procesados en el contexto de las moléculas MHC I y II a las células T (paso

2), resultando en el *priming* y la activación de la respuesta de las células T efectoras contra los Ags específicos del tumor (paso 3). Posteriormente, las células T efectoras activadas migran (paso 4), infiltran el lecho neoplásico (paso 5) donde reconocen y se unen específicamente a las células cancerosas a través de la interacción entre su TCR y el Ag unido al MHC (paso 6) y finalmente, matan a las células malignas diana (paso 7). Este último evento promueve la liberación de Ags adicionales asociados al tumor (paso 1 nuevamente) para aumentar la amplitud y profundidad de la respuesta en ciclos sucesivos.<sup>116</sup>



**Figura 8 Ciclo de inmunidad contra el cáncer.**

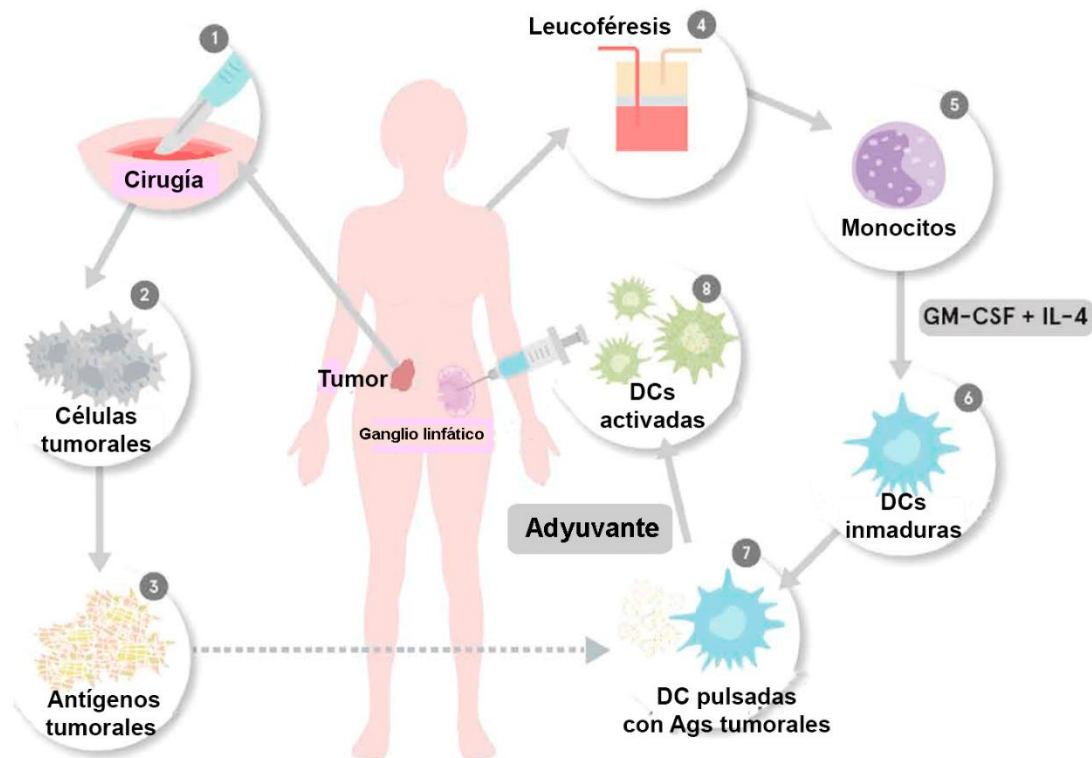
La generación de inmunidad antitumoral es un proceso cíclico que puede auto-propagarse, dando lugar a una acumulación de factores inmunoestimuladores que en principio deberían amplificar las respuestas de las células T. Este ciclo se caracteriza además por los factores inhibitorios que conducen a mecanismos inmunes regulatorios, los cuales pueden detener el desarrollo o limitar la respuesta inmune. Este ciclo se puede dividir en 7 pasos principales, comenzando con la liberación de antígenos de la célula tumoral y terminando con la destrucción de las células cancerosas. DCs: Células Dendríticas, CPA: Célula Presentadora de Antígeno. Adaptado con modificaciones de *Chen et. al., 2013*.<sup>116</sup>

Con el advenimiento de la inmunoterapia en los últimos años, se ha revolucionado el tratamiento de muchas neoplasias malignas sólidas y hematológicas. En este aspecto, ha habido enormes avances en diferentes terapias como la de bloqueo de puntos de control inmunológico, la administración de células adoptivas utilizando

leucocitos infiltrantes de tumores (TILs) y las estrategias de vacunación dirigidas a diferentes pasos del ciclo de inmunidad antitumoral para mejorar la funcionalidad de las células T.<sup>117</sup> Dado que las DCs juegan un rol clave en el inicio y regulación de la respuesta inmune innata y adaptativa, y además están involucradas en los primeros pasos del ciclo de inmunidad contra el cáncer, existe actualmente un gran interés en modular su función para mejorar la inmunoterapia antitumoral. Es por ello, que en los últimos años se han desarrollado diversas estrategias a fin de manipular a las DCs con el propósito de optimizar la respuesta inmune contra el cáncer.<sup>117 118</sup>

Cabe resaltar que hasta la fecha un número mayor de 200 ensayos clínicos del uso de vacunas a base de DCs como inmunoterapia antitumoral han sido completados.<sup>118</sup> Este tipo de terapia implica la diferenciación *in vitro* de DCs autólogas a partir de monocitos CD14<sup>+</sup> o progenitores de monocitos CD34<sup>+</sup> aislados de sangre periférica del paciente. No obstante, otra estrategia consiste en la purificación de los distintos subconjuntos de DCs de origen natural (cDC1 o cDC2) en sangre periférica del paciente, seguido de su amplificación *in vitro*. Posteriormente, las DCs obtenidas mediante la diferenciación de progenitores o purificación, contactan con Antígenos Asociados a Tumores (AATs) para permitir su captación en presencia de un adyuvante (**Figura 9**).<sup>119</sup> Luego de su manipulación *ex vivo*, las DCs maduras y activadas específicamente con los AATs son reinyectadas a los pacientes.<sup>120</sup> Este tipo de vacunación con DCs se asocia con toxicidades limitadas y bajos efectos secundarios potenciales, por lo que se considera un enfoque terapéutico seguro.<sup>118</sup> Hasta el momento, se encuentra disponible una única vacuna de DCs como inmunoterapia del cáncer aprobada por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) de Estados Unidos denominada Sipuleucel-T (comercialmente *Provenge*). Esta vacuna utilizada en casos de cáncer de próstata avanzado donde la terapia hormonal no está funcionando, consiste en la obtención de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) autólogas que incluyen a las CPAs y son activadas *ex vivo* con una proteína de fusión recombinante. Esta proteína de fusión consta de la fosfatasa ácida prostática como Ag específico de próstata y el GM-CSF como activador de células inmunes.<sup>121</sup>





**Figura 9. Obtención, producción y administración de vacunas basadas en Células Dendríticas.**

Flujo de trabajo para la generación de vacunas de Células Dendríticas (DCs). Mediante leucofóresis se aíslan los monocitos de sangre periférica, los cuales son diferenciados *in vitro* mediante el agregado de citoquinas como GM-CSF e IL-4 a DCs derivadas de monocitos (moDCs). Luego se procede a la activación *ex vivo* de las DCs con un adyuvante y en paralelo se produce la captación de los antígenos (Ags). Estos Ags pueden provenir de las mismas células tumorales del paciente luego de ser extraídas y procesadas de la manera correcta. Finalmente, las DCs autólogas son reinyectadas en el paciente con el objetivo de inducir células T específicas del Ag con efectos secundarios mínimos. Adaptado con modificaciones de *Tanyi et. al., 2018*.<sup>120</sup>

A pesar de la capacidad de la mayoría de las vacunas basadas en DCs para inducir una respuesta inmune contra un Ag específico, se desconoce el motivo por el cual estas vacunas han mostrado una eficacia limitada hasta la fecha, por lo que la mayoría de los pacientes aún no se benefician con este tratamiento y deben recurrir a terapias tradicionales que son más agresivas.<sup>122</sup> Uno de los principales obstáculos encontrados es que debido a la presión ejercida por la inmunidad antitumoral, pueden surgir variantes de las células cancerosas que logren aprovechar las capacidades de las DCs para promover la tolerancia inmunológica. De la misma manera, la presentación de AATs en ausencia de señales co-estimuladoras conduce a la anergia de las células T.<sup>123</sup> Además, la expresión de moléculas inhibitorias puede limitar la actividad efectora de las células T. En particular, la unión del receptor CTLA-4 (acrónimo del inglés *Cytotoxic T-*



*Lymphocyte Antigen 4*) expresado en la superficie de los linfocitos T, a las moléculas CD80 y CD86 en DCs, envía señales negativas de activación a las células T.<sup>124</sup> En el caso de la proteína de muerte celular programada 1 (PD-1) expresada en linfocitos T activados, su unión a los ligandos de PD-1 (PDL-1 y PDL-2) presentes en la superficie de las DCs y otras células del microambiente tumoral, inhiben la proliferación, activación y función de las células T activadas regulando de forma negativa la respuesta inmune.<sup>125</sup>

Asimismo, entre los factores asociados a la ausencia de un beneficio terapéutico en los pacientes, se incluye el microambiente tumoral (TME, acrónimo del inglés *Tumor Microenvironment*) anormal, caracterizado por vasos sanguíneos disfuncionales.<sup>126</sup> Desde el punto de vista morfológico, los vasos sanguíneos del tumor se caracterizan por ser tortuosos, dilatados y distribuidos de manera desigual, con células endoteliales adyacentes que se unen débilmente entre sí.<sup>127</sup> Estas características conducen a una perfusión sanguínea alterada con reducción del flujo sanguíneo y restricción del suministro de oxígeno, nutrientes y agentes terapéuticos, incluidos los anticuerpos y las células inmunes. Como consecuencia de la hipoxia resultante y el bajo pH se induciría la producción de moléculas inmunosupresoras en el TME.<sup>128</sup> En este sentido, la terapia de normalización de los vasos sanguíneos del tumor procura restaurar la integridad vascular con la finalidad de mejorar la perfusión del tumor, aminorar la hipoxia y potenciar la inmunidad antitumoral.<sup>129</sup> De lo expuesto anteriormente, se puede inferir que la tolerancia inducida por el tumor y su microambiente constituye una dificultad fundamental a superar para alcanzar el potencial máximo de las DCs aplicadas a la inmunoterapia contra el cáncer.

Existe actualmente gran interés en la investigación de procedimientos alternativos de maduración de las DCs, con el propósito de evitar la tolerancia y lograr optimizar las terapias basadas en vacunaciones con DCs.<sup>117</sup> Una de las variables a considerar para mejorar la eficiencia de las vacunaciones con DCs es la optimización en la captación de AATs por las DCs.<sup>130</sup> Los AATs son Ags celulares autólogos generados por las células tumorales, los cuales pueden ser producto de genes mutados, Ags producidos por virus oncogénicos, Ags oncofetales, glicolípidos y glicoproteínas alterados, Ags de diferenciación específicos para un tipo celular y proteínas celulares sobre-expresadas o expresadas de manera aberrante. Entre los AATs de uso más frecuente en la clínica para cargar las DCs *in vivo* o *in vitro*, se encuentran los Ags de diferenciación como el Ag

asociado a melanoma (MART1) o la fosfatasa ácida prostática (PAP); los Ags asociados a virus como las proteínas derivadas del Virus del Papiloma Humano y el Virus de Epstein-Barr; neoantígenos mutados que involucran proteínas mutadas específicas para cada tipo de cáncer y Ags tumorales completos que corresponden a lisados del material tumoral autólogo o alogénico bajo condiciones de muerte celular.<sup>131</sup> Cada una de estas estrategias de selección de AATs tiene sus ventajas y desventajas. En particular, las vacunas de DCs cargadas con Ags tumorales completos tienen como ventaja que presentan una selección de AATs de acuerdo con el tipo de cáncer del paciente, sin necesidad de identificar a los neoantígenos. Asimismo, contienen factores adicionales de activación de las DCs que mejoran la inmunidad con un reducido riesgo de inducir variantes de escape inmunológico, pueden provocar inmunidad contra múltiples tumores utilizando diferentes lisados y son más económicos.<sup>130 131</sup> Por otro lado, las principales desventajas incluyen la dificultad en el acceso al material tumoral autólogo, la compatibilidad sub-óptima que se presenta al utilizar material alogénico, y la variabilidad y falta de control de la calidad de los AATs.<sup>131</sup>

Como ha sido mencionado anteriormente, existen diversos mecanismos impulsados en el TME que perturban las funciones de las DCs, lo que resulta en una activación insuficiente de las células T y la inducción de tolerancia a los AATs. Una manera de sortear este inconveniente es incrementando la inmunogenicidad de las células cancerosas moribundas o muertas que se utilizan para cargar las DCs.<sup>130</sup> Se ha demostrado que la metodología utilizada para preparar la carga de las células tumorales puede influir en el potencial inmunogénico *in vivo* de las vacunas de las DCs que captaron esas células tumorales.<sup>132 133</sup> Hasta el momento, se han descritos diferentes modalidades de tratamientos capaces de potenciar la inmunogenicidad de las células cancerosas en el contexto de las vacunas de DCs. Estos tratamientos pueden mejorar la inmunidad antitumoral, ya sea, induciendo respuestas inmunes contra neoantígenos tumorales, o bien aumentando selectivamente la exposición o liberación de DAMPs que pueden activar el sistema inmune innato. Algunos de los métodos aplicados en modelos preclínicos y estudios clínicos para mejorar el potencial inmunogénico de la carga de células tumorales son la irradiación Ultravioleta (UV), modalidades inductoras de oxidación y los tratamientos de choque térmico.<sup>130</sup> En relación a la luz UV se considera una radiación electromagnética no ionizante con una longitud de onda entre 100 y 400

nm. Existen tres tipos principales de rayos UV ordenados desde menor energía/mayor longitud de onda a mayor energía/menor longitud de onda: UVA, UVB y UVC. La radiación de luz UV en las células produce daño en el ADN con el consecuente arresto de la transcripción y/o replicación conduciendo finalmente a la muerte celular.<sup>134</sup> En particular los procedimientos estándar para inducir la muerte celular mediante irradiación UVB, dan como resultado una población mixta de células tumorales viables, apoptóticas y necróticas. Es importante señalar que las células tumorales tratadas con luz UVB son fagocitadas de manera eficiente por las DCs, lo que conduce a una maduración fenotípica y una mayor producción de IL-12,<sup>129</sup> principalmente si luego de la irradiación se realiza una purificación adicional enriqueciendo la fracción de células apoptóticas.<sup>135</sup> Además, ha sido demostrado que las DCs humanas que captan células tumorales apoptóticas irradiadas con luz UV presentan una mayor efectividad para generar LTCs en relación a las DCs pulsadas con lisados celulares obtenidos mediante ciclos de congelación-descongelación.<sup>136</sup>

Con el advenimiento del concepto de muerte celular inmunogénica (ICD, acrónimo del inglés *Immunogenic Cell Death*), la cual implica una muerte celular capaz de inducir una respuesta inmune antitumoral eficaz, en contraste con la apoptosis silenciosa (no inducida) que es no inmunogénica; existen evidencias que la inducción de ICD podría reforzar los efectos terapéuticos de la quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia.<sup>137</sup> En este contexto, se ha demostrado que las células cancerosas sometidas a ICD exhiben una excelente capacidad inmunoestimuladora debido a la expresión de una serie de DAMPs críticos que actúan como potentes señales de peligro. Hasta el momento los principales DAMPs estudiados que tienen un papel como potenciadores inmunológicos incluyen las chaperonas como la ecto-calreticulina (ecto-CRT) y las proteínas de shock térmico (HSPs) expuestas en la superficie celular (señal de "cómeme"), el ATP (señal de "encuéntrame") y la proteína de la caja 1 del grupo de alta movilidad (HMGB1) liberados al medio extracelular.<sup>138 139</sup> En efecto, la unión de DAMPs a los RRP expresados en las DCs inicia la cascada celular que resulta finalmente en la activación de las respuestas inmunes innatas y adaptativas. Por este motivo, existen actualmente estudios clínicos abocados al desarrollo de vacunas terapéuticas basadas

en DCs aprovechando los enfoques novedosos para la inducción de ICD en células tumorales.<sup>118</sup>

La frecuencia de vacunación y el sitio de inoculación también son puntos a tener en cuenta a la hora de la optimización de esta terapia. En este sentido, se ha observado que las vías de vacunación con acceso a los ganglios linfáticos drenantes como la subcutánea, intradérmica, intraganglionar e intralinfática mejoran ampliamente la respuesta clínica en cáncer de próstata y en carcinoma de células renales.<sup>140</sup>

Otro aspecto fundamental para considerar en el desarrollo de vacunas antitumorales basada en DCs, es el estado de maduración de las células que van a ser reinyectadas al paciente. Por esta razón, uno de los aspectos más estudiados para mejorar la efectividad de las vacunaciones es la valoración de distintos factores de maduración, ya que las DCs en ausencia de los factores apropiados inducen tolerancia a las células T. Actualmente, el cóctel de citoquinas considerado como el estándar de oro para la maduración de DCs incluye TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y Prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>).<sup>141 142</sup> A pesar de que este cóctel incrementa los marcadores de maduración y el receptor CCR7 de direccionamiento a ganglios linfáticos, no es capaz de inducir la producción de IL-12 por las DCs, la cual es una citoquina esencial para la diferenciación del perfil Th1.<sup>141</sup> En efecto, la IL-12 ha sido reconocida como una de las citoquinas con mayor potencia en la mediación de la actividad antitumoral en una diversidad de modelos preclínicos.<sup>143</sup> Además, la estimulación de las DCs con PGE<sub>2</sub> induce la expresión de la enzima indolamina 2,3-dioxigenasa-1 (IDO1), encargada de la degradación de triptófano a quinurenina, constituyendo un mecanismo eficaz de modulación de la respuesta inmune.<sup>144</sup> La expresión de IDO1 mediada por PGE<sub>2</sub> y la producción de quinurenina, resulta en la generación de células Treg y la inhibición de la capacidad aloestimuladora. Dado que PGE<sub>2</sub> es considerado como indispensable para que la DC migre a los nódulos linfáticos, no puede ser simplemente omitido en los regímenes de maduración.<sup>145</sup> Es por esto que numerosos estudios están dirigidos a la búsqueda del agregado de otros compuestos capaces de madurar y activar a las DCs de manera más eficiente. Entre ellos han sido analizados diversos agonistas específicos de los receptores de tipo Toll (TLRs). La utilización de estos ligandos de TLRs se fundamenta en que la activación de estos receptores de la inmunidad innata gatilla una potente activación de las DCs, por lo cual

se generarían células con una capacidad superior de producir citoquinas y con alta capacidad migratoria.<sup>146</sup> En este aspecto, el ligando de TLR3 Poly(I:C) induce la activación de las DCs, particularmente las cDC1, contribuyendo a la eliminación del tumor en modelos animales.<sup>147 148</sup> Asimismo, diversos ligandos de TLR7/TLR8 como el Resiquimod,<sup>149</sup> el Imiquimod y otras imidazoquinolinas son eficientes en la activación de pDCs y cDCs humanas. Sin embargo, presentan la desventaja de que su aplicación es mayormente tópica.<sup>150</sup> De acuerdo a lo esperado, con el cóctel de citoquinas y agonistas de TLRs se obtuvieron DCs maduras con una elevada expresión de los marcadores de activación CD80 y CD83, junto con una capacidad migratoria superior y una mayor secreción de citoquinas (IL-6, IL-8, IL-10 e IL-12), comparado con DCs maduras solamente con las citoquinas proinflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . No obstante, las DCs estimuladas con PGE<sub>2</sub> y agonistas de TLRs fallaron en el procesamiento y la presentación cruzada de péptidos complejos como péptidos largos, proteínas o lisados tumorales que podrían ser necesarios para la generación de una vacuna antitumoral efectiva.<sup>151</sup> Cabe destacar, que la naturaleza de estos adyuvantes y agentes activantes condiciona su acción en cada subconjunto de DCs ya que su eficacia depende del perfil de RRP expresado por cada subpoblación.<sup>118</sup> Además, se han observado muchos efectos adversos al administrar estos compuestos principalmente debido a su naturaleza sintética. Por ejemplo, Poly(I:C) no ha sido bien tolerado en estudios clínicos,<sup>152</sup> y en consecuencia actualmente se encuentran en estudio variantes desarrolladas de este compuesto que tienen como objetivo reducir la toxicidad.<sup>117</sup>

## CAPÍTULO 3

### 1.3.1 Hormonas Tiroideas y Sistema Inmune

El conocimiento de la interacción entre el sistema inmune y las HTs ha adquirido relevancia en los últimos años, de manera que actualmente las HTs son reconocidas por desempeñar un rol esencial en las células inmunes y sus respuestas asociadas. Efectivamente, todas las células del sistema inmune expresan TRs indicando su importancia en la fisiología del sistema inmune.<sup>9</sup>

Inicialmente, las investigaciones estuvieron principalmente dirigidas al efecto de las HTs sobre la población de linfocitos T y B, evidenciando la contribución de estas hormonas en la respuesta inmune adaptativa (**Figura 10**). Diversos estudios han demostrado la acción de las HTs en linfocitos T y células T de linfoma murino (TCLs). Al respecto, T3 y T4 estimulan la proliferación de los linfocitos T y de las TCLs en respuesta a mitógenos. El efecto de las HTs sobre la proliferación de TCLs involucra la activación no-genómica de la isoforma zeta atípica de la proteína quinasa C (PKC $\zeta$ ) y ERK  $\frac{1}{2}$ , activación del factor de transcripción NF $\kappa$ B y la inducción genómica de la iNOS y del TR.<sup>153</sup> Asimismo, ha sido demostrado que la interacción de las HTs con la integrina  $\alpha$ v $\beta$ 3 en la membrana de las TLCs desencadena vías de señalización intracelulares que concluyen en la estimulación de la transcripción y la producción de factores angiogénicos.<sup>154 155 156</sup> Por otro lado, existen evidencias de que el tratamiento de linfocitos T con HTs reduce la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2, induce la producción de ROS y disminuye el potencial transmembrana mitocondrial, conduciendo a su muerte celular por apoptosis.<sup>157</sup> Cabe señalar que los linfocitos T de pacientes con Enfermedad de Graves presentan un incremento en la apoptosis en comparación con individuos eutiroideos.<sup>157 158</sup> Del mismo modo, las HTs actúan sobre los linfocitos B los cuales expresan el TR $\alpha$ .<sup>159</sup> En este sentido, las HTs regulan positivamente la linfopoyesis de las células B considerando que la frecuencia de las células del linaje B se reduce significativamente en las cepas de ratones que presentan defectos en el eje pituitario/tiroideo y que la producción normal de precursores de linfocitos B es dependiente de las HTs.<sup>160 161</sup> Estudios recientes en ratones que presentan una mutación en el TR $\alpha$  causante de resistencia a las HTs evidenciaron una reducción de

linfocitos B en circulación, médula ósea y bazo, mediante la supresión de reguladores claves en la linfopoyesis de las células B.<sup>162</sup>

A pesar de que numerosos estudios han abordado el efecto de la patología tiroidea y el sistema inmune, algunos resultados son controvertidos por lo cual es difícil establecer una correlación directa entre las condiciones de hiper o hipotiroidismo y la función inmune.<sup>155 8</sup> En particular, ha sido reportado que pacientes con hipotiroidismo suelen presentar inmunodeficiencias con un aumento significativo en la susceptibilidad a las infecciones;<sup>163</sup> en tanto que pacientes que sufren sepsis grave, shock séptico o hemorrágico tienen una mayor incidencia de hipotiroidismo concurrente.<sup>164 165</sup> El hipotiroidismo experimental en roedores se asocia con una disminución en la actividad tímica y la involución del bazo y los ganglios linfáticos, efectos restablecidos por la administración de HTs.<sup>166 167</sup> En relación a niños con diagnóstico de hipotiroidismo congénito, se ha descrito una deficiencia severa de los niveles séricos de IgA e IgM. Además, se observó una correlación positiva entre las concentraciones de dichas inmunoglobulinas en suero y los niveles de T4 libre, así como con la severidad del hipotiroidismo congénito.<sup>168</sup> Por otro lado, los pacientes con hipertiroidismo manifiestan con frecuencia desequilibrios en las respuestas inmunes, incluyendo una producción anormal de anticuerpos, tanto aumentada como disminuida.<sup>169</sup> A su vez se ha documentado, que el hipertiroidismo en ratones disminuyó la cantidad de células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en el timo, pero aumentó la cantidad de ambas poblaciones en sangre periférica.<sup>170</sup>

Por lo que se refiere a la inmunidad innata, sus principales células como neutrófilos, células NK, macrófagos y DCs son consideradas actualmente células blanco de la acción de las HTs.<sup>9 8</sup> En el caso de los neutrófilos (**Figura 10**), expresan elementos esenciales requeridos para la entrada de las HTs a la célula, su metabolización intracelular y su acción a través de sus receptores. Como se mencionó anteriormente, la capacidad de los neutrófilos de eliminar patógenos es mediada por diferentes mecanismos entre los que se encuentran la generación de ROS mediante la enzima NADPH oxidasa. En este sentido, ha sido establecido que los niveles circulantes de las HTs afectan la generación de ROS por parte de los neutrófilos.<sup>171</sup> En particular, la administración de T3 a ratas aumenta la actividad del estallido respiratorio de PMNs

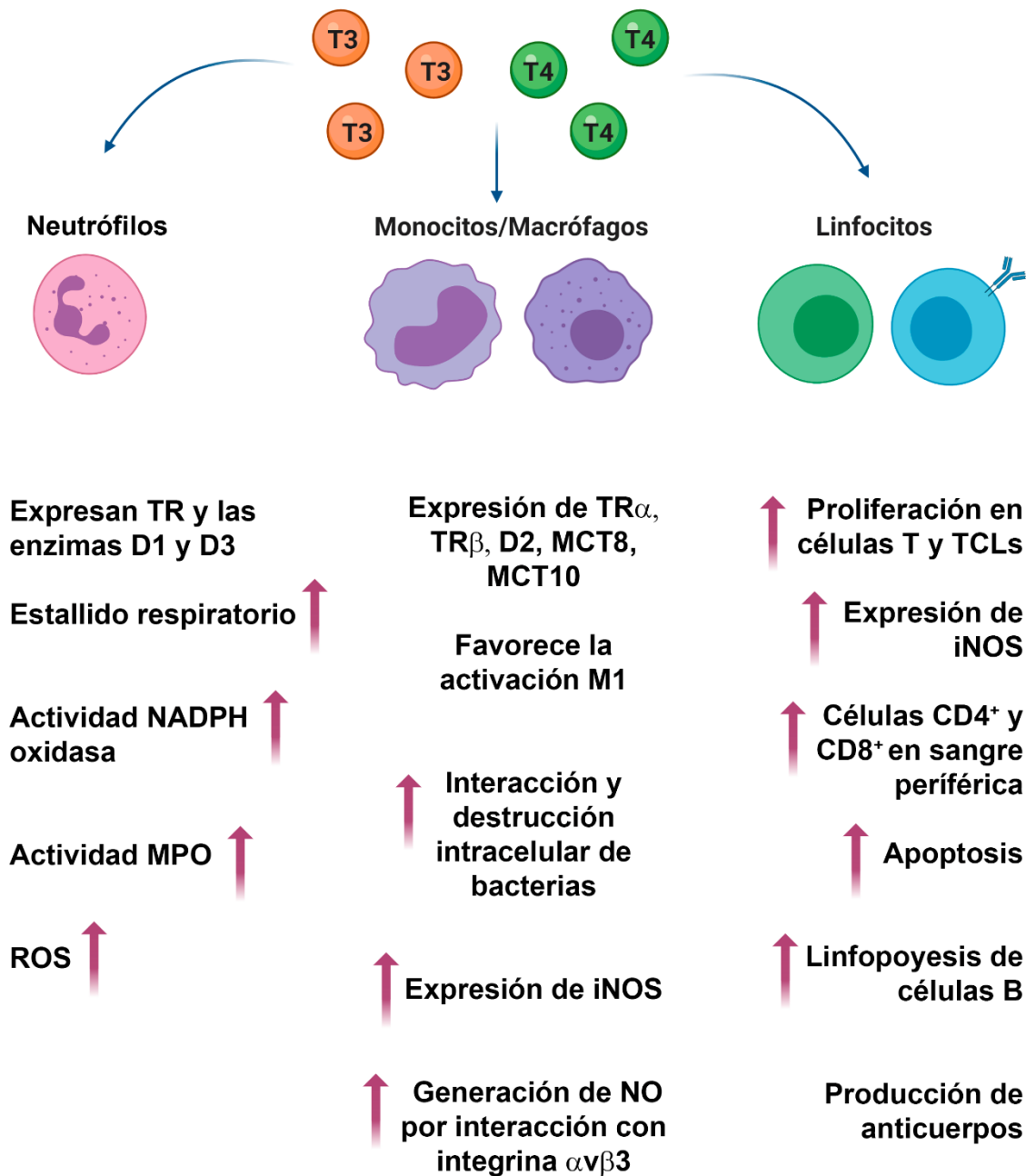
aislados de sangre periférica con un incremento en la actividad de NADPH oxidasa y MPO, resultando finalmente en una mayor producción de ROS.<sup>172 173</sup> Estos resultados concuerdan con los descritos en pacientes con Enfermedad de Graves y con adenoma tóxico donde se observó que los PMNs presentaban una mayor producción de ROS, específicamente peróxido de hidrógeno y superóxido.<sup>174 175</sup> Sin embargo, los efectos *in vitro* de las HTs sobre los neutrófilos exhiben resultados contradictorios, sugiriendo que los efectos de estas hormonas sobre estas células no pueden ser explicados únicamente por acción directa. En adición a los efectos de los niveles circulantes de las HTs, el metabolismo intracelular de estas hormonas presenta un rol fundamental en la función de los neutrófilos durante infecciones e inflamación. En efecto, los neutrófilos tanto de ratones como de humanos expresan las enzimas responsables de la metabolización de HTs D1 y D3. De esta manera las HTs (principalmente T4) entra a la célula y puede ser activada por D1 o inactivada por D3, regulando así los niveles intracelulares de T3.<sup>176 177</sup>

Existen escasos estudios que relacionen las acciones de las HTs con células NK.<sup>9</sup> Al respecto, algunos resultados sugieren que las HTs modulan la sensibilidad de las células NK murinas al IFN- $\gamma$ .<sup>178</sup> Además, ha sido demostrado que T3 incrementa tanto el número como la actividad de las células NK y que dicho efecto es más pronunciado en ratones de mayor edad.<sup>179</sup>

A pesar de algunos resultados controvertidos respecto a las isoformas del TR que se expresan en los macrófagos, ha sido demostrada la presencia de TR $\alpha$  y TR $\beta$  en las distintas especies estudiadas. Es importante destacar que los macrófagos murinos expresan además la integrina  $\alpha\beta 3$  en la membrana plasmática.<sup>171 9</sup> La evidencia actual demuestra que los estados relacionados al desbalance de los niveles circulantes de las HTs afectan considerablemente el metabolismo y la función de los macrófagos (**Figura 10**). Particularmente, la estimulación del sistema inmune en ratas hipertiroideas reveló una disminución en la migración de monocitos y producción de ROS. Por el contrario, el hipotiroidismo aumentó la capacidad fagocítica y la producción de ROS por los macrófagos, sin afectar su migración celular.<sup>180</sup> Estudios *in vitro* demostraron que las HTs incrementan la interacción celular con bacterias y la destrucción intracelular de las mismas en macrófagos murinos y humanos. En estas condiciones, la actividad bactericida de los macrófagos fue promovida por la expresión de iNOS inducida por T3



y T4, generando NO a través de la interacción de las hormonas a la integrina  $\alpha v \beta 3$ .<sup>181</sup> De acuerdo con estos hallazgos, la administración de T4 a ratones indujo un aumento en la actividad fagocítica de los macrófagos obtenidos del exudado peritoneal.<sup>182</sup> Respecto al fenotipo de los macrófagos inducido por las HTs, T3 induce la polarización hacia un perfil M1 con funciones proinflamatorias, microbicidas y antitumorales, a la vez que inhibe la expresión de genes característicos del perfil M2.<sup>183</sup> Otro punto a considerar en relación a los efectos de las HTs en los macrófagos, es el metabolismo intracelular de estas hormonas. En efecto, ha sido demostrado la expresión de la enzima D2, como así también de los transportadores MCT8 y 10 en macrófagos murinos y humanos.<sup>184</sup> Un estudio más reciente ha reportado que la menor expresión de la enzima D2 en embriones de peces cebra, aumentó su mortalidad durante la meningitis neumocócica. A su vez los macrófagos derivados de médula ósea de ratones que presentan el gen Dio 2 deletado (*D2 knockout*) exhibieron una fagocitosis alterada y una respuesta de citoquinas parcialmente reducida a la estimulación con la endotoxina bacteriana LPS.<sup>177</sup> En conjunto, estos resultados indican que la regulación adecuada de la concentración intracelular de la HT activa T3, es esencial para la función proinflamatoria de los macrófagos a través de una combinación de mecanismos genómicos y no genómicos.<sup>171</sup>



**Figura 10. Acción de las HTs sobre células de la Inmunidad innata y adaptativa.**

Principales efectos reportados de las HTs, T3 y T4, sobre diferentes células del sistema inmune como Granulocitos (Neutrófilos), Monocitos y Macrófagos y Linfocitos T y B. TCLs: células T de linfoma murino. Esta figura fue creada usando Biorender, adaptada de *Montesinos & Pellizas, 2019*.<sup>9</sup>

### 1.3.2 Hormonas Tiroideas y Células Dendríticas

El papel de las HTs en el inicio de la respuesta inmune y su efecto en el direccionamiento de la respuesta adaptativa fue abordado hace más de una década. En este sentido, el grupo donde se realizó esta tesis doctoral reportó en el año 2008 los primeros hallazgos del efecto de T3 sobre las características y funcionalidad de las DCs, consideradas el puente entre la inmunidad innata y adaptativa.<sup>185</sup> En particular, se evidenció por primera vez la expresión de TRs en DCs derivadas de médula ósea de ratón, tanto en iDCs como en aquellas maduras con LPS, presentando principalmente la isoforma TR $\beta$ 1 con una sorprendente localización preferentemente citoplasmática (**Figura 11**). Se demostró, además, que niveles fisiológicos de T3 incrementan la expresión de marcadores de maduración en las DCs (MHC II, CD80, CD86 y CD40) y la secreción de IL-12. Asimismo, la hormona concedió a las DCs una mayor capacidad para inducir la proliferación de células T vírgenes alogénicas y la producción de la citoquina efectora IFN- $\gamma$  en cultivos mixtos leucocitarios, favoreciendo así la diferenciación a un perfil Th1.<sup>185</sup>

Estudios posteriores del grupo revelaron que este efecto de T3 sobre las DCs podría ser mediado, al menos en parte, por la señalización de TR $\beta$ 1 a través de un mecanismo de acción dependiente de Akt y NF- $\kappa$ B. En este sentido, fue demostrada la participación de la vía de Akt independiente de la activación por PI3K como responsable de la acción de T3, así como el rol esencial del TR $\beta$ 1 en este efecto y a NF- $\kappa$ B como un nuevo factor de transcripción responsable de la expresión del TR.<sup>186 187</sup> Por otro lado, este mecanismo de señalización intracelular fue inhibido por glucocorticoides, contrarrestando así los efectos inducidos por T3 sobre las DCs.<sup>188</sup> En concordancia con los resultados iniciales en DCs murinas de nuestro grupo, se reportó que el estado metabólico tiroideo influye en el fenotipo y función de las DCs humanas en sangre periférica.<sup>189 190</sup> Los autores demostraron además que T3 en combinación con el factor de maduración de DCs, CD40 ligando (CD40L), favorece 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 Concanavalina A.<sup>189</sup>

El mecanismo de acción de las HTs incluye el transporte a través de la membrana y el metabolismo intracelular, siendo ambos procesos cruciales en los efectos inducidos

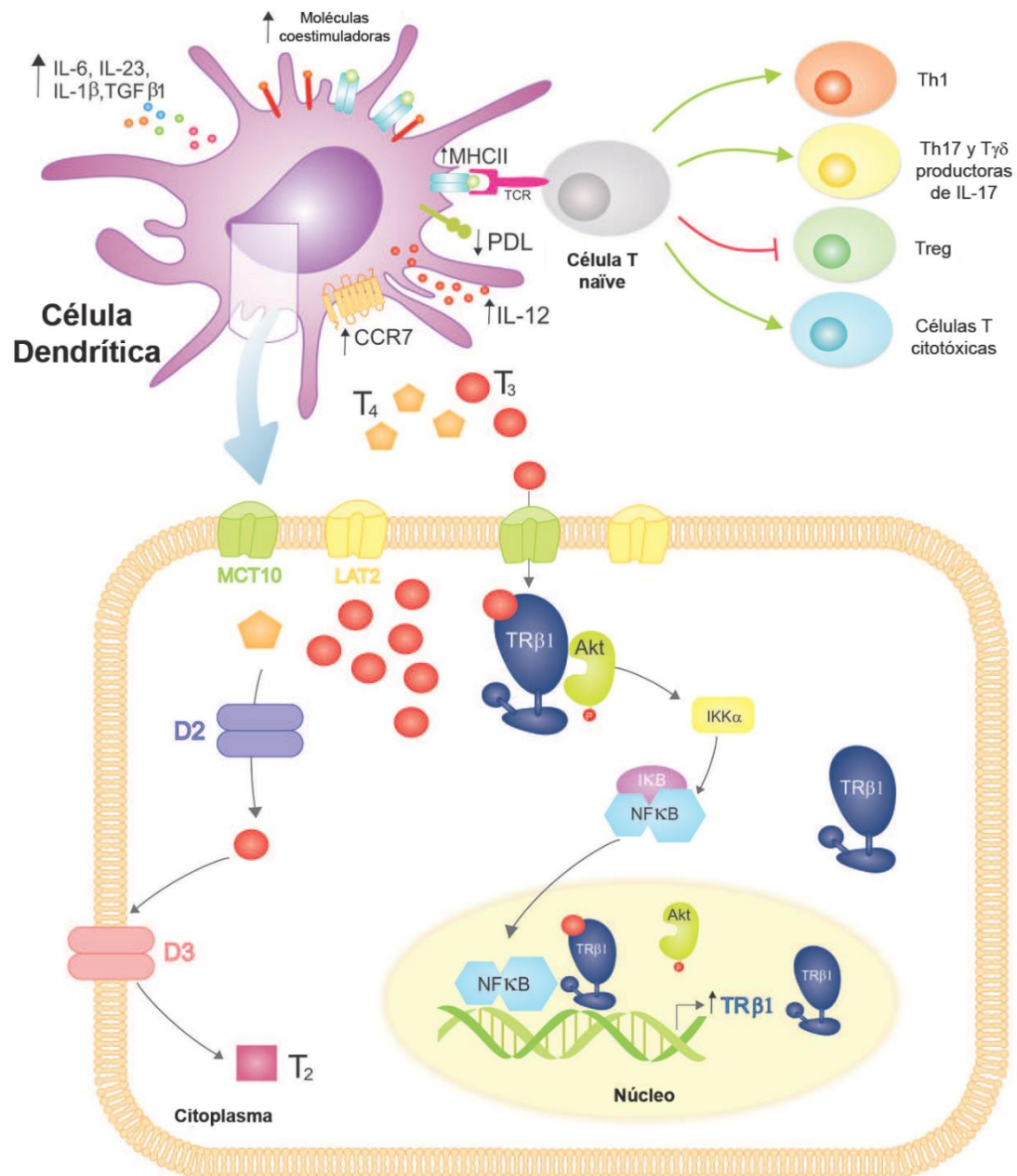
por las HTs en sus células diana como fue demostrado en macrófagos y neutrófilos.<sup>177</sup>  
<sup>183</sup> <sup>191</sup> En relación con las DCs, el grupo de investigación donde se realizó la presente tesis reportó los primeros hallazgos de estos procesos en DCs murinas.<sup>192</sup> En efecto, las DCs expresan los transportadores MCT10 y LAT2, y las deiodasas D2 y D3 con capacidad funcional de metabolizar las HTs. Asimismo, las DCs transportan HTs hacia el interior y exterior celular, con preferencia de T3 sobre T4 en la captación y de T4 sobre T3 en el proceso de eflujo de estas hormonas. Por otra parte, este estudio reveló que T4 no ejerce efectos sobre la maduración y funcionalidad de las DCs murinas en las condiciones evaluadas, sugiriendo la existencia de un mecanismo de regulación homeostático que prevendría la activación de las DCs circulantes por la acción de T4 y que ésta se restringiría a sitios de activación de las células mediado por aporte de T3 local.

Cabe señalar que estudios *in vitro* e *in vivo* del laboratorio, profundizaron el impacto de T3 sobre el balance entre diferentes respuestas proinflamatorias y tolerogénicas.<sup>193</sup> En este sentido, T3 estimuló la producción de las citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-23 e IL-1 $\beta$  en DCs, responsables del direccionamiento hacia células Th17. En concordancia, los esplenocitos alogénicos co-cultivados con DCs maduras en presencia de T3 secretan niveles más altos de IL-17, encontrándose, además, a la población de linfocitos T- $\gamma\delta$  como una de las principales productoras de dicha citoquina. A su vez, T3 disminuyó la expresión de las moléculas inhibitorias PDL-1 y 2 en las DCs, la frecuencia de células Treg e incrementó la expresión de PD-1 en los linfocitos T, lo que estaría asociado a una inhibición de la tolerancia inmune. Estos hallazgos sugieren un rol de T3 en la regulación del potencial inmunogénico de las DCs, aspecto involucrado en el desarrollo de una inmunidad protectora en infecciones y cáncer. Por otro lado, las DCs estimuladas con T3 en procesos autoinmunes podrían tener implicancia negativa relacionada a la inducción de una respuesta inmunogénica y la inhibición de una respuesta tolerogénica.<sup>194</sup>

En función de lo expuesto en el apartado 1.2.4, las DCs presentan características únicas para ser consideradas como una elección ideal en la vacunación antitumoral. La inmunoterapia basada en DCs evoca las respuestas de células T citotóxicas específicas de Ags tumorales que contribuyen a la restricción de la progresión y/o erradicación tumoral.<sup>195</sup> En particular, la presentación cruzada del Ag es esencial para la inducción de

una respuesta de linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxica específica del tumor.<sup>196</sup> En esta perspectiva, resultados del grupo demostraron que T3 le confiere a las DCs de una mayor capacidad para realizar presentación cruzada de Ags *in vitro* y estimular una respuesta citotóxica Ag-específica *in vivo*.<sup>187 197</sup> Al mismo tiempo, el tratamiento con T3 aumentó la sobrevivencia de las DCs probablemente a través de la fosforilación de Akt inducida por la hormona.<sup>186 187</sup> Asimismo, T3 incrementó la expresión del receptor de quimiocinas CCR7 y como consecuencia su migración a ganglios linfáticos, considerado un evento crítico para la activación de los linfocitos T (**Figura 11**). En efecto, ha sido reportado que las DCs en ratones que expresan CCR7 migran a los ganglios linfáticos e inducen de manera eficiente un rápido aumento en el número de células en estos órganos, mientras que por el contrario las DCs de ratones deficientes para CCR7 son incapaces de realizar este proceso.<sup>198</sup>

En función de los resultados mencionados en relación con las HTs y las DCs, se estableció en nuestro laboratorio un modelo murino de vacunación antitumoral de melanoma basado en DCs estimuladas *ex vivo* con T3 en presencia de ovoalbúmina (OVA) como único Ag tumoral. Este tratamiento fue capaz de aumentar el porcentaje de animales libres de tumor, retrasar la aparición y el crecimiento de los tumores en los ratones afectados aumentando su sobrevivencia.<sup>187 197</sup> Asimismo, este protocolo de vacunación indujo una prominente infiltración de células T CD8<sup>+</sup> intra-tumorales, lo cual ha sido asociado con una mayor sobrevivencia libre de enfermedad y/o general en diversos tipos de tumor.<sup>199</sup> Notablemente, los linfocitos aislados de bazo de los ratones portadores de tumor que recibieron la vacunación con DCs tratadas con T3, secretaron mayores niveles de IFN- $\gamma$  en cultivo en comparación con los esplenocitos de los animales vacunados con DCs no estimuladas con la hormona.



**Figura 11. Mecanismo de acción de las Hormonas Tiroideas sobre las Células Dendríticas y sus efectos en la polarización de la respuesta inmune.**

La acción de T3 resulta en la maduración fenotípica de las DCs regulando positivamente la expresión de moléculas co-estimuladoras (MHC II, CD80, CD86 y CD40). A su vez, fomenta su activación funcional promoviendo la secreción de citoquinas proinflamatorias (IL-12, IL-6, IL-23, IL-1β y TGF-β1) impulsando así, respuestas adaptativas que favorecen el desarrollo de células Th1, Th17, Tγδ productoras de IL-17 y células T citotóxicas. Por el contrario, se restringe la población Treg. Las DCs condicionadas con T3 aumentan la expresión de CCR7, lo que favorece su migración a los ganglios linfáticos. Además, T3 reduce la expresión de PDL en las DCs, modulando este punto de control inmunológico. Las DCs incorporan T3 con mayor eficacia que T4 a través de los transportadores MCT10 y LAT2. Una vez dentro, las HTs son metabolizadas por D2 (conversión de T4 en T3) y D3 (inactivación de T3). Estas células expresan principalmente TRβ1. Tras la unión de T3 a TRβ1, Akt se activa favoreciendo la translocación nuclear de NF-κB, que actúa como un factor de transcripción regulando positivamente la expresión de TRβ1. Una señalización de T3-TRβ1 intacta es esencial para los efectos inducidos por T3 sobre las DCs. Adaptado de *Montesinos & Pellizas, 2019*.<sup>9</sup>

---

## 2. OBJETIVOS

---

### OBJETIVO GENERAL

La creciente evidencia recopilada en las últimas décadas ha revelado una interacción bidireccional entre las HTs y el sistema inmune. Efectivamente, las HTs modulan la función de los diferentes actores involucrados en la inmunidad innata y adaptativa. En este contexto, el grupo de trabajo donde se realizó la presente tesis doctoral inició los estudios de la acción de las HTs sobre las DCs y su impacto sobre las respuestas inmunes adaptativas.

En esta perspectiva y sobre la base de los antecedentes presentados, el **Objetivo General** de esta tesis doctoral implica la **profundización del efecto de las HTs sobre la inducción de respuestas inmunes adaptativas a través de las DCs.**

Es importante destacar el rol de las HTs en el desarrollo de una respuesta antitumoral y los hallazgos previos en el modelo murino de melanoma, los cuales enfatizan y destacan el uso de DCs maduras en presencia de T3 como una alternativa para potenciar la inmunidad tumoral mediada por células T. En función de lo expuesto, resulta imprescindible analizar la eficacia de la inmunoterapia desarrollada en otros modelos tumorales, así como iniciar el estudio del efecto de las HTs en las DCs humanas, considerando la posible transferencia futura de los resultados obtenidos en modelos murinos a la clínica humana.

En este sentido, se abordó el estudio de nuevas aristas involucradas en el efecto de las HTs sobre las DCs mediante los objetivos específicos descriptos a continuación.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

### **1. Desarrollar una estrategia de vacunación para el tratamiento antitumoral basada en la manipulación de DCs estimuladas con T3 en presencia de un Ag tumoral.**

#### 1.1. Estudios *in vitro*:

- 1.1.a) Inducir inmunogenicidad en las células tumorales a través de irradiación UVB.
- 1.1.b) Evaluar la captación de Ags provenientes de las células tumorales por las DCs.
- 1.1.c) Estudiar las modificaciones en la expresión de marcadores de maduración celular inducidas por T3 en DCs expuestas a Ags tumorales.
- 1.1.d) Investigar el efecto de T3 sobre la producción de citoquinas proinflamatorias en DCs expuestas a Ags tumorales.

#### 1.2. Estudios *in vivo*:

- 1.2.a) Evaluar la capacidad de la estrategia de vacunación de generar una respuesta antitumoral *in vivo*:
  - 1.2.a.1) Analizar el crecimiento tumoral luego de la inoculación de las DCs.
  - 1.2.a.2) Caracterizar la respuesta inmune antitumoral inducida y evaluar las poblaciones inmunes involucradas.
- 1.2.b) Estudiar el efecto de IL-17 como mediador de la eficacia antitumoral.

### **2- Analizar el efecto de las HTs sobre las características y funcionalidad de DCs humanas (huDCs).**

- 2.a) Investigar los efectos de T3 sobre la maduración de las huDCs.
- 2.b) Analizar la producción de citoquinas por las huDCs luego de la estimulación con T3.



---

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 3.1 Ratones

Se utilizaron ratones hembra de la cepa C57BL/6 (B6; H-2b) *wild type* (WT) y transgénicos IL-17A/F doble *knockout* (IL-17 KO).<sup>200</sup> Los animales fueron mantenidos en bioterio a 25°C con ciclos de luz-oscuridad, recibiendo alimento y agua *ad libitum*, 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 Institucional de Cuidado y Uso de Animales (IACUC) de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba (Resolución HCD N° 1525/14).

### 3.2 Preparación y cultivo de las DCs

Las DCs inmaduras (iDCs) fueron diferenciadas a partir de progenitores de médula ósea, extraídos del fémur de ratones C57BL/6 WT y cultivados en medio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (Gibco) suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB), 1% de penicilina-estreptomicina, en presencia de GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos) en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> en aire a 37°C. Al octavo día de cultivo, más del 85% de las células no adherentes colectadas (iDCs) expresaron el marcador CD11c determinado por citometría de flujo.<sup>185</sup> Estas células fueron tratadas con 3,3',5-triiodo-L-tironina (T3, 10 nM, DC+T3) por 18 horas a 37°C. Cultivos paralelos fueron mantenidos sin estímulo y usados como controles (DC). La concentración final de los diluyentes usados fue idéntica en cada cultivo, independientemente de los tratamientos individuales.

La concentración de T3 utilizada en los ensayos se seleccionó de acuerdo con estudios previos del grupo de investigación, donde se realizaron curvas de dosis-respuesta (0,05 nM-500 nM), obteniendo la mayor respuesta en el rango de 5 nM.<sup>185 186</sup> Además, la concentración de T3 (10 nM) utilizada en esta tesis doctoral <sup>187 188</sup> corresponde a una concentración fisiológica, de acuerdo a diversos reportes en donde

evaluaron los efectos de T3 en cultivos celulares con concentraciones de T3 en el rango de 1-10 nM.<sup>201 202 203 204</sup> La hormona T3 (Sigma-Aldrich, USA) fue preparada de acuerdo con 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 la prueba de Limulus (Limulus amoebocyte lysate assay, Sigma-Aldrich).

### 3.3 Análisis del fenotipo de DCs murinas

Luego de los tratamientos realizados, las DCs fueron lavadas dos veces con buffer fosfato salino (PBS) suplementado con SFB al 2%. Posteriormente, las células fueron incubadas con los siguientes anticuerpos (Acs) durante 30 minutos a 4°C: APC-anti-CD11c, y PE.Cy7-anti-CD86 (BD Biosciences, USA) para realizar la marcación de superficie. Las células fueron procesadas en un citómetro de flujo (FACSCanto II o LSR Fortessa X-20 BD Biosciences) y analizadas con el software FlowJo (USA).

### 3.4 Cultivo e inducción de apoptosis de las células tumorales MC38

Las células MC38 derivadas de adenocarcinoma de colon murino fueron cultivadas en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma-Aldrich) suplementado con 10% de SFB, 2 mM de glutamina, 0,1 mM de aminoácidos no esenciales, 0,1 mM de piruvato de sodio, y 1% de penicilina-estreptomicina en una atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> en aire a 37°C. Cuando las células MC38 llegaron al 70% de confluencia se les realizó un lavado con PBS sin levantar las células de la placa de cultivo y posteriormente fueron expuestas a radiación ultravioleta (UV)-B (1 J/m<sup>2</sup>) por 5 minutos. Inmediatamente después, se les agregó 5 mL de medio completo (DMEM, 5% SFB) y se cultivaron durante 24 horas. Las células apoptóticas y necróticas (MC38-Apo/Nec) fueron analizadas mediante PE-Anexina V y 7-aminoactinomicina D (7-AAD) usando el Kit I de detección de Apoptosis (BD Biosciences) por citometría de flujo como fue descripto.<sup>205</sup>

### 3.5 Ensayo de captación de antígenos

Luego de la irradiación con luz UVB, las células MC38-Apo/Nec fueron teñidas con el colorante PKH26 (Sigma-Aldrich) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células fueron lavadas dos veces con PBS y obteniendo luego una suspensión de  $2 \times 10^7$  células por mL en Diluyente C. Seguidamente, 4 uL del colorante PKH26 fueron diluidos en 1 mL de Diluyente C, para luego ser agregados a la suspensión celular anterior, seguido de un suave pipeteo para homogenizar la muestra. Luego de 5 minutos de mezclado periódico, la reacción de tinción fue finalizada tras la adición de un volumen equivalente (2 mL) de suero. Finalmente, las células teñidas fueron centrifugadas, resuspendidas, transferidas a un nuevo tubo y lavadas 2 veces con 10 mL de medio completo para asegurar la remoción total del colorante no unido.

Las células MC38-Apo/Nec teñidas (MC38<sup>PKH26</sup>) fueron co-cultivadas con las DCs en presencia o ausencia de T3 (10 nM) en una relación 1:3 (MC38-Apo/Nec:DC) por diferentes tiempos (0,5 - 2 - 5 - 24 horas) a 37°C. Luego del co-cultivo, las células fueron lavadas con PBS e incubadas por 30 minutos a 4°C con un anticuerpo APC-anti-CD11c. Posteriormente se procedió al análisis por citometría de flujo. Las DCs que fueron capaces de captar Ags provenientes de las células MC38-Apo/Nec fueron definidas como células doble positivas para PKH26 y APC. El control de captura no específica de MC38-Apo/Nec se estableció mediante el co-cultivo de ambos tipos celulares a 4°C durante los tiempos señalados precedentemente.

### 3.6 Estimulación de las DCs con antígenos tumorales

Las iDCs fueron co-cultivadas con las células MC38-Apo/Nec en una relación 3:1 (DC:MC38-Apo/Nec) en presencia o ausencia de T3 (10 nM). Luego de 18 horas, las células fueron lavadas 2 veces con PBS para proceder a su tinción con los siguientes anticuerpos (BD Biosciences, eBioscience, Biolegend) de superficie: APC-anti-CD11c, PE.Cy7-anti-LAG (pro-TGF- $\beta$ ), PE.Cy7-anti-CD86, y las citoquinas intracelulares: PE-anti-IL-12 y Alexa Flúor488-anti-IL-6. Para ello, las células fueron expuestas a Brefeldina A (10  $\mu$ g/ml; Sigma) y/o Monensina (40  $\mu$ g/ml, BD Biosciences) durante las últimas 4 horas de cultivo, luego fueron levantadas y marcadas con los anticuerpos para la detección de las moléculas de superficie por 30 minutos a 4°C. A continuación, las

células fueron fijadas con Cytofix/Cytoperm y PermWash Buffer (BD Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante y luego marcadas con la concentración óptima del anticuerpo monoclonal anti-citoquina.<sup>193</sup> Posteriormente, las células fueron adquiridas en un citómetro de flujo (FACSCanto II o LSR Fortessa X-20) y analizadas con el software FlowJo.

### 3.7 Modelo tumoral *in vivo* y protocolo de inmunoterapia basada en DCs

La línea celular singénica de cáncer de colon MC38 fue utilizada para inducir el tumor en ratones C57BL/6 WT o IL-17KO.<sup>206</sup> Las células MC38 se mantuvieron en cultivo como se describió previamente y para levantarlas se utilizó PBS y 0,025 % de tripsina-EDTA a 37°C. Para la inducción de los tumores, las células MC38 se lavaron 2 veces en PBS; se contaron las células viables y  $5 \times 10^5$  células se inyectaron por vía s.c. en 100  $\mu$ l de PBS en el flanco izquierdo de los ratones de 6-8 semanas de edad (día 0).

Se establecieron 3 grupos de vacunación: 1) se inyectó sólo PBS (CONTROL), 2) se inyectaron DCs cargadas con Ags de las células MC38-Apo/Nec (DC), y 3) se inyectaron DCs cargadas con células MC38-Apo/Nec estimuladas con T3 (DC+T3). Las DCs tratadas en las condiciones expuestas en el apartado 3.6 se lavaron 2 veces con PBS, fueron resuspendidas  $1.5 \times 10^6$  DCs en 100  $\mu$ l de PBS y administradas por vía s.c. en el flanco derecho de los ratones portadores de tumor en los días 1, 3, 5, 7 y 9 luego de la inoculación de las células tumorales MC38.

El crecimiento del tumor fue monitoreado por palpación siendo detectado a partir del quinto día, y mediante el tamaño tumoral medido cada 2-3 días con un caliper digital Vernier. El volumen tumoral fue determinado utilizando la siguiente fórmula:  $V = (D \times d^2) / 2$ , donde V es el volumen ( $\text{mm}^3$ ), D es el diámetro mayor (mm) y d es el diámetro menor (mm).<sup>187 207</sup> Los animales fueron sacrificados en los días 15 o 21 luego de la inoculación de las células tumorales, dependiendo del experimento a realizar.

### **3.8 Obtención de esplenocitos y linfocitos del ganglio drenante del tumor de ratones**

El día 15 luego de la inyección de las células MC38 a los animales, se extrajeron los bazo y ganglios linfáticos drenantes del tumor. En el caso de los esplenocitos fueron obtenidos mediante disgregación mecánica del tejido y posterior lisis de los glóbulos rojos.<sup>193</sup> Por otro lado, los nódulos linfáticos fueron disgregados de forma mecánica y posterior tratamiento enzimático con 2 mg/mL de Colagenasa y 50 U/mL de DNasa I (Roche) durante 30 minutos en agitación. Luego las suspensiones celulares obtenidas de los ganglios fueron filtradas utilizando membranas de nylon de 70 µm.

Los esplenocitos ( $1 \times 10^6$ ) y linfocitos de ganglios linfáticos ( $5 \times 10^5$ ) fueron cultivados en RPMI suplementado con 10% SFB y 1% de penicilina-estreptomicina e incubados en presencia o ausencia de lisados de las células MC38. Luego de 72 horas, las células fueron procesadas para analizar las diferentes poblaciones de linfocitos y las citoquinas producidas mediante citometría de flujo. Se procedió además a la recolección del sobrenadante de cultivo donde se realizó la detección de citoquinas mediante el ensayo inmunoenzimático (ELISA).

Para la obtención de los lisados de las células MC38, las mismas se levantaron con 0,025% de tripsina-EDTA a 37°C y posterior a la centrifugación se suspendieron  $5 \times 10^6$  células/mL en PBS. A continuación, las células fueron sometidas a 5 ciclos de congelamiento-descongelamiento (nitrógeno líquido, 55°C, vortex) y posterior a la centrifugación se conservó el sobrenadante a -80°C.

### **3.9 Caracterización de poblaciones celulares y determinación de la producción de citoquinas**

La caracterización de las poblaciones celulares en esplenocitos y linfocitos de ganglio se realizó mediante citometría de flujo. Para la tinción de citoquinas intracelulares las células fueron tratadas con Brefeldina A (10 µg/mL) o Monensina (40 µg/mL) durante las últimas 4 horas de cultivo. A continuación de la tinción superficial por 30 minutos a 4°C, las células fueron fijadas y permeabilizadas utilizando Foxp3 Staining Buffer Set (eBioscience) o Cytotfix/Cytoperm y PermWash Buffer según

corresponda, siguiendo los procedimientos indicados por el fabricante. Posteriormente, se procedió a la tinción intracelular utilizando diferentes combinaciones de los siguientes anticuerpos anti-ratón (BD Biosciences, eBioscience, Biolegend): Alexa Fluor 488-anti-CD3, PerCPCy5.5/FITC anti-CD4, FITC/PECy7-anti-CD8, APC-anti-IFN- $\gamma$  y PE-anti IL-17. Las muestras fueron adquiridas en los citómetros FACSCanto II y LSR Fortessa, y posteriormente analizadas utilizando el software FlowJo.<sup>193</sup>

### 3.10 Determinación de citoquinas en sobrenadantes

La cuantificación de IL-12, IFN- $\gamma$  e IL-17 fue determinada en los sobrenadantes de cultivos celulares utilizando kits comerciales de ELISA (BD Biosciences). Los anticuerpos de captura fueron: anti-ratón (producidos en rata) IL-12 p40/p70, IFN- $\gamma$  e IL-17. Los anticuerpos de detección incluyeron: anti-ratón (producidos en rata) IL-12 p40/p70, IFN- $\gamma$  e IL-17 acoplados a biotina. La estreptavidina acoplada a peroxidasa y el ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS) fueron utilizados como enzima y sustrato, respectivamente.<sup>193</sup>

### 3.11 Ensayo de inmunofluorescencia

Los tumores fueron extraídos y congelados inmediatamente en nitrógeno líquido. Posteriormente, se cortaron secciones de 5  $\mu$ m mediante criostato, las cuales fueron fijadas con acetona fría, se dejaron secar a temperatura ambiente y se almacenaron a -80°C.

Para proceder con la inmunomarcación, los cortes se dejaron 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se lavaron 2 veces con PBS por 10 minutos. Las muestras fueron fijadas con metanol por 7 minutos y luego lavadas con PBS-Tween 0,2%. El bloqueo de sitios inespecíficos se realizó en solución de bloqueo [PBS (pH 7,4), Tween 0,2%, 2% BSA] durante 25 minutos. La incubación con el anticuerpo primario se realizó en solución de bloqueo durante toda la noche a 4°C utilizando una dilución 1:50 del anticuerpo monoclonal de rata anti-CD31 de ratón (CALTAG Laboratories, Invitrogen, USA). Las muestras se lavaron 3 veces cada 10 minutos con PBS-Tween, y se procedió a incubar durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad con el anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de rata conjugado con Alexa Fluor 594 (dilución: 1:200,

Abcam, Reino Unido). Posteriormente, se realizaron 3 lavados cada 10 minutos con PBS-Tween y los núcleos fueron teñidos con 1 µg/ml de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) durante 5 minutos. Luego, se procedió a montar los cubreobjetos utilizando FluorSave (Calbiochem, USA). Finalmente, las imágenes se procesaron con el software ImageJ 2 (Instituto Nacional de Salud: NHI, USA).

### 3.12 Aislamiento del Ácido Ribonucleico (ARN)

La extracción de ARN fue realizada acorde al protocolo basado en el método de *Chomczynski y Sacchi*.<sup>208</sup> Los tumores fueron extraídos y congelados inmediatamente en nitrógeno líquido y conservados a -80°C hasta su utilización. Los tejidos fueron disgregados mediante un homogeneizador de tejido con el agregado de 1 mL de Trizol cada 50 - 100 mg de tejido (Invitrogen, USA). Posteriormente, se adicionó 0,2 mL de cloroformo por cada mL de Trizol. La mezcla se agitó vigorosamente, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12.000 xg durante 15 minutos 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 minutos. El precipitado se lavó con etanol 75%, se centrifugó a 8000 xg por 15 minutos a 4°C, fue secado en estufa a 37°C y finalmente disuelto en agua libre de nucleasas. Posteriormente, se procedió a la determinación de la concentración de la solución de ARN mediante su absorbancia a 260 nm. A fin de evaluar la calidad de la muestra obtenida se analizó la relación de absorbancias entre 260 y 280 nm. Luego, se evaluó la integridad del material extraído mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

### 3.13 Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR)

El ARN mensajero (3 µg de ARN total) fue transcrito reversamente a cDNA por incubación con 0,25 µM de *primers* degenerados oligo dT12VG, 4 µl de 5x RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH= 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub> 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 1 hora a 37°C. La M-MLV-RT remanente fue inactivada a 95°C por 5 minutos.

La amplificación mediante 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, USA) en volúmenes de 10 µl conteniendo: 5 µl de SYBR Green PCR Master Mix 2x (Applied Biosystems), 0,3 µM del *primer* sentido, 0,3 µM del *primer* antisentido, 1 µl de ADNc, y cantidad necesaria de agua libre de nucleasas. El perfil térmico fue: 95°C 10 minutos; 95°C 15 segundos, 60°C 1 minuto (*annealing*) por 40 ciclos. La medición de la señal emitida fue realizada en la etapa de *annealing*. La cuantificación de cambios relativos en la expresión del gen VEGF respecto al gen de expresión constitutiva β-actina, usado como control interno, fue realizada mediante el método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .<sup>209</sup> 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 (USA), mientras que los *primers* fueron adquiridos en Sigma-Genosys (USA).

Gen	Secuencia sentido	Secuencia antisentido
VEGF	5'-AGAGCAGAAGTCCCATGAAGTGA-3'	5'-TCAATCGGACGGCAGTAGCT-3'
β-actina	5'-GGCACCACACTTTCTACAATG-3'	5'-TGGCTGGGGTGTGAAGGT-3'

### 3.14 Generación de Células Dendríticas humanas

Las Células Dendríticas humanas (huDCs) se diferenciaron a partir de monocitos de sangre periférica obtenidos de donantes sanos del Banco de Sangre del Instituto de Hematología y Hemoterapia de Córdoba, Argentina. Todos los protocolos fueron aprobados por el Comité de Ética del Hospital Nacional de Clínicas (CEHNC), UNC. Todos los pacientes firmaron un informe expresando su consentimiento. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se aislaron de la capa leuco-plaquetaria (*buffy coat*) mediante un gradiente de densidad por centrifugación utilizando Ficoll-Paque (GE Healthcare).<sup>210 211 212</sup> Posteriormente se procedió a aislar los monocitos CD14<sup>+</sup> utilizando el kit de selección positiva EasySep Human CD14 positive selection kit



II (Stemcell Technologies). La pureza de la población resultante se comprobó por citometría de flujo en la cual la fracción enriquecida en células CD14<sup>+</sup> resultó entre 80-90%. Luego de la purificación, los monocitos fueron cultivados en medio RPMI-1640 suplementados con 10% SFB y 1% de penicilina-estreptomicina, y se procedió a su diferenciación a iDCs en presencia de 50 ng/ml de IL-4 y 30 ng/ml GM-CSF (BD Biosciencias). Las células se cultivaron durante 6 días con cambio del medio de cultivo suplementado con las citoquinas cada 2 días. El día 7 las células fueron tratadas con T3 (10 nM) o LPS (100 ng/mL, Escherichia coli strain 0111:B4; Sigma-Aldrich) por 18 horas.

### 3.15 Caracterización del fenotipo de DCs humanas

Para la caracterización de las huDCs se utilizaron los siguientes anticuerpos en diferentes combinaciones: APC-anti-CD11c, APC-anti-CD14, PE-anti-IL-12, PE-anti-HLA-DR, PerCP-CY5.5-anti-CD86, FITC-anti-CD1a, siguiendo los protocolos descritos previamente. Las muestras fueron adquiridas en los citómetros FACSCanto II y LSR Fortessa y los datos analizados utilizando el software FlowJo.

### 3.16 Análisis estadístico

El análisis de las diferencias múltiples entre grupos fue realizado por Análisis de Varianza (ANOVA). Como post-test se utilizó la prueba de Comparaciones Múltiples Student-Newman Keuls. Las comparaciones entre dos grupos fueron analizadas usando la prueba t de Student para muestras no apareadas.

Las pruebas estadísticas fueron realizadas con la utilización del software Prism 6.0 (GraphPad 588 Software, USA). Valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos. Todos los experimentos fueron realizados al menos por triplicado.

---

## 4. RESULTADOS I

---

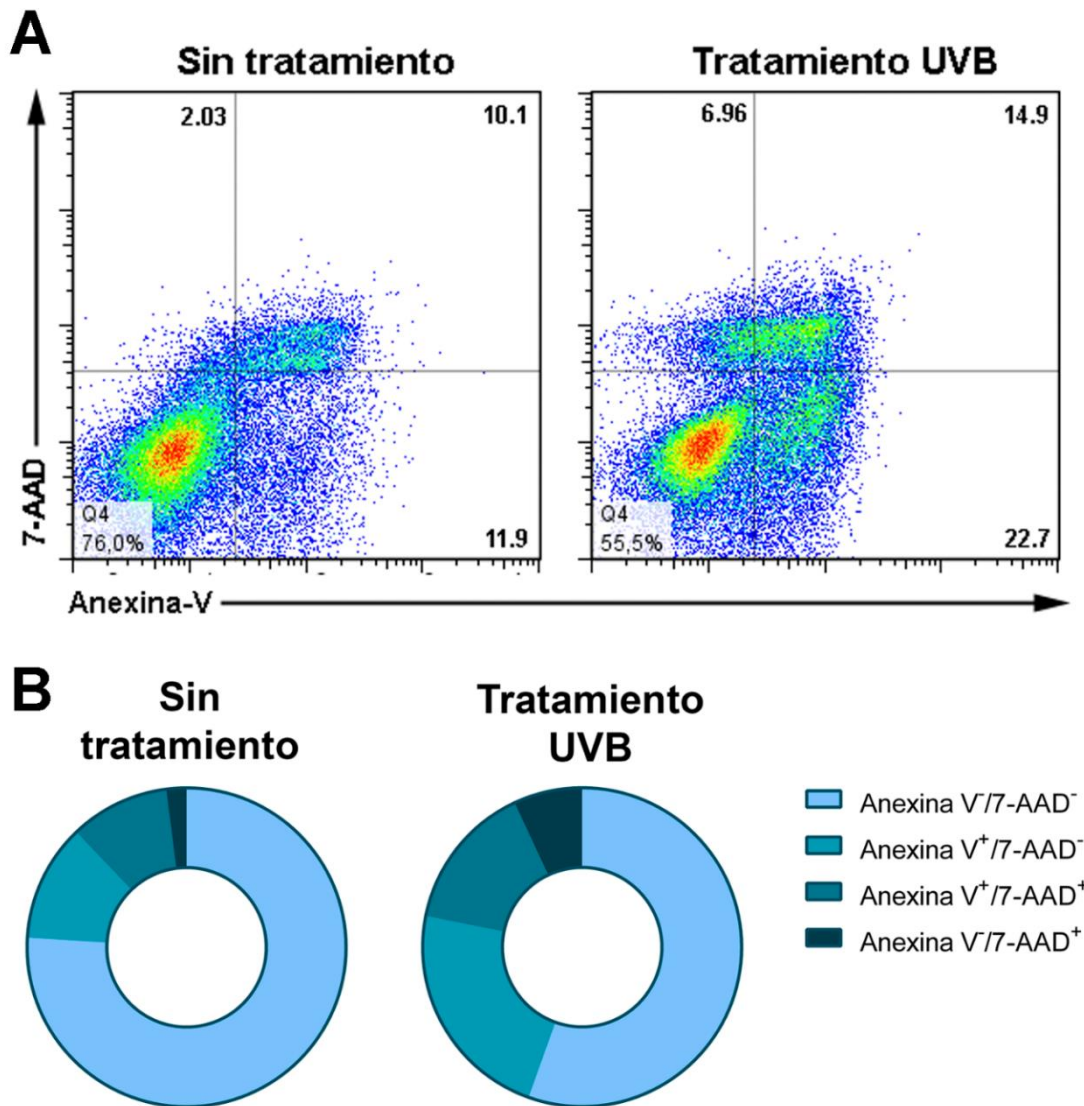
*- Desarrollo de una estrategia de vacunación para el tratamiento antitumoral basada en la manipulación de DCs estimuladas con T3 en presencia de un Ag tumoral.*

### 4.1 Evaluación de la respuesta de DCs estimuladas con T3 frente a Ags tumorales.

#### 4.1.a La irradiación con luz UVB induce la muerte celular de las células tumorales MC38.

Considerando el interés actual en la investigación de procedimientos alternativos de maduración de las DCs utilizados en inmunoterapia y los hallazgos relevantes ya obtenidos por el tratamiento antitumoral a base de DCs tratadas con T3 en un modelo de melanoma en ratón, se propuso reproducir la terapia en un modelo tumoral de alta prevalencia y agresividad como el cáncer de colon. A fin de dar inicio al desarrollo de la vacunación antitumoral basada en DCs estimuladas con T3, se realizaron estudios en cultivo utilizando la línea celular MC38 derivada de adenocarcinoma de colon murino. En primer lugar, con el propósito de generar una respuesta inmune eficiente frente a múltiples Ags expresados por las propias células tumorales, se buscó incrementar la inmunogenicidad de estas células. Entre las diferentes modalidades de tratamiento capaces de potenciar la inmunogenicidad en el contexto de las vacunas de DCs, se considera a la irradiación UV por su capacidad inductora de muerte celular.<sup>130</sup> En tal sentido, las células MC38 adherentes a un 70% de confluencia fueron irradiadas con luz UVB por 5 minutos, y posteriormente cultivadas en medio de crecimiento por 24 horas. Pasado ese tiempo se procedió a marcar las células MC38 con Anexina-V y 7-AAD y posterior análisis por citometría de flujo con el fin de evaluar el porcentaje de muerte celular obtenido. Como se observa en la **Figura 12 A** luego de la irradiación UVB, el porcentaje de células en apoptosis temprana (Anexina V<sup>+</sup>/7-AAD<sup>-</sup>), apoptosis tardía (Anexina V<sup>+</sup>/7-AAD<sup>+</sup>) y necrosis (Anexina V<sup>-</sup>/7-AAD<sup>+</sup>) incrementó un 10,8%, 4,8% y 4,9%,

respectivamente. Estos resultados corroboran el efecto inductor de muerte celular de la irradiación UVB en las condiciones mencionadas, alcanzando aproximadamente la muerte en un 45% de células MC38 (MC38-Apo/Nec).

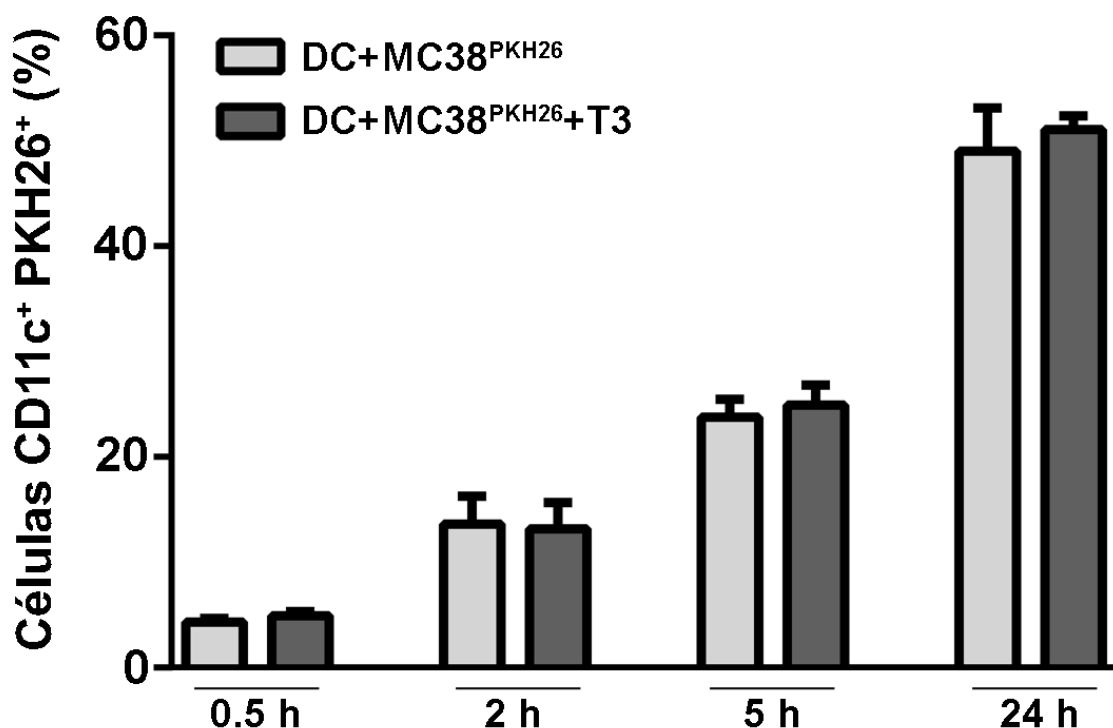


**Figura 12. Inducción de muerte en células MC38 mediante irradiación con luz UVB.**

Las células tumorales MC38 se sometieron a irradiación con luz UVB por 5 minutos para inducir apoptosis o se mantuvieron no irradiadas (Sin tratamiento). Luego de 24 horas, se analizó la muerte celular mediante el ensayo de Anexina-V/7-AAD. **(A)** Dot plots representativos del análisis por citometría de flujo: las células viables se localizan en el cuadrante Anexina V<sup>-</sup>/7-AAD<sup>-</sup>, las células apoptóticas en fase temprana y en fase tardía se encuentran en los cuadrantes Anexina V<sup>+</sup>/7-AAD<sup>-</sup> y Anexina V<sup>+</sup>/7-AAD<sup>+</sup>, respectivamente; mientras que las células necróticas se ubican en el cuadrante Anexina V<sup>-</sup>/7-AAD<sup>+</sup>. **(B)** Gráfico de torta representando la frecuencia de células MC38 viables, apoptóticas y necróticas en el cultivo sin tratamiento y posterior a la irradiación con luz UVB.

#### **4.1.b Las iDCs y las DCs estimuladas con T3 captan Ags provenientes de las células tumorales MC38.**

Es importante considerar que el procedimiento por el cual la DC capta los AATs es un parámetro fundamental en la producción de las vacunas basadas en DCs, debido a que los procesos de fagocitosis de Ags, su procesamiento y presentación son necesarios en el inicio de la inmunidad celular antitumoral.<sup>213</sup> Por tal motivo, evaluamos la capacidad de las DCs derivadas de médula ósea de ratón de capturar Ags provenientes de las células MC38-Apo/Nec. Para ello, las células MC38-Apo/Nec fueron teñidas utilizando el colorante PKH26 y luego de múltiples lavados fueron co-cultivadas con las iDCs en una relación 1:3 (MC38-Apo/Nec:DC) en presencia o ausencia de T3 (10 nM) por diferentes tiempos. A continuación, se procedió a marcar a las DCs con un anticuerpo anti-CD11c, evidenciando la captación de Ags derivados de las células MC38-Apo/Nec por citometría de flujo, documentadas como células doble positivas (CD11c<sup>+</sup> PKH26<sup>+</sup>). En la **Figura 13** se puede observar que no hubo una diferencia significativa en la captación antigénica por parte de las DCs controles y estimuladas con la hormona en los tiempos evaluados. Además, mientras aumenta el tiempo de exposición de las DCs a los Ags tumorales se evidencia un incremento en el porcentaje de DCs positivas para PKH26, alcanzando aproximadamente un 50% de las DCs que han incorporado las células MC38-Apo/Nec y/o restos celulares a las 24 horas en ambas condiciones.



**Figura 13. Captación de Ags tumorales proveniente de células MC38-Apo/Nec.**

Las células tumorales MC38 previamente irradiadas con luz UVB fueron teñidas con PKH26 y luego co-cultivadas con iDCs en ausencia o presencia de T3 (10 nM) en una relación 1:3 (MC38-Apo/Nec:DC), por diferentes tiempos (0,5; 2; 5 y 24 horas). Posteriormente, las células fueron marcadas con un anticuerpo APC-anti-CD11c y analizadas por citometría de flujo. Las DCs que captaron células MC38-Apo/Nec se definen como células doble positivas (CD11c<sup>+</sup> PKH26<sup>+</sup>). Los datos se expresan como media  $\pm$  DE y corresponden a un experimento representativo de un total de tres con resultados similares.

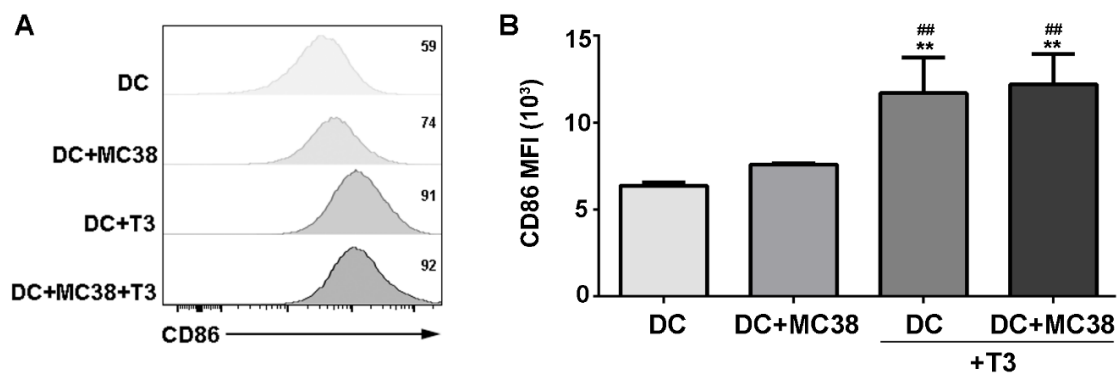
## 4.2 Efectos de las DCs estimuladas con T3 expuestas a Ags tumorales sobre el balance de la respuesta inmune.

### 4.2.a Las DCs estimuladas con T3 y en presencia de Ags tumorales, revelan una mayor expresión del marcador de maduración CD86.

Teniendo en cuenta que la captación de los Ags por las DCs, así como las señales recibidas de su entorno inmediato, inducen cambios fenotípicos, evaluamos en primer lugar la capacidad de T3 de favorecer la maduración de las DCs en presencia de los Ags tumorales. Con este fin, las iDCs fueron co-cultivadas con células MC38-Apo/Nec en ausencia (DC+MC38) o presencia de T3 (DC+MC38+T3) por 18 horas. En paralelo como control, las iDCs se cultivaron en condiciones basales (DC) y estimuladas con T3 (DC+T3),

sin estar expuestas a Ags tumorales debido a que estudios previos del grupo demuestran la capacidad de T3 de inducir la maduración de las DCs.<sup>185 188</sup> Luego de las 18 horas de tratamiento, se evaluó la expresión del marcador de superficie CD86 por citometría de flujo.

En concordancia con los resultados previos, T3 indujo la maduración de las DCs, evidenciada por el aumento de la expresión de CD86 (**Figura 14**). De modo similar, T3 incrementó el porcentaje de DCs que expresan CD86 en presencia de las células MC38-Apo/Nec como Ags tumorales [**Figura 14 A**: 92% (DC+MC38+T3) vs 74% (DC+MC38)]. Además, se registró un aumento significativo en la Intensidad de Fluorescencia Media (MFI) de CD86 en las DCs expuestas a T3 en presencia de los AATs [**Figura 14 B**:  $12211 \pm 1739$  (DC+MC38+T3) vs  $7583 \pm 79$  (DC+MC38)].



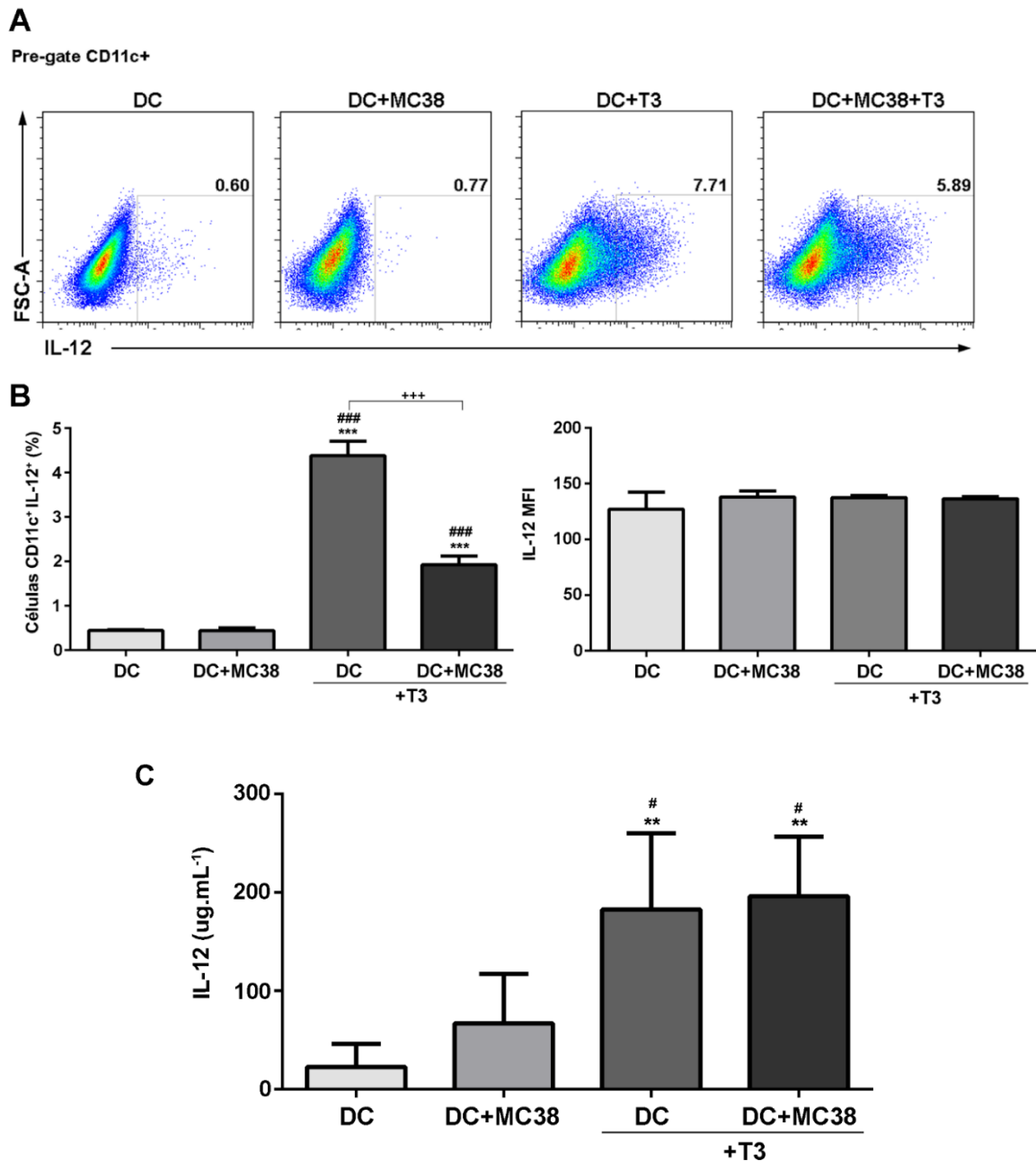
**Figura 14. Efecto de T3 sobre el fenotipo de las DCs cargadas con Ags tumorales.**

Las iDCs fueron co-cultivadas con células tumorales MC38-Apo/Nec (DC+MC38) en presencia o ausencia de T3 (10 nM) en una relación 3:1 (DC:MC38-Apo/Nec) por 18 horas. Como control, las iDCs se cultivaron en condiciones basales (DC) y estimuladas con T3. Las células fueron marcadas utilizando los anticuerpos APC-anti-CD11c y PE.Cy7-anti-CD86 y posteriormente la expresión de CD86 se analizó en la población de células CD11c<sup>+</sup> por citometría de flujo. (A) Histogramas representativos de la expresión de CD86 en las DCs frente a los distintos tratamientos. Los números en el margen derecho representan la media de los porcentajes de células CD11c<sup>+</sup> CD86<sup>+</sup> de tres experimentos independientes. (B) Análisis comparativo de la intensidad de fluorescencia media (MFI) de CD86 en la población de células CD11c<sup>+</sup>. Los datos se expresan como media  $\pm$  DE y corresponden a un experimento representativo de un total de tres con resultados similares, \*\* $p < 0.01$  vs DC control, ### $p < 0.01$  vs DC+MC38. ANOVA, Student-Newman-Keuls.

#### **4.2.b T3 favorece la producción de IL-12, IL-6 y TGF- $\beta$ en DCs expuestas a Ags tumorales.**

Para investigar si la maduración fenotípica favorecida por T3 en DCs expuestas a Ags tumorales se asocia con cambios funcionales, se analizó la capacidad de esta hormona de modular el perfil de citoquinas producidas por las DCs en presencia de Ags tumorales. En lo que respecta al perfil de citoquinas producidas por las DCs estimuladas con T3, resultados previos indican que niveles fisiológicos de T3 incrementan la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-12, IL-6, TGF- $\beta$  e IL-23.<sup>185 193</sup> En virtud de estos hallazgos y considerando que estas citoquinas son esenciales para direccionar una respuesta Th1<sup>91</sup> y Th17,<sup>103</sup> se analizó la producción y secreción de las citoquinas IL-12, IL-6 y TGF- $\beta$  en DCs tratadas con T3 en presencia de las células MC38-Apo/Nec en las condiciones experimentales descritas precedentemente (apartado 4.2.a).

En primer lugar, se muestran los resultados de citometría de flujo correspondientes a la determinación de IL-12 producida por las DCs en las diferentes condiciones (**Figura 15 A-B**). Como ha sido demostrado previamente,<sup>185 187</sup> el tratamiento de las DCs con T3 (DC+T3) indujo un incremento del porcentaje de células CD11c<sup>+</sup> IL-12<sup>+</sup>. En efecto, las DCs cargadas con AATs y expuestas a T3 (DC+MC38+T3) mostraron un aumento significativo en la frecuencia de DCs (CD11c<sup>+</sup>) productoras de IL-12 (**Figura 15 A-B: panel izquierdo**) pero sin cambios en la MFI de IL-12 (**Figura 15 B: panel derecho**), respecto a las condiciones controles (DC+MC38). En base a estos resultados, evaluamos si la liberación de IL-12 al medio de cultivo también se modificaba por el tratamiento con la hormona mediante la técnica de ELISA. Como se observa en la **Figura 15 C**, la concentración de IL-12 en el sobrenadante de DCs cultivadas con Ags tumorales estimuladas con T3 resultó mayor que en el medio de cultivo de DCs en presencia de las células MC38-Apo/Nec y ausencia de la hormona. Notablemente, las DCs maduras con T3 secretaron niveles similares de IL-12 al sobrenadante cuando se cultivaron solas o se enfrentaron a las células MC38-Apo/Nec.



**Figura 15. Efecto de T3 sobre la producción de IL-12 por las DCs cargadas con Ags tumorales.**

Las iDCs fueron co-cultivadas con células MC38-Apo/Nec (DC+MC38) y maduras con T3 (10 nM) en una relación 3:1 (DC:MC38-Apo/Nec) durante 18 horas. Como control, las iDCs se cultivaron en condiciones basales (DC) y estimuladas con T3. Las células se incubaron con Brefeldina A y Monensina durante las últimas 4 horas de cultivo para la tinción intracitoplásmica. Posteriormente se marcaron utilizando los anticuerpos APC-anti-CD11c y PE-anti-IL-12, y se analizó la producción de IL-12 en la población CD11c<sup>+</sup> por citometría de flujo (A-B). (A) Dot plots representativos de la producción de IL-12 en la población de células CD11c<sup>+</sup> seleccionada. (B) Análisis comparativo del porcentaje de células CD11c<sup>+</sup> IL-12<sup>+</sup> (panel izquierdo) y de la intensidad de fluorescencia media (MFI) de IL-12 en la población de células CD11c<sup>+</sup> (panel derecho). (C) La concentración de IL-12 se determinó en el sobrenadante de cultivo mediante ensayos de ELISA. Los datos se expresan como media  $\pm$  DE y corresponde a un experimento representativo de un total de tres con resultados similares, \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs DC control, # $p < 0.05$  vs DC+MC38, ### $p < 0.001$  vs DC+MC38. ANOVA, Student-Newman-Keuls.



A continuación, se procedió al análisis de la producción de IL-6 y TGF- $\beta$ , consideradas las principales citoquinas involucradas en la polarización de la respuesta inmune hacia un perfil Th17.<sup>103</sup> De acuerdo con nuestros reportes previos,<sup>193</sup> observamos que T3 incrementa de forma significativa la frecuencia de DCs productoras de IL-6 y TGF- $\beta$  cuando las mismas no fueron incubadas con los Ags tumorales (**Figura 16**). Como se hipotetizaba, la estimulación con la hormona de las DCs co-cultivadas con las células MC38-Apo/Nec indujo un mayor porcentaje de células productoras de las citoquinas IL-6 (**Figura 16 A-B**) y TGF- $\beta$  (**Figura 16 C-D: panel derecho**), así como un aumento en la MFI de TGF- $\beta$  (**Figura 16 D: panel izquierdo**).

Sorpresivamente, el incremento en la frecuencia de células CD11c<sup>+</sup> productoras tanto de IL-12<sup>+</sup> como TGF- $\beta$ <sup>+</sup> fue mayor en las DCs tratadas con T3 (DC+T3) en comparación con las DCs co-cultivadas con las células MC38-Apo/Nec y estimuladas con la hormona (DC+MC38+T3). Este resultado podría deberse a que ciertas células tumorales pueden proporcionar citoquinas inmunoregulatorias durante el proceso de cultivo celular, induciendo en consecuencia un fenotipo más tolerogénico en las DCs.<sup>214</sup> Es de considerar además, que las células MC38-Apo/Nec utilizadas como AATs en nuestro diseño experimental corresponden a una mezcla mixta de células viables, apoptóticas en diferentes estadios y necróticas. En este contexto, la endocitosis de células en apoptosis temprana o tardía puede conducir a diferentes fenotipos de maduración y de funcionalidad de las DCs, aún en presencia de estímulos madurativos.<sup>215</sup>

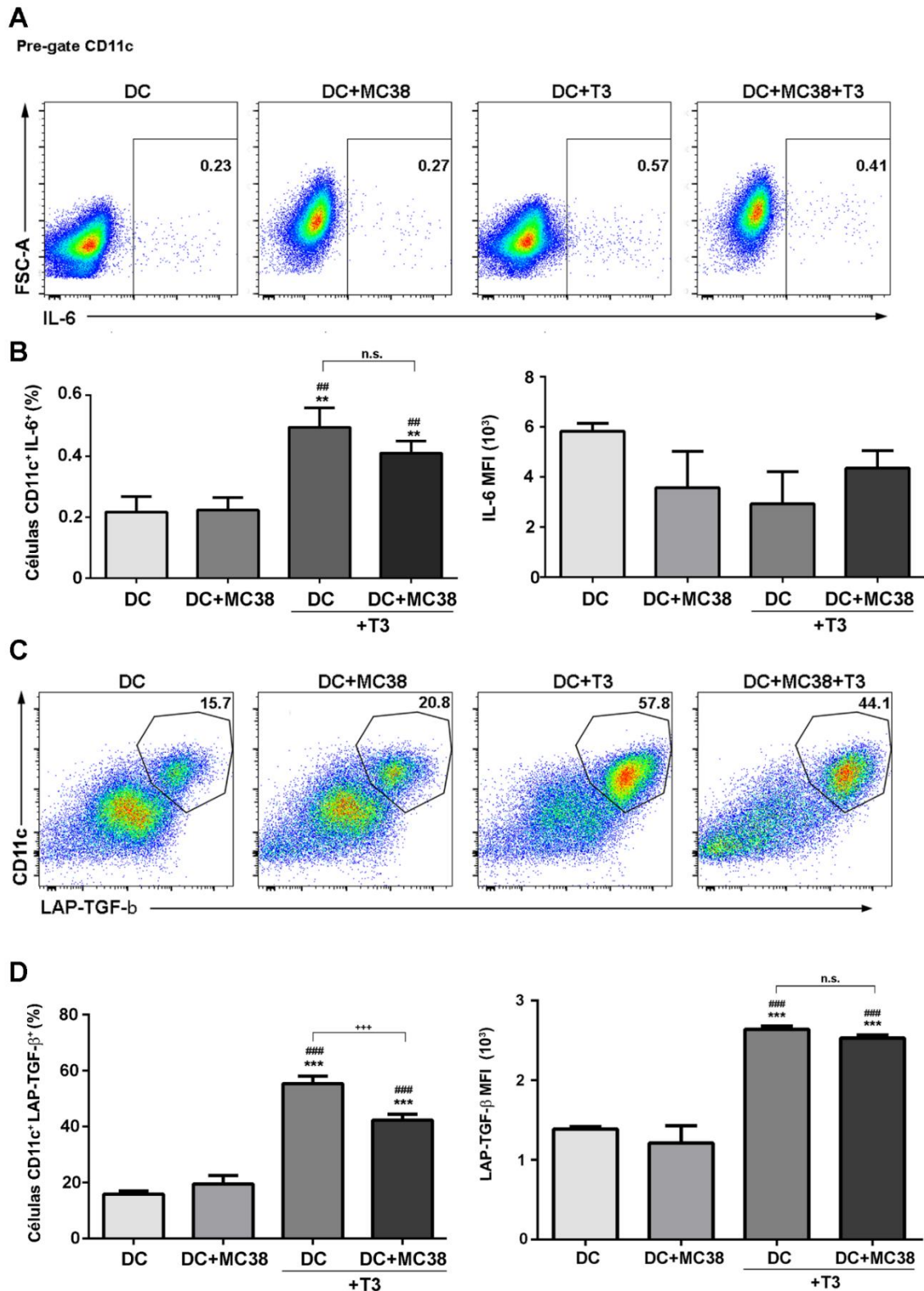


Figura 16. Perfil de citoquinas en DCs cargadas con Ags tumorales por la estimulación con T3.

Las iDCs fueron co-cultivadas con células MC38-Apo/Nec (DC+MC38) y maduras con T3 (10 nM) en una relación 3:1 (DC:MC38-Apo/Nec) durante 18 horas. Como control, las iDCs se cultivaron en condiciones basales (DC) y estimuladas con T3. Las células se incubaron con Brefeldina A y Monensina durante las últimas 4 horas de cultivo para la tinción intracitoplásmica. Luego, se marcaron utilizando los anticuerpos APC-anti-CD11c, Alexa Flúor488-anti-IL-6 y PE.Cy7-anti-LAG (pro-TGF-β), y se analizó la

producción de IL-6 y TGF- $\beta$  en la población CD11c<sup>+</sup> por citometría de flujo (A-D). (A) Dot plots representativos de la producción de IL-6 en la población de células CD11c<sup>+</sup> seleccionada. (B) Análisis comparativo del porcentaje de células CD11c<sup>+</sup> IL-6<sup>+</sup> (panel izquierdo) y de la intensidad de fluorescencia media (MFI) de IL-6 en la población de células CD11c<sup>+</sup> (panel derecho). (C) Dot plots representativos de la producción de TGF- $\beta$  en la población de células CD11c<sup>+</sup>. (D) Análisis comparativo del porcentaje de células CD11c<sup>+</sup> TGF- $\beta$ <sup>+</sup> (panel izquierdo) y de la MFI de TGF- $\beta$ <sup>+</sup> en la población de células CD11c<sup>+</sup> (panel derecho). Los datos se expresan como media  $\pm$  DE y corresponden a un experimento representativo de un total de tres con resultados similares, \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs DC control, ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$  vs DC+MC38. ANOVA, Student-Newman-Keuls.

*El conjunto de las evidencias experimentales in vitro indica que T3 tiene la capacidad de potenciar la maduración y funcionalidad de las DCs en presencia de Ags tumorales favoreciendo la producción de citoquinas proinflamatorias.*

### **4.3 Evaluación de la capacidad de las DCs maduras con T3 de estimular una respuesta inmune antitumoral *in vivo*.**

#### **4.3.a La vacunación con DCs estimuladas con T3 y cargadas con Ags propios del tumor induce una reducción del crecimiento tumoral.**

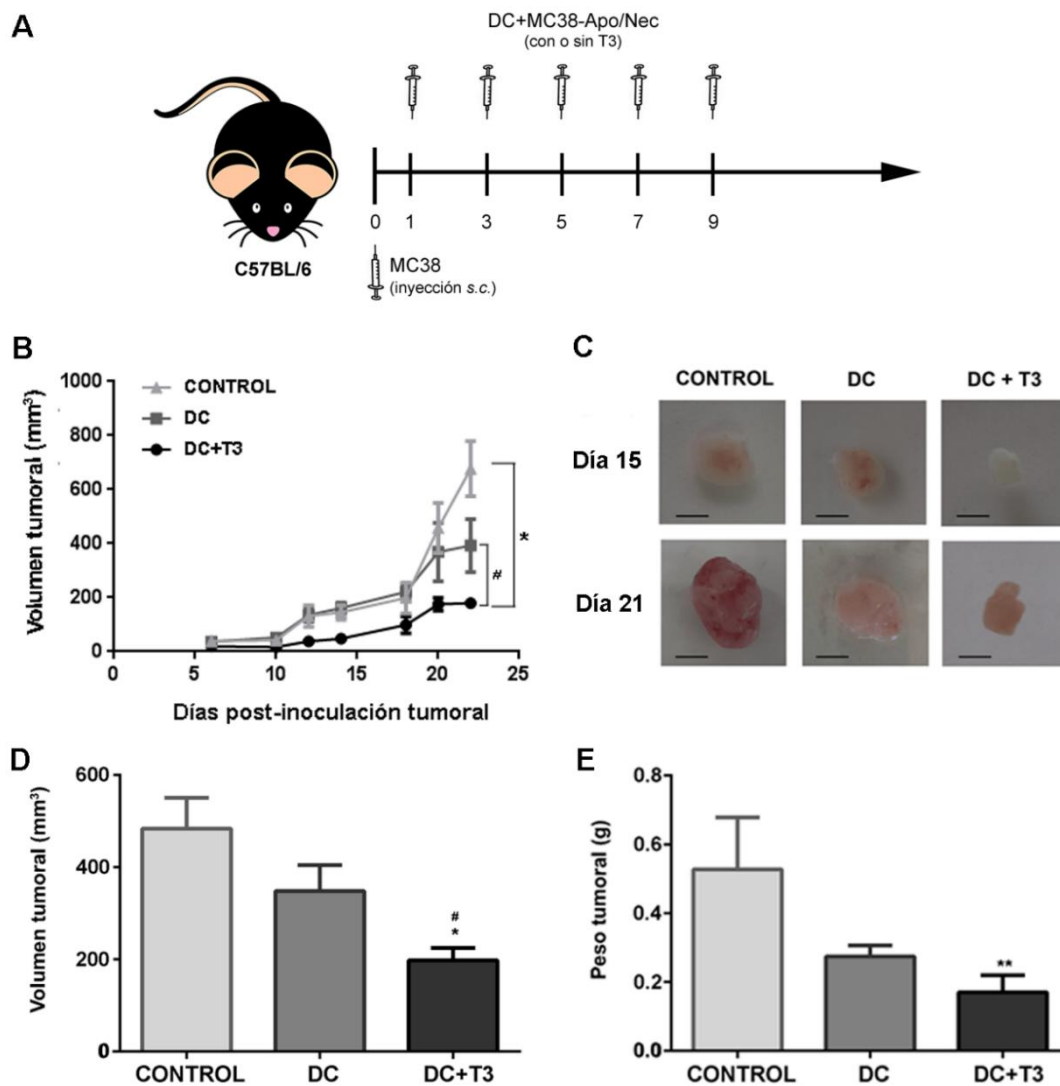
Como se mencionó anteriormente, resultados obtenidos por el grupo de investigación donde se realizó esta tesis doctoral asignan a T3 la habilidad de generar DCs capaces de migrar a los ganglios linfáticos y mediar una respuesta citotóxica específica de Ag, mejorando el potencial terapéutico de las vacunas de DCs en un modelo murino de melanoma.<sup>187 197</sup> Por su parte, en el presente trabajo de tesis se observó que las DCs estimuladas con T3 y expuestas a AATs adquieren una mayor maduración y capacidad funcional para generar una respuesta proinflamatoria. En virtud de estos hallazgos, nos propusimos evaluar el alcance de la terapia basada en DCs estimuladas con T3, como adyuvante, en otro modelo murino utilizando Ags propios asociados a tumor. Como fue explicado previamente, seleccionamos la irradiación con luz UVB como estrategia para potenciar la inmunogenicidad de las células MC38 que van a ser capturadas como Ags por las DCs.

Para cumplir este objetivo, se estableció un modelo tumoral de carcinoma de colon mediante la implantación s.c. de  $5 \times 10^5$  células MC38 en el flanco izquierdo de ratones C57BL/6 WT, considerado día 0 como se muestra en el esquema experimental

de la **Figura 17 A**. En paralelo, iDCs fueron co-cultivadas con las células MC38-Apo/Nec en ausencia o presencia de T3 por 18 horas como se describió en el apartado 4.1.b y en la sección de materiales y métodos. Posteriormente, los ratones fueron divididos aleatoriamente en tres grupos experimentales a los cuales se les administró: 1) Solución tampón (PBS), grupo CONTROL; 2) DCs co-cultivadas con células MC38-Apo/Nec (DC) y 3) DCs estimuladas con T3 en presencia de las células MC38-Apo/Nec (DC+T3). Cabe aclarar que en los diferentes grupos experimentales de los animales que recibieron la vacunación con DCs, se inyectaron  $2 \times 10^6$  DCs por vía s.c. en el flanco opuesto al tumor. Las inyecciones fueron administradas los días 1,3,5, 7 y 9 luego de la inoculación de las células tumorales.

El crecimiento del tumor fue monitoreado a partir del sexto día mediante la medición del volumen tumoral utilizando un calibre digital. Los resultados expuestos en la **Figura 17 B** evidencian que los ratones que recibieron la inmunización con DCs cargadas con Ags tumorales y estimuladas con T3 presentaron un retraso en la aparición del tumor y un volumen tumoral menor en la totalidad de los días evaluados en comparación con los animales pertenecientes a los grupos CONTROL y DC. Al respecto, el día 21 post-inyección de las células MC38, el volumen tumoral promedio alcanzado en los ratones que recibieron las DCs-Ags estimuladas con T3 (DC+T3) fue de  $197 \pm 27$  mm<sup>3</sup>, mientras que los volúmenes promedios de los tumores establecidos en los grupos CONTROL y DC fueron  $484 \pm 67$  mm<sup>3</sup> y  $348 \pm 56$  mm<sup>3</sup>, respectivamente (**Figura 17 D**). De acuerdo con los resultados respecto al tamaño tumoral, el peso de estos resultó significativamente menor en el grupo DC+T3 con un peso promedio de  $0,17 \pm 0,05$  g, en tanto que el peso promedio de los tumores en el grupo CONTROL fue de  $0,52 \pm 0,15$  g (**Figura 17 E**). En relación con la comparación del peso de los tumores alcanzados entre los animales que recibieron la vacunación con DCs, se obtuvo una tendencia a la disminución en los ratones que recibieron las DCs estimuladas con la hormona (DC+T3) respecto a los animales inyectados con las DCs sin estímulo (DC:  $0,27 \pm 0,03$  g), aunque sin alcanzar la significancia estadística. La **Figura 17 C** representa mediante fotografías

las diferencias en el tamaño de los tumores en los distintos grupos experimentales a los 15 y 21 días luego de la inoculación de las células MC38.



**Figura 17. Respuesta terapéutica de la vacunación con DCs estimuladas con T3 en el modelo de carcinoma de colon.**

(A) Esquema experimental del tratamiento del modelo de adenocarcinoma de colon MC38 mediante vacunaciones con DCs. Los ratones C57BL/6 WT fueron inyectados con las células MC38 ( $5 \times 10^5$ ) por vía s.c. en el flanco izquierdo (día 0). iDCs derivadas de médula ósea de ratón co-cultivadas previamente con células MC38-Apo/Nec (DC), o con MC38-Apo/Nec y T3 (10 nM, DC+T3) durante 18 horas, fueron administradas por vía s.c. en el flanco derecho de los animales los días 1, 3, 5, 7 y 9. Al grupo CONTROL se le inyectó PBS solamente. (B) Cinética del crecimiento tumoral. El volumen del tumor fue monitoreado cada 2-3 días utilizando un calibre digital y calculado usando la siguiente fórmula:  $V = (D \times d^2) / 2$ , donde V es el volumen ( $\text{mm}^3$ ), D es el diámetro mayor (mm) y d es el diámetro menor (mm). (C) Fotografías de los tumores a los 15 días (panel superior) y a los 21 días (panel inferior) post-inyección del tumor. Barra de escala: 5mm. (D) Volumen tumoral ( $\text{mm}^3$ ) de cada grupo experimental a los 21 días. (E) Peso del tumor (g) de cada grupo experimental a los 21 días. Los datos representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs DC control, # $p < 0.05$  vs DC+MC38. ANOVA, Student-Newman-Keuls.

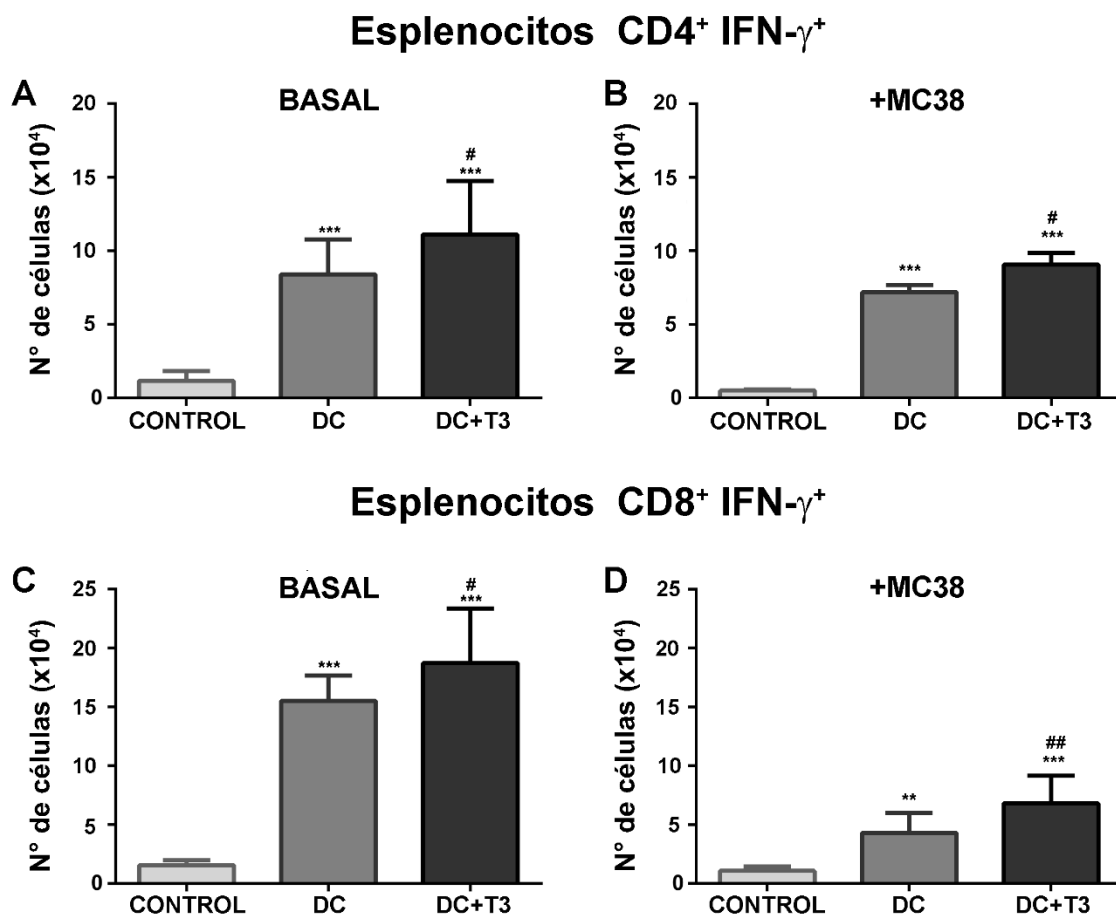
*Estos resultados sugieren que T3 proporciona a las DCs de una mayor capacidad inmunomoduladora, potenciando la eficacia terapéutica antitumoral de la inmunoterapia basada en DCs en presencia de Ags tumorales en el modelo de cáncer de colon.*

#### **4.3.b La vacunación con DCs estimuladas con T3 y cargadas con Ags asociados al tumor promueve la inducción de una respuesta antitumoral mediada por IFN- $\gamma$ .**

Respecto a los resultados obtenidos en función de la generación de respuestas citotóxicas, Th1 y Th17 en esplenocitos cultivados con DCs maduras con T3;<sup>187 193</sup> y considerando la capacidad de las DCs estimuladas con esta hormona en presencia de Ags específicos de tumor de reducir el tamaño tumoral observada en la presente tesis doctoral, decidimos investigar la respuesta inmune generada por la inmunoterapia en el modelo de cáncer de colon. Con este propósito, se extirparon los bazo y los ganglios linfáticos drenantes del tumor a los 15 días después de la implantación de las células tumorales. Luego de la disgregación de los órganos y de la purificación de las células, los esplenocitos y células de los ganglios fueron cultivados *ex vivo* en condiciones sin estímulo (BASAL) y estimuladas con lisados de las células MC38 (+MC38) por 72 horas.

En primer lugar, analizamos la producción de la citoquina efectora IFN- $\gamma$  en las poblaciones de linfocitos T CD4 y CD8 esplénicas por citometría de flujo (**Figura 18**). Como muestra la **Figura 18 A y B**, se registró un aumento en el número de células CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, que corresponden a linfocitos Th1, en la población de esplenocitos aislados de los ratones que recibieron la inmunoterapia en comparación con los obtenidos de animales controles. Notablemente, la vacunación con DCs-MC38-Apo/Nec maduras con T3 (DC+T3) indujo un incremento significativo en el número de linfocitos T CD4 productores de IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> respecto a la terapia con DCs-MC38-Apo/Nec (DC), tanto en la condición BASAL (**Figura 18 A**) como en presencia de los lisados de células MC38 (+MC38) (**Figura 18 B**). De modo similar, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$  (LTCs) incrementaron de forma significativa en los grupos DC y DC+T3 con relación al grupo CONTROL, en ambas condiciones evaluadas (**Figura 18 C y D**). No obstante, el aumento

en el número de LTCs dentro de la población de esplenocitos resultó más evidente en los animales que recibieron inmunizaciones con DCs cargadas con Ags tumorales estimuladas con T3 (DC+T3) que en los ratones que recibieron DCs expuestas únicamente a los Ags (DC).

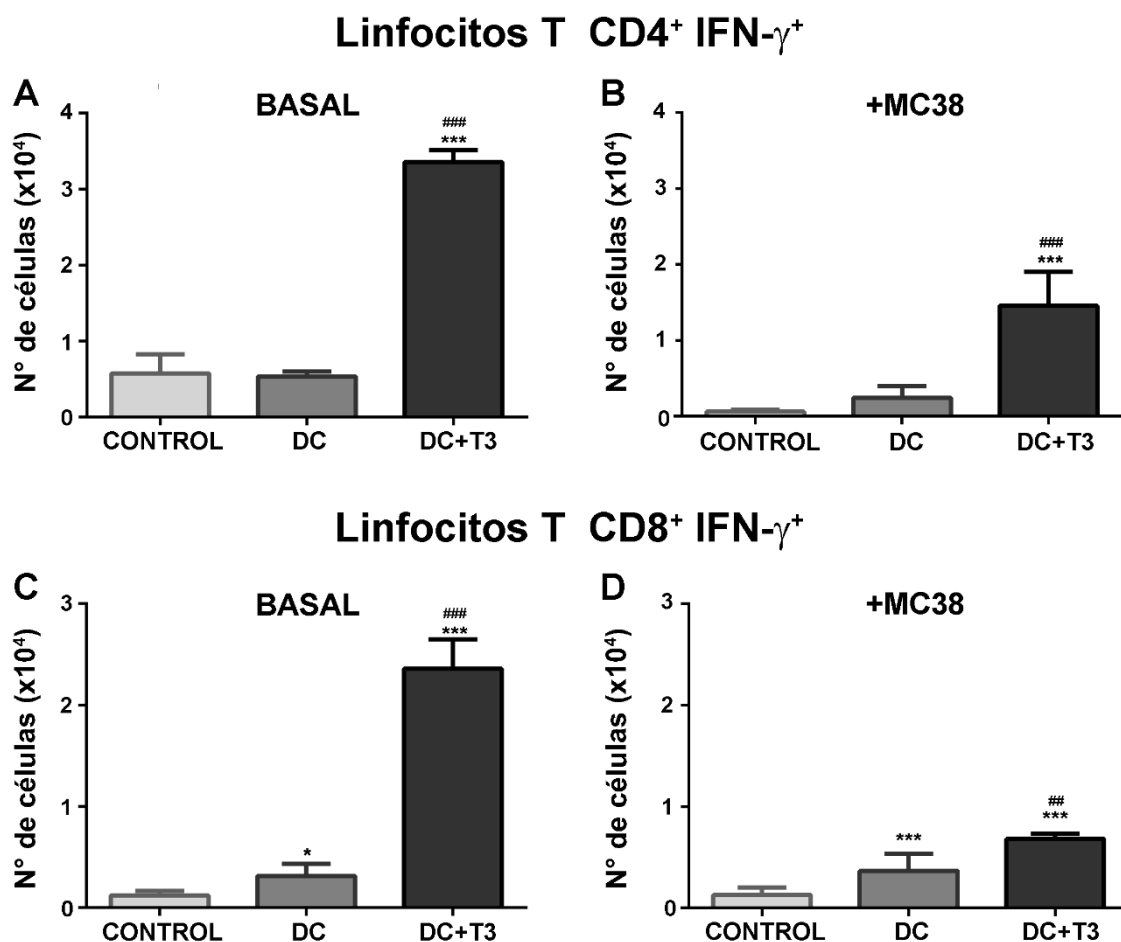


**Figura 18. Estudio de las poblaciones linfocitarias productoras de IFN- $\gamma$  en bazo inducidas por la inmunoterapia basada en DCs estimuladas con T3 en presencia de AATs**

El esquema experimental en los ratones fue similar al descrito en la Figura 17 A. Los ratones fueron sacrificados en el día 15 y se les extirpó el bazo. Los esplenocitos purificados fueron cultivados *ex vivo* en condiciones sin estímulo (BASAL) o incubados con lisados de las células MC38 (+MC38) durante 72 horas. En la población de esplenocitos se determinó la frecuencia de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> que producen IFN- $\gamma$  mediante la marcación de las moléculas de superficie CD4 y CD8 e IFN- $\gamma$  intracelular y analizadas por citometría de flujo. (A-B) Los números de células representados en los gráficos de barras corresponden al número total de linfocitos CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> en condiciones basales (A) y estimuladas con lisados celulares (B). Los números de células representados en los gráficos de barras corresponden al número total de linfocitos CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> en condiciones basales (C) y estimuladas con lisados celulares (D). Los resultados se expresan como media  $\pm$  DE y corresponden a un experimento representativo de un total de tres con resultados similares (n=5). \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001 vs CONTROL; # $p$ <0.05, ## $p$ <0.01 vs DC. ANOVA, Student-Newman-Keuls.

En segundo lugar, examinamos posibles cambios en la población de linfocitos T Th1 y LTCs de los ganglios linfáticos drenantes del tumor provenientes de los diferentes grupos experimentales (**Figura 19**). A diferencia de lo observado en esplenocitos en relación con la población Th1, no se evidenciaron diferencias significativas en el número de células CD4<sup>+</sup> productoras de IFN- $\gamma$  dentro de los linfocitos obtenidos de los ganglios linfáticos tanto de los ratones que recibieron vehículo (CONTROL), como de los que fueron inmunizados con DCs incubadas con MC38-Apo/Nec (DC), ya sea en condiciones basales como en los cultivos pulsados con lisados de MC38 (**Figura 19 A y B**). Es importante señalar que, por el contrario, la población CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> en ganglio del grupo DC+T3 resultó 9,3 y 5,8 veces mayor en comparación con los grupos CONTROL y DC en condiciones basales (sin re-estímulo), respectivamente (**Figura 19 A**). Al respecto, el incremento observado en los linfocitos CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> provenientes de los ganglios de animales DC+T3 fue de 23,1 veces respecto al CONTROL y 5,9 veces comparado con el grupo DC luego del re-estímulo Ag específico (**Figura 19 B**). Los resultados obtenidos concerniente a los LTCs en condiciones basales y pulsados con lisados, demostraron un aumento en el número de linfocitos T CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> en los ganglios aislados de los ratones luego de la vacunación con DCs-MC38-Apo/Nec maduradas con T3 respecto a los grupos CONTROL y DC (**Figura 19 C y D**).





**Figura 19.** Estudio de las poblaciones linfocitarias productoras de IFN- $\gamma$  en ganglio drenante del tumor inducidas por la inmunoterapia basada en DCs estimuladas con T3 en presencia de AATs.

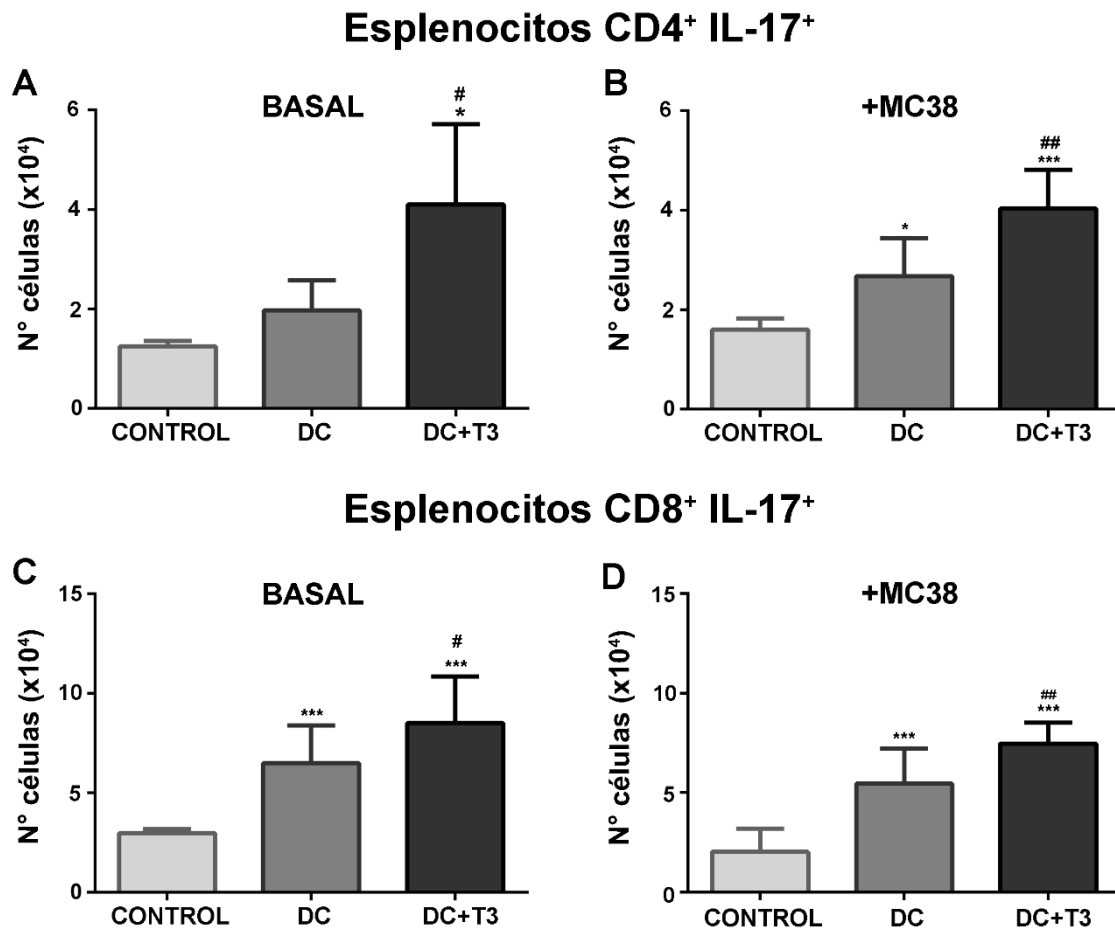
El esquema experimental en los ratones fue similar al descrito en la Figura 17 A. Los ratones fueron sacrificados en el día 15 y se les extirpó el ganglio drenante del tumor. Los linfocitos purificados fueron cultivados *ex vivo* en condiciones sin estímulo (BASAL) o incubados con lisados de las células MC38 (+MC38) durante 72 horas. La frecuencia de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> productoras de IFN- $\gamma$  se determinó mediante la marcación de las moléculas de superficie CD4 y CD8 e IFN- $\gamma$  intracelular y analizadas por citometría de flujo. (A-B) Los números de células representados en los gráficos de barras corresponden al número total de células CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> en condiciones basales (A) y estimuladas con lisados celulares (B). Los números de células representados en los gráficos de barras corresponden al número total de linfocitos CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> en condiciones basales (C) y estimuladas con lisados celulares (D). Los resultados se expresan como media  $\pm$  DE y corresponden a un experimento representativo de un total de tres con resultados similares (n=5). \* $p$ <0.05, \*\*\* $p$ <0.001 vs CONTROL; ## $p$ <0.01, ### $p$ <0.001 vs DC. ANOVA, Student-Newman-Keuls.

*Estos resultados indican que la vacunación con DCs estimuladas con T3 en presencia de Ags propios del tumor, genera una mayor respuesta de células T helper y citotóxicas productoras de IFN- $\gamma$  potenciando una inmunidad protectora eficaz en el modelo de cáncer de colon estudiado.*

#### **4.3.c T3 aumenta la capacidad de las DCs utilizadas como inmunoterapia antitumoral de polarizar la respuesta inmune hacia un perfil productor de IL-17.**

En base a nuestros resultados previos donde se pudo constatar que el tratamiento con T3 induce la secreción de citoquinas como IL-6, IL-1 $\beta$  y TGF- $\beta$  por las DCs, proporcionando una mayor capacidad de polarizar la respuesta inmune hacia un perfil enriquecido en la producción de IL-17,<sup>193</sup> especulamos que la inducción de una respuesta dependiente de IL-17 esté involucrada en el efecto terapéutico en nuestro modelo tumoral. A los fines de evaluar esta hipótesis, se analizaron los linfocitos T CD4 y CD8 capaces de producir IL-17 en la población celular del bazo y de los ganglios linfáticos drenantes del tumor, por citometría de flujo.

Como resultado del análisis, se demostró un incremento significativo en el número de células CD4<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> (Th17) en los esplenocitos de ratones inmunizados con DCs co-cultivadas con células MC38-Apo/Nec y estimuladas con T3 (DC+T3) en comparación con los grupos CONTROL y DC, tanto en condiciones basales (**Figura 20 A**) como luego del re-estímulo con el lisado de células MC38 (**Figura 20 B**). Posteriormente, se evaluó la cantidad de células CD8<sup>+</sup> productoras de IL-17, conocidas como células T citotóxicas 17 (Tc17),<sup>216</sup> generadas luego de la inmunización en el bazo de los animales portadores de tumor. Al igual que lo observado para las células Th17, los animales que recibieron la vacunación con DCs-MC38-Apo/Nec maduras con T3 presentaron un número significativamente mayor de células Tc17 respecto a los ratones inyectados con vehículo o con DCs-MC38-Apo/Nec (**Figura 20 C y D**). En este sentido, el efecto en el número de esplenocitos totales Tc17 inducido por las DCs en presencia de Ags y T3 se evidenció no solo en condiciones basales (**Figura 20 C**), sino también luego del re-estímulo con el lisado tumoral (**Figura 20 D**).



**Figura 20. Estudio de las poblaciones linfocitarias productoras de IL-17 en bazo inducidas por la inmunoterapia basada en DCs estimuladas con T3 en presencia de AATs.**

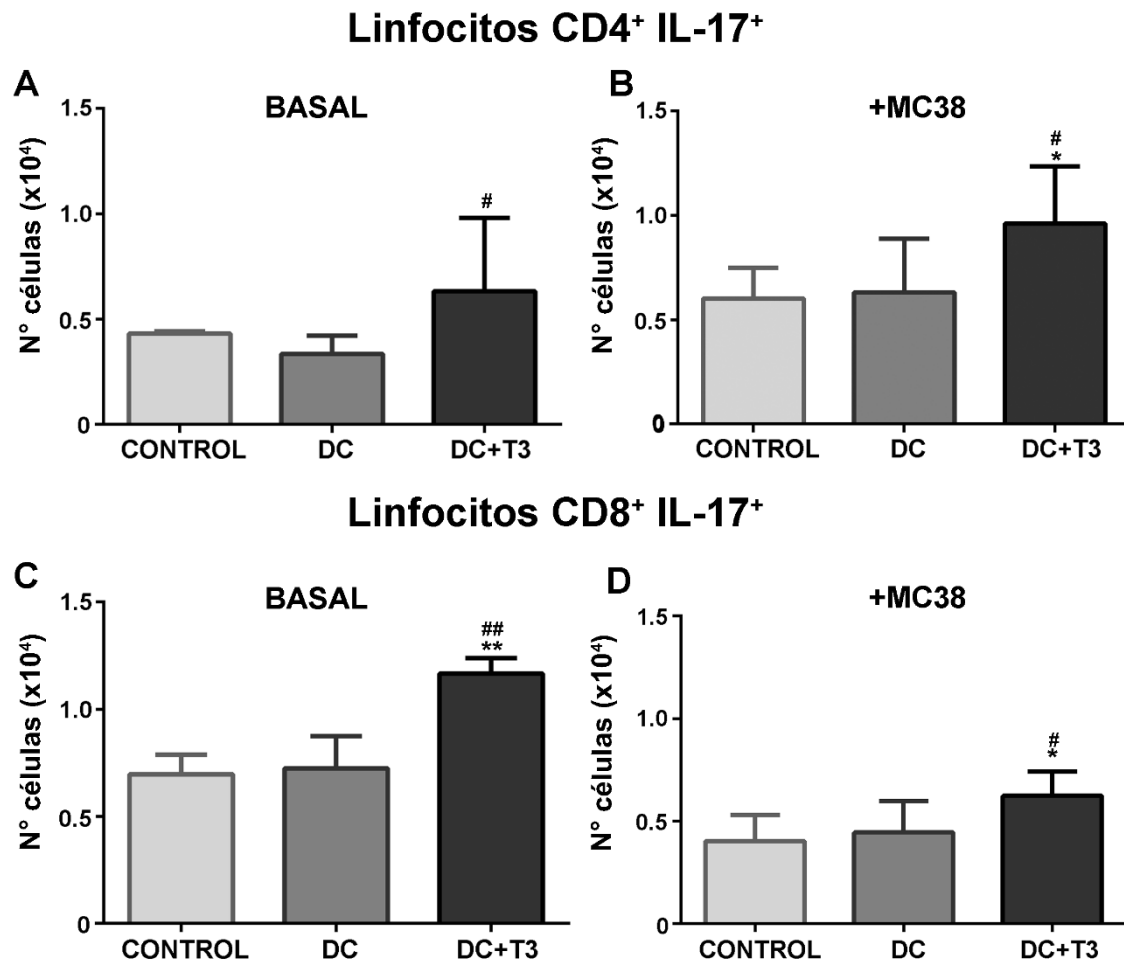
El esquema experimental en los ratones fue similar al descrito en la Figura 17 A. Los ratones fueron sacrificados en el día 15 y se les extirpó el bazo. Los esplenocitos purificados fueron cultivados *ex vivo* en condiciones sin estímulo (BASAL) o incubados con lisados de las células MC38 (+MC38) durante 72 horas. En la población de esplenocitos se determinó la frecuencia de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> que producen IL-17 mediante la marcación de las moléculas de superficie CD4 y CD8 e IL-17 intracelular, analizadas por citometría de flujo. (A-B) Los números de células representados en los gráficos de barras corresponden al número total de linfocitos CD4<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> (Th17) en condiciones basales (A) y estimuladas con lisados celulares (B). Los números de células representados en los gráficos de barras corresponden al número total de linfocitos CD8<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> (Tc17) en condiciones basales (C) y estimuladas con lisados celulares (D). Los resultados se expresan como media  $\pm$  DE y corresponden a un experimento representativo de un total de tres con resultados similares (n=5). \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs CONTROL; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  vs DC. ANOVA, Student-Newman-Keuls.

Además, examinamos la población de linfocitos Th17 (CD4<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup>) y Tc17 (CD8<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup>) en los ganglios linfáticos drenantes del tumor de los distintos grupos experimentales. Como se observa en la **Figura 21**, no se evidenciaron diferencias significativas en el número de células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> productoras de IL-17 en los ganglios

linfáticos entre los ratones del grupo CONTROL y los que fueron inmunizados con DCs incubadas con MC38-Apo/Nec (DC), ya sea en condiciones basales como en los cultivos pulsados con lisados de MC38. Sin embargo, la vacunación con DCs pulsadas con células MC38-Apo/Nec y estimuladas con T3 indujo un aumento significativo en la población de células CD4<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup>, respecto a la inmunoterapia con DCs-MC38-Apo/Nec sin estímulo hormonal (**Figura 21 A-B**). De manera similar, al evaluar el número de células Tc17 (CD8<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup>) demostramos una diferencia significativa en el grupo DC+T3 con respecto a los otros dos grupos experimentales, en condiciones basales y con el re-estímulo del lisado tumoral (**Figura 21 C y D**).

Cabe destacar que el notable incremento en los linfocitos productores de IL-17 evaluados en los ganglios drenantes del tumor fue evidenciado únicamente en las células aisladas de los animales portadores del tumor que recibieron la inmunoterapia basada en DCs cargadas con células MC38-Apo/Nec, y estimuladas con T3.

Es importante señalar además que el número total de células inmunes en las diferentes poblaciones analizadas es menor en presencia de los lisados celulares en comparación con las condiciones basales. Como ha sido descrito, los esplenocitos y linfocitos derivados del ganglio drenante del tumor fueron re-estimulados por 3 días en cultivo con lisados totales de las células tumorales MC38. La lisis de estas células se realizó por ciclos sucesivos de congelamiento-descongelamiento dando como resultado una mezcla que contiene múltiples Ags y diferentes sustancias que podrían ser inhibitorias. Por tal motivo, los lisados tumorales presentan un efecto dual ya que poseen la capacidad de inducir la activación de las células inmunes por los Ags, pero también inmunosupresión y apoptosis de linfocitos.<sup>217</sup> Se puede inferir entonces que la presencia de componentes inhibitorios de la activación de las células inmunes en el lisado total de las células MC38, podrían ser responsables de la menor detección de células activadas respecto a las condiciones basales en las diferentes poblaciones analizadas.



**Figura 21.** Estudio de las poblaciones linfocitarias productoras de IL-17 en el ganglio drenante del tumor inducidas por la inmunoterapia basada en DCs estimuladas con T3 en presencia de AATs.

El esquema experimental en los ratones fue similar al descrito en la Figura 17 A. Los ratones fueron sacrificados en el día 15 y se les extirpó el ganglio drenante del tumor. Los linfocitos purificados fueron cultivados *ex vivo* en condiciones sin estímulo (BASAL) o incubados con lisados de las células MC38 (+MC38) durante 72 horas. La frecuencia de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> productoras de IL-17 se determinó mediante la marcación de las moléculas de superficie CD4 y CD8 e IL-17 intracelular, analizadas por citometría de flujo. (A-B) Los números de células representados en los gráficos de barras corresponden al número total de células CD4<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> (Th17) en condiciones basales (A) y estimuladas con lisados celulares (B). Los números de células representados en los gráficos de barras corresponden al número total de linfocitos CD8<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> (Tc17) en condiciones basales (C) y estimuladas con lisados celulares (D). Los resultados se expresan como media  $\pm$  DE y corresponden a un experimento representativo de un total de tres con resultados similares (n=5). \* $p$ <0.05 \*\* $p$ <0.01 vs CONTROL; # $p$ <0.05, ## $p$ <0.01 vs DC. ANOVA, Student-Newman-Keuls.

*Los resultados demuestran que T3 confiere a las DCs la capacidad de generar una mayor respuesta de células T helper y citotóxicas productoras de IL-17 favoreciendo el desarrollo de una inmunidad proinflamatoria en el modelo de cáncer de colon estudiado.*

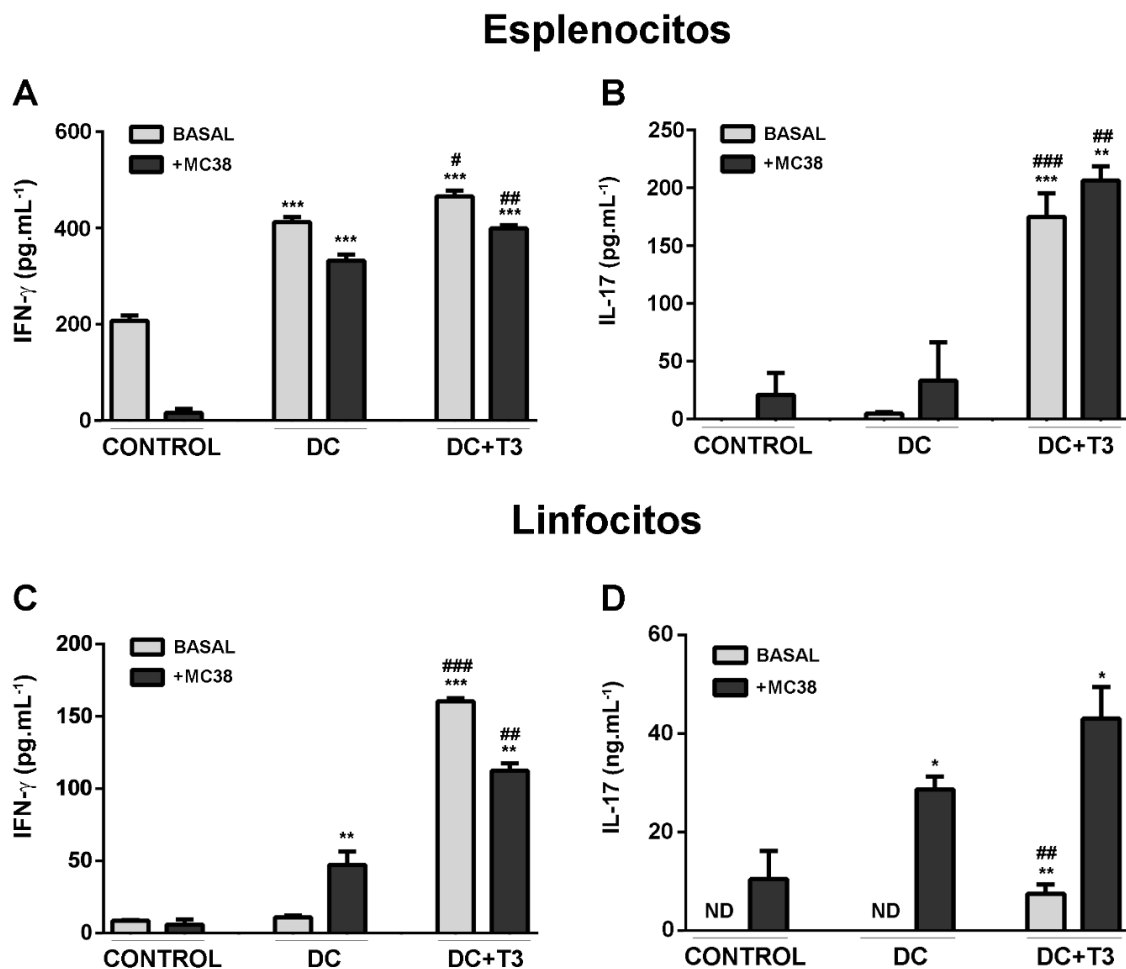
#### 4.3.d La vacunación con DCs estimuladas con T3 y enfrentadas a Ags propios del tumor, induce una respuesta proinflamatoria con un incremento en la secreción de IFN- $\gamma$ e IL-17.

Teniendo en cuenta los resultados presentados que sugieren que la inmunoterapia antitumoral desarrollada con DCs pulsadas con AATs y maduras con T3, aplicada al modelo de cáncer de colon, promueve una polarización de la respuesta inmune hacia un perfil proinflamatorio Th1 y Th17, así como un incremento en los LTCs y células Tc17, decidimos analizar la secreción de las principales citoquinas involucradas en dichas respuestas: IFN- $\gamma$  e IL-17. Para ello, se recolectó el sobrenadante de los cultivos de esplenocitos y linfocitos aislados de los nódulos linfáticos drenantes del tumor, re-estimulados *ex vivo* con lisados tumorales de células MC38 (+MC38) o en condiciones sin estímulo (BASAL).

En relación con la determinación de los niveles de IFN- $\gamma$  por ensayos de ELISA en los esplenocitos (**Figura 22 A**), el análisis reveló un aumento significativo en la liberación de dicha citoquina por las células de bazo de los animales que recibieron la vacunación con DCs cargadas con los Ags tumorales (DC y DC+T3), tanto en condiciones basales (barras grises) como con re-estímulo (barras negras), respecto al grupo CONTROL. No obstante, la mayor concentración de IFN- $\gamma$  se evidenció en los esplenocitos de los ratones inmunizados con DCs-MC38-Apo/Nec estimuladas con T3, en ambas condiciones de cultivo. Por su parte, la secreción de IFN- $\gamma$  fue significativamente mayor por parte de las células aisladas de los ganglios linfáticos del grupo DC+T3 en condiciones basales (**Figura 22 C**, barras grises: 18,4 y 15,2 veces de aumento vs CONTROL y DC, respectivamente), como luego del re-estímulo con el lisado tumoral (**Figura 22 C**, barras negras: 18,7 y 2,4 veces de aumento vs CONTROL y DC, respectivamente) comparados con los ganglios de los animales controles y DC.

Al mismo tiempo, se determinaron las concentraciones de IL-17 en los cultivos *ex vivo* de esplenocitos y ganglios linfáticos. Así, los niveles de IL-17 determinados en los medios de cultivo de esplenocitos pertenecientes a los grupos CONTROL y DC fueron muy reducidos (**Figura 22 B**). No obstante, los niveles incrementaron de manera significativa en los sobrenadantes de los esplenocitos que provenían de ratones

inmunizados con DCs estimuladas con T3 y cargadas con AATs (DC+T3) en ambas condiciones (BASAL: 174,8 y 9,8 veces de aumento; +MC38: 36,6 y 6,2 veces de aumento vs CONTROL y DC, respectivamente). En el caso de los linfocitos aislados del ganglio drenante cultivados en ausencia de los Ags tumorales, los niveles de IL-17 no fueron detectables en los grupos CONTROL y DC, sin embargo, su concentración incrementó 7,5 veces en el grupo DC+T3 (**Figura 22 D**, barras grises). Por su parte, el re-estímulo con los lisados tumorales (+MC38) de los linfocitos provenientes de ambos grupos de ratones inmunizados con DCs indujo una mayor secreción de IL-17 en el sobrenadante de cultivo, con una tendencia mayor en el grupo DC+T3.



**Figura 22.** Secreción de IFN- $\gamma$  e IL-17 en el sobrenadante del cultivo *ex vivo* de esplenocitos y células del ganglio drenante del tumor de ratones que recibieron la inmunoterapia basada en DCs.

El esquema experimental en los ratones fue similar al descrito en la Figura 17 A. Los ratones fueron sacrificados en el día 15 y se les extirpó el bazo y el ganglio drenante del tumor. Los esplenocitos y linfocitos purificados fueron cultivados *ex vivo* en condiciones sin estímulo (BASAL) o incubados con lisados de las células MC38 (+MC38) durante 72 horas. La producción de IFN- $\gamma$  y de IL-17 se determinó en

los sobrenadantes de los medios de cultivo por ensayos de ELISA. Concentración de IFN- $\gamma$  determinada en el sobrenadante del cultivo de esplenocitos (A) y linfocitos derivados del ganglio linfático drenante del tumor (C). Concentración de IL-17 determinada en el sobrenadante del cultivo de esplenocitos (B) y linfocitos derivados del ganglio drenante del tumor (D). 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 CONTROL; # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$  vs DC. ANOVA, Student-Newman-Keuls.

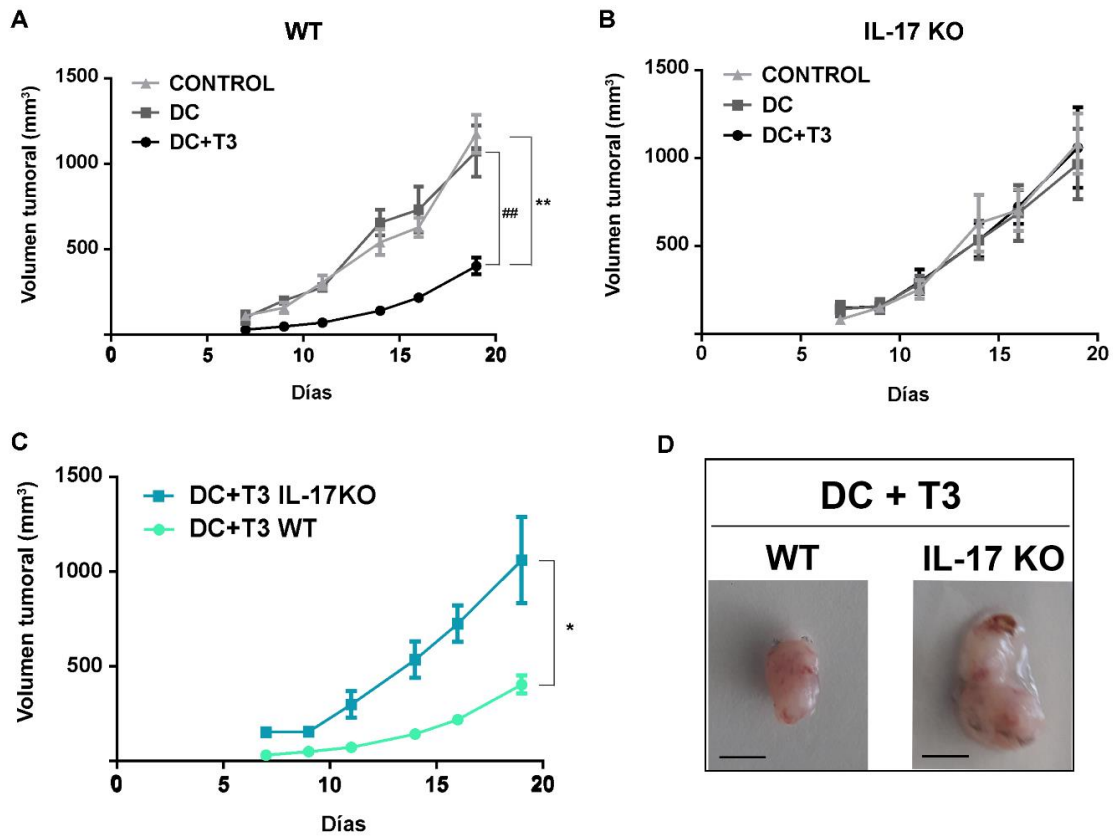
*El conjunto de las evidencias expuestas indica que la respuesta antitumoral inducida por la vacunación con DCs estimuladas con T3 está caracterizada por la secreción de las citoquinas IFN- $\gamma$  e IL-17 y el establecimiento de respuestas Th1, Th17 y citotóxicas específicas del tumor.*

### **4.3.e Rol esencial de IL-17 como mediador del efecto antitumoral inducido por la inmunoterapia basada en DCs estimuladas con T3 en el modelo de carcinoma de colon.**

A pesar de la existencia de múltiples reportes en la literatura que relacionan a la IL-17 y el cáncer, el papel de las células Th17 y otras células productoras de IL-17 en el contexto neoplásico es aún controvertido. En este sentido, ha sido reportado que la citoquina IL-17, así como las células Th17, presentan funciones tanto promotoras como supresoras tumorales. Probablemente parte de esta controversia surge del estudio de diversos aspectos de la respuesta dependiente de IL-17 en diferentes escenarios experimentales.<sup>218 219</sup> En la presente tesis doctoral, evidenciamos una marcada reducción en el volumen tumoral en el modelo de carcinoma de colon luego de la inmunoterapia con DCs pulsadas con AATs y estimuladas con T3; siendo estos efectos mediados, al menos en parte, por la inducción de una respuesta proinflamatoria dependiente de IFN- $\gamma$  e IL-17. En función de estos antecedentes y considerando nuestros resultados, nos propusimos investigar el rol de IL-17 producida por diferentes poblaciones inmunes en la respuesta antitumoral inducida por la inmunoterapia basada en DCs-T3. A tal fin, se replicó el modelo experimental del tumor y el protocolo de vacunación (**Figura 17 A**) en ratones deficientes de IL-17. Brevemente, ratones WT e IL-17A/F *knockout* (IL-17 KO) fueron inyectados con  $5 \times 10^5$  células MC38 por vía s.c. en el flanco izquierdo, y posteriormente se administraron las inyecciones con DCs cargadas



con células MC38-Apo/Nec estimuladas con T3 (DC+T3) o en ausencia de la hormona (DC). El grupo CONTROL recibió PBS como vehículo. De acuerdo con los resultados presentados en la **Figura 17**, los ratones WT que recibieron la inmunización con DCs en presencia de Ags tumorales estimuladas con T3 (DC+T3) mostraron una disminución significativa en el tamaño tumoral, con respecto a los grupos CONTROL y DC (**Figura 23 A**). Por el contrario, este efecto terapéutico no fue registrado en los ratones IL-17 KO que fueron vacunados con las DCs-MC38-Apo/Nec y maduras con T3 (**Figura 23 B**), sin evidenciarse diferencias significativas con los animales que recibieron la inmunoterapia con DCs no estimuladas (DC) o vehículo (CONTROL). La **Figura 23 C**, que representa la evolución del crecimiento tumoral en los animales WT e IL-17 KO que fueron vacunados con las DCs tratadas con T3 y cargadas con Ags tumorales (DC+T3), evidencia el menor volumen tumoral en los ratones WT durante todo el periodo analizado. Por su parte, la **Figura 23 D** muestra la diferencia observada entre ambos grupos experimentales mediante fotografías de los tumores obtenidas al día 19 luego de la inoculación de las células tumorales MC38.



**Figura 23. Rol de la citoquina IL-17 en la respuesta antitumoral inducida por la vacunación con DCs estimuladas con T3.**

Los ratones C57BL/6 WT y deficientes en IL-17 (IL-17 KO) fueron inyectados con las células MC38 ( $5 \times 10^5$ ) por vía s.c. en el flanco izquierdo (día 0) como se muestra en el diseño experimental de la Figura 17 A. iDCs derivadas de médula ósea de ratón co-cultivadas previamente con células MC38-Apo/Nec (DC), o con MC38-Apo/Nec y T3 (10 nM, DC+T3) durante 18 horas, fueron administradas por vía s.c. en el flanco derecho de los animales los días 1, 3, 5, 7 y 9. Al grupo CONTROL se le inyectó PBS solamente. El volumen del tumor fue monitoreado cada 2-3 días utilizando un calibre digital y calculado usando la siguiente fórmula:  $V = (D \times d^2) / 2$ , donde V es el volumen ( $\text{mm}^3$ ), D es el diámetro mayor (mm) y d es el diámetro menor (mm). **(A)** Cinética del crecimiento tumoral en ratones WT de los grupos CONTROL, DC y DC+T3. **(B)** Cinética del crecimiento tumoral en ratones IL-17 KO de los grupos CONTROL, DC y DC+T3. **(C)** Comparación del crecimiento tumoral entre ratones WT e IL-17 KO que recibieron vacunaciones con DCs tratadas con T3 y cargadas con AATs. **(D)** Fotografías representativas de los tumores a los 19 días post-inyección de las células tumorales MC38 en ratones WT (panel izquierdo) e IL-17 KO (panel derecho) que recibieron vacunaciones con DCs estimuladas con T3 y cargadas con AATs. Barra de escala: 5mm. Los datos se expresan como media  $\pm$  DE y corresponden a un experimento representativo de un total de tres con resultados similares.  $**p < 0.01$  vs CONTROL;  $##p < 0.01$  vs DC. ANOVA, Student-Newman-Keuls.  $*p < 0.05$  vs IL-17 KO, Prueba t de Student-No apareada.

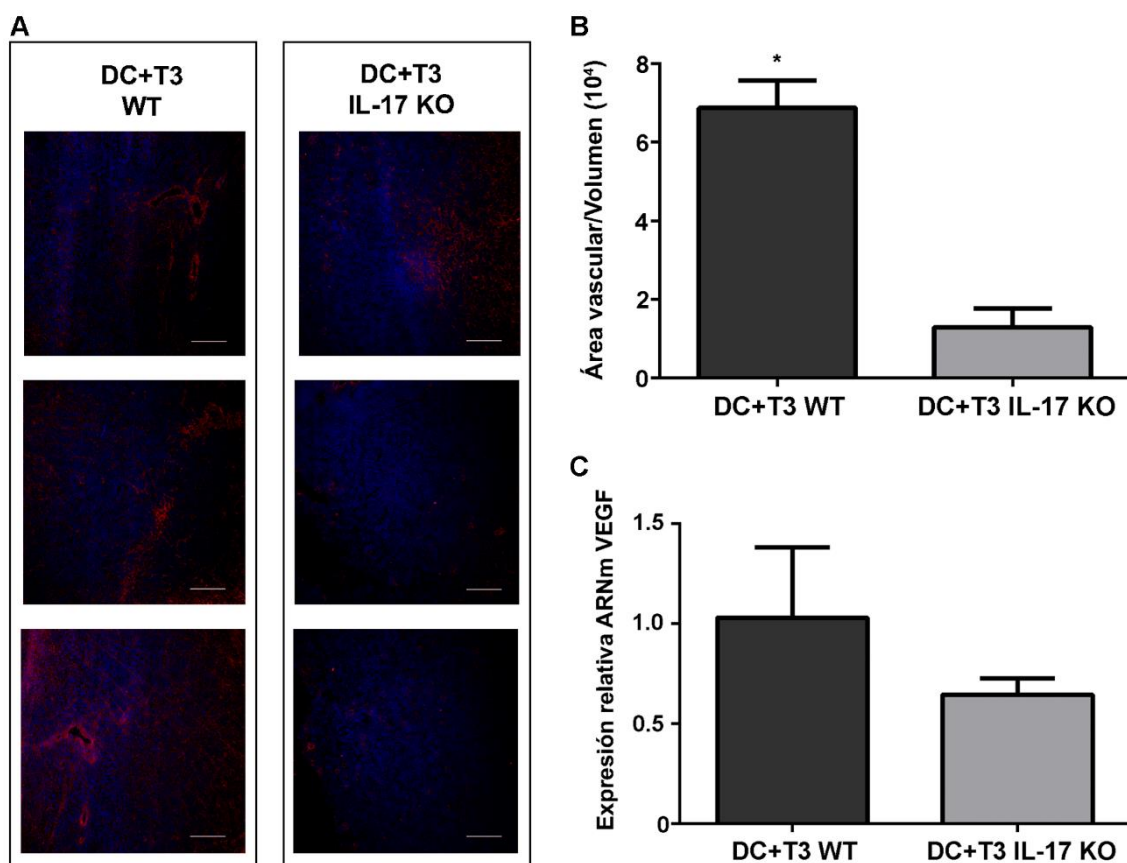
*Los resultados obtenidos, en su conjunto, sugieren que IL-17 presenta un rol esencial en el desarrollo de la inmunidad antitumoral mediada por linfocitos T desencadenada por la inmunoterapia basada en la vacunación con DCs estimuladas con T3 en el modelo de carcinoma de colon MC38.*

### **4.3.f Vascularización tumoral mediada por IL-17 como respuesta a la inmunoterapia antitumoral de DCs estimuladas con T3 en el modelo de carcinoma de colon.**

Los resultados presentados sugieren que la inmunoterapia antitumoral desarrollada con DCs pulsadas con AATs y maduras con T3 en el modelo de cáncer de colon, promueve una polarización de la respuesta inmune hacia un perfil proinflamatorio Th1 y Th17, así como un incremento en los LTCs y células Tc17. Además, la respuesta mediada por IL-17 resultó fundamental en los efectos antitumorales inducidos por la inmunoterapia. En función de estos hallazgos y considerando la capacidad proangiogénica de la IL-17,<sup>220</sup> evaluamos la presencia de vasos sanguíneos en los tumores provenientes de los ratones WT e IL-17 KO que recibieron la vacunación con DCs-AATs estimuladas con la hormona. Para ello, se analizó la expresión de la proteína transmembrana CD31, la cual se expresa en todos los endotelios continuos (arterias, arteriolas, vénulas, venas y capilares no sinusoidales)<sup>221</sup> por microscopia confocal. La identificación de los vasos sanguíneos en base a su morfología y determinados por sus células endoteliales inmunorreactivas para CD31, reveló un aumento en el número de vasos sanguíneos en los tumores extirpados de los ratones WT vacunados con DCs-AATs estimuladas con T3 (DC+T3 WT) en comparación con sus pares deficientes de IL-17 (DC+T3 IL-17 KO), como se observa en la **Figura 24 A**. Por consiguiente, se determinó el área vascular distinguiendo la cantidad y el calibre de los vasos sanguíneos identificados en las imágenes de microscopia utilizando el software ImageJ. En efecto, la cuantificación relativa del área vascular en función del volumen tumoral de cada una de las muestras (**Figura 24 B**), demostró un aumento en los ratones WT respecto a los animales IL-17 KO cuando ambos grupos de ratones recibieron las DCs-AATs estimuladas con T3 ( $p=0.013$ ).

Considerando que la citoquina IL-17 es capaz de estimular la producción de factores proangiogénicos, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF),<sup>222</sup><sup>223</sup><sup>224</sup> se realizó un análisis comparativo de la expresión del ARNm de este factor en muestras de tejido tumoral obtenidas de los ratones del grupo WT como del grupo IL-17 KO que recibieron la vacunación con DCs maduras con T3 en presencia de los AATs. Como se observa en la **Figura 24 C**, los niveles de ARNm de VEGF mostraron una tendencia al aumento en los animales WT respecto a los ratones deficientes de IL-17, aunque la diferencia no resultó estadísticamente significativa en las condiciones evaluadas.

En base a lo expuesto, estos resultados en conjunto indicarían que IL-17 podría estar favoreciendo la vascularización tumoral. La profundización de esta área de estudio, que excede los objetivos de esta tesis doctoral, permitirá dilucidar la implicancia de IL-17 en el incremento de los vasos sanguíneos del tumor y la regulación de marcadores proangiogénicos y antiangiogénicos.



**Figura 24. Rol de la citoquina IL-17 en la respuesta angiogénica inducida por la vacunación con DCs estimuladas con T3.**

Los ratones C57BL/6 WT y deficientes en IL-17 (IL-17 KO) fueron inyectados con las células MC38 ( $5 \times 10^5$ ) por vía s.c. en el flanco izquierdo (día 0). Posteriormente, iDCs derivadas de médula ósea de ratón co-cultivadas previamente con células MC38-Apo/Nec y tratadas con T3 (10 nM, DC+T3) durante 18 horas, fueron administradas por vía s.c. en el flanco derecho de los animales los días 1, 3, 5, 7 y 9. A los 19 días post-inyección de las células tumorales, los ratones fueron sacrificados, el tejido tumoral extraído y congelado en nitrógeno líquido para su conservación a  $-80^\circ\text{C}$ . **(A, B)** Los cortes de tejido tumoral realizados en el criostato fueron marcados con un anticuerpo monoclonal anti-CD31 (rojo), los núcleos identificados con DAPI (azul) y posteriormente analizados mediante microscopía confocal. **(A)** Inmunofluorescencias representativas del análisis de CD31 en criosecciones de los tumores obtenidos de ratones WT (panel izquierdo) e IL-17 KO (panel derecho). Barra de escala:  $200 \mu\text{m}$  **(B)** Análisis del área vascular marcada con CD31 en relación con el volumen tumoral de cada muestra. **(C)** Expresión de ARNm de VEGF por RT-qPCR. El ARN total se extrajo de las muestras de tejido tumoral de ratones WT e IL-17 KO que recibieron la inmunoterapia con DCs-AATs estimuladas con T3. Los niveles de ARNm de VEGF se grafican relativamente a la expresión de  $\beta$ -actina. Los datos se expresan como media  $\pm$  DE y corresponden a un experimento ( $n=2$ ), \* $p < 0.05$  vs IL-17 KO, Prueba t de Student-No apareada.

*Estos resultados sugieren que IL-17 presentaría un rol en la angiogénesis tumoral favoreciendo la reducción del tumor por la inmunoterapia basada en DCs estimuladas con T3 en el modelo de carcinoma de colon MC38.*

---

## 5. DISCUSIÓN I

---

Las DCs son consideradas las principales CPAs por su habilidad de capturar, procesar, y presentar Ags exógenos y auto-Ags a los linfocitos T. Estas células desempeñan un papel fundamental en la inmunidad, ya que, dependiendo del tipo de Ag procesado y de distintas señales que provengan del medioambiente en el que se encuentran, son capaces de direccionar la respuesta inmune actuando como el verdadero cerebro del sistema inmune.<sup>76</sup> Debido a esta característica, su manipulación siempre fue un blanco atractivo para distintos fines terapéuticos. Un ejemplo en este sentido es la utilización de la vitamina D3 por su efecto inmunosupresor sobre las DCs para el tratamiento de enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple.<sup>225</sup> A su vez, el advenimiento de la inmunoterapia ha revolucionado el tratamiento de tumores malignos sólidos y hematológicos, convirtiéndose en el cuarto pilar complementando la cirugía, la terapia citotóxica y la radioterapia.<sup>226</sup> La inmunoterapia incluye el bloqueo de puntos de control inmunológico y la transferencia adoptiva de células inmunes, debido a lo cual la utilización de DCs en la terapia antitumoral ha despertado gran interés desde hace tiempo.<sup>117</sup> Uno de los ejes de esta terapia es la utilización de las DCs con el propósito de generar una vacuna capaz de inducir inmunidad adaptativa frente a un determinado tipo de tumor. Sin embargo, a pesar de los múltiples esfuerzos, este tipo de vacuna contra el cáncer ha demostrado tener una eficacia limitada.<sup>227</sup> Este hecho probablemente responda a la diversidad de metodologías empleadas para obtener las DCs, la subpoblación de DCs utilizada y las condiciones del cultivo para su obtención, el tipo de Ags utilizado para cargarlas, las múltiples vías de administración de las vacunas e incluso el intervalo de tiempo entre una inmunización y otra.<sup>228</sup> <sup>118</sup> No obstante, debido a que las vacunas antitumorales basadas en DCs han demostrado tener limitada toxicidad se las considera un enfoque terapéutico seguro y efectivo, por lo cual su desarrollo continúa en estudio.<sup>117</sup> Para corroborar el fundamento de la vacunación con CPAs, un estudio evaluó la capacidad inmunogénica de las DCs administradas a sujetos sanos. Los resultados demostraron que una sola inyección de la vacuna constituida por DCs pulsadas con un Ag, era suficiente para inducir respuestas inmunes específicas

contra el Ag *in vivo*; mientras que por el contrario el Ag soluble por sí solo no logró inducir inmunidad.<sup>229</sup> Se puede inferir entonces que las DCs humanas cargadas con Ags y luego inyectadas pueden migrar hacia los tejidos linfoides para activar las células T y expandir la inmunidad celular.

Considerando a la inmunoterapia basada en DCs como una alternativa para el tratamiento del cáncer, mucho esfuerzo ha sido dirigido con el fin de optimizar la terapia que involucra la manipulación de estas células.<sup>230</sup> Por un lado, la selección de los Ags tumorales como blancos terapéuticos para el cargado de las DCs es sumamente crítico en este sentido. Las fuentes de Ag que pueden emplearse como cargo de las DCs son muy diversas e incluyen Ags tumorales seleccionados y preparaciones de Ags completos a partir de células tumorales. Se postula que las DCs cargadas con Ags tumorales totales podrían tener un beneficio agregado, permitiendo el procesamiento y selección de epitopes de forma “natural” proporcionando como resultado una respuesta inmune que involucre diversos clones de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>.<sup>231</sup> En consonancia con esto, se han evaluado y desarrollado diferentes estrategias, como la irradiación con luz UV, el shock térmico o distintos tratamientos oxidativos de las células tumorales de manera de obtener un cargo de células altamente inmunogénico y eficiente para activar las DCs.<sup>130</sup> Por otro lado, se ha intensificado el estudio de las condiciones óptimas para generar DCs *in vitro* con potencial inmunogénico en la clínica, centrándose en las condiciones de cultivo y los estímulos de activación de las células más favorables para obtener la respuesta inmune adecuada.<sup>232</sup> En efecto, el estímulo de maduración constituye un factor esencial impactando en la eficacia de las vacunas de DCs. Notablemente, estas vacunas en ausencia de factores de maduración apropiados inducen tolerancia.<sup>233</sup>

Resultados previos han demostrado que niveles fisiológicos de T3 inducen en las DCs murinas la expresión de moléculas co-estimuladoras, la secreción de citoquinas proinflamatorias, y la capacidad aloestimuladora de linfocitos T, favoreciendo así el desarrollo de respuestas proinflamatorias, así como efectos citotóxicos y antitumorales.<sup>185 187 193</sup> Estos antecedentes respaldan nuestra hipótesis de que la acción de T3 en las DCs potenciaría respuestas antitumorales *in vivo*, otorgando a la hormona propiedades adyuvantes en inmunoterapia basada en DCs.

En la presente tesis doctoral, inicialmente analizamos la capacidad de T3 de favorecer la maduración y función de las DCs *in vitro*, en presencia de Ags provenientes de las células tumorales MC38 de carcinoma de colon. La estrategia aplicada para obtener AATs con un alto potencial inmunogénico fue la irradiación con luz UVB de las células tumorales, obteniendo una mezcla de células MC38 viables, apoptóticas en etapas temprana y tardía, y necróticas. Como se ha planteado anteriormente, la luz UV se asocia a la inducción de muerte inmunogénica de las células tumorales promoviendo la maduración de las DCs.<sup>130 134</sup> En relación con lo anterior, nuestros resultados demostraron que las células MC38-Apo/Nec fueron eficientemente capturadas tanto por las DCs en condiciones basales, como las DCs estimuladas con T3. Sin embargo, la presencia de la hormona indujo la expresión de CD86 en la superficie de las DCs y potenció la producción de las citoquinas proinflamatorias IL-12, IL-6 y TGF- $\beta$  (**Figura 25**). Estos efectos de la HT sobre las DCs murinas que coinciden con resultados previos del grupo en otras condiciones experimentales,<sup>185 193</sup> son fundamentales durante el proceso de maduración y activación de estas células para ser utilizadas en inmunoterapia antitumoral. En este sentido, la molécula co-estimuladora CD86 consolida la interacción entre las DCs y los linfocitos T, evento que estaría asociado a una activación más eficiente de las células T.<sup>234</sup> Asimismo, la producción de IL-12 es esencial en la inmunoterapia antitumoral basada en DCs debido a su capacidad de polarizar linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes hacia un fenotipo Th1 productor de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ;<sup>235</sup> y prevenir el desarrollo de células productoras de IL-4 inhibiendo en consecuencia el desarrollo del programa transcripcional de las células Th2.<sup>236 237</sup> Por otro lado, la IL-12 influye en las propiedades de las células NK y T CD8<sup>+</sup> promoviendo en estas últimas células su sobrevivencia a largo plazo, así como su diferenciación en linfocitos efectores y de memoria.<sup>238</sup> En este sentido, *Chang et al.* demostraron que el *priming* de IL-12 durante la estimulación antigénica *in vitro* da como resultado un aumento significativo de la población de células T CD8<sup>+</sup> efectoras primarias y de memoria.<sup>239</sup> Además, la IL-12 estimula la presentación de Ags y su presentación cruzada por las DCs favoreciendo aún más la actividad citotóxica de las células CD8<sup>+</sup> y la respuesta de citoquinas de los linfocitos CD4<sup>+</sup>.<sup>143</sup> En este punto, es importante destacar que los niveles elevados de IL-12p70 producidos por las DCs utilizadas en las vacunas en pacientes que padecen glioma y melanoma correlacionaron positivamente con un resultado clínico más favorable.<sup>240</sup>



<sup>241</sup> Por su parte, la citoquina TGF- $\beta$  induce la conversión de la célula T virgen a una célula Treg. Sin embargo, la presencia de TGF- $\beta$  junto a IL-6 suprime el desarrollo de células Treg y en su lugar inicia la diferenciación a un perfil Th17 productor de IL-17 con funciones proinflamatorias.<sup>104</sup> Posteriormente, la acción combinada de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-23 amplifican la expresión de IL-17.<sup>242</sup> <sup>100</sup> A su vez, la polarización Th17 en presencia de TGF- $\beta$ 1 e IL-6, ha sido relacionada con la población no-pTH17.<sup>98</sup>

Las propiedades intrínsecas relevantes de las DCs para ser consideradas en la inmunoterapia contra el cáncer incluyen su migración a los ganglios linfáticos, su capacidad para polarizar la respuesta hacia un perfil Th1 y su habilidad para realizar presentación cruzada de Ags a los linfocitos T CD8<sup>+</sup> favoreciendo la inmunidad citotóxica protectora y específica contra los tumores.<sup>117</sup> Notablemente, resultados previos del grupo de investigación demostraron que T3 potencia la función de la DC en múltiples niveles de los requeridos para inmunoterapia, por lo cual podría considerarse a la hormona como un adyuvante en este tipo de terapia.<sup>187</sup> <sup>197</sup> En efecto, estudios previos del grupo de investigación demostraron que la vacunación con DCs estimuladas con T3 *ex vivo* y luego administradas a ratones en un modelo de melanoma, resultó efectiva evidenciada por un incremento en el porcentaje de animales libres de tumor, disminución del volumen tumoral y aumento de la supervivencia de los animales.<sup>187</sup> <sup>197</sup> A pesar de que los resultados iniciales fueron promisorios, resultaba imprescindible ampliar el estudio en otros modelos tumorales, considerando además que el modelo de melanoma consistió en la utilización de células B16-OVA, que expresan de manera artificial un Ag (OVA) y la respuesta fue evaluada contra OVA únicamente. Por todo lo expresado, en la presente tesis doctoral evaluamos en un modelo murino de carcinoma de colon el tratamiento antitumoral con DCs estimuladas con la hormona, en presencia de múltiples Ags específicos tumorales.

Con relación al cáncer colorrectal (CCR) como modelo tumoral a estudiar, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2020 se encontraba en el segundo lugar de incidencia en Argentina y representa la segunda causa principal de muerte asociada al cáncer. Además, a nivel mundial se encontraba en tercer lugar en incidencia y segundo en muertes relacionadas al cáncer.<sup>243</sup> Si bien las iniciativas de prevención y detección temprana de las últimas décadas, junto con opciones de tratamiento

mejoradas, han conducido a una reducción en los diagnósticos y las muertes de CCR, claramente no es un problema resuelto y los mayores inconvenientes surgen en aquellos pacientes cuya enfermedad no se detecta en forma temprana. Por este motivo, el desarrollo de nuevos tratamientos para el CCR es una necesidad permanente.<sup>244</sup> La línea celular MC38 de CCR deriva de un adenocarcinoma de grado III, el cual fue químicamente inducido en un ratón hembra C57BL/6, y usado desde entonces como un modelo tumoral trasplantable. Numerosos estudios han demostrado la inmunogenicidad de esta línea celular por lo cual se considera un excelente modelo para investigar inmunidad antitumoral e inmunoterapias.<sup>245 246 247</sup>

*Efremova et al.* caracterizaron el genoma y transcriptoma de las células MC38 realizando la secuenciación del exoma completo, secuenciación de RNA, y utilizando conjuntamente la técnica de polimorfismo de nucleótido único (*SNP: array-single nucleotide polymorphism*) que permite detectar la variación en una única base en el ADN, situación más frecuente en el genoma humano.<sup>248</sup> Lo interesante de esta investigación es la detección de mutaciones promotoras conocidas del CCR humano en las células MC38. Así, se evidenciaron mutaciones sin sentido compartidas en los genes TP53, PTEN (fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa) y en la vía de señalización de TGF- $\beta$ , como así también mutaciones BRAF. Asimismo, se detectaron en las células MC38 mutaciones en los genes que codifican al factor de transcripción SOX9 y ARID1A (dominio de interacción rico en AT de la proteína A1) que son frecuentes en CCR humano.<sup>249</sup> Todos estos datos, sugieren que la línea celular MC38 es un modelo válido para estudiar el CCR con características similares al que se desarrolla en humanos.

En relación con los estudios en el modelo tumoral de carcinoma de colon, nuestros datos demuestran que la vacunación con DCs estimuladas con T3 en presencia de células MC38-Apo/Nec como Ags tumorales, resultó competente a los fines de inducir una respuesta antitumoral. En efecto, la inmunoterapia basada en el uso de DCs maduras con T3 causó el retraso en la aparición de los tumores y la reducción significativa del crecimiento de los mismos en los ratones afectados. De los hallazgos en conjunto, obtenidos en los modelos murinos de melanoma<sup>187 197</sup> y carcinoma de colon, se desprende el potencial de T3 como inmunomodulador de la función de la DC y su posible utilización como adyuvante en las vacunas de DCs. Al indagar en el mecanismo

probable del efecto de la vacunación basada en DC-T3 sobre el tamaño tumoral, observamos una robusta respuesta de linfocitos T CD4<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$  (Th1) analizado tanto en esplenocitos, como a nivel del ganglio linfático drenante del tumor de los animales afectados. Cabe señalar que las diferentes estrategias de inmunoterapia antitumoral, como por ejemplo los agonistas de TLRs, tienen como finalidad la inducción de este tipo de respuesta inmune.<sup>250</sup> Las células Th1 juegan un rol fundamental en la generación de células T CD8<sup>+</sup> de memoria protectora luego de una infección o inmunización.<sup>251 252</sup> En el contexto de las terapias antitumorales, estas células de memoria adquieren importancia debido a su mayor potencial de proliferación y supervivencia; así como su capacidad de proporcionar una protección más robusta y duradera contra los tumores, en relación a las células T CD8<sup>+</sup> efectoras primarias.<sup>253</sup> En paralelo, se demostró un aumento significativo en la población de linfocitos CD8<sup>+</sup> productores de IFN- $\gamma$  (LTCs) (**Figura 25**). Los LTCs son las células inmunes predilectas para atacar el cáncer y forman la columna vertebral de las inmunoterapias contra el cáncer exitosas actuales.<sup>254</sup> Al respecto, estas células son las encargadas de la eliminación directa de las células tumorales que expresan los AATs a través de perforinas y granzimas,<sup>255</sup> así como también mediante la liberación de IFN- $\gamma$ . Esta citoquina ha sido históricamente considerada un jugador central en la inmunidad antitumoral, con la capacidad de influir tanto en las células cancerosas como en las células inmunes efectoras. En particular, una función importante de IFN- $\gamma$  es la regulación de la expresión de las moléculas del MHC I sobre las células tumorales, las cuales son componentes críticos de la maquinaria de presentación antigénica. El aumento de las moléculas MHC I inducido por IFN- $\gamma$  logra incrementar la antigenicidad de las células tumorales, favoreciendo así la presentación de Ags.<sup>256</sup> A su vez, IFN- $\gamma$  es capaz de inhibir la proliferación de las células tumorales provocando el arresto del ciclo celular e induciendo la muerte de estas células por apoptosis.<sup>257 258 259</sup> Aunque IFN- $\gamma$  ha sido reconocido como un factor inmune antitumoral, se sugiere que ante una exposición prolongada y/o una concentración no óptima de IFN- $\gamma$  se desarrolle una presión inmune selectiva sobre las células tumorales. Este mecanismo resulta en la remoción de las células tumorales altamente inmunogénicas y favorece la generación de variantes genéticas, las cuales exhiben una reducida inmunogenicidad lo que las convertirían en

“invisibles” para el sistema inmune.<sup>260</sup> La intervención de IFN- $\gamma$  en este proceso, caracteriza el lado pro-tumoral de esta citoquina y revela la naturaleza paradójica de la vía de señalización de IFN- $\gamma$  en cáncer.<sup>261 262</sup> En consonancia con su rol pro-tumoral, IFN- $\gamma$  promueve la síntesis de moléculas inhibitoras o supresoras de la activación del sistema inmune, mediando así mecanismos inmunosupresores.<sup>262 263</sup> En el contexto de los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral, la mayor concentración de IFN- $\gamma$  se observó en el sobrenadante de cultivo de los esplenocitos y linfocitos aislados de animales portadores de tumor inmunizados con DCs cargadas con AATs estimuladas con T3. El aumento de los niveles de esta citoquina se correlacionó con la disminución del volumen tumoral en los ratones, lo que podría avalar las características antitumorales de esta citoquina (**Figura 25**).

Otro punto relevante en relación con la respuesta inmune generada por la inmunoterapia antitumoral es el aumento de las células Th17 (CD4<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup>) y Tc17 (CD8<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup>) en bazo y ganglio linfático drenante del tumor de los animales que recibieron DCs pulsadas con células MC38-Apo/Nec y tratadas con T3. En consonancia, el aumento en los niveles de IL-17, secretados al medio extracelular por los esplenocitos y linfocitos provenientes de este grupo de ratones, concuerda con el mayor número de células productoras de IL-17 evidenciado en este grupo experimental. En definitiva, la mayor inducción de una respuesta inmune mediada a través de IL-17 se correlacionó con un menor volumen tumoral en los animales posterior a la inmunoterapia (**Figura 25**). Es importante considerar que además de las células Th17 y Tc17, diferentes tipos de células inmunes incluyendo, T- $\gamma\delta$ , NK, células linfoides innatas y linfocitos B tienen la capacidad de producir IL-17.<sup>99 264</sup> En este sentido, demostramos previamente que las DCs expuestas a T3 promueven la expansión de las células T- $\gamma\delta$  productoras de IL-17,<sup>193</sup> las cuales presentan un rol ambiguo en la inmunidad antitumoral.<sup>265</sup> La participación de estas células en la respuesta observada no fue abordado en el presente trabajo de tesis. Futuras investigaciones deberán dilucidar este aspecto.

A la luz de estos resultados y considerando que el rol de la IL-17 en cáncer presenta controversias en la actualidad, con efectos antitumorales y pro-tumorales dependiendo el contexto, evaluamos el papel de esta citoquina como mediador de la respuesta inmune antitumoral generada en el modelo de cáncer de colon. Los

experimentos realizados en ratones IL-17A/F KO (deficientes en el gen de IL-17) sugieren que la citoquina proinflamatoria IL-17 sería esencial para mediar una respuesta inmune antitumoral efectiva en la terapia con DCs estimuladas con T3. En este contexto, los ratones IL-17 KO no lograron controlar el crecimiento de los tumores como los animales WT, a pesar de haber recibido las vacunaciones con DCs pulsadas con T3. En concordancia con nuestros hallazgos, *Kryczek et al.* demostraron que la producción endógena de IL-17 contribuye a la reducción del crecimiento tumoral inducido a través de la inyección por vía s.c. de las células MC38 y además reduce a la formación de metástasis pulmonar por administración intravenosa de dichas células.<sup>266</sup> Asimismo, este estudio reveló que el mayor crecimiento tumoral y metástasis pulmonar observados en los ratones IL-17 KO estuvo asociado a una disminución de las células NK IFN- $\gamma^+$  y a una menor respuesta de células T productoras de IFN- $\gamma$  específicas de los Ags tumorales, encontradas tanto en los ganglios linfáticos drenantes como en el microambiente tumoral.

La IL-17 ha sido descrita como una citoquina prevalente en el microambiente tumoral, donde presenta roles duales tanto en el crecimiento como en la eliminación tumoral.<sup>218</sup> En relación con los efectos pro-tumorales, la IL-17 estimula de forma directa a las células cancerosas, así como favorece el crecimiento tumoral indirectamente mediante el reclutamiento de células inmunes con función inmunosupresora al microambiente tumoral. Esta citoquina se une al receptor de IL-17 en múltiples células tumorales iniciando vías de señalización involucradas en la activación de factores de transcripción, quinasas, metaloproteinasas de matriz involucradas en la remodelación tisular y proteínas antiapoptóticas.<sup>267</sup> En adición, existe evidencia que sostiene que la activación de señales mitogénicas y de supervivencia en las células tumorales inducidas por IL-17 les confiere resistencia frente a diversos agentes citotóxicos usados en la clínica en una variedad de líneas tumorales.<sup>268 269</sup> A su vez, ha sido reportada la presencia de IL-17 en el microambiente del tumor primario metastásico de un modelo murino de cáncer de mama.<sup>270</sup> En este estudio, el bloqueo farmacológico de esta citoquina con un anticuerpo anti-IL-17 inhibió significativamente el crecimiento del tumor, lo que indica un posible rol de IL-17 en el crecimiento del tumor mamario.<sup>270</sup>

Por otro lado, los efectos antitumorales de IL-17 se relacionan directamente con la apoptosis de la célula tumoral y en forma indirecta mediante la activación de las células inmunes con función antitumoral y la inducción de las células T  $\gamma\delta$  INF $\gamma$ <sup>+</sup>, Th1 y Th17. Notablemente, la expresión de IL-17 se correlaciona con un mejor pronóstico y supervivencia en pacientes que cursan diferentes tipos de cáncer, apoyando el rol de IL-17 en la inmunidad antitumoral.<sup>267</sup> En el mismo sentido, un aumento en el número de células IL-17<sup>+</sup> en cáncer cervical correlaciona con tumores pequeños y menor invasión vascular.<sup>271</sup> Asimismo, en el cáncer colorrectal se ha observado que IL-17 recluta neutrófilos con función antitumoral estimulando, además, una respuesta mediada por células T que se correlaciona con mejor supervivencia.<sup>272</sup> *Benchetrit et. al.* analizaron el papel de las células T en la actividad biológica de IL-17 para el control del crecimiento tumoral.<sup>273</sup> El estudio consistió en la inducción de la expresión de IL-17 en las células tumorales que posteriormente fueron inoculadas a ratones inmunocompetentes singénicos. Estos autores demostraron la inhibición en el crecimiento de los tumores capaces de sintetizar IL-17 y la generación de LTCs específicos dirigidos contra los Ags inmunodominantes de dichos tumores. De modo que estos resultados sugieren la implicancia de los linfocitos T en la actividad antitumoral mediada por IL-17. En paralelo, un estudio demostró que los ratones IL-17a<sup>-/-</sup> (deficientes en IL-17A), se presentaron más susceptibles a desarrollar metástasis pulmonar de melanoma que sus controles WT.<sup>274</sup> Consecutivamente, los autores realizaron experimentos de transferencia adoptiva con células Th17 a los ratones IL-17a<sup>-/-</sup> previamente inoculados por vía *i.v.* con las células de melanoma.<sup>274</sup> Efectivamente, los ratones a los cuales se les transfirió las células Th17 contenían un número reducido de colonias tumorales en el pulmón, un mayor número de leucocitos infiltrantes CD45<sup>+</sup> en los pulmones y aumento en el número de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. En base a estos resultados, los autores concluyeron que las células Th17 provocan una inflamación protectora que promueve la activación de las células T CD8<sup>+</sup> específicas del tumor.<sup>274</sup> Por otro lado, en línea con la transferencia adoptiva de células inmunes, un trabajo reciente ha demostrado que los linfocitos Th17, a diferencia de otras células T, no requieren de los protocolos de expansión rápida a largo plazo que son utilizados generalmente, y que además son más resistentes a la senescencia o apoptosis, conservando una sólida eficacia antitumoral *in vivo*.<sup>275</sup>

Nuñez *et. al.* evaluaron la capacidad de IL-17 de promover la infiltración tumoral de células supresoras mieloides (MDSCs, acrónimo del inglés *Myeloid-Derived Suppressor Cells*), linfocitos Treg y células T CD4<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, en un modelo de ratón deficiente del receptor huérfano relacionado al ácido retinoico  $\gamma$ t (ROR $\gamma$ t),<sup>276</sup> el cual es un factor de transcripción maestro que controla la diferenciación y el mantenimiento de los subconjuntos de células T efectoras CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> tipo 17, Th17 y Tc17, respectivamente.<sup>277</sup> En este trabajo, los autores reportan un porcentaje reducido de células Th17 en el microambiente tumoral de aquellos ratones deficientes en ROR $\gamma$ t, lo cual conduce a un mayor crecimiento tumoral. A su vez, observaron que este efecto podía revertirse mediante la transferencia adoptiva de células Th17.<sup>276</sup> Además, los autores demostraron que las diferencias en el crecimiento tumoral no se asociaron con cambios en la acumulación o función supresora de las MDSC y las células Treg, sino que se relacionaron con una disminución en la proporción de células T CD4<sup>+</sup> en el tumor. En base a los resultados obtenidos, ellos sugieren que las células Th17 no afectan el reclutamiento de poblaciones inmunosupresoras, sino que favorecen el reclutamiento de células Th1 efectoras en el tumor, promoviendo así respuestas antitumorales.<sup>276</sup>

Teniendo en cuenta el rol de IL-17 en la regulación de la angiogénesis en el contexto neoplásico,<sup>220</sup> evaluamos su implicancia en la estrategia de vacunación utilizada en nuestro modelo de estudio. En este sentido, se evidenció un incremento del área vascular en relación al volumen tumoral en aquellos tumores extraídos de los ratones WT en relación a los IL-17 KO, indicando una mayor vascularización del tumor en los animales que expresan IL-17.<sup>278</sup> Estos resultados están en consonancia con la tendencia al aumento observada en la expresión de ARNm de VEGF en los tumores de animales WT respecto a los IL-17 KO. Asimismo, se ha reportado que IL-17 media la angiogénesis en cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) a través de la migración de células endoteliales vasculares y la estimulación de la producción de factores proangiogénicos como VEGF.<sup>222</sup> A su vez, estos autores demostraron una estrecha correlación positiva entre los niveles serológicos de IL-17 y la concentración de VEGF en los pacientes con NSCLC, acompañado con un incremento en la vascularización tumoral.<sup>279</sup> De acuerdo con estos resultados, la acción de la IL-17 sobre el TME favorece

la expresión de factores angiogénicos y promueve la angiogénesis en diversos tipos de tumores murinos.<sup>280</sup>

Sobre la base de la hipótesis formulada por *Judah Folkman* en 1971 que establece que el crecimiento tumoral depende de la angiogénesis y que la inhibición de la misma tendría un beneficio terapéutico,<sup>281</sup> esta área de investigación presenta actualmente una base científica sólida.<sup>282</sup> La angiogénesis es considerada como uno de los procesos promotores del crecimiento tumoral, debido a que una mayor irrigación garantiza el suministro de oxígeno y nutrientes a las células tumorales para su crecimiento. Asimismo, la vasculatura asociada al tumor contribuye a la migración de las células malignas, permitiendo la generación del nicho metastásico.<sup>283</sup> En función de estas consideraciones, la inhibición de la angiogénesis es un campo de estudio interesante en el desarrollo de terapias para el tratamiento del cáncer. Sin embargo, a pesar de los resultados preclínicos prometedores, las monoterapias antiangiogénicas solo condujeron a beneficios clínicos leves.<sup>284</sup>

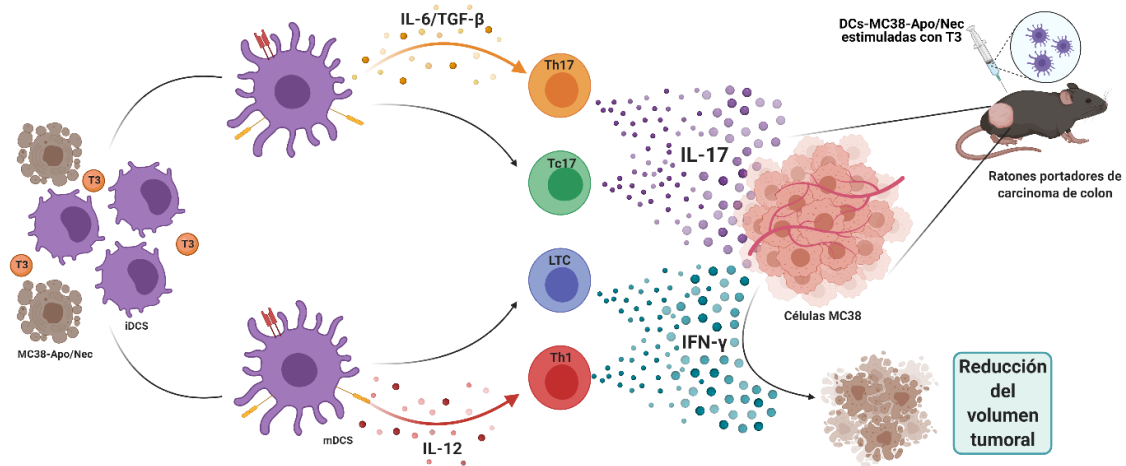
Por otro lado, el estrés hipóxico en el TME promueve mecanismos de escape del tumor de la vigilancia inmune, promoviendo la tumorigénesis. Al respecto, la hipoxia regula la promoción tumoral mediante diversos mecanismos que incluyen el desarrollo de angiogénesis, la adquisición de heterogeneidad fenotípica tumoral, la promoción de tolerancia inmune a través de la aparición de variantes tumorales inmunoresistentes y la inmunosupresión en el TME.<sup>285 286</sup> En relación a este último punto, la hipoxia promueve la acumulación de MDSCs y de células Treg, facilita la diferenciación y polarización de los macrófagos asociados al tumor en un perfil M2 e inhibe la activación y función de las células T citotóxicas. En efecto, han surgido nuevas perspectivas terapéuticas con la finalidad de inducir la normalización de la irrigación tumoral.<sup>287</sup> El principal objetivo de estas terapias no implica la inhibición del desarrollo de vasos sanguíneos, sino por el contrario restablecer la estructura y funcionalidad de la vasculatura presente en el tejido tumoral. La normalización del sistema vascular del tumor corrige su oxigenación, favorece el transporte de sustancias y el infiltrado de células inmunes efectoras al TME, contribuyendo a mejorar la eficacia de la radioterapia, quimioterapia e inmunoterapia.<sup>288</sup> Nuestros resultados en el modelo de carcinoma de colon, indican que la mayor vascularización observada en los tumores de los ratones WT



que recibieron la vacunación con DCs cargadas con AATs estimuladas con T3, se correlaciona con una reducción del tamaño tumoral. Con estos hallazgos, se podría hipotetizar que la mayor irrigación sanguínea del tumor, dependiente de IL-17, permitiría mejorar la perfusión tisular y el acceso de las células inmunes efectoras al TME, potenciando así el efecto terapéutico de la inmunoterapia.<sup>287</sup> Los mecanismos a través de los cuales la IL-17 podría mediar el efecto antitumoral en el presente modelo aún deben ser esclarecidos en su totalidad. En efecto, el estudio de las poblaciones inmunes que se encuentran en el TME, así como la profundización del sistema vascular desarrollado en el tumor, permitirían entender de forma más precisa la causa de la reducción de la masa tumoral. Considerando que las estrategias terapéuticas emergentes de normalización vascular presentan un gran potencial para lograr vasos sanguíneos maduros y funcionales que alivian la hipoxia tumoral,<sup>129</sup> resulta atractivo el abordaje de futuras investigaciones a fin de identificar estrategias de terapias combinadas que potencien la inmunidad antitumoral.

En definitiva, nuestros resultados sugieren que la inmunoterapia basada en DCs estimuladas con T3 en presencia de Ags tumorales proporciona un enfoque terapéutico antitumoral que podría aplicarse como una alternativa a las terapias convencionales o como complemento de otras estrategias inmunoterapéuticas que incluyen el bloqueo de puntos de control inmunológico (CTL-4, PD-1/PDL-1, LAG3, etc.), a fin de aumentar la eficacia clínica.<sup>289 290</sup> Al respecto, reportamos previamente la capacidad de T3 de modular el eje PD-1/PDL-1, reduciendo la expresión de PDL-1 y PDL-2 en las DCs y la frecuencia de las células T que expresan PD-1 en ensayos *in vitro* e *in vivo*.<sup>193</sup> Estos hallazgos estarían asociados a una inhibición de la tolerancia inmune, aspecto esencial para alcanzar una respuesta inmune antitumoral eficaz.

A modo de resumen, la **Figura 25** esquematiza los principales hallazgos de la primera parte de la presente tesis doctoral. Esta figura destaca el posible mecanismo involucrado en el éxito terapéutico de la inmunoterapia basada en DCs estimuladas con la HT activa, T3, y cargadas con AATs en el modelo de cáncer de colon murino.



**Figura 25. Esquema hipotético de los efectos de la inmunoterapia basada en DCs-AATs estimuladas con T3 en el modelo de carcinoma de colon murino.**

El tratamiento de las iDCs con T3, en presencia de las células MC38-Apo/Nec como AATs, induce su maduración y activación, observándose un incremento en la expresión de moléculas co-estimuladoras y citoquinas como IL-12, IL-6 y TGF- $\beta$ . Por su parte, la inmunoterapia con DCs estimuladas con T3 y cargadas con AATs a ratones portadores de cáncer de colon, es capaz de reducir el tamaño tumoral. El efecto de la vacunación se asocia a la polarización de la respuesta inmune hacia los perfiles Th1 y Th17, los cuales a su vez fomentarían la inducción de los LTCs y las células Tc17. La respuesta inmune desencadenada se acompaña con un notable incremento en la secreción de las citoquinas efectoras características de los perfiles inducidos como son IFN- $\gamma$  e IL-17.

---

## 6. RESULTADOS II

---

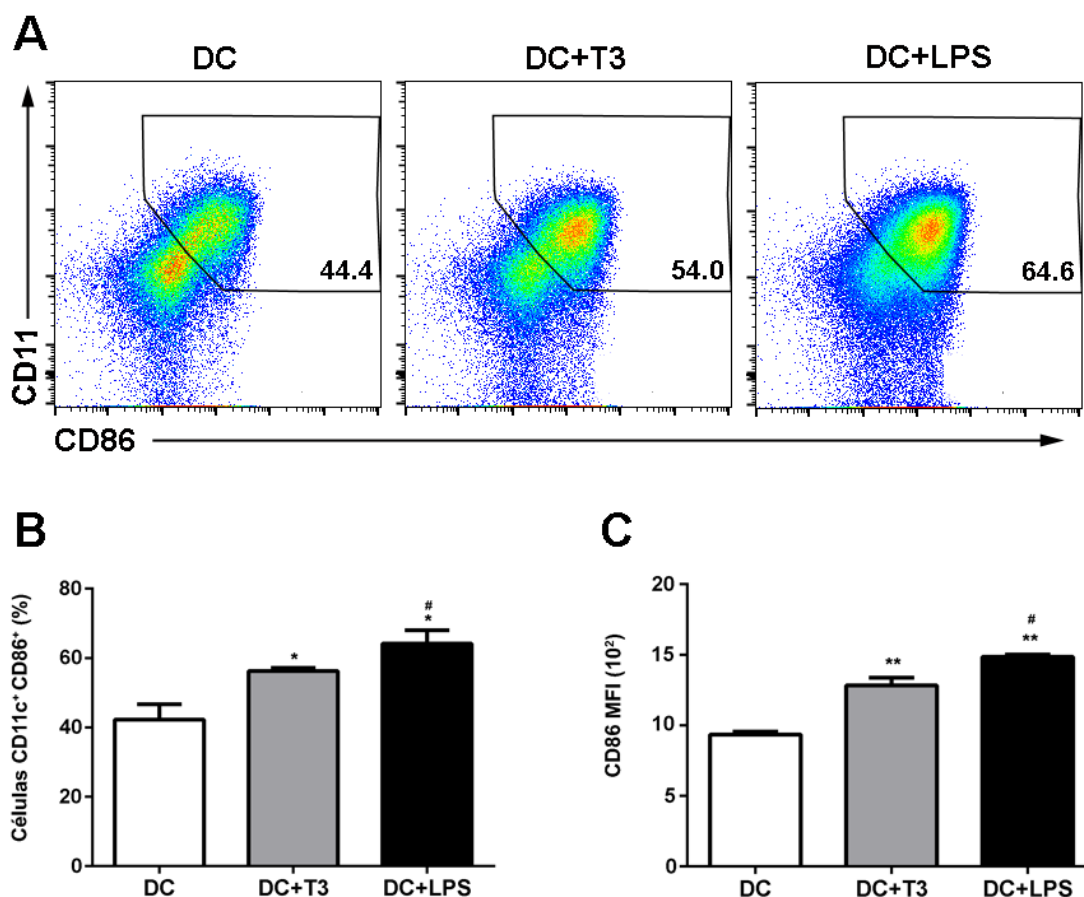
### *- Analizar el efecto de las HTs sobre las características y funcionalidad de DCs humanas*

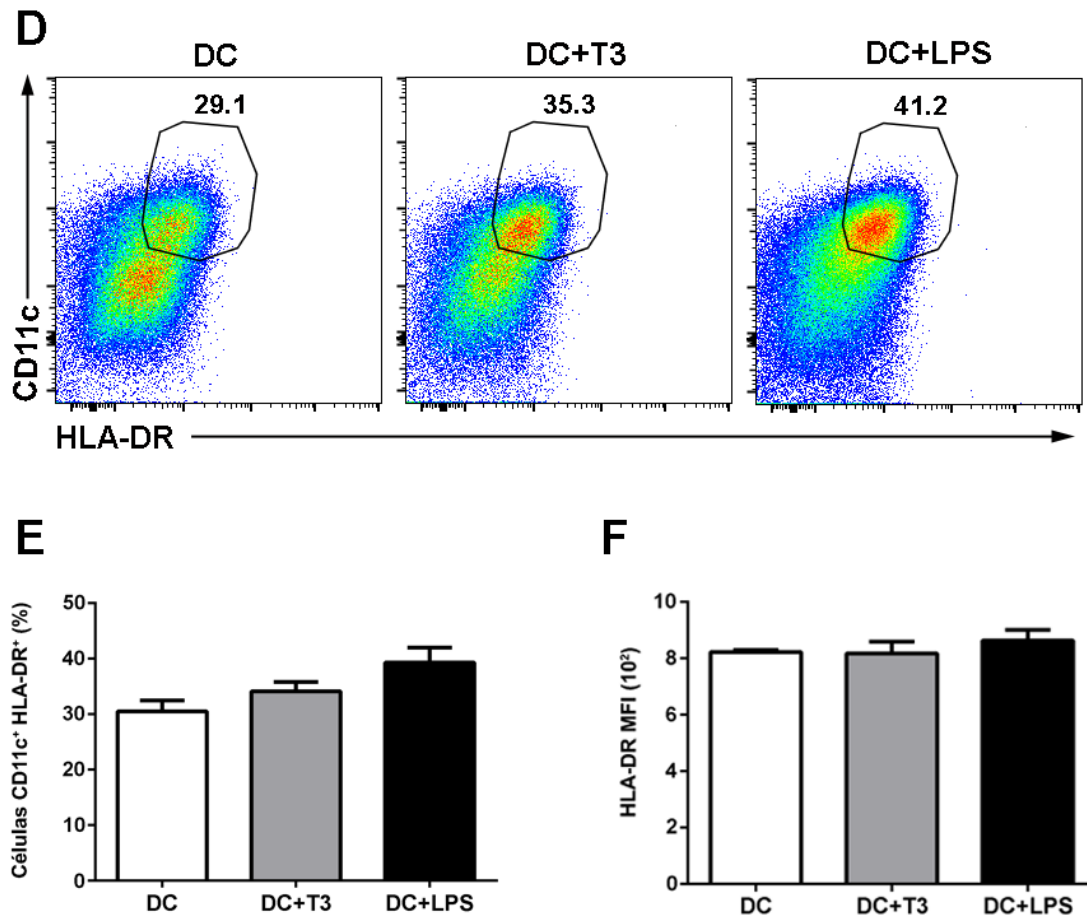
#### **6.1 Evaluación de los efectos de T3 sobre DCs humanas (huDCs).**

##### **6.1.a T3 promueve la maduración de huDCs.**

Como se ha expresado anteriormente, la maduración y activación de las DCs es un proceso esencial para el inicio de la inmunidad adaptativa específica de Ag e incluye el aumento en la expresión de moléculas co-estimuladoras y síntesis de ciertas citoquinas.<sup>117</sup> En relación a lo anterior, diversos estudios realizados por el grupo de trabajo donde se realizó esta tesis doctoral reportaron el rol crítico de T3 en la regulación de la fisiología de las DCs murinas y la inducción de respuestas inflamatorias Th1 y Th17, así como citotóxicas.<sup>185 186 187 193</sup> Además, los datos evidenciaron que las DCs estimuladas con T3 son capaces de potenciar la inmunidad antitumoral en un modelo murino de melanoma y en el modelo de carcinoma de colon desarrollado en la presente tesis doctoral.<sup>187 197</sup> En función de lo planteado y considerando la posible transferencia a la clínica humana y al futuro tratamiento de pacientes oncológicos, se llevaron a cabo experimentos iniciales a los fines de determinar si la exposición de huDCs a T3 podría resultar en cambios fenotípicos y funcionales relevantes. Para ello las PBMCs fueron obtenidas a partir de leucocitos de sangre periférica humana, y posteriormente se aislaron los monocitos CD14<sup>+</sup> como se detalla en el apartado 3.11. A continuación, estas células se cultivaron en presencia de IL-4 y GM-CSF recombinantes humanos, para favorecer su diferenciación a iDCs. Luego de 6 días de cultivo, las iDCs no adheridas a la placa fueron tratadas con T3 (10 nM) o LPS (100 ng/mL, control positivo)<sup>291</sup> por 18 horas. Posteriormente, se procedió a la caracterización fenotípica de las DCs luego de los tratamientos. A tal fin, las DCs fueron marcadas superficialmente con anticuerpos anti-CD11c, anti-CD86 y anti-HLA-DR humanos y adquiridas en un citómetro de flujo. El análisis de los datos obtenidos demostró que la exposición de iDCs a la hormona T3

favoreció la expresión de la molécula co-estimuladora CD86 en forma significativa, siendo este aumento evidenciado tanto en el porcentaje de células CD11c<sup>+</sup> CD86<sup>+</sup> (**Figura 26 A, B**), como en la MFI de expresión de este marcador (**Figura 26 C**). Este resultado sugiere que las huDCs estimuladas con T3 adquieren un perfil de maduración similar al obtenido en presencia de LPS. La molécula HLA-DR exhibe como principal función presentar Ags peptídicos a los linfocitos T y junto con las moléculas HLA-DP y -DQ conforman el grupo de los llamados receptores del MHCII en humanos.<sup>292</sup> Por tal motivo, nos propusimos analizar la expresión de HLA-DR en huDCs luego del tratamiento con la hormona. En efecto, observamos una tendencia a incrementar en el porcentaje de huDCs HLA-DR<sup>+</sup> en las células tratadas con T3 con respecto al control (**Figura 26 D y E**,  $p=0,0592$ ).



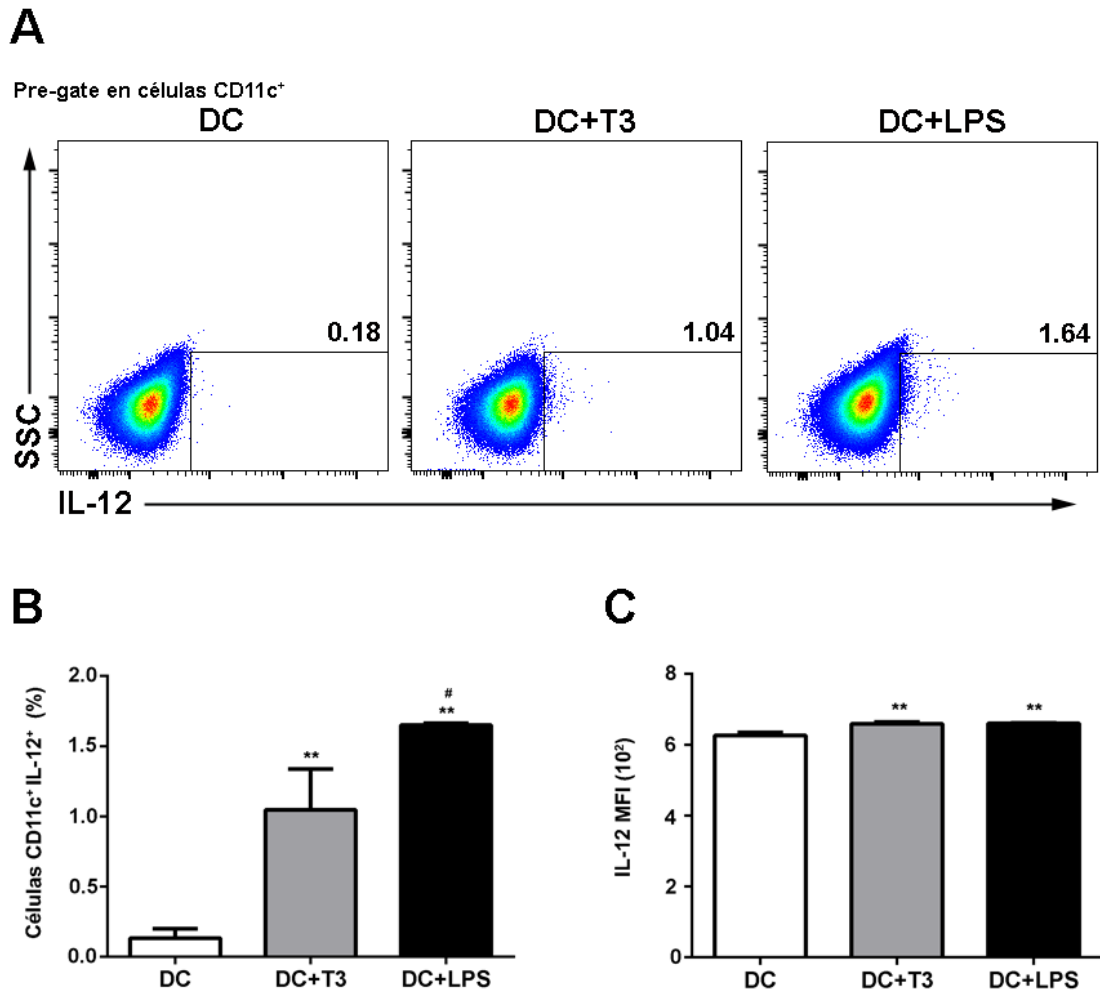


**Figura 26. Efecto de T3 sobre el fenotipo de las huDCs.**

Las huDCs fueron obtenidas a partir de monocitos de sangre periférica de donantes sanos. Los monocitos se diferenciaron a huDCs inmaduras en presencia de IL-4 y GM-CSF por 6 días y posteriormente fueron tratadas con T3 (10 nM) y LPS (100 ng/mL, control positivo) por 18 horas. Luego, las células se marcaron utilizando los anticuerpos APC-anti-CD11c, PE-anti-HLA-DR y PerCP-CY5.5-anti-CD86 y se analizó la expresión de los marcadores superficiales de maduración en la población CD11c<sup>+</sup> por citometría de flujo. **(A)** Dot plots representativos del análisis de las huDCs CD11c<sup>+</sup> que expresan el marcador CD86 en condiciones basales (DC) y luego del tratamiento con T3 (DC+T3) o LPS (DC+LPS). **(B)** Análisis comparativo del porcentaje de células CD11c<sup>+</sup> CD86<sup>+</sup>. **(C)** Análisis comparativo de la intensidad de fluorescencia media (MFI) de CD86 en la población CD11c<sup>+</sup>. **(D)** Dot plots representativos del análisis de las huDCs CD11c<sup>+</sup> que expresan HLA-DR en condiciones basales (DC) y luego del tratamiento con T3 (DC+T3) o LPS (DC+LPS). **(E)** Análisis comparativo de la frecuencia de células CD11c<sup>+</sup> HLA-DR<sup>+</sup>. **(F)** Análisis comparativo de la MFI de HLA-DR<sup>+</sup> en la población CD11c<sup>+</sup>. Los datos se expresan como media  $\pm$  DE y corresponden a un experimento representativo de un total de tres con resultados similares. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs DC; # $p < 0.05$  vs DC+T3. ANOVA, Student-Newman-Keuls.

### **6.1.b T3 estimula la activación de huDCs favoreciendo la producción de IL-12.**

Considerando el efecto de T3 sobre la maduración de huDCs, se analizó la capacidad de esta hormona de inducir cambios en el estado de activación de las huDCs. Para ello, los monocitos diferenciados a huDCs inmaduras se cultivaron en presencia de T3 (10 nM) o LPS (100 ng/mL, control positivo) por 18 horas. Durante las últimas 4 horas de cultivo se agregó Brefeldina A para inhibir el transporte intracelular de proteínas. Posteriormente, se procedió a la tinción superficial de CD11c en las huDCs y luego a la marcación intracelular con un anticuerpo anti-IL-12 humano para ser analizadas por citometría de flujo. En la **Figura 27 A** se observan dot plots representativos del subconjunto de células CD11c<sup>+</sup> productoras de IL-12. En efecto, se evidenció un aumento significativo (aproximadamente 8 veces) en la frecuencia de células CD11c<sup>+</sup> IL-12<sup>+</sup> luego del tratamiento con la HT, comparado con el control sin estimular (DC) (**Figura 27 B**). A su vez, se registró un aumento significativo en la MFI en las huDCs estimuladas con T3, indicando una mayor expresión de IL-12 por cada célula (**Figura 27 C**).



**Figura 27. Efecto de T3 en la producción de IL-12 en huDCs.**

Las huDCs fueron obtenidas a partir de monocitos de sangre periférica de donantes sanos. Los monocitos se diferenciaron a huDCs inmaduras en presencia de IL-4 y GM-CSF por 6 días y posteriormente fueron tratadas con T3 (10 nM) y LPS (100 ng/mL, control positivo) por 18 horas. Las células se incubaron con Brefeldina A durante las últimas 4 horas del tratamiento, se marcaron utilizando los anticuerpos APC-anti-CD11c y PE-anti-IL12 y finalmente se analizó la expresión de IL-12 en la población CD11c<sup>+</sup> por citometría de flujo. **(A)** Dot plots representativos del análisis de las huDCs que expresan IL-12 en condiciones basales (DC) y por el tratamiento con T3 (DC+T3) o LPS (DC+LPS), previa selección de la población CD11c<sup>+</sup>. **(B)** Análisis comparativo de la frecuencia de huDCs productoras de IL-12 (CD11c<sup>+</sup> IL-12<sup>+</sup>). **(C)** Análisis comparativo de la intensidad de fluorescencia media (MFI) de IL-12<sup>+</sup> en la población CD11c<sup>+</sup>. Los datos se expresan como media  $\pm$  DE y corresponden a un experimento representativo de un total de tres con resultados similares. \*\* $p$ <0.01 vs DC; # $p$ <0.05 vs DC+T3. ANOVA, Student-Newman-Keuls.

*Estos resultados iniciales sugieren que T3 induce la maduración fenotípica y funcional de huDCs derivadas de monocitos.*

---

## 7. DISCUSIÓN II

---

Desde hace décadas la relación entre el sistema inmune y las hormonas producidas por la glándula tiroides ha despertado gran interés. Actualmente, la interrelación entre ambos se encuentra mejor establecida, y se evidencia claramente en que las fluctuaciones fisiopatológicas de los niveles de HTs son capaces de afectar la respuesta inmune. Efectivamente, diferentes situaciones que afectan la acción de las HTs tienen un impacto en las características y/o funciones de las células inmunes, y se ven reflejadas en el estado del sistema de defensas del huésped.<sup>9</sup> A su vez, los trastornos relacionados con la inmunidad conducen a las disfunciones tiroideas más frecuentes, las cuales tienen un origen autoinmune, como la Enfermedad de Graves y la Tiroiditis de Hashimoto.<sup>10 293</sup> Aunque la conexión entre las HTs y el sistema inmune es compleja y aún no se comprende por completo, en la actualidad se considera tanto a los linfocitos B y T como a las diferentes células de la inmunidad innata, células blanco de la acción de las HTs.<sup>8 9 155 156</sup>

En cuanto a la acción de las HTs sobre las principales CPAs, los primeros resultados del efecto de T3 sobre las DCs murinas fueron reportados por nuestro grupo de trabajo y posteriormente su capacidad de direccionar la respuesta inmune adaptativa.<sup>185 186 187 193</sup> Por otro lado, la comprensión del rol de las HTs en la biología de las DCs humanas aún es limitada. En este sentido, *Mooij et al.* proporcionaron las primeras evidencias de que las HTs, principalmente T3, y otros derivados iodados son capaces de favorecer la diferenciación de monocitos humanos de sangre periférica a DCs funcionales.<sup>294</sup> Más de una década después, *Dedecjus et al.* evidenciaron que el estado tirometabólico influye en las principales poblaciones de DCs de sangre periférica de humanos, las DCs plasmocitoides y mieloides.<sup>189</sup> Además, observaron que en pacientes con cáncer de tiroides luego de la ablación quirúrgica de la glándula, la sustitución de T4 aumentó la frecuencia de estas poblaciones de DCs, y la expresión de CD86 y HLA-DR en estas células. Es importante señalar que los pacientes que participaron en este estudio no presentaron enfermedades autoinmunes, por lo cual representó un buen modelo para analizar la influencia de la administración de HTs en las DCs humanas en circulación.



Posteriormente, el mismo grupo de investigación reportó que pacientes hipotiroideos por causa de Tiroiditis de Hashimoto, que recibieron el tratamiento con T4 con dosis adecuadas para alcanzar el eutiroidismo, presentaron un incremento en la expresión de moléculas co-estimuladoras en la población de cDCs.<sup>190</sup> Por otro lado, pacientes que presentan Enfermedad de Graves autoinmune mostraron niveles elevados de IL-12 en circulación en su estado de hipertiroidismo.<sup>295</sup> Por el contrario, durante el tratamiento farmacológico del hipertiroidismo con metimazol o propiltiouracilo, los niveles de IL-12 disminuyeron y se correlacionaron con el descenso de la concentración de T3 y T4 libres. Estos autores además observaron un incremento de los niveles séricos de IL-12 en sujetos controles luego de la administración de T3. De acuerdo con estos hallazgos, las pDCs humanas cultivadas *ex vivo* en presencia de T3 en combinación con el factor de maduración sCD40L (ligando soluble de CD40) aumentó la habilidad de las DCs de incrementar la respuesta proliferativa y la secreción de IL-12 por los PBMCs.<sup>189</sup> Por su parte, los hallazgos obtenidos en esta tesis doctoral en relación con el efecto de T3 en las DCs humanas se encuentran en consonancia con los reportes mencionados, aunque en un contexto experimental diferente. Efectivamente, el tratamiento de DCs humanas diferenciadas a partir de monocitos de sangre periférica con concentraciones fisiológicas de T3 estimuló el aumento en la expresión de CD86, así como una tendencia al aumento en la expresión de HLA-DR. Asimismo, luego de la estimulación de las huDCs con T3 se evidenció un mayor número de huDCs productoras de IL-12, acompañado de un aumento en la expresión de esta citoquina en estas células (**Figura 28**). En definitiva, nuestros resultados en conjunto con los reportes de la bibliografía sugieren un efecto inmunomodulador de las HTs sobre las DCs humanas, favoreciendo su maduración y activación funcional, de acuerdo con nuestros resultados en DCs murinas.<sup>185</sup>

Retomando el concepto de que las DCs son CPAs profesionales, que cuentan con el potencial de inducir diferentes respuestas inmunes, se han convertido en el centro del escenario de la inmunoterapia activa. Por esta razón, desde hace años se encuentran en estudio diferentes estrategias destinadas a manipular *ex vivo* las características inmunomoduladoras de las DCs con diferente grado de maduración y activación. En este contexto, existen evidencias de los efectos clínicos de la inmunoterapia basada en el uso de DCs para el tratamiento del cáncer, desórdenes autoinmunes y en el rechazo de

trasplantes. Entre las biomoléculas que causan tolerancia en las DCs se encuentran hormonas como los glucocorticoides (dexametasona) y el metabolito activo de la vitamina D (vitamina D3). Ambas hormonas han sido ampliamente evaluadas como agentes farmacológicos en DCs humanas para la generación de DCs con características tolerogénicas para su uso en enfermedades autoinmunes y rechazo de trasplantes.<sup>296</sup>

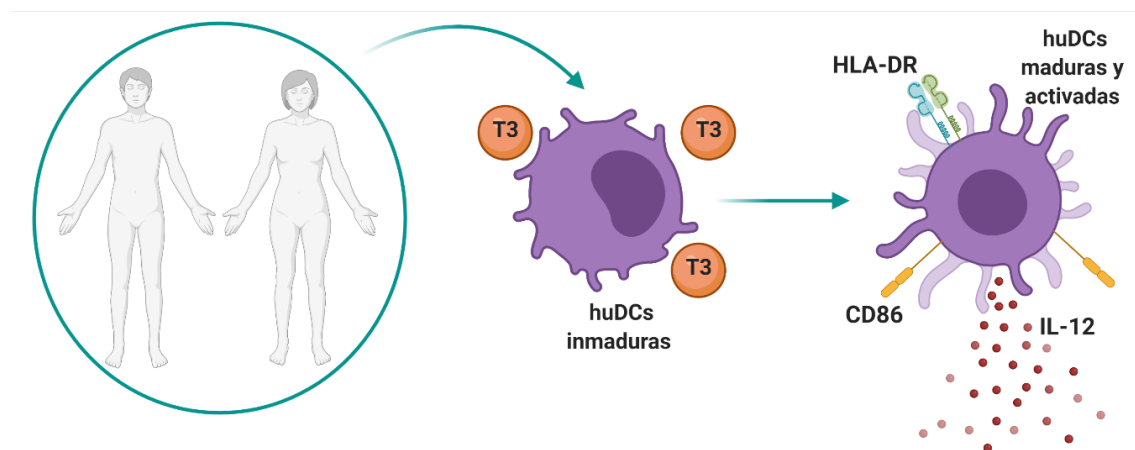
297 298 299

Por su parte, la inmunoterapia antitumoral se encuentra en constante y rápido desarrollo, con más de 200 ensayos clínicos finalizados hasta la fecha.<sup>226 131 300</sup> La vacunación basada en DCs implica el aislamiento de poblaciones particulares de DCs autólogas<sup>301</sup> o la generación y amplificación *in vitro* de DCs derivadas de monocitos de sangre periférica, seguido de su manipulación *ex vivo* y reinyección en los pacientes.<sup>302</sup> En este sentido, la mayoría de los ensayos clínicos de vacunas de DCs destinadas a combatir el cáncer se basan en el uso de DCs derivadas de monocitos.<sup>213</sup> A lo largo de los años desde su descubrimiento y caracterización como un tipo de célula morfológicamente único con capacidad para activar linfocitos T vírgenes, se han desarrollado varios métodos para generar DCs de aplicación clínica. El método más utilizado, es su diferenciación a partir de monocitos utilizando una combinación de citoquinas, que involucran el GM-CSF y la IL-4.<sup>303</sup> Con relación a las poblaciones de DCs encontradas naturalmente en sangre periférica, exhiben una mejor capacidad de presentación antigénica que las DCs derivadas de monocitos debido a la mayor expresión de moléculas MHC, por lo que han sido propuestas como la base para las vacunas de la próxima generación. Sin embargo, su efectividad todavía no ha sido afianzada debido a la baja frecuencia de las subpoblaciones de estas células en sangre periférica y la dificultad en su purificación.<sup>131</sup>

Teniendo en cuenta el éxito de la inmunoterapia basada en DCs, utilizando T3 como un adyuvante potenciador de la función de estas células en los modelos murinos de melanoma y carcinoma de colon,<sup>187</sup> se desprende la importancia de evaluar el efecto de T3 en DCs humanas considerando la posible transferencia futura de nuestros resultados a la oncoterapia clínica. En efecto, los resultados de la presente tesis doctoral aportan las primeras evidencias de la acción de T3 en las huDCs. Sin embargo, resulta indispensable la profundización en este sentido, con investigaciones futuras dirigidas a

ampliar el perfil de citoquinas analizadas, determinar las respuestas adaptativas inducidas, capacidad migratoria, entre otras propiedades esenciales en la inmunoterapia. Además, resulta interesante explorar la expresión y funcionalidad de los receptores de HTs en huDCs, como las isoformas de TR y la integrina de membrana  $\alpha\beta3$ , así como el mecanismo molecular involucrado en la acción de la hormona. Cabe destacar que hasta nuestro conocimiento este aspecto no ha sido abordado en DCs humanas.

A modo ilustrativo, la **Figura 27** resume en conjunto, los resultados obtenidos de la segunda parte de la presente tesis doctoral en relación con los efectos de T3 sobre las huDCs.



**Figura 28. Esquema de los efectos de T3 en la maduración fenotípica y funcional de huDCs.**

La Hormona Tiroidea biológicamente activa, T3, genera la maduración fenotípica de las huDCs derivadas de monocitos a través de la inducción en la expresión de la molécula co-estimuladora CD86 y HLA-DR en su superficie. En paralelo, la hormona T3 regula la funcionalidad de las huDCs estimulando la producción de la citoquina proinflamatoria IL-12.

---

## 8. CONCLUSIÓN GENERAL

---

En conclusión, a lo largo de este trabajo de tesis doctoral se demostró la eficacia de la utilización de la HT biológicamente activa, T3, para la manipulación de las propiedades inmunogénicas de las DCs, tanto murinas como humanas, regulando positivamente el desarrollo de la inmunidad protectora. En este sentido, los hallazgos obtenidos sugieren también que la inmunoterapia basada en DCs estimuladas con T3 en presencia de un Ag tumoral específico, proporcionaría una alternativa en la generación de DCs clínicamente relevantes, para ser utilizadas en la terapia antitumoral. A su vez, la caracterización de la respuesta inmune inducida luego del tratamiento con las vacunaciones basadas en DCs estimuladas con T3, evidenció la generación de células T efectoras del tipo Th1, Th17 y células T CD8<sup>+</sup> tanto citotóxicas productoras de IFN- $\gamma$  (LTCs), como productoras de IL-17 (Tc17). Además, los resultados indican que la presencia de IL-17 es fundamental para la inducción de una inmunidad protectora efectiva contra las células tumorales murinas de cáncer de colon.

Por otro lado, los incipientes resultados obtenidos en este trabajo indican que T3 es capaz de ejercer un efecto inmunomodulador sobre DCs derivadas de monocitos humanos, favoreciendo su maduración y su activación. Estos hallazgos son prometedores y alientan la profundización del estudio del efecto de T3 sobre DCs humanas, aspecto muy poco explorado y de trascendencia considerando la potencial transferencia de los resultados obtenidos en modelos murinos a la clínica oncológica humana.

Por su parte, las patologías relacionadas con la glándula tiroidea son las disfunciones endócrinas más comunes, habiéndose reportado innumerables casos de pacientes con desórdenes hipo e hipertiroideos con consecuencias inmunológicas. Nuestras observaciones pueden contribuir a la comprensión de dichas consecuencias, ayudando a esclarecer los efectos de T3 sobre el inicio de la respuesta inmune adaptativa. Un enfoque que sin dudas merece una mayor evaluación clínica.

---

## 9. BIBLIOGRAFÍA

---

1. Miyake, S. Mind over cytokines: Crosstalk and regulation between the neuroendocrine and immune systems. *Clinical and Experimental Neuroimmunology* (2012) doi: 10.1111/j.1759-1961.2011.00023.x.
2. Kelley, K. W., Weigent, D. A. & Kooijman, R. Protein hormones and immunity. *Brain, Behavior, and Immunity* (2007) doi:10.1016/j.bbi.2006.11.010.
3. Butts, C. L. & Sternberg, E. M. Neuroendocrine factors alter host defense by modulating immune function. *Cellular Immunology* (2008) doi:10.1016/j.cellimm.2007.09.009.
4. Webster, J. I., Tonelli, L. & Sternberg, E. M. Neuroendocrine regulation of immunity. *Annual Review of Immunology* (2002) doi:10.1146/annurev.immunol.20.082401.104914.
5. Liberman, A. C. *et al.* Regulatory and mechanistic actions of glucocorticoids on T and inflammatory cells. *Frontiers in Endocrinology* (2018) doi:10.3389/fendo.2018.00235.
6. Cain, D. W. & Cidlowski, J. A. Immune regulation by glucocorticoids. *Nature Reviews Immunology* (2017) doi:10.1038/nri.2017.1.
7. Jara, E. L. *et al.* Modulating the function of the immune system by thyroid hormones and thyrotropin. *Immunology Letters* (2017) doi: 10.1016/j.imlet.2017.02.010.
8. Rubingh, J., van der Spek, A., Fliers, E. & Boelen, A. The role of thyroid hormone in the innate and adaptive immune response during infection. *Comprehensive Physiology* (2020) doi: 10.1002/cphy.c200003.
9. Del Mar Montesinos, M. & Pellizas, C. Thyroid hormone action on innate immunity. *Frontiers in Endocrinology* (2019) doi:10.3389/fendo.2019.00350.
10. Ramos-Leví, A. M. & Marazuela, M. Pathogenesis of thyroid autoimmune

- disease: the role of cellular mechanisms. *Endocrinología y Nutrición (English Edition)* (2016) doi:10.1016/j.endoen.2016.09.005.
11. Mullur, R., Liu, Y. Y. & Brent, G. A. Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiological Reviews* (2014) doi:10.1152/physrev.00030.2013.
  12. Carvalho, D. P. & Dupuy, C. Thyroid hormone biosynthesis and release. *Molecular and Cellular Endocrinology* (2017) doi:10.1016/j.mce.2017.01.038.
  13. Ortiga-Carvalho, T. M., Chiamolera, M. I., Pazos-Moura, C. C. & Wondisford, F. E. Hypothalamus-pituitary-thyroid axis. *Comprehensive Physiology* (2016) doi:10.1002/cphy.c150027.
  14. Bianco, A. C. & da Conceição, R. R. The deiodinase trio and thyroid hormone signaling. in *Methods in Molecular Biology* (2018). doi:10.1007/978-1-4939-7902-8\_8.
  15. Chiamolera, M. I. & Wondisford, F. E. Minireview: Thyrotropin-releasing hormone and the thyroid hormone feedback mechanism. *Endocrinology* (2009) doi:10.1210/en.2008-1795.
  16. Cicatiello, A. G., Di Girolamo, D. & Dentice, M. Metabolic effects of the intracellular regulation of thyroid hormone: Old players, new concepts. *Frontiers in Endocrinology* (2018) doi:10.3389/fendo.2018.00474.
  17. Bernal, J., Guadaño-Ferraz, A. & Morte, B. Thyroid hormone transporters- functions and clinical implications. *Nature Reviews Endocrinology* (2015) doi:10.1038/nrendo.2015.66.
  18. Friesema, E. C. H. *et al.* Effective cellular uptake and efflux of thyroid hormone by human monocarboxylate transporter 10. *Molecular Endocrinology* (2008) doi:10.1210/me.2007-0112.
  19. Kersseboom, S. & Visser, T. J. Tissue-specific effects of mutations in the thyroid hormone transporter MCT8. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia* (2011) doi:10.1590/S0004-27302011000100001.
  20. van der Spek, A. H., Fliers, E. & Boelen, A. The classic pathways of thyroid

- hormone metabolism. *Molecular and Cellular Endocrinology* (2017) doi:10.1016/j.mce.2017.01.025.
21. Mendoza, A. & Hollenberg, A. N. New insights into thyroid hormone action. *Pharmacology and Therapeutics* (2017) doi:10.1016/j.pharmthera.2017.02.012.
  22. Bianco, A. C. *et al.* Paradigms of Dynamic Control of Thyroid Hormone Signaling. *Endocrine Reviews* (2019) doi:10.1210/er.2018-00275.
  23. Hönes, G. S. *et al.* Noncanonical thyroid hormone signaling mediates cardiometabolic effects in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2017) doi:10.1073/pnas.1706801115.
  24. Brent, G. A. Mechanisms of thyroid hormone action. *Journal of Clinical Investigation* (2012) doi:10.1172/JCI60047.
  25. Astapova, I. Role of co-regulators in metabolic and transcriptional actions of thyroid hormone. *Journal of Molecular Endocrinology* (2016) doi:10.1530/JME-15-0246.
  26. Cheng, S. Y., Leonard, J. L. & Davis, P. J. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocrine Reviews* (2010) doi:10.1210/er.2009-0007.
  27. Bergh, J. J. *et al.* Integrin  $\alpha V\beta 3$  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) doi:10.1210/en.2005-0102.
  28. Verga Falzacappa, C. *et al.* Thyroid hormone receptor TR $\beta$ 1 mediates Akt activation by T3 in pancreatic  $\beta$  cells. *Journal of Molecular Endocrinology* (2007) doi:10.1677/jme.1.02166.
  29. Davis, P. J., Leonard, J. L., Lin, H. Y., Leinung, M. & Mousa, S. A. Molecular Basis of Nongenomic Actions of Thyroid Hormone. in *Vitamins and Hormones* (2018). doi:10.1016/bs.vh.2017.06.001.
  30. Hercbergs, A. Clinical Implications and Impact of Discovery of the Thyroid Hormone Receptor on Integrin  $\alpha V\beta 3$ —A Review. *Frontiers in Endocrinology* (2019) doi:10.3389/fendo.2019.00565.

31. Taylor, P. N. *et al.* Global epidemiology of hyperthyroidism and hypothyroidism. *Nature Reviews Endocrinology* (2018) doi:10.1038/nrendo.2018.18.
32. Chaker, L., Bianco, A. C., Jonklaas, J. & Peeters, R. P. Hypothyroidism. *The Lancet* (2017) doi:10.1016/S0140-6736(17)30703-1.
33. Trifu, D. S., Gil-Fournier Esquerra, N., Peláez Torres, N. & Álvarez Hernández, J. Hypothyroidism. *Medicine (Spain)* (2020) doi:10.1016/j.med.2020.07.003.
34. De Leo, S., Lee, S. Y. & Braverman, L. E. Hyperthyroidism. *The Lancet* (2016) doi:10.1016/S0140-6736(16)00278-6.
35. Tomar, N. & De, R. K. A brief outline of the immune system. *Methods in Molecular Biology* (2014) doi:10.1007/978-1-4939-1115-8\_1.
36. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell. 4th edition. Innate Immunity. New York: Garland Science; (2002).*
37. Amarante-Mendes, G. P. *et al.* Pattern recognition receptors and the host cell death molecular machinery. *Frontiers in Immunology* (2018) doi:10.3389/fimmu.2018.02379.
38. Chaplin, D. D. Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* (2010) doi:10.1016/j.jaci.2009.12.980.
39. Yatim, K. M. & Lakkis, F. G. A brief journey through the immune system. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* (2015) doi:10.2215/CJN.10031014.
40. Marshall, J. S., Warrington, R., Watson, W. & Kim, H. L. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology* (2018) doi:10.1186/s13223-018-0278-1.
41. Vivier, E. *et al.* Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell* (2018) doi:10.1016/j.cell.2018.07.017.
42. Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature Immunology* (2015) doi:10.1038/ni.3123.



43. Dranoff, G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* (2004) doi:10.1038/nrc1252.
44. Liew, P. X. & Kubes, P. The Neutrophil's role during health and disease. *Physiological Reviews* (2019) doi:10.1152/physrev.00012.2018.
45. Németh, T., Sperandio, M. & Mócsai, A. Neutrophils as emerging therapeutic targets. *Nature Reviews Drug Discovery* (2020) doi:10.1038/s41573-019-0054-z.
46. Blériot, C., Chakarov, S. & Ginhoux, F. Determinants of Resident Tissue Macrophage Identity and Function. *Immunity* (2020) doi:10.1016/j.immuni.2020.05.014.
47. Zhang, C., Yang, M. & Ericsson, A. C. Function of Macrophages in Disease: Current Understanding on Molecular Mechanisms. *Frontiers in Immunology* (2021) doi:10.3389/fimmu.2021.620510.
48. Russell, D. G., Huang, L. & VanderVen, B. C. Immunometabolism at the interface between macrophages and pathogens. *Nature Reviews Immunology* (2019) doi:10.1038/s41577-019-0124-9.
49. Steinman, R. M. & Cohn, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice: I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *Journal of Experimental Medicine* (1973) doi:10.1084/jem.137.5.1142.
50. Nussenzweig, M. C., Steinman, R. M., Gutchinov, B. & Cohn, Z. A. Dendritic cells are accessory cells for the development of anti-trinitrophenyl cytotoxic T lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine* (1980) doi:10.1084/jem.152.4.1070.
51. Vu Manh, T. P., Bertho, N., Hosmalin, A., Schwartz-Cornil, I. & Dalod, M. Investigating evolutionary conservation of dendritic cell subset identity and functions. *Frontiers in Immunology* (2015) doi:10.3389/fimmu.2015.00260.
52. Mildner, A. & Jung, S. Development and function of dendritic cell subsets. *Immunity* (2014) doi: 10.1016/j.immuni.2014.04.016.

53. Anderson, D. A., Dutertre, C. A., Ginhoux, F. & Murphy, K. M. Genetic models of human and mouse dendritic cell development and function. *Nature Reviews Immunology* (2020) doi:10.1038/s41577-020-00413-x.
54. Edelson, B. T. *et al.* Peripheral CD103<sup>+</sup> dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> conventional dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine* (2010) doi:10.1084/jem.20091627.
55. Vremec, D. *et al.* The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: Investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine* (1992) doi:10.1084/jem.176.1.47.
56. Haniffa, M. *et al.* Human Tissues Contain CD141<sup>hi</sup> Cross-Presenting Dendritic Cells with Functional Homology to Mouse CD103<sup>+</sup> Nonlymphoid Dendritic Cells. *Immunity* (2012) doi:10.1016/j.immuni.2012.04.012.
57. Jongbloed, S. L. *et al.* Human CD141<sup>+</sup> (BDCA-3)<sup>+</sup> dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *Journal of Experimental Medicine* (2010) doi:10.1084/jem.20092140.
58. Suzuki, S. *et al.* Critical roles of interferon regulatory factor 4 in CD11b<sup>high</sup>CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> dendritic cell development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2004) doi:10.1073/pnas.0402139101.
59. Bosteels, C. & Scott, C. L. Transcriptional regulation of DC fate specification. *Molecular Immunology* (2020) doi:10.1016/j.molimm.2020.02.021.
60. Guilliams, M. *et al.* Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species. *Immunity* (2016) doi:10.1016/j.immuni.2016.08.015.
61. Eisenbarth, S. C. Dendritic cell subsets in T cell programming: location dictates function. *Nature Reviews Immunology* (2019) doi:10.1038/s41577-018-0088-1.
62. León, B. & Lund, F. E. Compartmentalization of dendritic cell and T-cell interactions in the lymph node: Anatomy of T-cell fate decisions. *Immunological*

- Reviews* (2019) doi:10.1111/imr.12758.
63. Cook, S. J. *et al.* Differential chemokine receptor expression and usage by pre-cDC1 and pre-cDC2. *Immunology and Cell Biology* (2018) doi:10.1111/imcb.12186.
  64. Alloatti, A., Kotsias, F., Magalhaes, J. G. & Amigorena, S. Dendritic cell maturation and cross-presentation: timing matters! *Immunological Reviews* (2016) doi:10.1111/imr.12432.
  65. Montealegre, S. & Van Endert, P. M. Endocytic recycling of MHC class I molecules in non-professional antigen presenting and dendritic cells. *Frontiers in Immunology* (2019) doi:10.3389/fimmu.2018.03098.
  66. Neuenhahn, M. & Busch, D. H. Unique functions of splenic CD8 $\alpha$ + dendritic cells during infection with intracellular pathogens. *Immunology Letters* (2007) doi:10.1016/j.imlet.2007.09.007.
  67. Chiang, M. C. *et al.* Differential uptake and cross-presentation of soluble and necrotic cell antigen by human DC subsets. *European Journal of Immunology* (2016) doi:10.1002/eji.201546023.
  68. Joffre, O. P., Segura, E., Savina, A. & Amigorena, S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nature Reviews Immunology* (2012) doi:10.1038/nri3254.
  69. Farhood, B., Najafi, M. & Mortezaee, K. CD8+ cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: A review. *Journal of Cellular Physiology* (2019) doi:10.1002/jcp.27782.
  70. Roberts, E. W. *et al.* Critical Role for CD103+/CD141+ Dendritic Cells Bearing CCR7 for Tumor Antigen Trafficking and Priming of T Cell Immunity in Melanoma. *Cancer Cell* (2016) doi:10.1016/j.ccell.2016.06.003.
  71. Martínez-López, M., Iborra, S., Conde-Garrosa, R. & Sancho, D. Batf3-dependent CD103+ dendritic cells are major producers of IL-12 that drive local Th1 immunity against *Leishmania major* infection in mice. *European Journal of Immunology* (2015) doi:10.1002/eji.201444651.

72. Mashayekhi, M. *et al.* CD8 $\alpha$ + Dendritic Cells Are the Critical Source of Interleukin-12 that Controls Acute Infection by *Toxoplasma gondii* Tachyzoites. *Immunity* (2011) doi:10.1016/j.immuni.2011.08.008.
73. 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. *Annual Review of Immunology* (2013) doi:10.1146/annurev-immunol-020711-074950.
74. Sittig, S. P. *et al.* A Comparative Study of the T Cell Stimulatory and Polarizing Capacity of Human Primary Blood Dendritic Cell Subsets. *Mediators of Inflammation* (2016) doi:10.1155/2016/3605643.
75. Knutson, K. L. & Disis, M. L. Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy* (2005) doi:10.1007/s00262-004-0653-2.
76. Hilligan, K. L. & Ronchese, F. Antigen presentation by dendritic cells and their instruction of CD4+ T helper cell responses. *Cellular and Molecular Immunology* (2020) doi:10.1038/s41423-020-0465-0.
77. Flores-Langarica, A. *et al.* T-zone localized monocyte-derived dendritic cells promote Th1 priming to Salmonella. *European Journal of Immunology* (2011) doi:10.1002/eji.201141440.
78. Nakano, H. *et al.* Blood-derived inflammatory dendritic cells in lymph nodes stimulate acute T helper type 1 immune responses. *Nature Immunology* (2009) doi:10.1038/ni.1707.
79. De Koker, S. *et al.* Inflammatory monocytes regulate Th1 oriented immunity to CpG adjuvanted protein vaccines through production of IL-12. *Scientific Reports* (2017) doi:10.1038/s41598-017-06236-6.
80. Mansouri, S. *et al.* Immature lung TNFR2 – conventional DC 2 subpopulation activates moDCs to promote cyclic di-GMP mucosal adjuvant responses in vivo. *Mucosal Immunology* (2019) doi:10.1038/s41385-018-0098-0.

81. Blecher-Gonen, R. *et al.* Single-Cell Analysis of Diverse Pathogen Responses Defines a Molecular Roadmap for Generating Antigen-Specific Immunity. *Cell Systems* (2019) doi:10.1016/j.cels.2019.01.001.
82. Patente, T. A., Pelgrom, L. R. & Everts, B. Dendritic cells are what they eat: how their metabolism shapes T helper cell polarization. *Current Opinion in Immunology* (2019) doi:10.1016/j.coi.2019.02.003.
83. Reis E Sousa, C. Dendritic cells in a mature age. *Nature Reviews Immunology* (2006) doi:10.1038/nri1845.
84. Gardner, A. & Ruffell, B. Dendritic Cells and Cancer Immunity. *Trends in Immunology* (2016) doi:10.1016/j.it.2016.09.006.
85. Boltjes, A. & van Wijk, F. Human dendritic cell functional specialization in steady-state and inflammation. *Frontiers in Immunology* (2014) doi:10.3389/fimmu.2014.00131.
86. Hackstein, H. & Thomson, A. W. Dendritic cells: Emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. *Nature Reviews Immunology* (2004) doi:10.1038/nri1256.
87. Alcaraz-Serna, A. *et al.* Immune synapse instructs epigenomic and transcriptomic functional reprogramming in dendritic cells. *Science Advances* (2021) doi:10.1126/sciadv.abb9965.
88. Worbs, T., Hammerschmidt, S. I. & Förster, R. Dendritic cell migration in health and disease. *Nature Reviews Immunology* (2017) doi:10.1038/nri.2016.116.
89. Pulendran, B. The varieties of immunological experience: Of pathogens, stress, and dendritic cells. *Annual Review of Immunology* (2015) doi:10.1146/annurev-immunol-020711-075049.
90. Manetti, R. *et al.* Interleukin 12 induces stable priming for interferon 3'(ifn-3") production during differentiation of human t helper (th) cells and transient ifn-3' production in established th2 cell clones. *Journal of Experimental Medicine* (1994) doi: 10.1084/jem.179.4.1273.

91. Mullen, A. C. *et al.* Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science* (2001) doi:10.1126/science.1059835.
92. Prout, M. S., Kyle, R. L., Ronchese, F. & Le Gros, G. IL-4 is a key requirement for IL-4- and IL-4/IL-13-expressing CD4 Th2 subsets in lung and skin. *Frontiers in Immunology* (2018) doi:10.3389/fimmu.2018.01211.
93. Fitzsimmons, C. M., Falcone, F. H. & Dunne, D. W. Helminth allergens, parasite-specific IgE, and its protective role in human immunity. *Frontiers in Immunology* (2014) doi:10.3389/fimmu.2014.00061.
94. Dong, C. & Flavell, R. A. Control of T helper cell differentiation--in search of master genes. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* (2000) doi:10.1126/stke.2000.49.pe1.
95. Jankovic, D. *et al.* In the absence of IL-12, CD4+ T cell responses to intracellular pathogens fail to default to a Th2 pattern and are host protective in an IL-10/- setting. *Immunity* (2002) doi:10.1016/S1074-7613(02)00278-9.
96. Kaiser, M. M. M. *et al.* Dectin-1/2-induced autocrine PGE<sub>2</sub> signaling licenses dendritic cells to prime Th2 responses. *PLoS Biology* (2018) doi:10.1371/journal.pbio.2005504.
97. Harrington, L. E. *et al.* Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature Immunology* (2005) doi:10.1038/ni1254.
98. Wu, X., Tian, J. & Wang, S. Insight into non-pathogenic Th17 cells in autoimmune diseases. *Frontiers in Immunology* (2018) doi:10.3389/fimmu.2018.01112.
99. Zhao, Y., Liu, Z., Qin, L., Wang, T. & Bai, O. Insights into the mechanisms of Th17 differentiation and the Yin-Yang of Th17 cells in human diseases. *Molecular Immunology* (2021) doi:10.1016/j.molimm.2021.03.010.
100. McGeachy, M. J. *et al.* The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nature Immunology* (2009) doi:10.1038/ni.1698.

101. Langrish, C. L. *et al.* IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *Journal of Experimental Medicine* (2005) doi:10.1084/jem.20041257.
102. Chung, Y. *et al.* Critical Regulation of Early Th17 Cell Differentiation by Interleukin-1 Signaling. *Immunity* (2009) doi:10.1016/j.immuni.2009.02.007.
103. Wu, B. & Wan, Y. Molecular control of pathogenic Th17 cells in autoimmune diseases. *International Immunopharmacology* (2020) doi:10.1016/j.intimp.2020.106187.
104. Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M. & Kuchroo, V. K. IL-17 and Th17 cells. *Annual Review of Immunology* (2009) doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132710.
105. Stockinger, B. & Omenetti, S. The dichotomous nature of T helper 17 cells. *Nature Reviews Immunology* (2017) doi:10.1038/nri.2017.50.
106. Josefowicz, S. Z., Lu, L. F. & Rudensky, A. Y. Regulatory T cells: Mechanisms of differentiation and function. *Annual Review of Immunology* (2012) doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623.
107. Thornton, A. M. *et al.* Expression of Helios, an Ikaros Transcription Factor Family Member, Differentiates Thymic-Derived from Peripherally Induced Foxp3 + T Regulatory Cells . *The Journal of Immunology* (2010) doi:10.4049/jimmunol.0904028.
108. Chen, W. J. *et al.* Conversion of Peripheral CD4+CD25- Naive T Cells to CD4+CD25+ Regulatory T Cells by TGF- $\beta$  Induction of Transcription Factor Foxp3. *Journal of Experimental Medicine* (2003) doi:10.1084/jem.20030152.
109. Fantini, M. C. *et al.* Cutting Edge: TGF- $\beta$  Induces a Regulatory Phenotype in CD4 + CD25 – T Cells through Foxp3 Induction and Down-Regulation of Smad7 . *The Journal of Immunology* (2004) doi:10.4049/jimmunol.172.9.5149.
110. Jones, A. *et al.* Immunomodulatory Functions of BTLA and HVEM Govern Induction of Extrathymic Regulatory T Cells and Tolerance by Dendritic Cells. *Immunity* (2016) doi:10.1016/j.immuni.2016.10.008.

111. Guilliams, M. *et al.* Skin-draining lymph nodes contain dermis-derived CD103-dendritic cells that constitutively produce retinoic acid and induce Foxp3 + regulatory T cells. *Blood* (2010) doi:10.1182/blood-2009-09-245274.
112. Sun, C. M. *et al.* Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *Journal of Experimental Medicine* (2007) doi:10.1084/jem.20070602.
113. Crotty, S. T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. *Immunity* (2019) doi:10.1016/j.immuni.2019.04.011.
114. Choi, Y. S. *et al.* ICOS Receptor Instructs T Follicular Helper Cell versus Effector Cell Differentiation via Induction of the Transcriptional Repressor Bcl6. *Immunity* (2011) doi:10.1016/j.immuni.2011.03.023.
115. Vogelzang, A. *et al.* A Fundamental Role for Interleukin-21 in the Generation of T Follicular Helper Cells. *Immunity* (2008) doi:10.1016/j.immuni.2008.06.001.
116. Chen, D. S. & Mellman, I. Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. *Immunity* (2013) doi:10.1016/j.immuni.2013.07.012.
117. Gardner, A., de Mingo Pulido, Á. & Ruffell, B. Dendritic Cells and Their Role in Immunotherapy. *Frontiers in Immunology* (2020) doi:10.3389/fimmu.2020.00924.
118. Wculek, S. K. *et al.* Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology* (2020) doi: 10.1038/s41577-019-0210-z.
119. Bol, K. F., Schreiber, G., Gerritsen, W. R., De Vries, I. J. M. & Figdor, C. G. Dendritic cell-based immunotherapy: State of the art and beyond. *Clinical Cancer Research* (2016) doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-1399.
120. Tanyi, J. L. *et al.* Personalized cancer vaccine effectively mobilizes antitumor T cell immunity in ovarian cancer. *Science Translational Medicine* (2018) doi:10.1126/scitranslmed.aao5931.
121. Kantoff, P. W. *et al.* Sipuleucel-T Immunotherapy for Castration-Resistant Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine* (2010)



- doi:10.1056/nejmoa1001294.
122. Sabado, R. L., Balan, S. & Bhardwaj, N. Dendritic cell-based immunotherapy. *Cell Research* (2017) doi:10.1038/cr.2016.157.
  123. Steinman, R. M. Decisions about dendritic cells: Past, present, and future. *Annual Review of Immunology* (2012) doi:10.1146/annurev-immunol-100311-102839.
  124. Rowshanravan, B., Halliday, N. & Sansom, D. M. CTLA-4: A moving target in immunotherapy. *Blood* (2018) doi:10.1182/blood-2017-06-741033.
  125. Flies, D. B. *et al.* Coinhibitory receptor PD-1H preferentially suppresses CD4+ T cell-mediated immunity. *Journal of Clinical Investigation* (2014) doi:10.1172/JCI74589.
  126. Mpekris, F. *et al.* Combining microenvironment normalization strategies to improve cancer immunotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2020) doi:10.1073/pnas.1919764117.
  127. Huang, Y., Goel, S., Duda, D. G., Fukumura, D. & Jain, R. K. Vascular normalization as an emerging strategy to enhance cancer immunotherapy. *Cancer Research* (2013) doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-4354.
  128. Munn, L. L. & Jain, R. K. Vascular regulation of antitumor immunity. *Science* (2019) doi:10.1126/science.aaw7875.
  129. Abou Khouzam, R. *et al.* Tumor Hypoxia Regulates Immune Escape/Invasion: Influence on Angiogenesis and Potential Impact of Hypoxic Biomarkers on Cancer Therapies. *Frontiers in Immunology* (2021) doi:10.3389/fimmu.2020.613114.
  130. Vandenberg, L., Belmans, J., Van Woensel, M., Riva, M. & Van Gool, S. W. Exploiting the immunogenic potential of cancer cells for improved dendritic cell vaccines. *Frontiers in Immunology* (2016) doi: 10.3389/fimmu.2015.00663.
  131. Wculek, S. K. *et al.* Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology* (2020) doi:10.1038/s41577-019-0210-z.

132. Vandenberg, L. *et al.* Irradiation of necrotic cancer cells, employed for pulsing dendritic cells (DCs), potentiates DC vaccine-induced antitumor immunity against high-grade glioma. *OncolImmunology* (2016) doi: 10.1080/2162402X.2015.1083669.
133. Hatfield, P. *et al.* Optimization of Dendritic Cell Loading With Tumor Cell Lysates for Cancer Immunotherapy. *J Immunother* (2008) doi: 10.1097/CJI.0b013e31818213df.
134. Lamberti, M. J. *et al.* Dendritic cells and immunogenic cancer cell death: A combination for improving antitumor immunity. *Pharmaceutics* (2020) doi:10.3390/pharmaceutics12030256.
135. Kotera, Y., Shimizu, K. & Mulé, J. J. Comparative analysis of necrotic and apoptotic tumor cells as a source of antigen(s) in dendritic cell-based immunization. *Cancer Research* (2001) doi: 15;61(22):8105-9.
136. Hoffmann, T. K., Meidenbauer, N., Dworacki, G., Kanaya, H. & Whiteside, T. L. Generation of tumor-specific T lymphocytes by cross-priming with human dendritic cells ingesting apoptotic tumor cells. *Cancer Research* (2000) doi: 1;60(13):3542-9.
137. Fucikova, J. *et al.* Detection of immunogenic cell death and its relevance for cancer therapy. *Cell Death and Disease* (2020) doi:10.1038/s41419-020-03221-2.
138. Kepp, O. *et al.* Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death. (2014) doi:10.4161/21624011.2014.955691.
139. Galluzzi, L. *et al.* Consensus guidelines for the definition, detection and interpretation of immunogenic cell death. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* (2020) doi:10.1136/jitc-2019-000337.
140. Draube, A. *et al.* Dendritic Cell Based Tumor Vaccination in Prostate and Renal Cell Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. doi:10.1371/journal.pone.0018801.
141. Massa, C., Thomas, C., Wang, E., Marincola, F. & Seliger, B. Different maturation

- cocktails provide dendritic cells with different chemoattractive properties. *Journal of Translational Medicine* (2015) doi:10.1186/s12967-015-0528-7.
142. Lee, A. W. *et al.* A clinical grade cocktail of cytokines and PGE 2 results in uniform maturation of human monocyte-derived dendritic cells: implications for immunotherapy. *Vaccine* (2002) doi: 10.1016/s0264-410x(02)00382-1.
  143. Tugues, S. *et al.* New insights into IL-12-mediated tumor suppression. *Cell Death and Differentiation* (2015) doi:10.1038/cdd.2014.134.
  144. TrabANELLI, S. *et al.* PGE2-induced IDO1 inhibits the capacity of fully mature DCs to elicit an in vitro antileukemic immune response. *Journal of Immunology Research* (2015) doi: 10.1155/2015/253191.
  145. Scandella, E., Men, Y., Gillessen, S., Förster, R. & Groettrup, M. Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* (2002) doi:10.1182/blood-2001-11-0017.
  146. Gierlich, P. *et al.* Prostaglandin E2 in a TLR3- and 7/8-agonist-based DC maturation cocktail generates mature, cytokine-producing, migratory DCs but impairs antigen cross-presentation to CD8+ T cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy* (2020) doi:10.1007/s00262-019-02470-1.
  147. Ammi, R. *et al.* Poly(I:C) as cancer vaccine adjuvant: Knocking on the door of medical breakthroughs. *Pharmacology and Therapeutics* (2015) doi:10.1016/j.pharmthera.2014.09.010.
  148. Mailliard, R. B. *et al.*  $\alpha$ -type-1 polarized dendritic cells: A novel immunization tool with optimized CTL-inducing activity. *Cancer Research* (2004) doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1261.
  149. Anguille, S., Smits, E. L., Lion, E., Van Tendeloo, V. F. & Berneman, Z. N. Clinical use of dendritic cells for cancer therapy. *The Lancet Oncology* (2014) doi:10.1016/S1470-2045(13)70585-0.
  150. Adams, S. *et al.* Topical TLR7 agonist imiquimod can induce immune-mediated rejection of skin metastases in patients with breast cancer. *Clinical Cancer*

- Research* (2012) doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-1149.
151. Gierlich, P. *et al.* Prostaglandin E2 in a TLR3- and 7/8-agonist-based DC maturation cocktail generates mature, cytokine-producing, migratory DCs but impairs antigen cross-presentation to CD8+ T cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy* (2020) doi: 10.1007/s00262-019-02470-1.
  152. Robinson, R. A. *et al.* A phase I-II trial of multiple-dose polyribinosinic-polyribocytidylic acid in patients with leukemia or solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute* (1976) doi: 10.1093/jnci/57.3.599.
  153. Barreiro Arcos, M. L., Gorelik, G., Klecha, A., Genaro, A. M. & Cremaschi, G. A. Thyroid hormones increase inducible nitric oxide synthase gene expression downstream from PKC- $\zeta$  in murine tumor T lymphocytes. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* (2006) doi:10.1152/ajpcell.00316.2005.
  154. Cayrol, F. *et al.* Integrin  $\alpha\beta 3$  acting as membrane receptor for thyroid hormones mediates angiogenesis in malignant T cells. *Blood* (2015) doi:10.1182/blood-2014-07-587337.
  155. Cremaschi, G. A., Cayrol, F., Sterle, H. A., Díaz Flaqué, M. C. & Barreiro Arcos, M. L. Thyroid hormones and their membrane receptors as therapeutic targets for T cell lymphomas. *Pharmacological Research* (2016) doi:10.1016/j.phrs.2016.02.001.
  156. Cayrol, F., Sterle, H. A., Flaqué, M. C. D., Arcos, M. L. B. & Cremaschi, G. A. Non-genomic actions of thyroid hormones regulate the growth and angiogenesis of T cell lymphomas. *Frontiers in Endocrinology* (2019) doi:10.3389/fendo.2019.00063.
  157. Mihara, S. *et al.* Effects of thyroid hormones on apoptotic cell death of human lymphocytes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* (1999) doi:10.1210/jc.84.4.1378.
  158. Sera, N. *et al.* Fas/FasL mediated apoptosis of thyrocytes in Graves' disease. *Clinical and Experimental Immunology* (2001) doi:10.1046/j.1365-2249.2001.01476.x.

159. Hastings, M. L., Milcarek, C., Martincic, K., Peterson, M. L. & Munroe, S. H. Expression of the thyroid hormone receptor gene, *erbA $\alpha$* , in B lymphocytes: alternative mRNA processing is independent of differentiation but correlates with antisense RNA levels. *Nucleic Acids Research* (1997) doi:10.1093/nar/25.21.4296.
160. Montecino-Rodriguez, E., Clark, R., Johnson, A., Collins, L. & Dorshkind, K. Defective B Cell Development in Snell Dwarf (*dw/dw*) Mice Can Be Corrected by Thyroxine Treatment. *Journal of immunology* (1996)
161. Montecino-Rodriguez, E., Clark, R. G., Powell-Braxton, L. & Dorshkind, K. Primary B cell development is impaired in mice with defects of the pituitary/thyroid axis. *Journal of immunology* (1997).
162. Park, S., Zhu, X., Kim, M., Zhao, L. & Cheng, S. Y. Thyroid hormone receptor  $\alpha 1$  mutants impair b lymphocyte development in a mouse model. *Thyroid* (2021) doi:10.1089/thy.2019.0782.
163. Tan, T. L., Rajeswaran, H., Haddad, S., Shahi, A. & Parvizi, J. Increased Risk of Periprosthetic Joint Infections in Patients With Hypothyroidism Undergoing Total Joint Arthroplasty. *Journal of Arthroplasty* (2016) doi:10.1016/j.arth.2015.10.028.
164. Hao, C. H., Chapital, A. D. & Yu, M. Hypothyroidism and adrenal insufficiency in sepsis and hemorrhagic shock. *Archives of Surgery* (2004) doi:10.1001/archsurg.139.11.1199.
165. Afhami, S. *et al.* Assessment of the factors involving in the development of hypothyroidism in HIV-infected patients: A case-control study. *Infection* (2007) doi:10.1007/s15010-007-6163-3.
166. Fabris, N., Mocchegiani, E. & Provinciali, M. Pituitary-thyroid axis and immune system: A reciprocal neuroendocrine-Immune interaction. *Hormone Research in Paediatrics* (1995) doi:10.1159/000184234.
167. Roksandić, D. *et al.* Stereological and immunohistochemical study of the spleen in hypothyroid juvenile rats. *Acta Veterinaria* (2015) doi:10.1515/acve-2015-

0021.

168. Stagi, S. *et al.* Undetectable serum IgA and low IgM concentration in children with congenital hypothyroidism. *Clinical Immunology* (2005) doi:10.1016/j.clim.2005.03.003.
169. Nandakumar, D. N. *et al.* Activation of NF- $\kappa$ B in lymphocytes and increase in serum immunoglobulin in hyperthyroidism: Possible role of oxidative stress. *Immunobiology* (2008) doi:10.1016/j.imbio.2007.10.005.
170. Robinson, M. V., Obut, T. A., Mel'Nikova, E. V. & Trufakin, V. A. Effects of thyroxin and mercazolyl on immunological parameters of blood lymphocytes and lymphoid organs. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* (2013) doi:10.1007/s10517-013-2319-6.
171. van der Spek, A. H., Fliers, E. & Boelen, A. Thyroid hormone metabolism in innate immune cells. *Journal of Endocrinology* (2017) doi:10.1530/JOE-16-0462.
172. Videla, L. A., Correa, L., Rivera, M. & Sir, T. Zymosan-induced luminol-amplified chemiluminescence of whole blood phagocytes in experimental and human hyperthyroidism. *Free Radical Biology and Medicine* (1993) doi:10.1016/0891-5849(93)90149-O.
173. Fernández, V. & Videla, L. A. On the mechanism of thyroid hormone-induced respiratory burst activity in rat polymorphonuclear leukocytes. *Free Radical Biology and Medicine* (1995) doi:10.1016/0891-5849(95)00016-Q.
174. Szabó, J. *et al.* Parameters of respiratory burst and arachidonic acid metabolism in polymorphonuclear granulocytes from patients with various thyroid diseases. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes* (1996) doi:10.1055/s-0029-1211440.
175. Magsino, C. H. *et al.* Effect of triiodothyronine on reactive oxygen species generation by leukocytes, indices of oxidative damage, and antioxidant reserve. *Metabolism: Clinical and Experimental* (2000) doi:10.1053/meta.2000.6263.
176. Van Der Spek, A. H. *et al.* The thyroid hormone inactivating enzyme type 3

- deiodinase is present in bactericidal granules and the cytoplasm of human neutrophils. *Endocrinology* (2016) doi:10.1210/en.2016-1103.
177. Van Der Spek, A. H. *et al.* Regulation of intracellular triiodothyronine is essential for optimal macrophage function. *Endocrinology* (2018) doi:10.1210/en.2018-00053.
  178. Provinciali, M., Muzzioli, M. & Fabris, N. Thyroxine-dependent modulation of natural killer activity. *Journal of Experimental Pathology* (1987).
  179. Mahoney, M. X., Currier, N. L. & Miller, S. C. Natural killer cell levels in older adult mice are gender-dependent: Thyroxin is a gender-independent natural killer cell stimulant. *Natural Immunity* (1998) doi:10.1159/000069441.
  180. Rosa, L. F. B. P. C., Safi, D. A. & Curi, R. Effect of hypo- and hyperthyroidism on the function and metabolism of macrophages in rats. *Cell Biochemistry and Function* (1995) doi:10.1002/cbf.290130211.
  181. Chen, Y. *et al.* Thyroid hormone enhances nitric oxide-mediated bacterial clearance and promotes survival after meningococcal infection. *PLoS ONE* (2012) doi:10.1371/journal.pone.0041445.
  182. El-Shaikh, K. A., Gabry, M. S. & Othman, G. A. Recovery of age-dependent immunological deterioration in old mice by thyroxine treatment. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* (2006) doi:10.1111/j.1439-0396.2005.00602.x.
  183. Perrotta, C. *et al.* The thyroid hormone triiodothyronine controls macrophage maturation and functions: Protective role during inflammation. *American Journal of Pathology* (2014) doi:10.1016/j.ajpath.2013.10.006.
  184. Kwakkkel, J. *et al.* A novel role for the thyroid hormone-activating enzyme type 2 deiodinase in the inflammatory response of macrophages. *Endocrinology* (2014) doi:10.1210/en.2013-2066.
  185. Mascanfroni, I. *et al.* Control of dendritic cell maturation and function by triiodothyronine. *The FASEB Journal* (2008) doi:10.1096/fj.07-8652com.

186. Mascanfroni, I. D. *et al.* Nuclear factor (NF)- $\kappa$ B-dependent thyroid hormone receptor  $\beta$ 1 expression controls dendritic cell function via Akt signaling. *Journal of Biological Chemistry* (2010) doi:10.1074/jbc.M109.071241.
187. Alamino, V. A. *et al.* Antitumor Responses Stimulated by Dendritic Cells Are Improved by Triiodothyronine Binding to the Thyroid Hormone Receptor  $\beta$ . (2015) doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-1875.
188. Montesinos, M. M. *et al.* Dexamethasone counteracts the immunostimulatory effects of triiodothyronine (T3) on dendritic cells. *Steroids* (2012) doi:10.1016/j.steroids.2011.10.006.
189. Dedecjus, M., Stasiolek, M., Brzezinski, J., Selmaj, K. & Lewinski, A. Thyroid hormones influence human dendritic cells' phenotype, function, and subsets distribution. *Thyroid* (2011) doi:10.1089/thy.2010.0183.
190. Stasiolek, M. *et al.* Effect of L-thyroxine treatment on peripheral blood dendritic cell subpopulations in patients with Hashimoto's thyroiditis. *Folia Histochemica et Cytobiologica* (2014) doi:10.5603/FHC.2014.0013.
191. van der Spek, A. H. *et al.* The thyroid hormone inactivating type 3 deiodinase is essential for optimal neutrophil function: Observations from three species. *Endocrinology* (2018) doi:10.1210/en.2017-00666.
192. Gigena, N. *et al.* Dissecting thyroid hormone transport and metabolism in dendritic cells. *Journal of Endocrinology* (2017) doi:10.1530/JOE-16-0423.
193. Alamino, V. A. *et al.* Dendritic cells exposed to triiodothyronine deliver pro-inflammatory signals and amplify IL-17-driven immune responses. *Cellular Physiology and Biochemistry* (2019) doi:10.33594/000000025.
194. Fucikova, J., Palova-Jelinkova, L., Bartunkova, J. & Spisek, R. Induction of tolerance and immunity by dendritic cells: Mechanisms and clinical applications. *Frontiers in Immunology* (2019) doi:10.3389/fimmu.2019.02393.
195. Berhanu, A., Huang, J., Alber, S. M., Watkins, S. C. & Storkus, W. J. Combinational FLT3 ligand and granulocyte macrophage colony-stimulating



- factor treatment promotes enhanced tumor infiltration by dendritic cells and antitumor CD8<sup>+</sup> T-cell cross-priming but is ineffective as a therapy. *Cancer Research* (2006) doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2384.
196. Hildner, K. *et al.* Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8<sup>+</sup> dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* (2008) doi:10.1126/science.1164206.
197. Alamino, V. A., Montesinos, M. M., Rabinovich, G. A. & Pellizas, C. G. The thyroid hormone triiodothyronine reinvigorates dendritic cells and potentiates anti-tumor immunity. *Oncolmmunology* (2016) doi:10.1080/2162402X.2015.1064579.
198. Förster, R. *et al.* CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* (1999) doi:10.1016/S0092-8674(00)80059-8.
199. Fridman, W. H., Pagès, F., Sauts-Fridman, C. & Galon, J. The immune contexture in human tumours: Impact on clinical outcome. *Nature Reviews Cancer* (2012) doi:10.1038/nrc3245.
200. Haas, J. D. *et al.* Development of Interleukin-17-Producing  $\gamma\delta$  T Cells Is Restricted to a Functional Embryonic Wave. *Immunity* (2012) doi:10.1016/j.immuni.2012.06.003.
201. Zambrano, A. *et al.* The thyroid hormone receptor  $\beta$  induces DNA damage and premature senescence. *Journal of Cell Biology* (2014) doi:10.1083/jcb.201305084.
202. Forini, F. *et al.* Amiodarone inhibits the 3,5,3'-triiodothyronine-dependent increase of sodium/potassium adenosine triphosphatase activity and concentration in human atrial myocardial tissue. *Thyroid* (2004) doi:10.1089/1050725041517084.
203. Fagner, P., Ladram, A. & De Leon, S. A. Triiodothyronine down-regulates thyrotropin-releasing hormone (TRH) synthesis and decreases pTRH-(160-169) and insulin releases from fetal rat islets in culture. *Endocrinology* (1999) doi:10.1210/endo.140.9.6952.

204. Fragner, P., Lee, S. L. & Aratan de Leon, S. Differential regulation of the TRH gene promoter by triiodothyronine and dexamethasone in pancreatic islets. *Journal of Endocrinology* (2001) doi:10.1677/joe.0.1700091.
205. van Genderen, H. *et al.* In vitro measurement of cell death with the annexin A5 affinity assay. *Nature Protocols* (2006) doi:10.1038/nprot.2006.55.
206. Zhang, M. *et al.* Interleukin-15 combined with an anti-CD40 antibody provides enhanced therapeutic efficacy for murine models of colon cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2009) doi:10.1073/pnas.0902637106.
207. di Scala, M. *et al.* Identification of IFN- $\gamma$ -producing T cells as the main mediators of the side effects associated to mouse interleukin-15 sustained exposure. *Oncotarget* (2016) doi:10.18632/oncotarget.10264.
208. Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* (1987) doi:10.1016/0003-2697(87)90021-2.
209. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* (2001) doi:10.1006/meth.2001.1262.
210. Posch, W., Lass-Flörl, C. & Wilflingseder, D. Generation of human monocyte-derived dendritic cells from whole blood. *Journal of Visualized Experiments* (2016) doi:10.3791/54968.
211. Nair, S., Archer, G. E. & Tedder, T. F. Isolation and generation of human dendritic cells. *Current Protocols in Immunology* (2012) doi:10.1002/0471142735.im0732s99.
212. de Almeida, M. C., Silva, A. C., Barral, A. & Barral Netto, M. A simple method for human peripheral blood monocyte isolation. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* (2000) doi:10.1590/s0074-02762000000200014.
213. Constantino, J., Gomes, C., Falcão, A., Cruz, M. T. & Neves, B. M. Antitumor

- dendritic cell–based vaccines: lessons from 20 years of clinical trials and future perspectives. *Translational Research* (2016) doi:10.1016/j.trsl.2015.07.008.
214. González, F. E. *et al.* Tumor cell lysates as immunogenic sources for cancer vaccine design. *Human Vaccines and Immunotherapeutics* (2014) doi:10.4161/21645515.2014.982996.
215. Ip, W.-K. & Lau, Y.-L. Distinct Maturation of, but Not Migration between, Human Monocyte-Derived Dendritic Cells upon Ingestion of Apoptotic Cells of Early or Late Phases. *The Journal of Immunology* (2004) doi:10.4049/jimmunol.173.1.189.
216. Srenathan, U., Steel, K. & Taams, L. S. IL-17+ CD8+ T cells: Differentiation, phenotype and role in inflammatory disease. *Immunology Letters* (2016) doi: 10.1016/j.imlet.2016.05.001.
217. Dong, B. *et al.* Tumor cell lysate induces the immunosuppression and apoptosis of mouse immunocytes. *Molecular Medicine Reports* (2014) doi:10.3892/mmr.2014.2606.
218. Murugaiyan, G. & Saha, B. Protumor vs Antitumor Functions of IL-17. *The Journal of Immunology* (2009) doi:10.4049/jimmunol.0901017.
219. Bastid, J., Dejou, C., Docquier, A. & Bonnefoy, N. The Emerging Role of the IL-17B/IL-17RB Pathway in Cancer. *Frontiers in Immunology* (2020) doi:10.3389/fimmu.2020.00718.
220. Zhao, J., Chen, X., Herjan, T. & Li, X. The role of interleukin-17 in tumor development and progression. *Journal of Experimental Medicine* (2020) doi:10.1084/jem.20190297.
221. Lertkiatmongkol, P., Liao, D., Mei, H., Hu, Y. & Newman, P. J. Endothelial functions of PECAM-1 (CD31). *Current Opinion in Hematology* (2016) doi: 10.1097/MOH.0000000000000239.
222. Pan, B. *et al.* Interleukin-17 promotes angiogenesis by stimulating VEGF production of cancer cells via the STAT3/GIV signaling pathway in non-small-cell

- lung cancer. *Scientific Reports* (2015) doi:10.1038/srep16053.
223. Huang, Q. *et al.* IL-17 Promotes Angiogenic Factors IL-6, IL-8, and Vegf Production via Stat1 in Lung Adenocarcinoma. *Scientific Reports* (2016) doi:10.1038/srep36551.
224. Xu, X. *et al.* IL-17 regulates the expression of major histocompatibility complex II and VEGF in DLBCL mice on tumor growth. *Aging Pathobiology and Therapeutics* (2020) doi:10.31491/apt.2020.06.020.
225. Navarro-Barriuso, J. *et al.* MAP7 and MUCL1 are biomarkers of Vitamin D3-induced tolerogenic dendritic cells in multiple sclerosis patients. *Frontiers in Immunology* (2019) doi: 10.3389/fimmu.2019.01251.
226. Emens, L. A. *et al.* Cancer immunotherapy: Opportunities and challenges in the rapidly evolving clinical landscape. *European Journal of Cancer* (2017) doi:10.1016/j.ejca.2017.01.035.
227. Butterfield, L. H. Dendritic cells in cancer immunotherapy clinical trials: Are we making progress? *Frontiers in Immunology* (2013) doi: 10.3389/fimmu.2013.00454.
228. Mastelic-Gavillet, B., Balint, K., Boudousquie, C., Gannon, P. O. & Kandalaft, L. E. Personalized dendritic cell vaccines-recent breakthroughs and encouraging clinical results. *Frontiers in Immunology* (2019) doi: 10.3389/fimmu.2019.00766.
229. Dhodapkar, M. V. *et al.* Rapid generation of broad T-cell immunity in humans after a single injection of mature dendritic cells. *Journal of Clinical Investigation* (1999) doi:10.1172/JCI6909.
230. Harari, A., Graciotti, M., Bassani-Sternberg, M. & Kandalaft, L. E. Antitumour dendritic cell vaccination in a priming and boosting approach. *Nature Reviews Drug Discovery* (2020) doi:10.1038/s41573-020-0074-8.
231. Mastelic-Gavillet, B., Balint, K., Boudousquie, C., Gannon, P. O. & Kandalaft, L. E. Personalized dendritic cell vaccines-recent breakthroughs and encouraging clinical results. *Frontiers in Immunology* (2019) doi:10.3389/fimmu.2019.00766.

232. Van Brussel, I., Berneman, Z. N. & Cools, N. Optimizing dendritic cell-based immunotherapy: Tackling the complexity of different arms of the immune system. *Mediators of Inflammation* (2012) doi:10.1155/2012/690643.
233. Perez, C. R. & De Palma, M. Engineering dendritic cell vaccines to improve cancer immunotherapy. *Nature Communications* (2019) doi:10.1038/s41467-019-13368-y.
234. Lim, T. S. *et al.* CD80 and CD86 Differentially Regulate Mechanical Interactions of T-Cells with Antigen-Presenting Dendritic Cells and B-Cells. *PLoS ONE* (2012) doi:10.1371/journal.pone.0045185.
235. Datta, J. *et al.* Rationale for a multimodality strategy to enhance the efficacy of dendritic cell-based cancer immunotherapy. *Frontiers in Immunology* (2015) doi:10.3389/fimmu.2015.00271.
236. Manetti, R. *et al.* Interleukin 12 Induces Stable Priming for Interferon 3' (IFN-3") Production During Differentiation of Human T Helper (Th) Cells and Transient IFN-3' Production in Established Th2 Cell Clones. <http://rupress.org/jem/article-pdf/179/4/1273/1104789/1273.pdf> (1994).
237. Tugues, S. *et al.* New insights into IL-12-mediated tumor suppression. *Cell Death and Differentiation* (2015) doi: 10.1038/cdd.2014.134.
238. Borst, J., Ahrends, T., Bąbała, N., Melief, C. J. M. & Kastenmüller, W. CD4+ T cell help in cancer immunology and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology* (2018) doi:10.1038/s41577-018-0044-0.
239. Chang, J. *et al.* IL-12 Priming during In Vitro Antigenic Stimulation Changes Properties of CD8 T Cells and Increases Generation of Effector and Memory Cells. *The Journal of Immunology* (2004) doi: 10.4049/jimmunol.172.5.2818.
240. Okada, H. *et al.* Induction of CD8+ T-cell responses against novel glioma-associated antigen peptides and clinical activity by vaccinations with  $\alpha$ -type 1 polarized dendritic cells and polyinosinic-polycytidylic acid stabilized by lysine and carboxymethylcellulose in patient. *Journal of Clinical Oncology* (2011) doi:10.1200/JCO.2010.30.7744.

241. Carreno, B. M. *et al.* IL-12p70-producing patient DC vaccine elicits Tc1-polarized immunity. *Journal of Clinical Investigation* (2013) doi:10.1172/JCI68395.
242. Martinez, G. J., Nurieva, R. I., Yang, X. O. & Dong, C. Regulation and function of proinflammatory TH17 cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* (2008) doi:10.1196/annals.1443.021.
243. Xi, Y. & Xu, P. Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040. *Translational Oncology* (2021) doi:10.1016/j.tranon.2021.101174.
244. Howlader N *et al.* *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016*. National Cancer Institute (2019).
245. Zhang, T. & Sentman, C. L. Cancer immunotherapy using a bispecific NK receptor fusion protein that engages both T cells and tumor cells. *Cancer Research* (2011) doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-3200.
246. Zippelius, A., Schreiner, J., Herzig, P. & Muller, P. Induced PD-L1 expression mediates acquired resistance to agonistic anti-CD40 treatment. *Cancer Immunology Research* (2015) doi:10.1158/2326-6066.CIR-14-0226.
247. Woo, S. R. *et al.* Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape. *Cancer Research* (2012) doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1620.
248. Efremova, M. *et al.* Targeting immune checkpoints potentiates immunoediting and changes the dynamics of tumor evolution. *Nature Communications* (2018) doi:10.1038/s41467-017-02424-0.
249. Cancer Genome Atlas Network, T. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. (2012) doi:10.1038/nature11252.
250. Kirkwood, J. M. *et al.* Immunotherapy of Cancer in 2012. doi:10.3322/caac.20132.
251. Laidlaw, B. J., Craft, J. E. & Kaech, S. M. The multifaceted role of CD4+ T cells in CD8+ T cell memory. *Nature Reviews Immunology* (2016) doi: 10.1038/nri.2015.10.

252. Basu, A. *et al.* Differentiation and Regulation of TH Cells: A Balancing Act for Cancer Immunotherapy. *Frontiers in immunology* (2021) doi:10.3389/fimmu.2021.669474.
253. Perret, R. & Ronchese, F. Memory T cells in cancer immunotherapy: Which CD8+ T-cell population provides the best protection against tumours? *Tissue Antigens* (2008) doi:10.1111/j.1399-0039.2008.01088.x.
254. Raskov, H., Orhan, A., Christensen, J. P. & Gögenur, I. Cytotoxic CD8+ T cells in cancer and cancer immunotherapy. *British Journal of Cancer* (2021) doi:10.1038/s41416-020-01048-4.
255. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, et al. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition. T-cell receptor gene rearrangement. *New York: Garland Science;* (2001).
256. Martini, M. *et al.* IFN- $\gamma$ -mediated upmodulation of MHC class I expression activates tumor-specific immune response in a mouse model of prostate cancer. *Vaccine* (2010) doi:10.1016/j.vaccine.2010.03.007.
257. Harvat, B. L., Seth, P. & Jetten, A. M. The role of p27(Kip1) in gamma interferon-mediated growth arrest of mammary epithelial cells and related defects in mammary carcinoma cells. *Oncogene* (1997) doi:10.1038/sj.onc.1201055.
258. Chin, Y. E. *et al.* Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 Mediated by STAT1. *Science* (1996) doi:10.1126/science.272.5262.719.
259. Chawla-Sarkar, M. *et al.* Apoptosis and interferons: Role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis* (2003) doi:10.1023/A:1023668705040.
260. Schreiber, R. D., Old, L. J. & Smyth, M. J. Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* (2011) doi:10.1126/science.1203486.
261. Zaidi, M. R. The Interferon-Gamma Paradox in Cancer. *Journal of Interferon and*

- Cytokine Research* (2019) doi:10.1089/jir.2018.0087.
262. Mojic, M., Takeda, K. & Hayakawa, Y. The dark side of IFN- $\gamma$ : Its role in promoting cancer immunoevasion. *International Journal of Molecular Sciences* (2018) doi:10.3390/ijms19010089.
263. Zaidi, M. R., Davis, S., Noonan, F. P., Graff-cherry, C. & Hawley, T. S. Interferon- $\gamma$  links UV to melanocyte activation and promotes melanomagenesis. *Nature* (2011) doi: 10.1038/nature09666.
264. Bermejo, D. A. *et al.* Trypanosoma cruzi trans-sialidase initiates a program independent of the transcription factors ROR $\gamma$ t and Ahr that leads to IL-17 production by activated B cells. *Nature Immunology* (2013) doi:10.1038/ni.2569.
265. Chitadze, G., Oberg, H. H., Wesch, D. & Kabelitz, D. The Ambiguous Role of  $\gamma\delta$  T Lymphocytes in Antitumor Immunity. *Trends in Immunology* (2017) doi:10.1016/j.it.2017.06.004.
266. Kryczek, I., Wei, S., Szeliga, W., Vatan, L. & Zou, W. Endogenous IL-17 contributes to reduced tumor growth and metastasis. *Blood* (2009) doi:10.1182/blood-2008-09-177360.
267. Vitiello, G. A. & Miller, G. Targeting the interleukin-17 immune axis for cancer immunotherapy. *Journal of Experimental Medicine* (2020) doi:10.1084/jem.20190456.
268. Lotti, F. *et al.* Chemotherapy activates cancer-associated fibroblasts to maintain colorectal cancer-initiating cells by IL-17A. *Journal of Experimental Medicine* (2013) doi:10.1084/jem.20131195.
269. Sui, G., Qiu, Y., Yu, H., Kong, Q. & Zhen, B. Interleukin-17 promotes the development of cisplatin resistance in colorectal cancer. *Oncology Letters* (2019) doi:10.3892/ol.2018.9645.
270. Benevides, L. *et al.* IL17 promotes mammary tumor progression by changing the behavior of tumor cells and eliciting tumorigenic neutrophils recruitment. *Cancer Research* (2015) doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-0054.



271. Punt, S. *et al.* FoxP3+ and IL-17+ cells are correlated with improved prognosis in cervical adenocarcinoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy* (2015) doi:10.1007/s00262-015-1678-4.
272. Lin, Y. *et al.* Interleukin-17 is a favorable prognostic marker for colorectal cancer. *Clinical and Translational Oncology* (2015) doi:10.1007/s12094-014-1197-3.
273. Benchetrit, F. *et al.* Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism. *Blood* (2002) doi:10.1182/blood.V99.6.2114.
274. Martin-Orozco, N. *et al.* T Helper 17 Cells Promote Cytotoxic T Cell Activation in Tumor Immunity. *Immunity* (2009) doi:10.1016/j.immuni.2009.09.014.
275. Bowers, J. S. *et al.* Th17 cells are refractory to senescence and retain robust antitumor activity after long-term ex vivo expansion. *JCI Insight* (2017) doi:10.1172/jci.insight.90772.
276. Nuñez, S. *et al.* T helper type 17 cells contribute to anti-tumour immunity and promote the recruitment of T helper type 1 cells to the tumour. *Immunology* (2013) doi:10.1111/imm.12055.
277. Ivanov, I. I. *et al.* The Orphan Nuclear Receptor ROR $\gamma$ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells. *Cell* (2006) doi:10.1016/j.cell.2006.07.035.
278. Wang, R. *et al.* IL-17A-stimulated endothelial fatty acid  $\beta$ -oxidation promotes tumor angiogenesis. *Life Sciences* (2019) doi:10.1016/j.lfs.2019.05.030.
279. Pan, B. *et al.* Interleukin-17 levels correlate with poor prognosis and vascular endothelial growth factor concentration in the serum of patients with non-small cell lung cancer. *Biomarkers* (2015) doi:10.3109/1354750X.2015.1068853.
280. Chang, S. H. *et al.* T helper 17 cells play a critical pathogenic role in lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2014) doi:10.1073/pnas.1319051111.
281. Sherwood, L. M., Parris, E. E. & Folkman, J. Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *New England Journal of Medicine* (1971)

- doi:10.1056/nejm197111182852108.
282. Ribatti, D. Judah Folkman, a pioneer in the study of angiogenesis. *Angiogenesis* (2008) doi:10.1007/s10456-008-9092-6.
283. Zuazo-Gaztelu, I. & Casanovas, O. Unraveling the role of angiogenesis in cancer ecosystems. *Frontiers in Oncology* (2018) doi:10.3389/fonc.2018.00248.
284. Haibe, Y. *et al.* Resistance Mechanisms to Anti-angiogenic Therapies in Cancer. *Frontiers in Oncology* (2020) doi:10.3389/fonc.2020.00221.
285. Hassan Venkatesh, G. *et al.* Hypoxia increases mutational load of breast cancer cells through frameshift mutations. *Oncolmmunology* (2020) doi:10.1080/2162402X.2020.1750750.
286. Terry, S., Buart, S. & Chouaib, S. Hypoxic stress-induced tumor and immune plasticity, suppression, and impact on tumor heterogeneity. *Frontiers in Immunology* (2017) doi:10.3389/fimmu.2017.01625.
287. Huang, Y. *et al.* Improving immune-vascular crosstalk for cancer immunotherapy. doi:10.1038/nri.2017.145.
288. Zheng, R., Li, F., Li, F. & Gong, A. Targeting tumor vascularization: promising strategies for vascular normalization. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* (2021) doi:10.1007/s00432-021-03701-8.
289. Shi, Y. *et al.* Next-Generation Immunotherapies to Improve Anticancer Immunity. *Frontiers in Pharmacology* (2021) doi:10.3389/fphar.2020.566401.
290. Bagchi, S., Yuan, R. & Engleman, E. G. Immune Checkpoint Inhibitors for the Treatment of Cancer: Clinical Impact and Mechanisms of Response and Resistance. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* (2021) doi:10.1146/annurev-pathol-042020-042741.
291. Arimilli, S., Johnson, J. B., Alexander-Miller, M. A. & Parks, G. D. TLR-4 and -6 agonists reverse apoptosis and promote maturation of simian virus 5-infected human dendritic cells through NFkB-dependent pathways. *Virology* (2007) doi:10.1016/j.virol.2007.02.035.

292. Radwan, J., Babik, W., Kaufman, J., Lenz, T. L. & Winternitz, J. Advances in the Evolutionary Understanding of MHC Polymorphism. *Trends in Genetics* (2020) doi:10.1016/j.tig.2020.01.008.
293. Prabhakar, B. S., Bahn, R. S. & Smith, T. J. Current Perspective on the Pathogenesis of Graves' Disease and Ophthalmopathy. *Endocrine Reviews* (2003) doi:10.1210/er.2002-0020.
294. Mooij, P., Simons, P. J., De Haan-Meulman, M. D., De Wit, H. J. & Drexhage, H. A. 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. *Journal of Endocrinology* (1994) doi:10.1677/joe.0.1400503.
295. Tamaru, M., Matsuura, B. & Onji, M. Increased levels of serum interleukin-12 in Graves' disease. *European Journal of Endocrinology* (1999) doi:10.1530/eje.0.1410111.
296. Naranjo-Gómez, M. *et al.* Comparative study of clinical grade human tolerogenic dendritic cells. *Journal of Translational Medicine* (2011) doi:10.1186/1479-5876-9-89.
297. Navarro-Barriuso, J. *et al.* Comparative transcriptomic profile of tolerogenic dendritic cells differentiated with vitamin D3, dexamethasone and rapamycin. *Scientific Reports* (2018) doi:10.1038/s41598-018-33248-7.
298. Navarro-Barriuso, J. *et al.* MAP7 and MUCL1 are biomarkers of Vitamin D3-induced tolerogenic dendritic cells in multiple sclerosis patients. *Frontiers in Immunology* (2019) doi:10.3389/fimmu.2019.01251.
299. Cifuentes-Rius, A., Desai, A., Yuen, D., Johnston, A. P. R. & Voelcker, N. H. Inducing immune tolerance with dendritic cell-targeting nanomedicines. *Nature Nanotechnology* (2021) doi:10.1038/s41565-020-00810-2.
300. Melero, I. *et al.* Therapeutic vaccines for cancer: An overview of clinical trials. *Nature Reviews Clinical Oncology* (2014) doi:10.1038/nrclinonc.2014.111.

301. Dey, M. *et al.* Dendritic Cell–Based Vaccines that Utilize Myeloid Rather than Plasmacytoid Cells Offer a Superior Survival Advantage in Malignant Glioma. *The Journal of Immunology* (2015) doi:10.4049/jimmunol.1401607.
302. Janikashvili, N., Laemonier, N. & Katsanis, E. Personalized dendritic cell-based tumor immunotherapy. *Immunotherapy* (2010) doi:10.2217/imt.09.78.
303. Hopewell, E. L. & Cox, C. Manufacturing Dendritic Cells for Immunotherapy: Monocyte Enrichment. *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development* (2020) doi:10.1016/j.omtm.2019.12.017.

---

## 10. ABREVIATURAS

---

**AATs:** Antígenos asociados a tumor

**Acs:** Anticuerpos

**Ags:** Antígenos

**CCR:** Cáncer colorrectal

**cDCs:** Células Dendríticas convencionales

**CDP:** Precursor de Célula Dendrítica Común (del inglés *“Common DC Precursor”*)

**cMoP:** Progenitor de Monocitos Común (del inglés *“Common Monocyte Progenitor”*)

**CMPs:** Progenitores Mieloides Comunes (del inglés *“Common Myeloid Progenitors”*)

**CPA:** Células presentadoras de antígenos

**DCs:** Células Dendríticas (del inglés *“Dendritic cells”*)

**ELISA:** Enzimoimmunoensayo en fase sólida (del inglés *“Enzyme linked immunosorbent assay”*)

**GM-CSF:** Factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos (del inglés *“granulocyte-macrophage colony stimulating factor”*)

**GMP:** Progenitor de Granulocitos-Macrófagos (del inglés *“Granulocyte–Macrophage Progenitor”*)

**HSCs:** Células Madre Hematopoyéticas (del inglés *“Haematopoietic Stem cells”*)

**HTs:** Hormonas tiroideas

**huDCs:** Células Dendríticas humanas

**i.v.:** Intravenosa

**ICB:** Bloqueo de puntos de control inmunológico (del inglés *“immune checkpoint blockade”*)

## Abreviaturas

**iDC:** Célula Dendrítica inmadura

**IDO1:** Enzima indolamina 2,3-dioxigenasa-1

**IFN:** Interferón

**IL:** Interleuquina

**ILCs:** Células linfoides innatas

**iNOS:** Enzima óxido nítrico sintasa inducible

**IRF:** Factor regulador de interferón (del inglés *“Interferon regulatory factor”*)

**iTreg:** Células Th reguladoras inducibles

**Li:** Linfocitos

**LPS:** Lipopolisacárido

**LTC:** Linfocitos T citotóxicos

**M.O:** Médula ósea

**mDC:** Célula Dendrítica madura

**MDSC:** Células supresoras derivadas de mieloides (del inglés *“Myeloid-derived suppressor cell”*)

**MFI:** Intensidad de fluorescencia media (del inglés *“mean fluorescence intensity”*)

**MHC:** Complejo Mayor de Histocompatibilidad

**moDC:** Células Dendríticas derivadas de monocitos

**MPPs:** Progenitores Multipotentes (del inglés *“Multipotent Progenitors”*)

**NETs:** Trampas extracelulares de neutrófilos (del inglés *“neutrophil extracellular traps”*)

**NK:** Células asesinas naturales (del inglés *“Natural Killer”*)

**PBMC:** Células mononucleares de sangre periférica

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

**pDCs:** Células Dendríticas plasmocitoides

## Abreviaturas

**PGE<sub>2</sub>**: Prostaglandina E2

**PMNs**: Células polimorfonucleares

**ROR $\gamma$ t**: Receptor huérfano relacionado al ácido retinoico  $\gamma$ t (del inglés "*retinoic acid related orphan receptor gamma-t*")

**ROS**: Especies reactivas de oxígeno (del inglés "*reactive oxygen species*")

**RRP**: Receptores de reconocimiento de patrones

**s.c.**: Subcutánea

**SFB**: Suero fetal bovino

**SP**: Sangre periférica

**Tc17**: Células T citotóxicas 17

**TCA**: Terapia celular adoptiva

**TGF- $\beta$** : Factor de crecimiento transformante Beta (del inglés "*transforming growth factor*")

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

**TLRs**: Receptores de tipo Toll (del inglés "*Toll like receptors*")

**TNF- $\alpha$** : Factor de necrosis tumoral Alpha (del inglés "*Tumor necrosis factor*")

**Tregs**: Células T regulatorias

**TREs**: Elementos de respuesta a Hormona Tiroidea (del inglés "*Thyroid or T3 response elements*")

**VEGF**: Factor de crecimiento endotelial vascular (del inglés "*vascular endothelial growth factor*")

**WHO**: Organización Mundial de la Salud (del inglés "*world health organization*")

---

## 11. PRESENTACIONES EN CONGRESOS

---

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

**Soler MF**; Alamino VA, Giusiano L; Pellizas CG; Montesinos MM. *“Dendritic cells (DCs) stimulated with Triiodothyronine (T3) enhances antitumor immunity in a mice colon cancer model”*. **Reunión conjunta de sociedades de Biociencia: SAIC, SAIB, SAI, SAA, SAB, SAB, SAFE, SAFIS, SAH, SAP**. Noviembre de 2017. Buenos Aires, Argentina. *Medicina*, 2017; 77 (Supl. I): 7-19.

**Soler MF**, Alamino VA, Giusiano L, Donadio AC, Pellizas CG & Montesinos MM. *“Dendritic Cells (DCs) stimulated with Triiodothyronine (T3) enhances antitumor immunity in a murine colon cancer model”*. **15<sup>th</sup> International Symposium on Dendritic Cells**. Junio de 2018. Aachen, Alemania. *European Journal Immunology* 2018, 48 (Suppl 1): 96, P-124. **(Travel Grant)**

**Soler MF**, Alamino VA, Negretti-Borga DM, Donadio AC, Pellizas CG & Montesinos MM. *“Triiodothyronine (T3) potentiates antitumor immunity in immunotherapy based on dendritic cells (DCs) in a murine model of colon cancer. Evidence of the role of T3 in human DCs”*. **XX Jornada Anual de la Sociedad de Endocrinología y Metabolismo de Córdoba (SEMCO)**. November 2018. Córdoba, Argentina. *Este trabajo mereció la distinción al mejor trabajo científico de investigación básico SEMCO.*



**Soler MF**, Negretti-Borga D, Bravo-Miana R, Donadio AC, Pellizas CG & Montesinos MM. *“T3 improves mice colon cancer antitumor responses stimulated by dendritic cells (DCs). Role of T3 in human DCs”*. **XVII Congreso de la Sociedad Latinoamericana de Tiroides**. Junio 2019. Buenos Aires, Argentina. Arch Endocrinol Metabol (ABEM) Vol. 63, suppl. 02, pg. S8. **(Travel Grant y Mención Especial)**.

**Soler, María F**; Negretti-Borga, Dana M; Bravo-Miana, Rocío; Donadio, Ana C; Pellizas Claudia G; Montesinos, María del Mar. *“Antitumor immune responses generated by Triiodothyronine (T3)-stimulated Dendritic Cells (DCs) loaded with tumor-specific Antigens in a murine Colon Cancer Model. Role of T3 in Human DCs”*. **89° Reunión Anual de la Asociación Americana de Tiroides**. Octubre 2019. Thyroid Vol. 29, pg. A-157. Chicago, Estados Unidos de América.

---

## 12. PUBLICACIONES

---

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

**“Dendritic cells exposed to triiodothyronine deliver pro-inflammatory signals and amplify IL-17-driven immune responses”**

Alamino VA, Montesinos MM, Soler MF, Giusiano L, Gigena N, Fozzatti L, Maller SM, Mendez-Huergo SP, Rabinovich GA & Pellizas CG

Cell. Physiol. Biochem., 52, 354-367 (2019). SJR Impact factor: 5.141

**“Triiodothyronine-stimulated dendritic cell vaccination promotes antitumor immunity against colon carcinoma”**

Soler MF, Bravo-Miana RC, Negretti-Borga DM, Subirada PV, Donadio AC, Sánchez MC, Pellizas CG & Montesinos MM

Manuscrito en preparación para ser enviado a publicar a la Revista *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*.

---

## 13. AGRADECIMIENTOS

---

La realización de una tesis doctoral representa un esfuerzo inmensurable en el cual, directa o indirectamente, participan muchas personas, por lo que quiero agradecer sus consejos, apoyo, ánimo y compañía tanto en los momentos de crisis, como en los de felicidad.

A mi directora, Dra. María del Mar Montensinos, y a la Dra. Claudia Pellizas por haberme dado la oportunidad y confianza de llevar a cabo este proyecto. Permitirme desenvolverme libremente, y resolver los interrogantes que nos planteamos durante el trabajo de tesis.

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 de mesada, colegas y amigos, Rocío, Vicky, Marian, Romi, Danu, Edu, Lucy, Vani, Nico, y Ana Belén. Quienes constituyeron un pilar fundamental para superar todos los obstáculos que surgieron durante el desarrollo de la tesis. Gracias por sus consejos, por su buena predisposición a ayudar, por escucharme y por compartir tantos buenos momentos dentro y fuera del Lab.

A las Dras. Mónica Gilardoni, Ana Carolina Donadio y Laura Fozzatti quienes me abrieron su corazón y me hicieron sentir parte de un hogar. Gracias por motivarme a continuar, y a confiar en mis capacidades, por sus consejos profesionales y personales y por todo el cariño que me brindaron.

A mis compañeros y amigos del CIBICI por todas las charlas, y risas entre pasillos, la colaboración desinteresada para resolver todo tipo de problemas. En especial a Coni,

Pauli, Xime, Mer, Coti, y Nacho. Además, gracias por las inolvidables salidas, After Labs, Trekkings, y asados compartidos, principalmente con el ex lab 114, y el ex 120.

A mis eternos amigos/hermanos de la vida, quienes me acompañan desde jardín de infantes y quienes se fueron sumando por el camino. Ellos están siempre presentes para escucharme, aconsejarme, desestructurarme, y apoyarme en cada decisión. Por las largas charlas que me enriquecen como persona y llenan de alegría: Jo, Ham, Belu, Mer, Yani, Bequi, Mari, Lucas, Martín, Cabeza, Antonio, Yuli, José, y Carli. En especial, a mi Rosarito, hermana del alma que siempre me guía y motiva a seguir, en vos encuentro la fortaleza.

A mi familia, que siempre estuvo para apoyarme y alentarme en cada decisión, en cada paso, y en cada emprendimiento, aun cuando parecían inalcanzables. A mi mamá, por demostrarme que luchar hasta el cansancio vale la pena. Gracias por ser esa fuerte, cariñosa y hermosa mujer que me dio la vida. Gracias por enseñarme a ser libre e independiente, a no rendirme nunca, a tener fortaleza y a buscar siempre la felicidad. A mi papá, tierno y sensible, de quien heredé su carácter. Gracias por tu inmenso corazón, y por demostrarme que nunca hay que darse por vencido. A mis hermanas, por todo el amor que nos une y por el apoyo incondicional de siempre. Por tantos momentos vividos y tantas historias juntas inmejorables. A mis cuñados, Franco y Tebi, por hacer más grande y divertida mi familia. Al bombón de la familia, Emma, cuya sola presencia alegra mi día con su risa e insuperable carisma.

A Matías, mi compañero de vida, mi mejor amigo. Gracias por ser parte de mi vida y permitirme serlo en la tuya. Gracias por incitarme a soñar, a superarme, a crecer. Gracias por estar presente en cada caída, por escucharme, apoyarme, y buscarle una solución a todo lo que me enloquece. Gracias a la vida, que te puso en mi camino, y nos permitió convertirnos en familia. Gracias a los amores de mi vida, Benicio y Fara, que me llenan de alegría.