

Tesis Doctoral

Modulación in vivo del desarrollo y evolución de linfomas T por el estado tiroideo

Sterle, Helena Andrea

2013-10-13

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Sterle, Helena Andrea. (2013-10-13). Modulación in vivo del desarrollo y evolución de linfomas T por el estado tiroideo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Sterle, Helena Andrea. "Modulación in vivo del desarrollo y evolución de linfomas T por el estado tiroideo". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013-10-13.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Modulación *in vivo* del desarrollo y evolución de linfomas T por el estado tiroideo

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área Química Biológica

Lic. Helena Andrea Sterle

Director de tesis: Dra. Graciela Alicia Cremaschi

Director Asistente: Dra. María Laura Barreiro Arcos

Consejero de Estudios: Dr. Juan Carlos Calvo

Lugar de trabajo:

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO) - CONICET - UBA

Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED) - UCA - CONICET

Buenos Aires, 2013

Los trabajos realizados relacionados con este trabajo de tesis se detallan a continuación:

- *Cooperative nongenomic and genomic actions on thyroid hormone mediated-modulation of T cell proliferation involve up-regulation of thyroid hormone receptor and inducible nitric oxide synthase expression.* (2011) Barreiro Arcos M, **Sterle H**, Paulazo M, Valli E, Klecha A, Isse B, Pellizas C, Farías R, Cremaschi G. *J Cell Physiol.* 226(12):3208-18.

- *Induction of apoptosis in T lymphoma cells by long-term treatment with thyroxine involves PKC ζ nitration by nitric oxide synthase.* (2013) Barreiro Arcos ML, **Sterle HA**, Vercelli C, Valli E, Cayrol MF, Klecha AJ, Paulazo MA, Diaz Flaqué MC, Franchi AM, Cremaschi GA. *Apoptosis.* 18(11):1376-90.

- *Thyroid status modulates the proliferation of murine T lymphoma EL-4 growing in vivo in syngeneic mice via activation of cyclin and angiogenesis stimulation.* **Sterle HA**, Valli E, Cayrol MF, Paulazo MA, Martinel Lamas DJ, Colombo L, Medina VA, Cremaschi GA, Barreiro Arcos ML. Enviado para su publicación.

- *Thyroid status mediated regulation of antitumor immune response determines T lymphoma growth and dissemination.* **Sterle HA**, Barreiro Arcos ML; Valli E; Paulazo MA; Colombo L; Rabinovich GA, Cremaschi GA. Manuscrito en preparación.

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecerles a las personas por las cuales voy a trabajar feliz todos los días, a mis queridos compañeros del laboratorio. A mi directora y mamá científica, Graciela, por guiarme en este camino hacia el doctorado con cariño, por transmitirme sus conocimientos y alentarme todos los días a crecer tanto profesional como personalmente. Por su preocupación, sus abrazos y palabras de aliento cuando las cosas no andan tan bien y por contagiar su mirada siempre positiva frente a la vida. A María Laura, mi directora asistente, que me inició en el camino de la ciencia, porque de ella aprendí a trabajar en un laboratorio y a Ali, por su preocupación y por estar siempre dispuesta a ayudarme en todo lo que necesitara. A Flor y a Cele, por su afectuosa compañía de todos los días y su colaboración en todos los problemas que se me presentaran y a nuestra integrante italiana del laboratorio, a Fede, por transmitirme su alegría y su energía estos últimos meses.

A mis queridos amigos Ale y Edu, por toda la ayuda que me brindaron en mis experimentos, cada uno a su manera, Ale desde tempranito a la mañana y Edu hasta muy tarde a la noche. Gracias por escucharme y aconsejarme, por las largas charlas, las salidas y por sobre todas las cosas, por brindarme la calidez y sencillez de su amistad.

A todos mis compañeros del BIOMED, a Mariángeles, Kolko, Lorena, Diego, Gabriel, Macarena, Francisco, Agustina, Belén y Cristian por recibirnos con tanto cariño en su instituto, por la buena predisposición para responder todas las dudas y consultas que teníamos cuando entramos a trabajar en este nuevo lugar y por hacer más amenos todos los mediodías con las charlas, discusiones y risas. Quiero agradecer también muy especialmente a María por su inmenso trabajo de limpieza y a Fabio por criar y cuidar a los ratones que utilizamos en este trabajo y a ambos por la buena onda de todos los desayunos compartidos. Muchas gracias también al Dr. Tomás Santa Coloma por ofrecernos un hermoso laboratorio y recibirnos con las manos abiertas.

Al CEFYBO, donde inicié mis trabajos de investigación. En particular a Ana Genaro, María Zorrilla y Miriam Wald por su compañía y por los aportes que hicieron a mi trabajo. A mis compañeros y amigos Ceci, Bere, Damián y Romi, por la hermosa amistad que iniciamos entre pipetas, mates y papers. También a Laurita, Roxi y María Rosa, porque sus consejos me ayudaron a transitar este camino. Y a los más nuevitos del laboratorio, Yami, Joy, Elías, Rocío y Emi, que a pesar de no haber compartido mucho tiempo en el laboratorio siempre nos reciben con alegría.

Quiero agradecer también a nuestros colaboradores de otros grupos de investigación. Al Dr. Gabriel Rabinovich y Santiago Méndez-Huergo, con quienes realizamos parte de los estudios en inmunidad. Al Dr. Lucas Colombo, cuya ayuda fue muy importante en los ensayos de metástasis experimentales y angiogénesis. A la Dra. Vanina Medina y a Diego Martinel Lamas, por sus aportes en las técnicas de inmunohistoquímica.

Muchas gracias a mis amigas del alma, Sabri y Naty, por esta hermosa amistad que tenemos. Porque a pesar de que a veces pasamos tiempo sin vernos, están siempre presentes alentándome, escuchándome y compartiendo los momentos más importantes conmigo. Gracias también a Dani y a Luquitas, por quererlas tanto y por brindarme también su amistad. Y a Evancito, mi ahijado hermoso, por su dulzura, sus sonrisas y sus besos. Gracias a las chiquis, a Ceci, Marian, Candy, Tucu, Adri, Fabi, Sole y Georgi, por las extensas horas de terapia de grupo, por todas las salidas y principalmente por su apoyo incondicional. Gracias a la vida por juntarnos tan lejos de nuestros hogares, para que nos hagamos compañía mutuamente. Y a mis compañeros de la facultad, a Marian, Sebas, Naty y Hernán por el cariño de siempre.

Gracias a mi futura familia política, principalmente a Moni y Sabri, por aceptarme en su familia y brindarme todo su amor. También a Lala, Pipi, Ricky, Martín y Vani por todos los almuerzos de domingo compartidos y por interesarse y preocuparse siempre por mí. Soy feliz de que formen parte de mi vida. Y a los chiquitos de la familia, a Santi, Agus y Joaco por la dulzura de sus sonrisas y la pureza de su cariño.

Muchas gracias también a mi tía Ani, por estar presente en todos los momentos de mi vida con todo su amor. Mil gracias a mis hermanos Andrés, Vesna y Tomi, porque juntos aprendimos a vivir. Gracias por los juegos cuando éramos chicos y por las charlas ahora que somos grandes, por acompañarme siempre. Gracias también a mis cuñadas Ale y Caro, por su cariño y afecto.

A mi papá y a mi mamá, las dos mejores personas que existen. Gracias por la vida. Gracias por hacerme lo que soy, por ser mi ejemplo a seguir siempre, por mostrarme que el mejor camino a seguir siempre es el de la bondad y el respeto. Por darme la libertad de seguir mi camino, aunque fuera difícil, por enseñarme el valor del esfuerzo y del trabajo duro, de la perseverancia. Gracias por estar siempre para mí a pesar de la distancia y por apoyarme en todas mis decisiones y proyectos. Yo no estaría escribiendo esta tesis si no fuera por ellos.

Finalmente le agradezco a Hernán, mi futuro marido, por estos casi 7 años compartidos. Gracias por aparecer en mi vida, cambiándola por completo y llenándola de felicidad. Por tomar las decisiones más difíciles sólo para acompañarme. Gracias por ser mi sostén en los momentos difíciles y por compartir mis alegrías como si fueran tuyas. Gracias por entender mis momentos de malhumor y ansiedad y responder siempre con una sonrisa. Simplemente gracias por estar siempre y por amarme tanto.

Modulación in vivo del desarrollo y evolución de linfomas T por el estado tiroideo

Resumen

Las hormonas tiroideas (HTs) son importantes reguladoras de la respuesta inmune, pero su participación en el desarrollo tumoral es controversial. El objetivo de este trabajo fue estudiar la modulación de las HTs sobre el comportamiento biológico y evolución del linfoma T EL-4 creciendo in vivo en ratones singéneos eu- (controles), hiper- (hiper) o hipotiroideos (hipo).

El tratamiento de las células EL-4 *in vitro* con HTs indujo un aumento en la proliferación y cambios en los niveles de expresión de reguladores del ciclo celular a tiempos cortos, pero llevó a la apoptosis a tiempos más largos de cultivo.

La inoculación de las células EL-4 en animales hiper desarrolló tumores sólidos de mayor volumen que el de los Controles, pero los hipo presentaron un mayor número de metástasis. Adicionalmente, los tumores hiper mostraron un aumento en los niveles de expresión de ciclinas, mientras que en los hipo encontramos niveles incrementados de p16, p27 y p53. Los tumores hiper también exhibieron mayor angiogénesis por inmunohistoquímica y una expresión aumentada de metaloproteasas, por qRT-PCR, junto con incrementada apoptosis.

Por otra parte, los ratones hiper mostraron un menor infiltrado linfocitario tumoral, compuesto por un menor porcentaje de linfocitos CD8+ que los ratones control. Por otra parte, los bazo de estos animales presentaron una aumentada proporción y actividad de células NK, junto con un menor porcentaje de células supresoras de origen mieloide. Los ratones hipo, sin embargo, mostraron una reducción en la actividad citotóxica específica contra células tumorales.

Nuestros resultados sugieren que el estado tiroideo es capaz de modular el crecimiento tumoral a través de mecanismos que involucran la regulación de proteínas relacionadas con la progresión y/o arresto del ciclo celular y de la angiogénesis, y a través del control de la respuesta inmune antitumoral que puede limitar su diseminación.

Palabras clave: linfoma T, estado tiroideo, ciclo celular, apoptosis, angiogénesis, inmunidad antitumoral.

Thyroid status modulates the *in vivo* development and evolution of T lymphomas

Abstract

Thyroid hormones (THs) are important regulators of immune response, but their role in tumor development is still controversial. The aim of this work was to evaluate THs involvement in the biological behavior and evolution of the EL-4 T lymphoma, growing *in vivo* in singeneic eu- (controls), hyper- (hyper) or hypothyroid (hypo) mice.

The *in vitro* treatment of EL-4 cells for short periods of time with THs increased cell proliferation and led to changes in the expression of cell cycle regulators. However, longer treatment with THs induced apoptosis in these cells.

Hyperthyroid mice that were inoculated with EL-4 cells showed an increased solid tumor volume compared to controls, while hypo exhibited a higher number of metastases. These results were associated with an increment in the expression of cyclins in hyper tumors, and higher levels of p16, p27 and p53 in tumors from hypo mice. An immunohistochemical analysis of tumor sections demonstrated an increased angiogenesis in hyper tumors, which was accompanied with an augmented expression of metalloproteases, measured by qRT-PCR, and an increased apoptosis.

Furthermore, a lower number of tumor infiltrating lymphocytes was found in hyper mice, which was comprised of a decreased percentage of CD8⁺ lymphocytes compared to controls. However, the spleens obtained from these animals showed an increased proportion and activity of NK cells, together with a diminished percentage of tumor derived suppressor cells. Hypo mice, on the other hand, displayed a reduced tumor-specific cytotoxic activity.

Our results suggest that thyroid status can directly modulate tumor development through the regulation of proteins that are involved with the cell cycle progression and/or arrest and through the regulation of angiogenesis. Together with this, thyroid status can also regulate tumor dissemination as a result of the modulation of the anti-tumor immune response.

Keywords: T lymphoma, thyroid status, cell cycle, apoptosis, angiogenesis, anti-tumor immunity.

Índice

1. INTRODUCCIÓN	13
1.1. HORMONAS TIROIDEAS.....	14
1.1.1. GLÁNDULA TIROIDES.....	14
1.1.2. EL EJE HIPOTALAMO-HIPOFISO (PITUITARIO)-TIROIDEO (HPT).....	16
1.1.3. SÍNTESIS Y METABOLISMO DE LAS HORMONAS TIROIDEAS.....	18
1.1.4. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LAS HORMONAS TIROIDEAS	20
1.1.4.1. Mecanismos genómicos.....	20
1.1.4.2. Mecanismos no genómicos de acción de HTs.....	23
1.1.5. PATOLOGÍAS TIROIDEAS.....	25
1.1.5.1. Hipertiroidismo	26
1.1.5.2. Hipotiroidismo.....	27
1.2. CÁNCER	28
1.2.1. LINFOMAS	28
1.2.2. PARTICIPACIÓN DEL EJE TIROIDEO EN PROCESOS NEOPLÁSICOS	29
1.2.3. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS PROCESOS NEOPLÁSICOS	31
1.2.3.1. Proliferación y ciclo celular	35
1.2.3.1.1. Ciclinas.....	36
1.2.3.1.2. Inhibidores de Cdk.....	38
1.2.3.1.3. Genes supresores tumorales.....	40
1.2.3.2. Angiogénesis	42
1.2.3.3. Mecanismo de apoptosis celular.....	44
1.3. INMUNIDAD	46
1.3.1. INMUNIDAD ANTITUMORAL.....	47
1.4.1.1. Linfocitos T citotóxicos.....	49
1.4.1.2. Linfocitos T colaboradores	50
1.4.1.3. Células NK.....	52
1.4.1.4. Células NKT.....	53
1.4.1.5. Linfocitos B	54
1.4.1.6. Macrófagos.....	56
1.4.1.7. Linfocitos T regulatorios (Tregs).....	56
1.4.1.8. Células supresoras de origen mieloide	58
1.4.2. ANTECEDENTES QUE SEÑALAN INTERACCIONES ENTRE EL EJE TIROIDEO Y EL SISTEMA INMUNE	60
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	62
2.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO	63
2.2. OBJETIVOS.....	63
2.2.1. OBJETIVOS GENERALES.....	63
2.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	63
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	66

3.1. SUSPENSIONES CELULARES Y CONDICIONES DE CULTIVO	67
3.2. ENSAYOS <i>IN VITRO</i> EN CÉLULAS EL-4	67
3.2.1. TRATAMIENTO CON T4 A TIEMPOS CORTOS	67
3.2.2. TRATAMIENTO CON T4 A TIEMPOS LARGOS	68
3.2.3. MARCACIÓN CON IODURO DE PROPIDIO Y ANEXINA V-FITC	68
3.2.4. ANÁLISIS POR RT-PCR EN TIEMPO REAL	68
3.2.5. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT	71
3.3. OBTENCIÓN DE MODELOS EXPERIMENTALES <i>IN VIVO</i>.....	73
3.3.1. MODELO DE HIPERTIROIDISMO	73
3.3.2. MODELO DE HIPOTIROIDISMO.....	73
3.3.3. DETERMINACIONES HORMONALES EN SUEROS	74
3.3.3.1. Determinaciones de T3 y T4.....	74
3.3.3.2. Radioinmunoensayo para la determinación cuantitativa de Tirotrófina (TSH)	75
3.3.4. MODELO DE LINFOMA T SINGENEICO	77
3.3.4.1. Obtención de tumores sólidos	77
3.3.4.2. Ensayos de metástasis experimentales.....	77
3.4. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DEL TUMOR SÓLIDO.....	78
3.4.1. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO DE LOS TUMORES.....	78
3.4.1.1. Coloración con hematoxilina-eosina.....	79
3.4.1.2. Coloración tricrómica de Masson	79
3.4.1.3. Inmunohistoquímica	79
3.4.2. ENSAYOS DE DIVISIÓN CELULAR DEL LINFOMA T CRECIENDO <i>IN VIVO</i>	80
3.4.3. ANÁLISIS POR RT-PCR EN TIEMPO REAL.....	81
3.4.4. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT	81
3.4.5. DETERMINACIÓN DE LA GENERACIÓN DE NUEVOS VASOS SANGUÍNEOS	83
3.4.6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE METALOPROTEASAS EN SUEROS MEDIANTE ZIMOGRFÍA	83
3.5. ESTUDIO DEL ESTADO INMUNOLÓGICO.....	84
3.5.1. SUSPENSIONES DE CÉLULAS LINFOIDES	84
3.5.2. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO	84
3.5.2.1. Detección de marcadores de membrana.....	85
3.5.2.2. Detección de FoxP ₃ en Tregs.....	86
3.5.3. ENSAYO DE ACTIVIDAD DE CÉLULAS NK	86
3.5.4. ENSAYO DE ACTIVIDAD CITOTÓXICA ESPECÍFICA CONTRA CÉLULAS EL-4.....	87
3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	87
4. RESULTADOS	88
4.1. EFECTOS DEL TRATAMIENTO <i>IN VITRO</i> DE CÉLULAS DEL LINFOMA T EL-4 CON HTs.....	89
4.1.1. EFECTO <i>IN VITRO</i> DE LA TIROXINA SOBRE LA PROLIFERACIÓN LINFOCITARIA	89
4.1.2. EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON TIROXINA SOBRE LA REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR EN CÉLULAS EL-4 ..	91
4.1.3. INDUCCIÓN DE APOPTOSIS EN CÉLULAS EL-4 POR TRATAMIENTO PROLONGADO CON TIROXINA	93
4.2. MODULACIÓN DEL CRECIMIENTO TUMORAL DEL LINFOMA T EL-4 POR EL ESTADO TIROIDEO.....	97
4.2.1. ESTABLECIMIENTO DE LOS MODELOS DE HIPER- E HIPOTIROIDISMO EN RATONES C57BL/6J.....	97
4.2.1.1. Verificación del estado tiroideo en los modelos experimentales establecidos.....	97
4.2.2. EL ESTADO TIROIDEO REGULA EL CRECIMIENTO TUMORAL	98

4.2.3. MODULACIÓN DE LA GENERACIÓN Y DESARROLLO DE METÁSTASIS POR EL ESTADO TIROIDEO.....	100
4.3. ACCIÓN DEL ESTADO TIROIDEO SOBRE EL CRECIMIENTO DEL TUMOR PRIMARIO.....	102
4.3.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS TUMORES SÓLIDOS EL-4 DE RATONES CON DIFERENTE ESTADO TIROIDEO	102
4.3.2. MODULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PCNA EN TUMORES POR EL ESTADO TIROIDEO	104
4.3.3. MODULACIÓN POR EL ESTADO TIROIDEO DE LA PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS EL-4 CRECIENDO <i>IN VIVO</i>	105
4.3.4. MODULACIÓN POR EL ESTADO TIROIDEO DE PROTEÍNAS REGULADORAS DEL CICLO CELULAR EN TUMORES EL-4	106
4.3.5. MODULACIÓN POR EL ESTADO TIROIDEO DE PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN APOPTOSIS EN TUMORES EL-4	110
4.3.6. MODULACIÓN POR EL ESTADO TIROIDEO DE LA ANGIOGÉNESIS EN TUMORES EL-4	112
4.3.7. MODULACIÓN POR EL ESTADO TIROIDEO DE METALOPROTEASAS DE MATRIZ Y SUS INHIBIDORES TISULARES EN TUMORES EL-4.....	115
4.4. EL ESTADO TIROIDEO MODULA LA INMUNIDAD ANTITUMORAL	119
4.4.1. EL ESTADO TIROIDEO MODULA LA RESPUESTA INMUNE EN EL TUMOR PRIMARIO.....	119
4.4.1.1. Evaluación del efecto del estado tiroideo sobre los ganglios linfáticos	119
4.4.1.1.1. Modulación de la distribución de subpoblaciones linfocitarias en ganglios drenante y no drenante por el estado tiroideo	120
4.4.1.1.2. Modulación de la distribución de células inmunosupresoras en ganglios por el estado tiroideo.....	123
4.4.1.2. Evaluación del efecto del estado tiroideo sobre el infiltrado tumoral	124
4.4.1.2.1. Modulación de la distribución de subpoblaciones linfocitarias en el infiltrado tumoral por el estado tiroideo.....	125
4.4.2. EL ESTADO TIROIDEO MODULA EL SISTEMA INMUNE A NIVEL SISTÉMICO.....	127
4.4.2.1. Modulación de la distribución de subpoblaciones linfocitarias en bazo por el estado tiroideo	128
4.4.2.2. Modulación de células NK en bazo por el estado tiroideo	130
4.4.2.3. Modulación de la distribución de poblaciones inmunosupresoras en bazo por el estado tiroideo	132
<u>5. DISCUSIÓN.....</u>	<u>135</u>
5.1. EFECTOS DIRECTOS DE LAS HTS SOBRE EL CRECIMIENTO DEL LINFOMA T EL-4	138
5.2. MODELOS MURINOS PARA LA EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DEL ESTADO TIROIDEO SOBRE EL DESARROLLO DEL LINFOMA T EL-4 <i>IN VIVO</i>	143
5.3. MECANISMOS POR LOS CUALES EL ESTADO TIROIDEO MODULA EL CRECIMIENTO TUMORAL	146
5.4. MECANISMOS POR LOS CUALES EL ESTADO TIROIDEO MODULA LA GENERACIÓN DE METÁSTASIS.	157
<u>6. CONCLUSIONES.....</u>	<u>165</u>
<u>7. ABREVIATURAS.....</u>	<u>171</u>
<u>8. BIBLIOGRAFÍA.....</u>	<u>174</u>

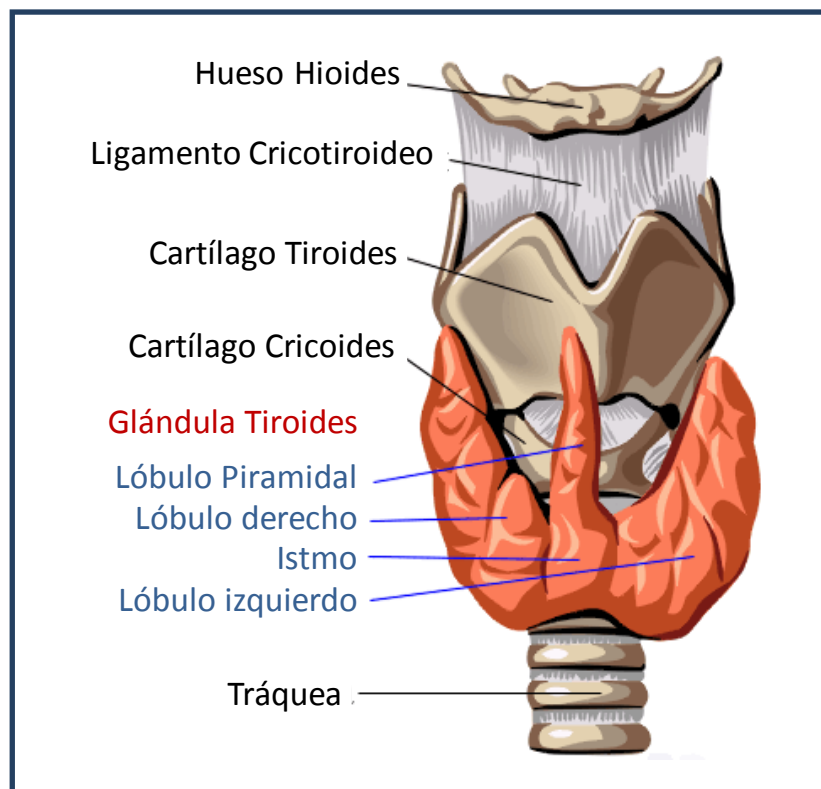
1. Introducción

1.1. Hormonas Tiroideas

1.1.1. Glándula tiroides

La tiroides es la glándula encargada de la síntesis y secreción de las Hormonas Tiroideas (HTs). Está compuesta por dos lóbulos, derecho e izquierdo, respecto de la tráquea y conectados por el istmo. Puede haber además un pequeño lóbulo llamado piramidal en contacto con el istmo (**Figura 1.1**).

Figura 1.1: Ubicación anatómica de la glándula tiroides.

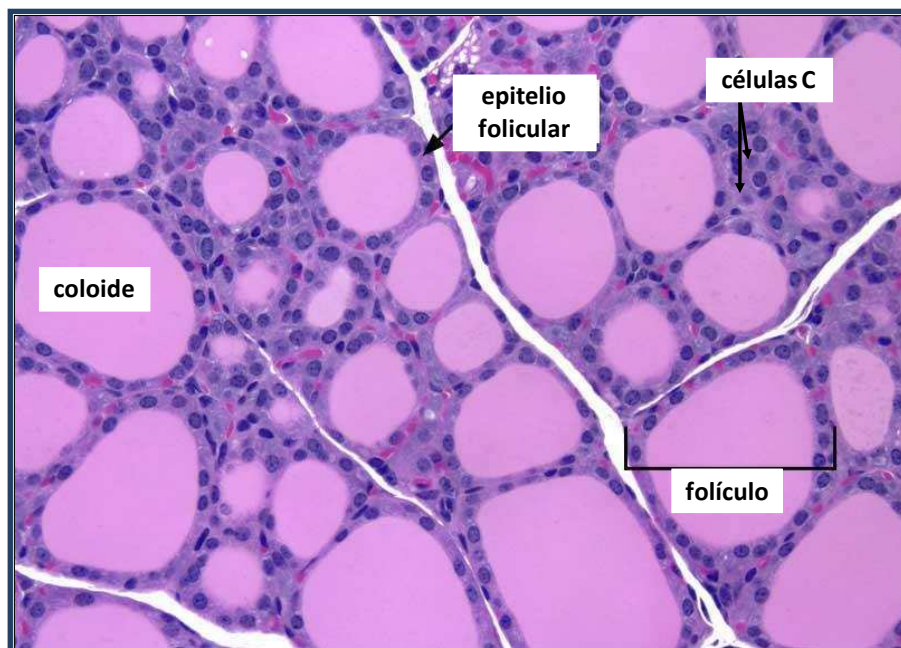


Representación frontal de la glándula tiroides y sus límites. La tiroides, ubicada en la región infrahioides junto al cartílago tiroides, consta de un lóbulo a la derecha y otro a la izquierda de la tráquea, unidos por el istmo, el cual puede presentar una prolongación a la que se denomina lóbulo piramidal. El istmo se encuentra justo debajo del nivel del cartílago cricoides. Se muestra además el ligamento cricotiroideo que une los cartílagos tiroides y cricoides. *Adaptado de: es.wikipedia.org*

La glándula está situada en la región infrahioides en la parte frontal del cuello junto al cartílago tiroides, yace sobre la tráquea, a la que rodea hasta alcanzar posteriormente al esófago. Tiene un flujo sanguíneo muy alto en relación a su

tamaño, ya que está irrigada por las arterias tiroideas superiores, ramificación de la carótida externa, e inferiores que derivan de la subclavia. Hay tres venas que la drenan, que son las venas tiroideas superior, media e inferior y que desembocan en las yugulares internas (Dumont y col, 2008).

Figura 1.2: Histología de la glándula tiroides



Corte histológico de la glándula tiroides teñida con hematoxilina y eosina, en un aumento 40X. Se observan los folículos, que están formados por el coloide y el epitelio folicular, junto con células C o parafoliculares, cuya tinción es más débil. *Adaptado de: www.deltagen.com.*

La tiroides está compuesta por folículos o acinos que pueden ser considerados, tanto desde el punto de vista estructural como funcional, como las unidades primarias o secretoras del órgano (**Figura 1.2**). Las células de los folículos son las productoras de las hormonas y el lumen es el depósito. Las paredes del folículo están formadas por un epitelio continuo de una célula de profundidad, el parénquima tiroideo. Dentro del folículo y contenido en el lumen se encuentra el coloide, constituido por una mezcla de proteínas, principalmente la tiroglobulina (Tg), pero también hay otras iodoproteínas de menor peso molecular y proteínas séricas, entre ellas la albumina (Livolsi, 2001).

Adicionalmente a las células foliculares hay células individuales o pequeños grupos de células que se ubican entre los acinos (**Figura 1.2**). Estas células parafoliculares, o células C, secretan calcitonina (o tirocalcitonina) en respuesta al aumento del calcio sérico. Fuera de los folículos hay células endoteliales y fibroblastos (Livolsi, 2001).

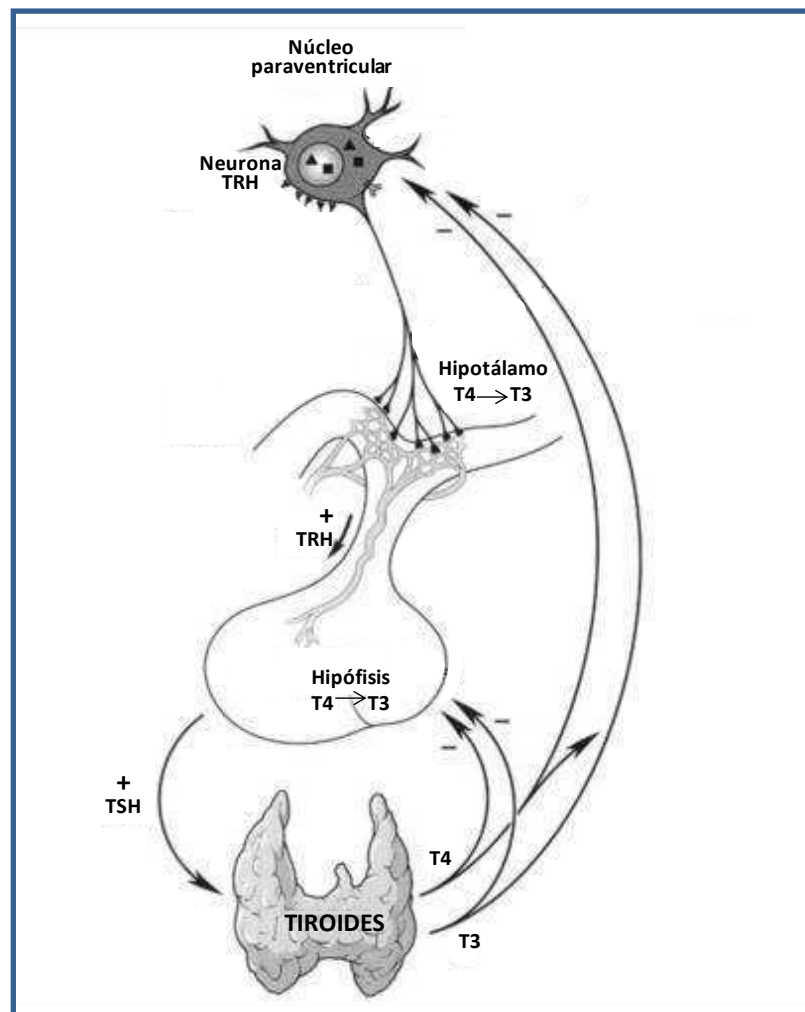
1.1.2. El eje Hipotalamo-Hipofiso (Pituitario)-Tiroideo (HPT).

La síntesis de HTs está finamente regulada por el eje HPT (**Figura 1.3**). El componente neuronal del eje es el hipotálamo, que está ubicado en la región más rostral del cerebro, en el diencefalo. Actúa como un integrador que recibe señales de todo órgano sensorial relacionado con el estado del entorno interno y externo y responde rápidamente con la liberación de neurotransmisores y neuropéptidos dentro del SNC y hacia la hipófisis. Contiene varios grupos de células con fenotipo neuronal que, en respuesta a un estímulo despolarizante, liberan péptidos o neurotransmisores hacia el plexo capilar portal localizado en el tallo infundibular de la glándula hipófisis anterior.

La hormona hipotalámica involucrada en el eje HPT es la hormona liberadora de tirotrófina (TRH), producida por un grupo específico de células en los núcleos arcuato y paraventricular del hipotálamo. La TRH es un tripéptido sintetizado a través del clivaje de una prohormona (pre-pro-TRH), cuyo procesamiento se inicia durante el transporte axonal luego de la remoción de un péptido señal. Los clivajes subsiguientes se van produciendo a medida que los péptidos circulan por el axón hacia la terminal del nervio (Carr y col, 1993).

La TRH es liberada de las terminales nerviosas en la zona externa de la eminencia media al sistema capilar portal. El tripéptido alcanza a sus receptores localizados en células de la hipófisis anterior, llamadas tirotropos, los que son estimulados para la producción de tirotrófina (TSH). La unión del ligando a estos receptores acoplados a proteína G lleva a la fosforilación y a cambios en las concentraciones de proteínas nucleares que interaccionan con los genes involucrados en la síntesis de TSH, incrementando su transcripción.

Figura 1.3: Eje hipotálamo hipofisario tiroideo



Representación esquemática del eje HPT, mostrando las neuronas liberadoras de TRH en el núcleo paraventricular (NPV) proyectando sus terminales a la zona externa de la eminencia media. Esto ocurre de forma bilateral, aunque en este esquema se muestra la proyección unilateralmente. La TRH viaja a través del sistema vascular porta hipofisario estimulando la síntesis y liberación de TSH de los tirotrópos. Esta molécula actúa en la glándula tiroides promoviendo la biosíntesis y liberación de T3 y T4. Estas son liberadas en la circulación general para cumplir su importante papel fisiológico que es el de regular el metabolismo. Adicionalmente inducen la retroalimentación negativa en los tirotrópos de la hipófisis y en las neuronas del NPV encargadas de la liberación de TRH. *Adaptado de: Williams Textbook of Endocrinology, 11ª edición.*

La TSH y presumiblemente la TRH, son liberadas de forma pulsátil, con pulsos que ocurren por intervalos de 90 a 180 minutos en humanos (Gore y Roberts, 2003). Los estudios sobre la liberación pulsátil de TSH en humanos demuestran que ésta cambia a lo largo de un período de 24 hs, alcanzando su máximo entre el atardecer y las 4 hs. Los niveles de TSH descienden al mediodía y permanecen bajos hasta que se reinicia el ciclo. Este ritmo circadiano sería controlado por el núcleo supraquiasmático del hipotálamo (Gore y Roberts, 2003).

La TSH, hormona glicoproteica de 30 kDa, es un heterodímero formado por dos subunidades, α y β , unidas de forma no covalente. La subunidad α es idéntica a la de las gonadotropinas, LH y FSH, mientras que la subunidad β le confiere especificidad, siendo la que se une al receptor en la célula tiroidea. Sin embargo, la subunidad β libre es inactiva, de lo que se desprende que la subunidad α es necesaria para la expresión de la actividad biológica de la hormona (Grossmann y col, 1997). El receptor de TSH está acoplado a proteína G, tiene 7 dominios transmembrana y se localiza fundamentalmente en la glándula tiroidea (Graves y Davies, 2000). La TSH liberada de la hipófisis anterior, por lo tanto, actúa a nivel de sus receptores en la glándula tiroidea, induciendo la producción de HTs (**Figura 1.3**).

La T3 y T4, al ser liberadas a circulación, se unen en gran proporción a sus proteínas transportadoras y menos del 1% permanece en forma libre. Las HTs que circulan en forma libre actúan a nivel de sus órganos diana en la modulación del metabolismo celular o participan en el mecanismo de retroalimentación negativa a nivel del hipotálamo y la hipófisis inhibiendo la síntesis y liberación de TRH y TSH respectivamente (**Figura 1.3**).

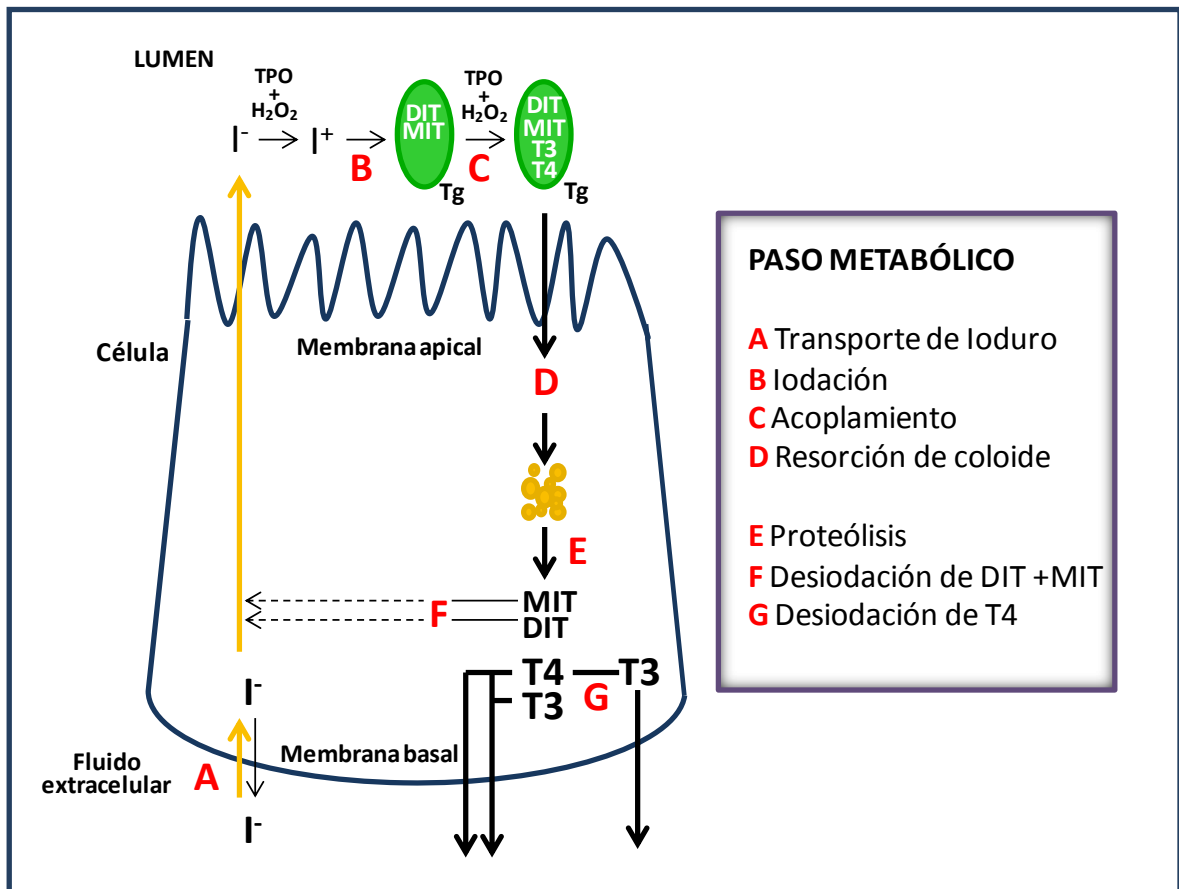
Este control tan preciso permite mantener constantes las concentraciones de T3 y T4 y así evitar tanto el exceso como la carencia de estas hormonas, ambas circunstancias sumamente adversas para el organismo, en especial en etapas tempranas de su desarrollo (Gore y Roberts, 2003).

1.1.3. Síntesis y metabolismo de las hormonas tiroideas

La síntesis de HTs se activa por la unión de la TSH a su receptor específico, que regula positivamente a una variedad de genes tiroideos incluyendo el simporter Na^+/I^- (NIS), la Tg y la peroxidasa tiroidea (TPO). Los productos de estos genes intervienen en la síntesis de T3 y T4 (Lin X y col, 2004; Riedel y col, 2001).

Para la síntesis y secreción de las HTs, las células foliculares realizan una serie de funciones especializadas esquematizadas en la **Figura 1.4**.

Figura 1.4: Síntesis y secreción de las hormonas tiroideas.



Se señalan los pasos que llevan a la síntesis de HTs, su almacenamiento en la Tg y finalmente su secreción. *Adaptado de <http://www.docstoc.com/docs/Thyroid-Function>.*

En la membrana basal se encuentra la proteína NIS, que realiza una captación activa de yoduro, concentrándolo como NaI. El yoduro incorporado es luego transportado hacia la membrana apical, donde sale al coloide mediante una proteína transportadora denominada pendrina. Allí la TPO produce la oxidación del yoduro a yodonio, que es luego incorporado a la Tg para producir dos tipos de iodotirosinas hormonalmente inactivas, las monoiodotirosinas (MIT) y diiodotirosinas (DIT). La TPO participa en el acoplamiento de las iodotirosinas para formar las iodotironinas T3 y T4. Para poder disponer de las mismas para su secreción, la célula folicular capta gotitas del coloide por endocitosis. Luego se produce la ruptura proteolítica de los enlaces que unen a las HTs a la Tg, de modo que tanto la T4 como la T3 pueden acceder al torrente sanguíneo. La mayor liberación de HTs se da en la forma de T4, siendo su concentración en suero 40 veces mayor que la de T3 (Lester Reed, 2001).

Solo una pequeña proporción de las HTs circula en forma libre con capacidad de entrar en la célula y ejercer los efectos biológicos. La mayor proporción de las HTs se encuentra unida a proteínas transportadoras. La T4 se une a la globulina transportadora de HTs (TBG) en un 70%, a la albúmina en un 20% y a la transtiretina (TTR) en un 10%. La T3, por su lado, se une principalmente a TBG (80%), y el resto a TTR y a albúmina (Lester Reed, 2001).

La T4 puede ser convertida en T3 a través de la 5'-deiodinación del anillo externo de la T4 por dos tipos de deiodinasas. La deiodinasa de tipo 1, localizada principalmente en la membrana plasmática de células del hígado y del riñón, es responsable de la conversión de la mayor parte de T4 a T3 en circulación. La deiodinasa de tipo 2 se encuentra localizada en el retículo endoplasmático de células de cerebro, hipófisis y tejido adiposo y tiene como función la conversión de T4 a T3 para uso intracelular. Este paso metabólico constituye el camino principal para la provisión de T3 en diferentes tejidos (Darras y Van Herck, 2012).

1.1.4. Mecanismos de acción de las hormonas tiroideas

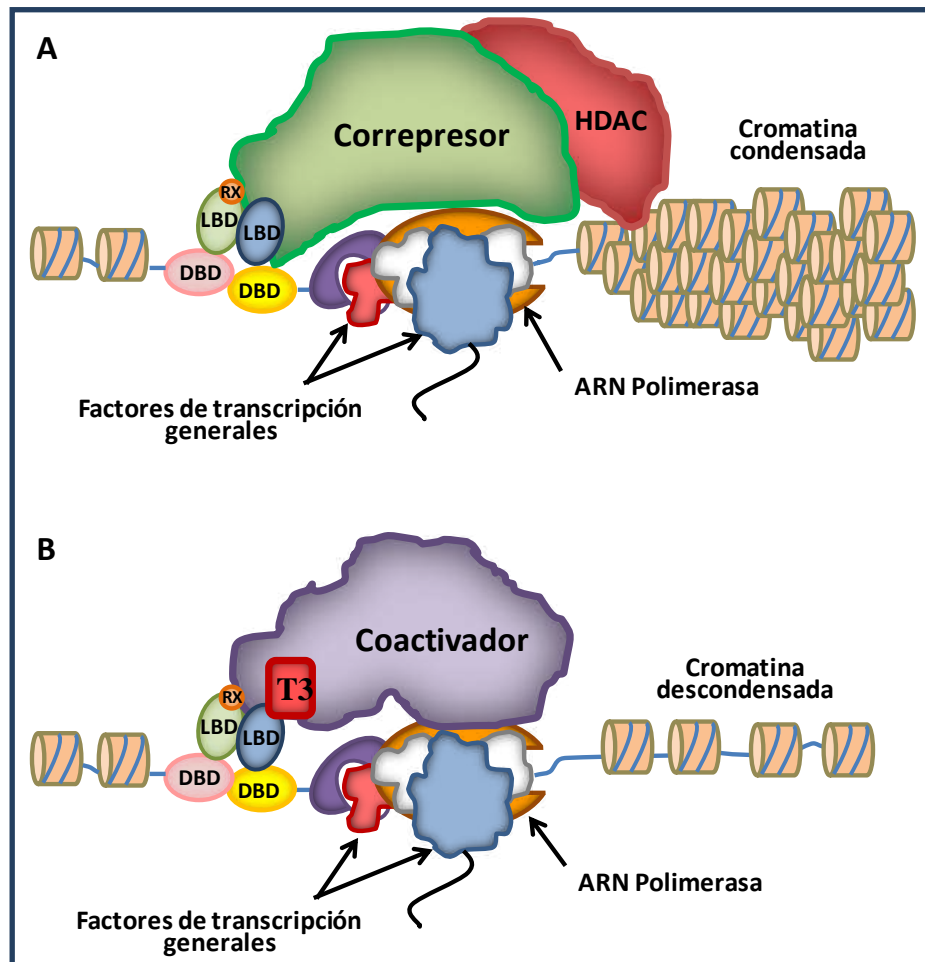
1.1.4.1. Mecanismos genómicos

Los receptores clásicos para HTs (TRs) son factores de transcripción específicos. Estos receptores unen preferentemente T3 con una afinidad varias veces superior que la de T4. Los TRs se encuentran asociados al ADN aún en ausencia de hormona tiroidea, regulando la expresión de genes (Yen y col, 2006).

Los TRs están codificados por dos genes diferentes, TR α y TR β . El gen TR α genera por empalme (*splicing*) alternativo de exones tres isoformas, TR α 1, TR α 2 y TR α 3, que difieren en la región carboxilo terminal donde está ubicado el dominio de unión a la hormona. El gen TR β origina dos isoformas a través de la elección de un promotor alternativo: TR β 1, TR β 2 y TR β 3. La expresión de los genes para estos receptores es variable, siendo el TR β 2 el involucrado principalmente en la regulación de la producción de la TSH. En el hipotálamo, esta isoforma es quizás la única responsable de la regulación negativa del gen de TRH por parte de la T3 (Oetting y Yen, 2007). La regulación de la expresión de las isoformas de TRs es

dependiente del tejido y regulada por el desarrollo, por lo que los TRs cumplen funciones isotipo-dependientes (Cheng y col, 2010).

Figura 1.5: Mecanismo genómico de acción de las hormonas tiroideas



(A) Esquema que muestra la unión del TR al ADN mediante su dominio de unión al ADN (DBD) y en ausencia de T3 en el dominio (LBD) de unión al ligando. La unión constitutiva del TR al correpresor provoca el reclutamiento de proteínas histona acetilasa, lo que causa la condensación de la cromatina y la represión de la transcripción. (B) Al unirse la T3 al TR provoca el intercambio del correpresor por un coactivador, se descondensa la cromatina y se facilita la transcripción. *Adaptado de Juvenal (2009).*

La T3, una vez que atraviesa la membrana plasmática, se une a su receptor en el núcleo. El receptor se dimeriza con otro receptor de T3, para formar un homodímero, o con el receptor de retinoides RXR para formar un heterodímero (Lee y Privalsky, 2005). La heterodimerización con RXR incrementa dramáticamente la unión de los TRs al ADN, la respuesta del TR a T3 y la activación transcripcional (Cheng y col, 2010). Los dímeros interactúan con el ADN, a través del reconocimiento de secuencias de aminoácidos del dominio de

unión al ADN presentes en el receptor, y de secuencias nucleotídicas específicas que se encuentran presentes en aquellos genes cuya expresión está regulada por la T3. Estas secuencias nucleotídicas se conocen como elementos de respuesta a hormona tiroidea (TRE) (Yen y col, 2006).

En ausencia de T3, el TR se une constitutivamente a correpresores nucleares, que se caracterizan por reclutar otras proteínas accesorias que a su vez compactan a los nucleosomas y reprimen el proceso de transcripción (**Figura 1.5 A**). Al unirse con la T3, el receptor cambia de conformación y disminuye su afinidad por los corepresores, intercambiándolos por coactivadores, lo que lleva a que la cromatina se desenrolle, facilitándose por lo tanto la transcripción (**Figura 1.5 B**), (Aranda y Pascual, 2001; Yen, 2001; Oetting y Yen, 2007). En el caso de los genes regulados negativamente el proceso es el inverso; estos pueden ser estimulados en ausencia de hormonas e inhibidos cuando la T3 se une a su receptor. Estos efectos genómicos generan respuestas biológicas que llevan desde horas a días (Yen, 2001; You y col, 2010).

Las HTs ejercen su actividad en todos los sistemas del organismo, ya que sus receptores se expresan en todos los tejidos. Sin embargo, cada tejido presenta una respuesta distinta frente a las HTs, ya que poseen diferente expresión de receptores y de sus isoformas y además presentan desigualdades en la actividad de las deiodinasas.

Las principales acciones sistémicas de estas hormonas abarcan el aumento del metabolismo basal, con estimulación de la termogénesis y regulación del consumo de oxígeno celular. El aumento de la función tiroidea induce un incremento en la captación de glucosa, la demanda de vitaminas y modifica las concentraciones de proteínas y enzimas séricas. En cuanto al metabolismo de los lípidos, las HTs tienen diferentes acciones metabólicas en diversos tejidos diana, cuyo resultado global es un descenso en la concentración plasmática del colesterol total (Hulbert, 2000).

Las HTs ejercen, también, una serie de acciones periféricas fundamentales para el correcto funcionamiento de varios órganos y sistemas. Entre ellas, suprimen la secreción de TSH por parte de las células tirotropas hipofisarias, regulando

negativamente la transcripción de sus genes por un mecanismo mediado por la deiodinación intracelular de T4 en T3. A nivel del SN, tienen un papel fundamental en el desarrollo del cerebro del feto y durante el periodo neonatal. Además regulan proteínas y glúcidos que participan en la mielinización (Williams, 2008).

En el hígado, estimulan las enzimas que regulan la lipogénesis y la lipólisis, inducen la síntesis de transaminasas y de proteínas plasmáticas. Son capaces de regular el número de receptores β adrenérgicos en el corazón, aumentando la sensibilidad a catecolaminas. Adicionalmente, en este órgano, presentan un efecto inotrópico y cronotrópico positivo a través de mecanismos que disminuyen la resistencia vascular sistémica. En el tejido adiposo, la T3 regula el consumo basal de oxígeno, el almacenamiento de grasa, la lipogénesis y la lipólisis. También induce la diferenciación del tejido adiposo y estimula la proliferación de los adipocitos (Hulbert, 2000).

Los efectos hormonales se extienden al músculo esquelético, donde favorecen la acción contráctil, la biosíntesis de miosina y de enzimas lisosómicas, así como también la captación de glucosa. Un correcto funcionamiento tiroideo es fundamental para el desarrollo óseo (Gogakos y col, 2010). Por otro lado, una secreción inadecuada de estas hormonas se ha relacionado con irregularidades a nivel gonadal.

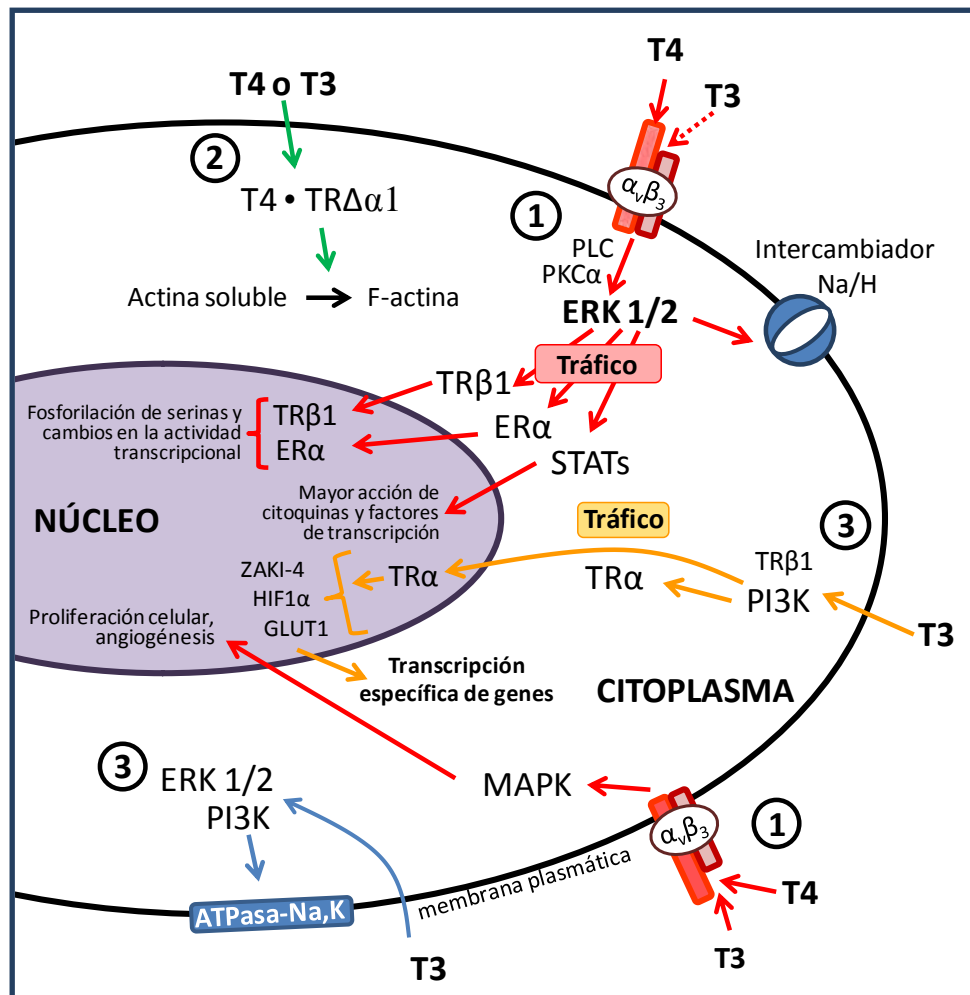
1.1.4.2. Mecanismos no genómicos de acción de HTs

En la actualidad se conoce que las HTs ejercen además acciones rápidas, que llevan a la activación de eventos celulares complejos que previamente no habían sido atribuidos a estas hormonas. Como se observa en la **Figura 1.6**, los sitios de acción no genómica de las HTs han sido localizados en la membrana plasmática, en el citoplasma y en organelas celulares (Bassett y col, 2003).

Varias evidencias sugieren que las acciones no genómicas de las HTs podrían iniciarse en el citoplasma celular o ser mediadas por un receptor de membrana plasmática. Con respecto a las primeras, están mediadas por TR citoplasmáticos. Se ha observado, por ejemplo, que el TR β 1 citoplasmático lleva a la activación de PI3K y posterior activación de la transcripción génica. También se ha detectado

TR α citoplasmático en células endoteliales, que lleva a la activación de la óxido nítrico sintasa, contribuyendo con la vasodilatación (Cheng y col, 2010).

Figura 1.6: Mecanismos no genómicos de acción de las hormonas tiroideas



Via la integrina $\alpha v \beta 3$, las HTs en la membrana estimulan MAPK (ERK1/2) mediante la fosfolipasa C (PLC) y la proteína quinasa C (PKC). La activación de ERK1/2 promueve el tráfico de proteínas residentes en el citoplasma hacia el núcleo y la fosforilación en serinas de nucleoproteínas tales como ER- α , TR- $\beta 1$, STAT-1 α , y Trip230. Los complejos eventos celulares inducidos por los receptores de membrana incluyen angiogénesis (células de músculo liso endotelial y vascular) y la proliferación de células tumorales. En el citoplasma, la T3 puede activar PI3K e iniciar río abajo la transcripción de genes específicos. La activación de PI3K puede incluir los TR $\beta 1$ o TR α residentes en el citoplasma. Una forma truncada de TR $\alpha 1$ (TR $\Delta \alpha 1$) en el citoplasma media la acción de T4 sobre el citoesqueleto de actina. T3 y T4 pueden activar también PI3K por unión a la integrina $\alpha v \beta 3$. Adaptado de Davis y col, 2008 y de Cheng y col, 2010.

Davis y col. (2006), por otra parte, han demostrado en varios tipos celulares que el receptor para los efectos no genómicos de HTs recae en la molécula de la integrina $\alpha v \beta 3$ (Davis y col, 2006 y 2011), a través de la cual se transducen

señales que pueden modular el tráfico intracelular de proteínas y la actividad de los canales iónicos en la membrana plasmática (Davis y col, 2011). Estos receptores tienen mayor afinidad por T4 que por T3. Se ha visto *in vitro* que la T4 en concentraciones fisiológicas y la T3 en concentraciones suprafisiológicas son capaces de inducir la proliferación celular dependiente de la activación de ERK1/2 (Davis y col, 2011).

Algunas de las acciones atribuidas a efectos no genómicos de HTs, mediados por receptores de membrana, son la activación de la bomba Ca^{2+} -ATPasa, la captación de 2-deoxiglucosa en timocitos, células cardíacas y adipocitos; la activación de la bomba Na^+/K^+ y del antiporter Na^+/H^+ en varios tipos celulares; la inactivación de corrientes de Na^+ en miocardiocitos y neuronas sensoriales y la activación de procesos de endocitosis (Cheng y col, 2010).

Acciones celulares complejas también son iniciadas o moduladas por los receptores de membrana de HTs. Entre las acciones más importantes se encuentran el tráfico intracelular de proteínas, la migración de células neuronales y gliales y la agregación de plaquetas. Es muy importante también el efecto no genómico de HTs sobre la proliferación celular. En particular, se ha visto que las HTs tienen un efecto pro-angiogénico y están involucradas en el desarrollo tumoral (Cheng y col, 2010). Por lo tanto, los efectos hormonales que comienzan de forma “no genómica”, pero que inducen la activación de factores de transcripción, llevan finalmente a efectos dependientes del ADN (Cheng y col, 2010).

1.1.5. Patologías tiroideas

Los niveles hormonales normales en sangre son de entre 4.5 y 12.5 ug/dl para la T4 y entre 100 y 200 ng/dl para la T3. Los valores de TSH, por su parte, deben oscilar entre 0.4 y 4.0 mUI/L. Cuando estos valores se encuentran por encima o por debajo del rango normal, esto puede estar indicando la existencia de una patología tiroidea primaria.

Las mujeres tienen una predisposición 10 veces mayor que los hombres al desarrollo de patologías tiroideas. Algunos factores pueden incrementar aun más

la predisposición a esta enfermedad, entre los más importantes se encuentran el embarazo, la edad superior a 60 años, la existencia de antecedentes familiares o la presencia de patologías como anemia perniciosa, diabetes tipo I, artritis reumatoidea, lupus o insuficiencia adrenal primaria.

1.1.5.1. Hipertiroidismo

El hipertiroidismo es un desorden en el cual los niveles de HTs están por encima de los normales. Puede tener causas diversas:

- Enfermedad de Graves: Es un desorden autoinmune, en el cual se producen anticuerpos que reconocen y activan el receptor de TSH. Estos anticuerpos inducen el crecimiento y la funcionalidad de las células foliculares tiroideas, llevando a una excesiva producción de T3 y T4. En los pacientes con esta patología se detecta un infiltrado linfocitario heterogéneo en el parénquima de la tiroides, junto con un infiltrado retro-orbital (Morshed y col, 2012).
- Nódulos tiroideos: Frecuentemente se producen nódulos en la tiroides, que en general no son funcionales. Sin embargo, algunos de estos nódulos pueden convertirse en hiperreactivos llevando al bocio multinodular tóxico, que es la causa más frecuente de hipertiroidismo espontáneo (Faggiano y col, 2011).
- Tiroiditis: Es una inflamación de la glándula que lleva a que ésta aumente de tamaño y comience a liberar hormonas al torrente sanguíneo. En su etapa aguda, las características son indistinguibles de la enfermedad de Graves. Hay tres formas de tiroiditis: sub-aguda, silenciosa y de post parto. Esta condición es temporal, de 1 a 3 meses, pero cuando se revierte puede llevar al hipotiroidismo (Samuels, 2012).
- Alto consumo de yodo: El exceso de consumo de yodo en la dieta, la exposición a medios de contraste radiográficos o el consumo de medicamentos que contengan una gran cantidad de yodo, como la amiodarona puede llevar a que la glándula produzca altos niveles de hormonas que son liberados a circulación (Reid y Wheeler, 2005).
- Algunas causas raras de hipertiroidismo incluyen cáncer tiroideo metastásico, tumores de ovarios que producen hormonas tiroideas, tumores trofoblásticos que producen gonadotrofina coriónica y activan receptores de TSH altamente sensibles o tumores pituitarios secretores de TSH (Reid y Wheeler, 2005).

Los síntomas más comunes en el hipertiroidismo son la irritabilidad o nerviosismo, la fatiga o debilidad muscular, intolerancia al calor, trastornos de sueño, temblores, taquicardias, diarreas frecuentes, pérdida de peso, cambios de humor y bocio. La magnitud de estos síntomas depende de la edad del paciente, la duración de la enfermedad y la magnitud del exceso hormonal. Los síntomas se relacionan con la estimulación por HTs del catabolismo y con el aumento de la sensibilidad a catecolaminas (Reid y Wheeler, 2005).

1.1.5.2. Hipotiroidismo

El hipotiroidismo, por otro lado, es una enfermedad en la cual se producen bajos niveles de HTs. Puede tener diversas causas:

- Enfermedad de Hashimoto: Es un desorden autoinmune y la causa más frecuente de hipotiroidismo en adultos de países desarrollados. Se origina por la existencia de linfocitos T o anticuerpos contra la TPO y/o Tg, que se asocian con la destrucción de los folículos tiroideos. Se caracteriza por una marcada y difusa infiltración linfocitaria en el parénquima tiroideo, que genera una acumulación de linfocitos T, células plasmáticas y centros germinales, junto con células dendríticas y macrófagos (Morshed y col, 2012).
- Tiroiditis: Tal como se mencionó anteriormente, es una inflamación de la glándula que la lleva a producir altos niveles de HTs. Luego de dos o tres meses la situación se revierte y puede llevar a un estado de hipotiroidismo antes de volver a los valores normales (Samuels, 2012).
- Hipotiroidismo congénito: Es el desorden endócrino más común en neonatos, y causa retardo mental si no es tratado a tiempo. La mayoría de los casos están asociados con anormalidades durante el desarrollo de la glándula tiroides, aunque también pueden deberse a defectos genéticos en las proteínas involucradas en las síntesis de las HTs (Grasberger y Refetoff, 2011).
- La remoción quirúrgica parcial o total de la glándula tiroides o el tratamiento con iodo radiactivo de la glándula tiroides por hipertiroidismo, generalmente llevan al desarrollo de hipotiroidismo (Faggiano y col, 2011).
- Algunos medicamentos pueden interferir en la producción de HTs y llevar a un estado de hipotiroidismo. Los agonistas de dopamina, glucocorticoides y análogos de somatostatina pueden afectar la función tiroidea mediante la

supresión de TSH. También pueden afectar los niveles de TSH la metformina, drogas antiepilépticas y el carbonato de litio (Faggiano y col, 2011).

Los síntomas más comunes en el hipotiroidismo son la fatiga, ganancia de peso, intolerancia al frío, dolor en articulaciones y músculos, constipación, piel y cabello secos, baja sudoración, ciclos menstruales irregulares e infertilidad, depresión y latidos cardíacos lentos (Gaitonde y col, 2012).

1.2. Cáncer

El cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolados de células que puede aparecer prácticamente en cualquier lugar del cuerpo. El tumor suele invadir el tejido circundante y puede provocar metástasis en puntos distantes del organismo. Esta patología involucra cambios dinámicos en el genoma, que son transmitidos en cada división celular a las células hijas durante un número indefinido de generaciones, aun cuando el estímulo que provocó inicialmente dicho cambio ya no esté presente. En general, se originan por mutaciones en oncogenes que les otorgan una ganancia de función dominante o en genes supresores tumorales, los cuales presentan una pérdida de función recesiva.

1.2.1. Linfomas

Los linfomas son de particular importancia en el desarrollo de este trabajo de tesis. Constituyen un grupo heterogéneo y amplio de síndromes linfoproliferativos tumorales, clasificados en base a criterios morfológicos, inmunológicos, genéticos y clínicos. Se generan por la expansión clonal de una línea o sublínea linfoide, que presenta alterados algunos de los mecanismos de homeostasis, por lo que se produce su transformación neoplásica.

Los linfomas de células T periféricos (PTCL) constituyen aproximadamente el 10-15% del total de las neoplasias linfoides (de Leval y Gaulard, 2011). Con una incidencia anual aproximada de 1,77 por cada 100.000 habitantes, su frecuencia varía geográficamente, siendo su prevalencia mayor en Asia (Dearden y col, 2011; Armitage, 2013; William y Armitage, 2013). Estos linfomas resultan de la proliferación clonal de linfocitos T maduros post-tímicos. La última clasificación de

neoplasias hematopoyéticas de la OMS ha dividido a este grupo de desórdenes de acuerdo a su forma de presentación, según sea predominantemente leucémica (diseminada), ganglionar, extraganglionar o cutánea (Jaffe y col. 2008; Dearden y col, 2011). Las variedades más comunes son las de tipo nodal, que incluyen al linfoma de células T periféricas no especificado de otro modo (PTCL-NOS), al linfoma de células grandes anaplásico (ALCL) y al linfoma de células T angioinmunoblástico (AITL). Usualmente afectan a adultos y son más frecuentes en hombres que en mujeres. Aunque algunos subtipos pueden seguir un curso prolongado más benigno, la gran mayoría de pacientes con PTCL tiene mal pronóstico, debido a la combinación de un curso clínico agresivo y a la falta de tratamientos específicos (Foss y col, 2011). No se dispone de protocolos estándares para el tratamiento de pacientes con PTCL, los que son generalmente tratados con los regímenes terapéuticos diseñados para los linfomas de células B. Sin embargo este enfoque general tiene un resultado muy pobre, siendo habitual la presentación de recaídas y pocas las opciones eficaces para la terapia de rescate (Foss y col, 2011). Los mecanismos moleculares que intervienen en la patogénesis de los linfomas están basados en el estudio de la desregulación de genes que resultan ser indispensables para la supervivencia de las células linfoides. Estos estudios también aportan información vital para el diseño y desarrollo de regímenes terapéuticos específicos para PTCL (Jaffe y col, 2008).

1.2.2. Participación del eje tiroideo en procesos neoplásicos

Existen evidencias que sugieren alteraciones en el eje tiroideo durante el curso de enfermedades neoplásicas, así como también que las HTs tienen efectos sobre el crecimiento y desarrollo tumoral, aunque los resultados hasta la fecha no son concluyentes.

En este sentido, Reddy y col (2007) han sugerido que los pacientes con hipotiroidismo tienen un mayor riesgo de desarrollar algún tipo cáncer hepático o de mama. Franklyn y col. (1999) también han demostrado una mayor incidencia de cáncer en pacientes hipotiroideos, y también han visto que los pacientes con hipertiroidismo presentan un menor desarrollo de neoplasias que los individuos eutiroideos. Esto último probablemente relacionado con el aumento de la función

inmunológica del huésped ejercido por las HTs, lo que facilitaría la resistencia tumoral.

Sin embargo, también se ha descrito una menor incidencia de carcinoma mamario en pacientes hipotiroideas (Cristofanilli y col, 2005) y una menor incidencia y mortalidad en pacientes tratadas con radioiodo por su hipertiroidismo. En concordancia con esto, varias evidencias indican que el cáncer puede ocasionalmente permanecer en estadio “dormido” por tiempos prolongados y que la normalización del estado tiroideo mediante la terapia de reemplazo hormonal conduce a la reactivación de la enfermedad (Theodossiou y Schwarzenberger, 2000). Asimismo, el hipotiroidismo clínico ha sido asociado con una mayor supervivencia en varios tipos de procesos malignos aunque los mecanismos involucrados son desconocidos (Toms y col, 1998). Hercbergs (1999) ha sugerido que el hipotiroidismo incrementaría la predisposición a que se genere una regresión de los neoplasmas, tanto espontánea como inducida por terapia, a través de un mecanismo apoptótico.

Estudios *in vitro* han demostrado el incremento de la proliferación de una línea celular leucémica por acción de T3 (Brtko y col., 1992) y del linfoma T murino BW5147 por tratamiento con concentraciones fisiológicas de T3 y T4 (Barreiro Arcos y col, 2011). Sin embargo, el tratamiento crónico con HTs indujo la apoptosis de linfocitos normales y tumorales (Mihara y col, 1999; Barreiro Arcos y col, 2013).

Por otra parte, estudios realizados en modelos experimentales indican que el crecimiento tumoral se exacerba en animales hipertiroideos y se enlentece en los hipotiroideos. Así por ejemplo, en ratones hipotiroideos se vio inhibido tanto el crecimiento local como metastásico de tumores originados a partir de líneas de hepatomas. El hipertiroidismo, por otra parte, aceleró el crecimiento del hepatoma de Morris en ratas y el de dos fibrosarcomas en ratón (Hercbergs, 1996). También se comprobó que el crecimiento de tumores humanos de próstata y pulmonar está enlentecido en ratones atímicos o tratados con propiltiouracilo. Este efecto fue revertido por el tratamiento con T3 (Theodossiou y col, 1999).

Por su parte la patología neoplásica puede llevar a alteraciones en el eje tiroideo. Así, se ha descrito la disminución de los niveles séricos de HTs en animales singeneicos transplantados con linfomas (Besedovsky y col, 1989). También existe una correlación positiva entre el cáncer de mama y el desarrollo de alteraciones tiroideas de origen autoinmune (Giani y col, 1996). Las alteraciones en el metabolismo de las hormonas tiroideas son dos veces más comunes en pacientes con cáncer que no han sido tratados por su enfermedad que en individuos sanos (Dişel y col, 2011). Más aún, es común el síndrome de T3 baja en pacientes de edad avanzada con injurias graves o diversas enfermedades terminales, siendo un indicador de un peor pronóstico (Tognini y col, 2010). Sin embargo, también se ha detectado este síndrome en pacientes pediátricos con linfoma Hodgkin (Mohn y col, 2001).

Teniendo en cuenta estas evidencias, se puede deducir la existencia de un fenómeno bidireccional en el que el estado tiroideo puede afectar el balance entre la proliferación y la muerte de las células tumorales y por otro lado, el tumor puede afectar la función tiroidea.

1.2.3. Características generales de los procesos neoplásicos

Para estudiar en profundidad el efecto del estado tiroideo sobre el desarrollo de neoplasias, es necesario conocer las características que distinguen a las células tumorales de las normales y que les otorgan la capacidad de proliferar descontroladamente y hacer metástasis en sitios distantes. A continuación se detallan las capacidades adquiridas por las células tumorales, descritas por Hanahan y Weinberg en el año 2000, que se encuentran representadas en la **Figura 1.7.**

Figura 1.7: Capacidades adquiridas en cáncer

Capacidades adquiridas por la mayoría de las células tumorales durante su desarrollo a través de diversas estrategias mecánicas. *Adaptado de Hanahan y Weinberg, 2000.*

- **Autosuficiencia de señales de crecimiento:** Para dividirse, las células normales requieren de señales de crecimiento que las activen y las saquen de un estado quiescente. Estas señales son factores solubles, componentes de la matriz extracelular o moléculas de adhesión célula-célula, que se unen a sus receptores y activan la división celular. Las células tumorales adquieren la capacidad de dividirse independientemente de estos factores. Muchas células producen por sí mismas factores de crecimiento, otras sobreexpresan receptores que las hacen hiperreactivas, y también hay células tumorales que cambian el patrón de expresión de integrinas hacia aquellas que generan señales que favorecen el crecimiento. Otros mecanismos, aún más complicados, incluyen alteraciones en las cascadas de señalización intracelular luego de la activación de los receptores o integrinas por un ligando específico.
- **Insensibilidad a señales anti-proliferativas:** Además de los factores de crecimiento, existen también factores solubles o de matriz extracelular que inhiben la división y llevan al arresto del ciclo celular. Algunas células tumorales adquieren

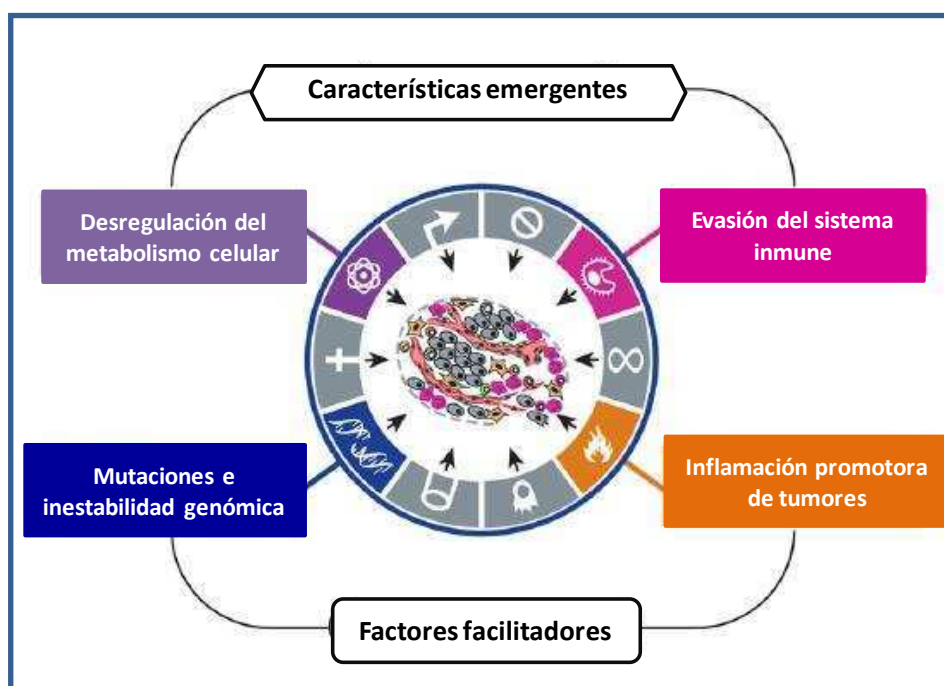
la capacidad de independizarse de estas señales. Lo hacen principalmente mediante la activación de proteínas que regulan la entrada a la fase G₁ del ciclo celular o por la disminución de la expresión de los receptores de factores inhibitorios.

- **Evasión de la apoptosis:** El crecimiento celular no sólo está determinado por su tasa de proliferación, sino también por su tasa de muerte. Frente a la detección de anomalías, tales como daño al ADN, desbalances en las señales intracelulares por activación de oncogenes, insuficientes factores de supervivencia o hipoxia, las células disparan procesos de apoptosis. Sin embargo, las células tumorales presentan mecanismos que impiden estos procesos. Estos mecanismos se basan principalmente en la sobreexpresión de genes antiapoptóticos como Bcl-2 o la pérdida de reguladores proapoptóticos, que está generalmente mediada por la funcionalidad de p53.
- **Potencial proliferativo ilimitado:** Las células tumorales, a diferencia de las normales, tienen un potencial de crecimiento ilimitado. Este tipo de células no sufren de acortamiento de los telómeros y no entran en senescencia. Esto es posible porque sobreexpresan la enzima telomerasa, encargada de colocar las repeticiones de hexanucleótidos al final del ADN de los telómeros.
- **Angiogénesis:** Casi todas las células en todos los tejidos se encuentran ubicadas a una distancia no mayor de 100 µm de un capilar sanguíneo. Las células que conforman neoplasias incipientes en general no tienen capacidad angiogénica, pero para poder crecer en tamaño, hacen un “switch angiogénico” y comienzan a producir VEGF y FGF, disminuyen la expresión de factores anti-angiogénicos como trombospondina 1 o interferón (IFN) β o inducen cambios en la expresión de integrinas hacia aquellas que son pro-angiogénicas.
- **Invasión tisular y metástasis:** El asentamiento de las células tumorales en tejidos distantes es la principal causa de muerte por cáncer. Lo que permite que estas células puedan separarse del tejido tumoral y entrar en circulación son los cambios en la expresión de integrinas y de proteínas de adhesión célula-célula, principalmente cadherinas, que son las que unen a las células con la matriz extracelular, y la activación de proteasas extracelulares que degradan la matriz.

Adicionalmente, en el año 2011 Hanahan y Weinberg han agregado otras dos características de las células tumorales sumadas a las descritas anteriormente

(Figura 1.8). Una de ellas es la desregulación del metabolismo celular, que permite la supervivencia celular mediante la glicólisis anaeróbica y que afecta no sólo el crecimiento de las células tumorales, sino también la migración de las mismas para la generación de metástasis (Han y col, 2013). La otra característica fundamental que presentan todos los tumores es la capacidad de evadir la vigilancia del sistema inmune, responsable de la eliminación de la mayoría de las células tumorales incipientes, mediante la detección de antígenos extraños en las mismas.

Figura 1.8: Capacidades adicionales adquiridas en cáncer



Capacidades adquiridas por la mayoría de las células tumorales y características tumorales que permiten el establecimiento de todas las capacidades descritas. *Adaptado de Hanahan y Weinberg, 2011.*

Junto con estas características, Hanahan y Weinberg (2011), también describieron dos factores que facilitan el establecimiento de neoplasias. Uno de estos factores es la aparición de mutaciones e inestabilidad genómica en las células, que induce la mayoría de las características de las células tumorales previamente mencionadas. El otro factor necesario para el establecimiento de neoplasias es el proceso inflamatorio, que podría aportar moléculas bioactivas al microambiente tumoral, tales como citoquinas y factores de crecimiento. En algunos tipos de cáncer, el proceso inflamatorio está presente antes de que

ocurra la transformación maligna, mientras que, en otros casos, el cambio oncogénico induce un microambiente inflamatorio que promueve el desarrollo del tumor (Montovani y col, 2008).

Es importante volver a resaltar que, si bien todas las características descritas por Hanahan y Weinberg (2011) tienen un amplio consenso, no incluyen la influencia del microambiente tumoral crucial para el desarrollo y evolución del tumor. La inclusión de los mediadores y efectores celulares de la inflamación como un factor promotor de la formación de tumores es un primer paso hacia ese sentido, aunque corresponde sólo a una porción del microambiente tumoral, compuesto por una compleja y dinámica red de interrelaciones entre numerosos tipos celulares que lo componen (Floor y col, 2012). En este contexto es además de especial atención la relación entre el estroma y el epitelio tumoral, ya que alteraciones a nivel de estas interacciones recíprocas podrían llevar a la carcinogénesis (Sonnenschein y Soto, 2013).

1.2.3.1. Proliferación y ciclo celular

Para poder dividirse las células entran en el denominado ciclo celular, un proceso ordenado y repetitivo en el tiempo, en el que la célula proliferante crece y se divide en dos células hijas (**Figura 1.9**).

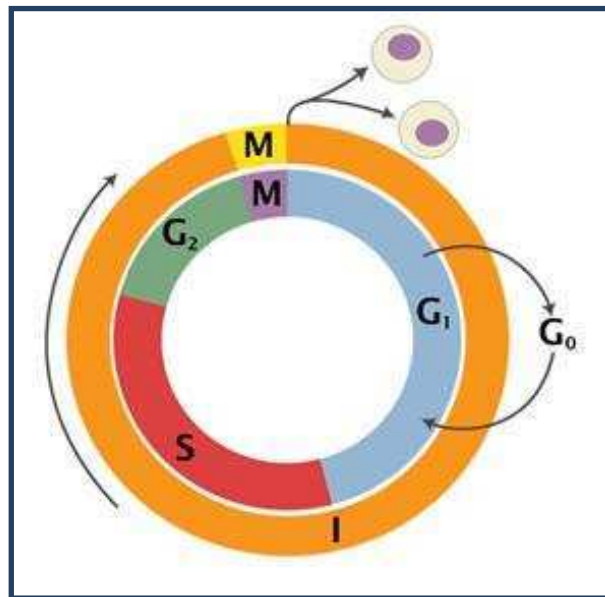
La interfase es la fase más larga del ciclo, ocupando casi el 95% del mismo, y comprende tres etapas:

- Fase G₁ (Gap 1): En esta primera fase del ciclo celular tiene lugar el crecimiento celular, dado que la célula sintetiza proteínas y RNA para la posterior división celular. Es una fase muy importante porque aquí se decide el destino de la célula, si continúa dividiéndose o sale del ciclo celular. En condiciones desfavorables para la célula o frente a señales inhibitorias, las células pueden permanecer durante tiempos prolongados en G₁ o hasta pueden ingresar en un estado de no división llamado G₀.
- Fase S: Fase en la cual ocurre la replicación del ADN y la duplicación de los cromosomas.
- Fase G₂ (Gap 2): Continúa el crecimiento celular y la duplicación de proteínas y RNA, observándose cambios en la estructura celular, que indican el principio de

la división. Esta fase termina cuando los cromosomas empiezan a condensarse al inicio de la mitosis.

La mitosis corresponde a la fase M del ciclo celular. En esta fase la célula progenitora se divide para formar dos células hijas. Esta compuesta por dos eventos principales: la división del núcleo, o mitosis, y la división de la célula o citocinesis.

Figura 1.9: Fases del ciclo celular



Esquema representativo de las fases del ciclo celular. Frente a estímulos proliferativos, las células atraviesan la interfase (I), que está compuesta por las fases Gap1 (G₁), síntesis (S) y Gap2 (G₂) y luego ingresan en la fase de mitosis (M), lo que lleva a la formación de dos células hijas. *Adaptado de: Galderisi y col, 2003.*

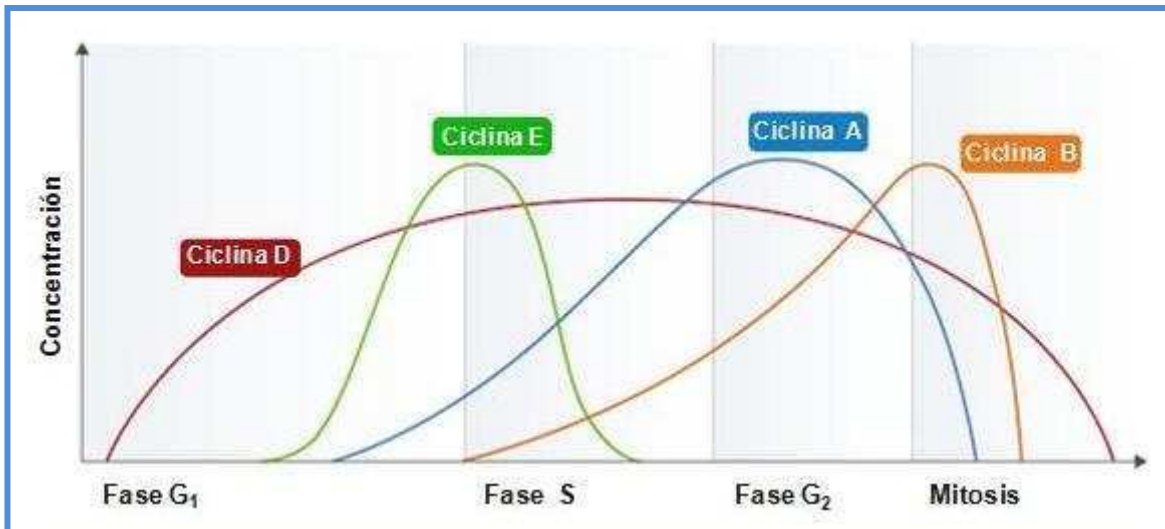
Para asegurar el correcto desarrollo del ciclo, es decir, que cada nueva célula hija reciba un genoma completo, tanto el inicio y progresión de la fase S, como la mitosis deben ser controladas exhaustivamente. En este control del ciclo celular son muy importantes las ciclinas, las quinasas dependientes de ciclinas (Cdks) y sus inhibidores (CdkI), y los genes supresores tumorales (Lim y Kaldis, 2013).

1.2.3.1.1. Ciclinas

Las ciclinas son proteínas reguladoras del ciclo celular, que forman complejos enzimáticos con quinasas dependientes de ciclinas (Cdks), encargadas de

fosforilar residuos de serina y treonina de proteínas regulatorias específicas. Cada complejo ciclina-Cdk regula distintas partes del ciclo celular (**Figura 1.10**).

Figura 1.10: Regulación de la expresión de ciclinas a lo largo del ciclo celular



Esquema representativo de la regulación de la expresión de ciclinas a lo largo del ciclo celular. Adaptado de: *Roberti y col, 2009*.

Las ciclinas D conforman la subunidad reguladora del complejo formado con Cdk4 o Cdk6 y son importantes durante la transición G_0/G_1 . La ciclina D1 fosforila al retinoblastoma (Rb), bloqueando su efecto inhibitorio sobre el factor de transcripción E2F, involucrado en la expresión de un gran número de genes regulatorios. La ciclina D1 se ha visto sobreexpresada en varios tipos de cáncer, incluyendo el adenoma de paratiroides (Imanishi y col, 2001; Corbetta y col, 2007), cáncer de mama (Casimiro y col, 2012), próstata y colon, linfomas (Siddon et. al., 2012) y melanomas. Las alteraciones de las otras ciclinas D en células tumorales son menos frecuentes. La ciclina D2 se ha visto sobreexpresada en algunos tumores gástricos (Tacano y col, 2000) y de colon (Leach y col, 1993). La ciclina D3 raramente se encuentra sobreexpresada en tumores humanos, salvo en algunos subtipos de carcinomas mamarios (Bartkova y col, 1996) y tumores cerebrales Buschges y col, 1999).

La ciclina E forma un complejo con Cdk2 en la fase G_1 del ciclo celular, lo cual es necesario para la transición G_1/S . Este complejo fosforila p27Kip1, un inhibidor de las ciclinas D, que es degradado en el proteasoma y además promueve la

expresión de la ciclina A y, como consecuencia, la entrada y la progresión de la fase S.

La ciclina A, por su parte, forma complejos enzimáticos con Cdk1 y Cdk2. Dependiendo de cuál es la quinasa que forma esta unión, favorece la progresión de la fase S o la transición de la fase G₂ a la fase M, respectivamente. Esta ciclina se une a importantes reguladores del ciclo celular, como proteínas de la familia Rb, factores de transcripción E2F-1 y a proteínas de la familia p21.

Cdk1 también se une a la ciclina B, lo cual es necesario para la progresión de las células a lo largo de la fase M. Las ciclinas A y B son consideradas ciclinas mitóticas y son rápidamente degradadas durante la mitosis.

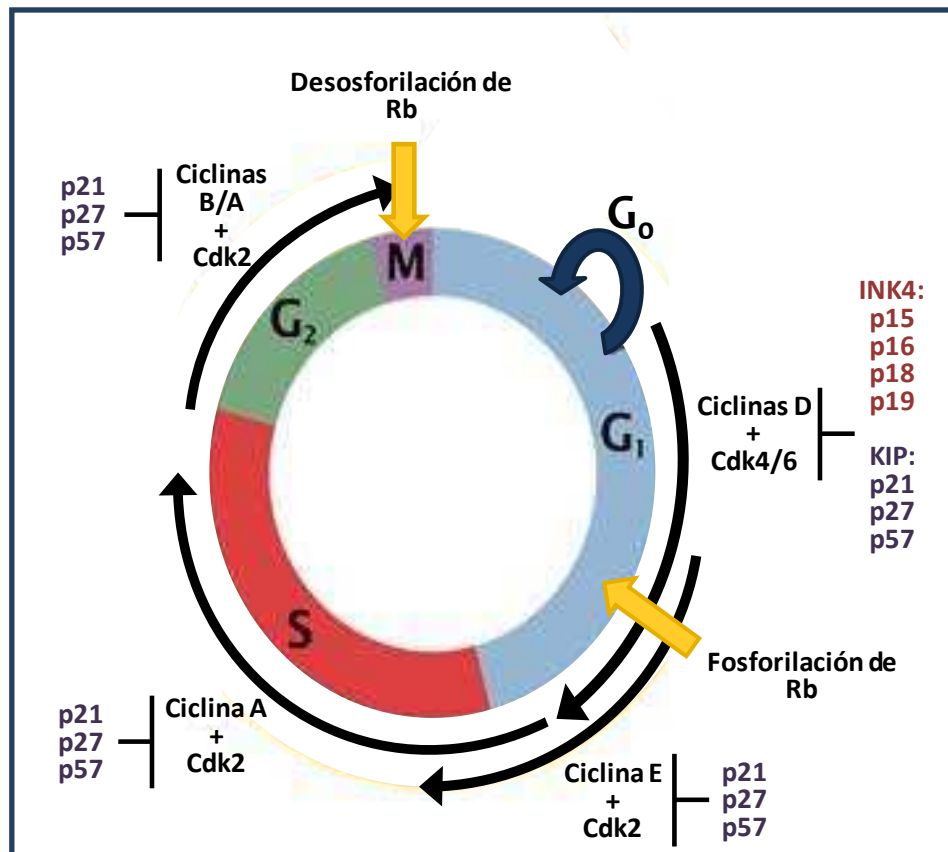
Alisi y col. (2005) reportaron que el estado tiroideo modula la proliferación de los hepatocitos mediante la regulación de proteínas del ciclo celular. El hipertiroidismo aumenta la expresión de las ciclinas D1, E y A, al favorecer la formación de complejos ciclinas-cdks y disminuir la expresión de inhibidores de Cdks y las proteínas proapoptóticas p53 y p27. Por el contrario, en condiciones de hipotiroidismo se encontró una disminución en los niveles de expresión de ciclinas y un incremento en la expresión de proteínas proapoptóticas.

1.2.3.1.2. Inhibidores de Cdks

El ciclo celular es interrumpido en respuesta a diversas señales antiproliferativas, como la privación de factores de crecimiento y citoquinas o daño al ADN, principalmente por la inhibición de la fosforilación de la proteína de Rb. Esto lleva a la inhibición de factores de transcripción E2F, que son necesarios para la activación transcripcional de genes necesarios para la síntesis del ADN. Los principales mediadores de este efecto son los inhibidores de Cdks.

Los inhibidores de Cdks están divididos en dos familias: la familia CIP/KIP, que incluye a p21 y p27 y la familia INK4, que incluye las proteínas p15 y p16. Ambas familias difieren en su estructura, mecanismo de acción y especificidad (**Figura 1.11**).

Figura 1.11: Inhibidores de quinasas de ciclinas en el ciclo celular



Se muestran los puntos del ciclo celular regulados por los miembros de las familias INK4 y KIP/KIP. *Adaptado de: Galderisi y col, 2003*

Los componentes de la familia INK4 interactúan previniendo la formación específica de complejos ciclina/Cdk e inhiben la actividad de Cdk4 y Cdk6, ambos involucrados en el control de la fase G₁. Como consecuencia de esto, se inhibe la fosforilación de Rb, que lleva a la inhibición de la transcripción de una variedad de proteínas necesarias para la progresión de G₁ a S y para la replicación del ADN, incluyendo las ciclinas E y A (Mirzayans y col, 2012b).

El componente más importante de la familia es p16, que se encuentra mutado en muchas neoplasias. Además de su rol como inhibidor del ciclo celular, existen numerosos reportes que involucran a p16 en otros roles dentro de la célula. Participa en los procesos de angiogénesis, invasión tumoral, diseminación celular y apoptosis, entre otros, mediante la regulación negativa de la transcripción de diversos genes implicados en estos procesos (Mirzayans y col, 2012b).

A diferencia de p16, la expresión de p15 se induce cuando las células están expuestas a TGF- β y es esencial en la regulación de los efectos inhibitorios del ciclo celular de esta citoquina (Hannon y Beach, 1996). Es importante destacar que se ha reportado el silenciamiento transcripcional de p15, por metilación de su promotor, en leucemias mieloides y linfoblásticas, mielomas múltiples y linfomas (Hayslip y Montero, 2006). El silenciamiento transcripcional de genes supresores de tumores, asociado a la metilación del ADN, es un evento epigenético común en las neoplasias hematológicas.

Los miembros de la familia CIP/KIP también interactúan e inhiben la actividad de los complejos Cdk/ciclinas.

Cuando hay daño al ADN se genera un aumento en la concentración y actividad de la proteína p53, que promueve la transcripción de p21. Como consecuencia, p21 bloquea el ciclo celular en la transición G₁/S, a través de la unión con los complejos Cdk4/ciclina D y Cdk2/ciclina E. Este freno del ciclo celular permite a la célula reparar el ADN dañado antes de la replicación. A su vez, p21 también ejerce su efecto sobre el ciclo celular mediante la inhibición del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) y la degradación de Rb (Mirzayans y col, 2012). p21 inhibe también a la ciclina B1, regulando de esta manera también la transición de G₂ a S (Mirzayans y col, 2012). Se ha visto *in vitro* que la depleción de HTs inhibe la proliferación de células de glioblastoma mediante el arresto de las células en G₁, como resultado de la inducción de p21 (Toms y col, 1998).

La proteína p27, por su parte, juega un rol crucial en la comunicación entre las señales extracelulares de regulación del crecimiento celular y la progresión o salida del ciclo celular. En respuesta a diversas señales tanto intra- como extracelulares, p27 se une a Cdk2, que es la quinasa predominante para la progresión entre la fase G₁ y S, y así evita los eventos replicativos sucesivos, llevando al arresto en G₁ (He y col, 2012).

1.2.3.1.3. Genes supresores tumorales

Los genes supresores tumorales son genes fundamentales en la regulación del ciclo celular. Su rol principal es inhibir el ciclo frente a condiciones celulares

adversas e impedir la proliferación excesiva. Estos genes se encuentran frecuentemente mutados en diversos tipos de tumores. Algunos de los genes supresores tumorales que se encuentran más frecuentemente mutados en linfomas son p53, Rb y PTEN (Nagai y col, 2002; Murakami y Tanaka, 1991), que serán brevemente descriptos a continuación.

En su publicación en la revista Nature, Lane (1992) denominó a la proteína p53 como “*guardián del genoma*”. Esto se debe a que frente a situaciones de hipoxia, estrés del retículo endoplasmático, agentes que dañen al ADN, disfunción de los microtúbulos, acortamiento de los telómeros, estrés oxidativo o la activación de oncogenes, se activa p53, que a su vez activa otras proteínas efectoras que evitan el desarrollo de neoplasias. Como ya mencionamos anteriormente, p53 puede activar la transcripción de proteínas que frenan el ciclo celular, como p21. También regula la expresión de proteínas que regulan la apoptosis, entre las que se encuentra Bax, que es regulada tanto directa como transcripcionalmente de forma positiva por p53 (Chipuk y col, 2004). Regula también proteínas involucradas en la angiogénesis, como VEGF, que es inhibida por p53 (Ghahremani y col, 2013). Se demuestra claramente la importancia de esta proteína como supresora tumoral en datos clínicos, donde se observó que más del 50% de los tumores humanos presentan mutaciones en el gen de p53. En el caso de los linfomas este número es un poco menor, de aproximadamente 30% (Soussi, 2001).

Como ya mencionamos previamente, cuando el Rb es fosforilado por los complejos ciclinas/Cdks, se frena la progresión del ciclo celular entre las fases G₁ y S, mediante la inhibición de los factores de transcripción E2F. El Rb también realiza un control no transcripcional del ciclo celular, mediante la estabilización de p27. Además del control del ciclo celular en G₁, Rb tiene acciones sobre otras funciones celulares, que incluyen la diferenciación celular, mediante el control de la transcripción de las proteínas involucradas (Lipinski y Jacks, 1993), la interacción con enzimas remodeladoras de la cromatina, con lo que regula la expresión global de genes (Harbour y Dean, 2000) y el control de la estabilidad genómica (Hernando y col, 2004).

El PTEN es la fosfatasa del fosfatidilinositol (3, 4, 5)-trifosfato (PIP₃). Regula negativamente los niveles intracelulares del PIP₃ y la cascada de señalización Akt/PKB. Por lo tanto, es un regulador de la homeostasis celular y también está relacionado con la regulación de diversas funciones celulares básicas, entre las que se encuentran la migración celular y la quimiotaxis (Sulis y Parsons, 2003). Se lo considera un gen supresor de tumores, ya que se ha reportado su mutación en un número significativo de cánceres de mama y de próstata, en carcinomas de endometrio, glioblastomas, algunos melanomas y en linfomas no-Hodgkin (Sakai y col, 1998).

1.2.3.2. Angiogénesis

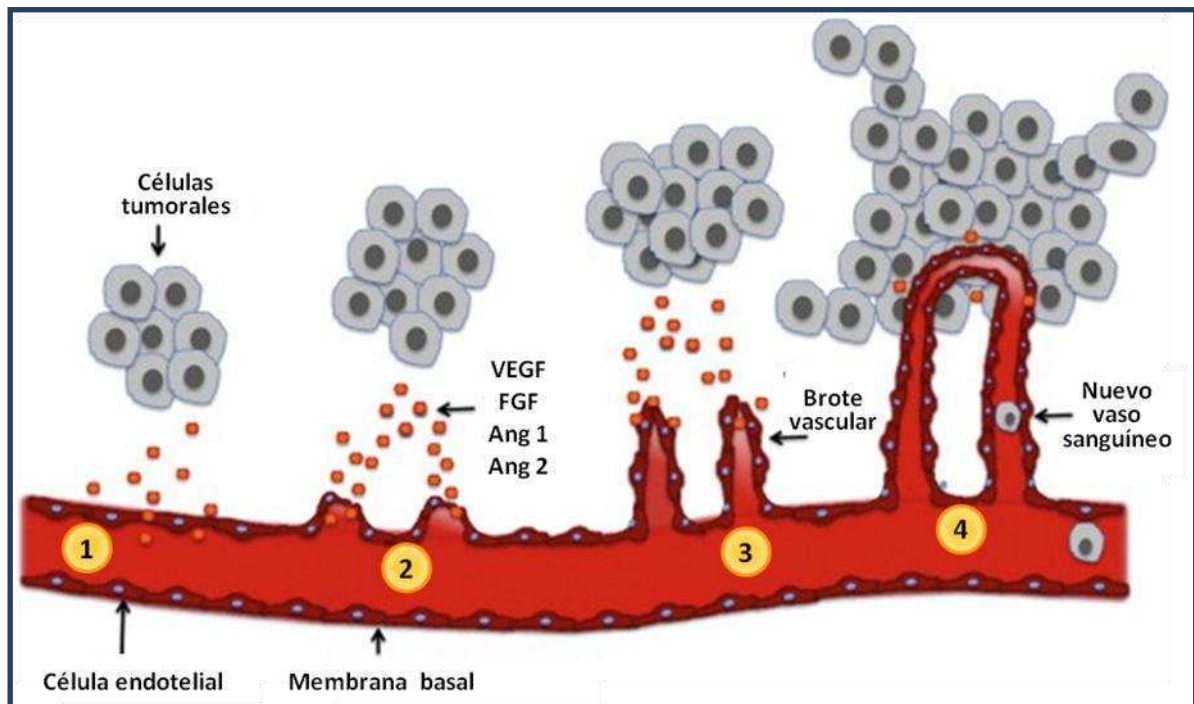
La angiogénesis es el proceso por el cual se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura normal preexistente. Esto ocurre en diferentes tejidos frente a condiciones fisiológicas (embriogénesis, reparación de heridas) y patológicas (enfermedades inflamatorias, cáncer). La angiogénesis está regulada por un balance delicado de señales parácrinas, que incluyen citoquinas proinflamatorias y factores de crecimiento. Estas promueven y regulan la proliferación y migración de células endoteliales, remodelado de la matriz extracelular, reclutamiento de pericitos y la estabilización de los nuevos vasos. Entre las moléculas más importantes en cuanto a su efecto regulatorio sobre la angiogénesis, se encuentran las angiopoyetinas (Ang-1 y Ang-2), la familia del receptor de tirosina quinasas Tie-2, el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (Figuroa-Vega y col, 2009).

El crecimiento tumoral, la invasión y la formación de metástasis están fuertemente relacionados con la angiogénesis. Los nuevos vasos formados promueven el crecimiento tumoral, ya que facilitan la llegada de oxígeno y nutrientes y permiten la remoción de catabolitos. El proceso de angiogénesis consiste en una serie de pasos regulados, que se muestran en la **Figura 1.12**.

Las células tumorales secretan factores proangiogénicos, principalmente VEGF y FGF, activando a las células endoteliales que conforman capilares cercanos a la zona donde se generó la neoplasia. Como consecuencia, éstas comienzan a

secretar metaloproteasas de matriz (MMPs), con el fin de degradar la matriz extracelular y migrar hacia el estímulo. Allí, las células endoteliales proliferan y generan brotes vasculares. Estos dan lugar finalmente al desarrollo de una red circulatoria funcional con el posicionamiento perivascular de células de soporte, como los pericitos (Risau, 1997).

Figura 1.12: Proceso de angiogénesis tumoral



(1) En los tumores recientemente formados se genera hipoxia, que lleva a la activación de genes proangiogénicos como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEFG) o el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). (2) La secreción de estos factores activa células endoteliales de capilares cercanos preexistentes, que producen metaloproteasas de matriz (MMPs) para romper la matriz extracelular y poder migrar hacia el estímulo. (3) Las células endoteliales proliferan y forman brotes vasculares. (4) Luego de la formación de una nueva matriz extracelular y una nueva membrana basal, el nuevo vaso sanguíneo está disponible para la oxigenación del tejido y la eliminación de desechos. *Adaptado de: Weiss y col, 2012.*

Los estudios realizados sobre la modulación de la angiogénesis por el estado tiroideo arrojaron resultados muy diversos. Por un lado, la endostatina, un inhibidor natural de la angiogénesis, se vio aumentada en sueros de pacientes hipertiroideos y disminuida en pacientes hipotiroideos (Kucharz y col, 2003). Sin embargo, se han encontrado niveles séricos aumentados de moléculas proangiogénicas, como Tie-2 y Ang-2, en pacientes con la enfermedad de Graves, lo cual fue revertido por el tratamiento con agentes antitiroideos (Figuroa-Vega y

col, 2009). Experimentos realizados *in vitro* demuestran un efecto positivo de la T4 en la inducción de la angiogénesis, que sería mediado por la vía no genómica de acción de estas hormonas (Bergh y col, 2005).

1.2.3.3. Mecanismo de apoptosis celular

Como vimos previamente, la evasión de la apoptosis es una de las características principales de un proceso tumoral. Defectos en los factores que inducen la apoptosis pueden eventualmente llevar a la expansión de células neoplásicas. La resistencia a la apoptosis puede también aumentar el escape de las células tumorales de la vigilancia del sistema inmune.

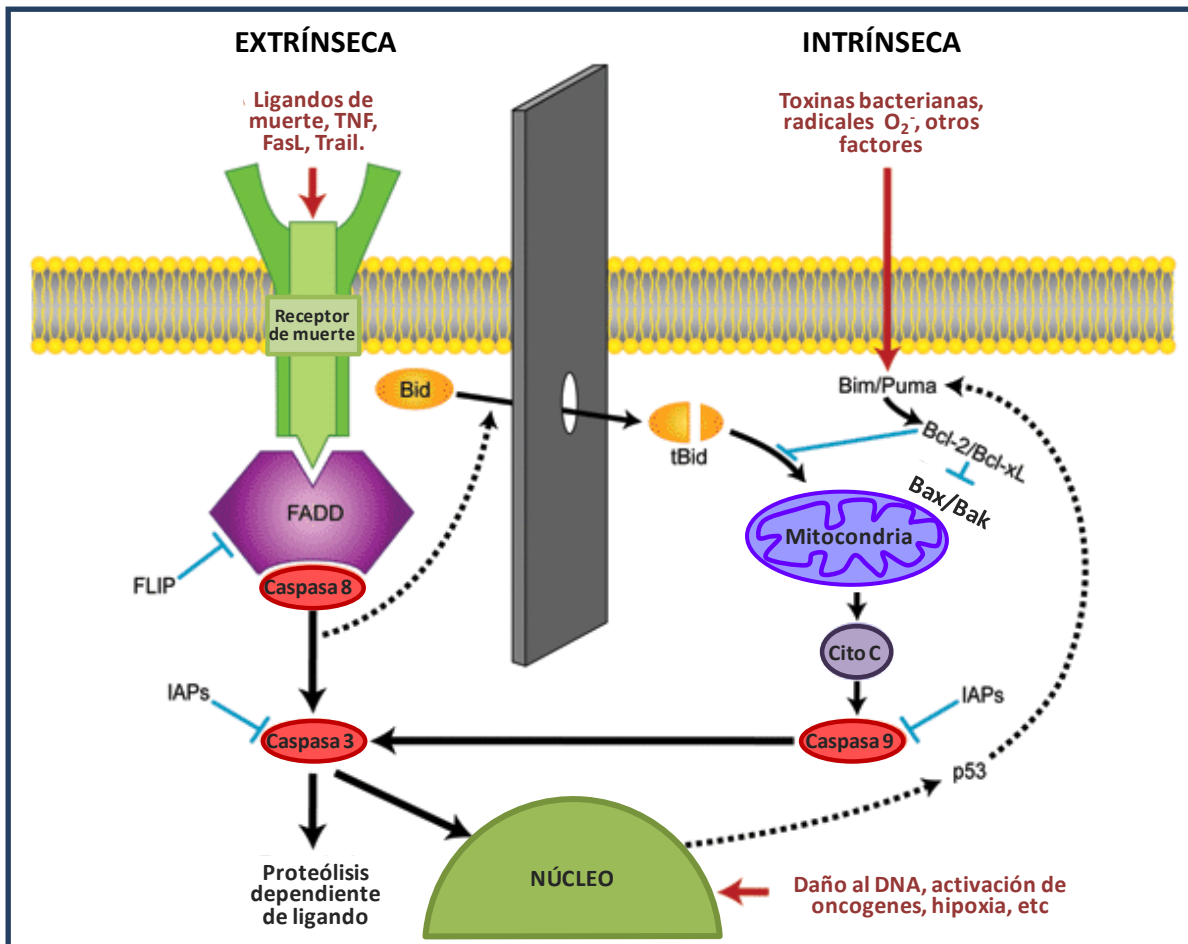
Existen dos vías alternativas para el inicio de la apoptosis, una es mediada por receptores de muerte sobre la superficie celular, comúnmente llamada vía extrínseca, y la otra es mediada por la mitocondria, la vía intrínseca (**Figura 1.13**). Ambas vías convergen en la activación de caspasas, que clivan sustratos celulares y llevan a cambios bioquímicos y morfológicos, característicos de la apoptosis.

Los miembros de la familia de las caspasas comparten dos características claves: son sintetizados como proenzimas y activados por clivaje por otras caspasas originando una cascada de eventos proteolíticos. Los 14 miembros de la familia de las caspasas se dividen en: caspasas ejecutoras, encargadas de clivar sustratos particulares que llevan a la apoptosis; y caspasas iniciadoras, que actúan río arriba, activando proteolíticamente a las caspasas ejecutoras. Las caspasas iniciadoras se activan por autoproteólisis; entre ellas se encuentran las caspasas 2, 8 y 9. Entre las caspasas ejecutoras, la más estudiada es la caspasa 3, responsable del clivaje del regulador de p21 y de la endonucleasa dependiente de Ca/Mg. Esta última al activarse corta el ADN en fragmentos nucleosomales.

Las células que entran en el proceso de apoptosis sufren una serie de cambios morfológicos comunes. Estos cambios incluyen la separación de la célula de sus vecinas, alteraciones de las membranas celulares con aumento de la permeabilidad y ampollado (*blebbing*), densidad celular aumentada, compactación y segregación de la cromatina nuclear. Posterior a la condensación de la

cromatina, el núcleo se fragmenta y se forman los cuerpos apoptóticos que son eliminados al entorno extracelular, donde son endocitados por células fagocíticas, lo que evita la lesión y la consiguiente respuesta inflamatoria.

Figura 1.13: Mecanismos de inducción de apoptosis celular



Vía extrínseca y la vía intrínseca de apoptosis celular. En la primera, ligandos específicos se unen a receptores de muerte, existe activación de caspasas iniciadoras que activan por proteólisis a las efectoras; en la segunda vía el estímulo apoptótico provoca daños a nivel mitocondrial con liberación de citocromo c y activación de caspasas iniciadoras y efectoras. Ambas vías conducen a la muerte celular por la actividad proteolítica de las caspasas sobre sustratos específicos. *Adaptado de: Coto (2007).*

En la vía intrínseca, los estímulos apoptóticos inducen daños a nivel mitocondrial, tales como la pérdida del potencial de membrana (despolarización), con la consecuente alteración del funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial, la liberación de calcio y de citocromo c. La salida del citocromo c desde el espacio intermembrana mitocondrial hacia el citosol activa la cascada proteolítica de

caspasas. El citocromo c se une a Apaf-1 y permite que esta proteína reclute caspasa 9. Esta última es activada por clivaje y procesa a las caspasas efectoras provocando la fragmentación del núcleo celular (Slee y col, 1999).

La integridad mitocondrial está regulada por la familia de proteínas Bcl-2. Por un lado, las proteínas antiapoptóticas como Bcl-xL previenen la despolarización de la membrana interna mitocondrial inhibiendo la liberación de citocromo c. Adicionalmente Bcl-2 forma un complejo con Apaf-1, proteína que se une al citocromo c durante la inducción de la apoptosis, impidiendo su acción. Por otro lado, Bad y Bax son proteínas proapoptóticas que se unen a la membrana externa mitocondrial formando poros. Este hecho altera la permeabilidad de la membrana mitocondrial, desestabilizándola, generando una reducción de su potencial redox y permitiendo la salida del citocromo c hacia el citosol. El balance entre la expresión de proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas determina la inducción o no de la apoptosis celular.

1.3. Inmunidad

Como mencionamos previamente, una de las características comunes a la mayoría de los procesos tumorales es la inflamación (Mantovani, 2009). En algunos tipos de cáncer, el proceso inflamatorio se presenta previamente a la transformación maligna, mientras que, en otros casos, el cambio oncogénico induce un microambiente inflamatorio que promueve el desarrollo del tumor (Montovani y col, 2008). Independientemente de su origen, este proceso puede contribuir a la formación de neoplasias mediante la liberación de moléculas bioactivas en el microambiente tumoral, que incluyen factores de crecimiento que mantienen la señalización proliferativa, factores de supervivencia que evitan la muerte celular, factores proangiogénicos y enzimas de remodelado de la matriz extracelular (Hanahan y Weinberg, 2011). Esto contribuye a la proliferación y a la supervivencia de las células malignas, promueve la angiogénesis y la metástasis, altera la respuesta inmune adaptativa y las respuestas a las hormonas y agentes quimioterapéuticos.

Sin embargo, el sistema inmune, a través de la inmunovigilancia tumoral, es responsable de la eliminación de la mayoría de las células tumorales incipientes. Además evita la progresión de tumores en fase tardía y la formación de micrometástasis (Hanahan y Weinberg, 2011).

1.3.1. Inmunidad Antitumoral

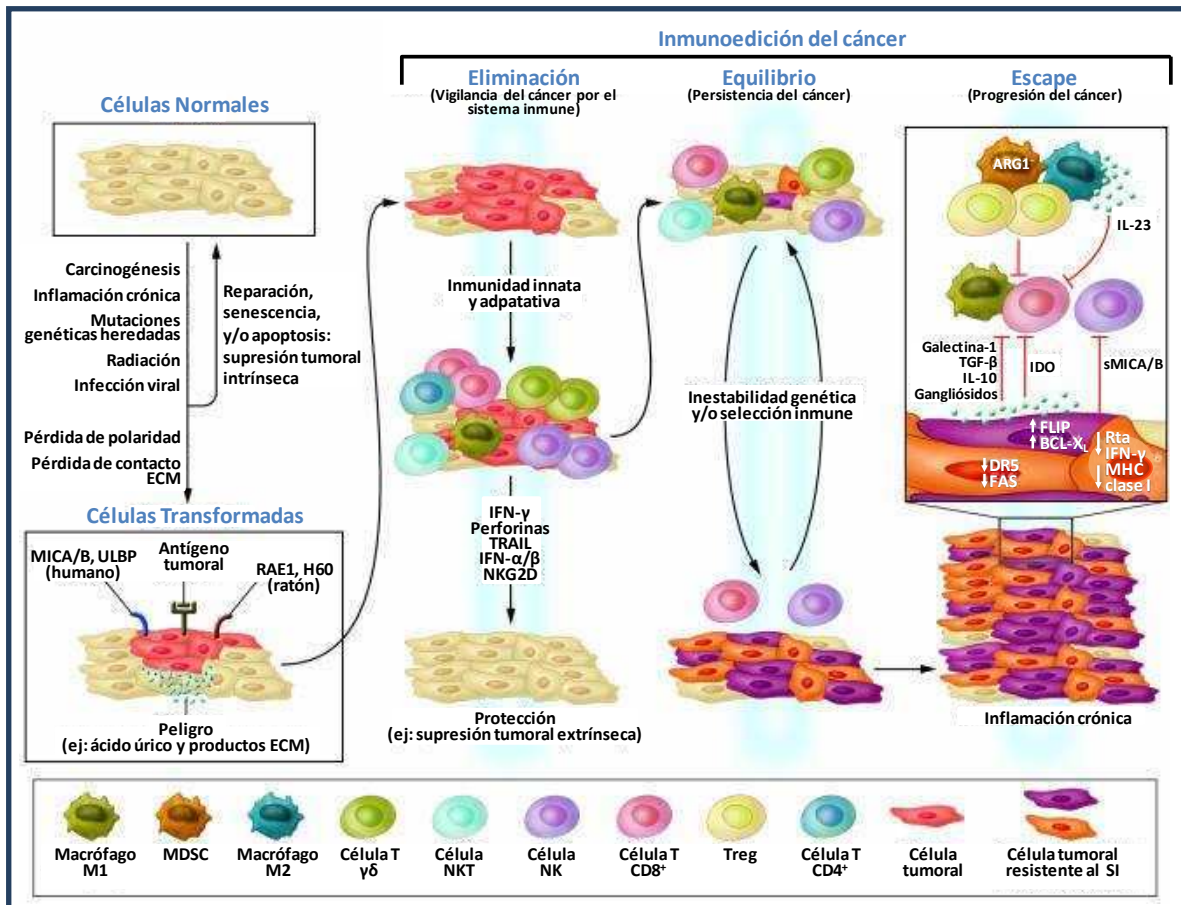
El concepto de inmunovigilancia tumoral fue propuesto por Sir Macfarlane Burnett y Lewis Thomas en 1957, pero no fue tenido en cuenta por muchos años, debido a la falta de evidencias experimentales. Sin embargo, hoy se sabe que una efectiva vigilancia tumoral por el sistema inmune es crítica para mantener la homeostásis del individuo.

El microambiente tumoral está compuesto por células tumorales, tejido estromal y matriz extracelular. El sistema inmune es un componente muy importante del microambiente tumoral. En las últimas décadas se ha estudiado exhaustivamente la compleja interrelación entre las células tumorales y la respuesta inmune del huésped. Se han relacionado varias deficiencias inmunológicas con un aumento en el desarrollo tumoral, tanto en humanos como en modelos murinos. En pacientes con tratamientos inmunosupresores prolongados, así como también en modelos animales con modificaciones genéticas que comprometen las funciones inmunes, se ha observado un incremento en la aparición de tumores (Dunn y col, 2002). El sistema inmune es capaz de identificar y eliminar células tumorales en base a la expresión de antígenos tumorales específicos o de moléculas inducidas por el estrés celular.

La inmunovigilancia, o inmuoedición, como se la denomina actualmente, consta de tres fases: la eliminación, el equilibrio y el escape (**Figura 1.14**). En la fase de eliminación el sistema inmune detecta y elimina células tumorales que se desarrollan por fallas en sus mecanismos intrínsecos de supresión tumoral. La eliminación puede ser completa, cuando no queda ninguna célula tumoral, o incompleta, cuando sólo una porción de las células fue eliminada. En este último caso, las células tumorales ingresan a una fase de equilibrio, donde siguen evolucionando y acumulando cambios que modulan la expresión de antígenos tumorales. En esta fase, el sistema inmune continúa actuando y eliminando los

clones tumorales susceptibles. Sin embargo, pueden aparecer variantes celulares capaces de resistir, evitar o suprimir la respuesta inmune, llevando a la fase de escape. Durante esta fase el sistema inmune no es capaz de contener el crecimiento tumoral, por lo que se genera un crecimiento progresivo del tumor (Swann y Smyth, 2007).

Figura 1.14: Supresión tumoral extrínseca por el sistema inmune



Las células transformadas que escaparon al control intrínseco son objeto de mecanismos extrínsecos de supresión tumoral, que detectan y eliminan los tumores en desarrollo antes de que sean clínicamente visibles, mediante la inmunoección. Esta consta de tres fases: eliminación, equilibrio y escape. DR5, receptor de muerte 5; IDO, indolamina 2,3-dioxigenasa; MICA/B, antígenos relacionados a CMH clase I A y B; RAE1, transcritto temprano de ácido retinoico 1; sMICA/B, MICA/B soluble; ULBP, proteína de unión a UL16. *Adaptado de Swann y Smith, 2007.*

Como se puede observar en la **Figura 1.14**, son varios los componentes del sistema inmune que intervienen en el proceso de inmunoección. A modo de resumen, las células del sistema inmune que participan en la inmunidad antitumoral son:

- Linfocitos T CD8⁺ efectores citotóxicos
- Linfocitos T CD4⁺ colaboradores (Th1 y Th2)
- Células citotóxicas naturales (NK)
- Células NKT
- Linfocitos B
- Macrófagos
- Linfocitos T regulatorios (Tregs)
- Células supresoras de origen mieloide (MDSC)

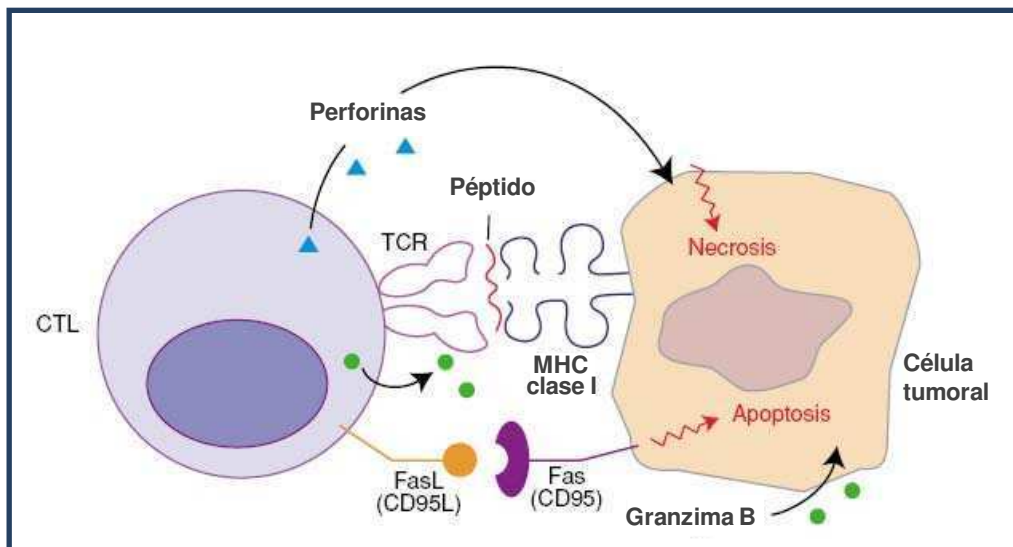
La participación de cada uno de estos componentes del sistema inmune se detalla a continuación.

1.4.1.1. Linfocitos T citotóxicos

Uno de los principales mecanismos de inmunidad antitumoral es la destrucción de las células tumorales por los linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8⁺. Los CTL específicos de tumores desempeñan una función de vigilancia reconociendo y destruyendo las células con potencial maligno que expresan péptidos derivados de proteínas celulares mutantes o de proteínas de virus oncogénicos que son presentadas en asociación con moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH-I). Cuando reconocen un péptido extraño, se activan y producen perforinas (proteínas formadoras de poros), granzimas, esterasas de serinas e IFN- γ o TNF- α ; (**Figura 1.15**), que llevan a la destrucción de la célula tumoral. (Mitra y col, 2003)

Se ha visto recientemente que los CTL son muy importantes en el microambiente tumoral. Numerosos estudios realizados en biopsias de pacientes con melanoma, cáncer de ovario, carcinoma renal, cáncer de vejiga y otros tumores, indican que los tumores sólidos que presentan un infiltrado tumoral (TIL) con mayor proporción de CD8⁺ tienen un mejor pronóstico (Hadrup y col, 2013).

Figura 1.15: Respuesta de los linfocitos T citotóxicos (CTL) frente a células tumorales

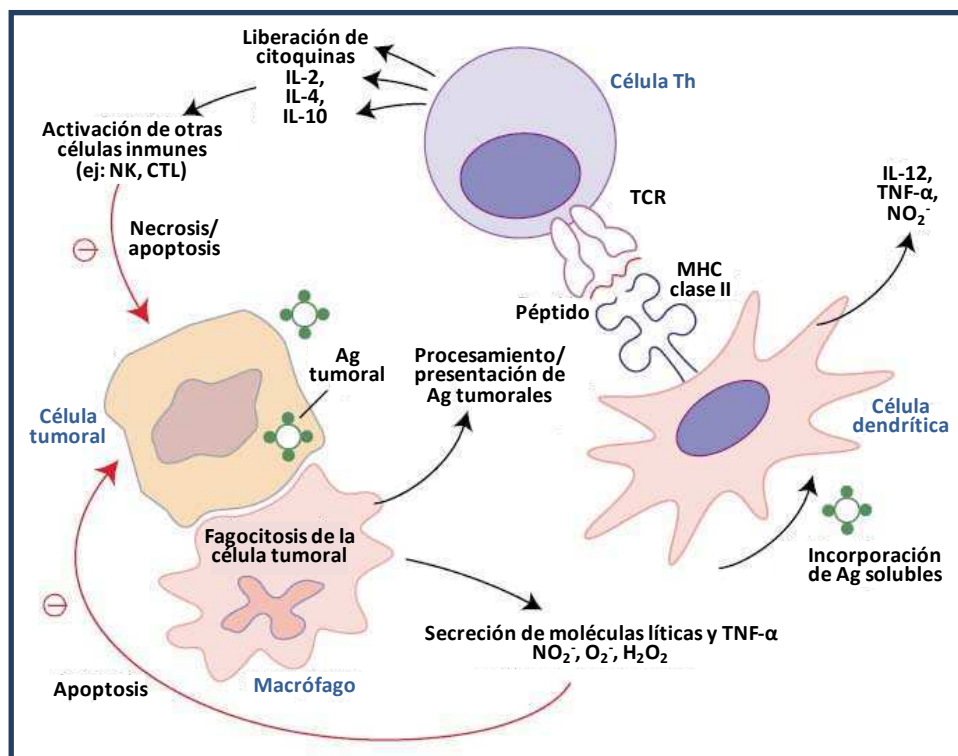


Los CTLs interactúan con las células tumorales a través de la unión del receptor de células T (TCR) al péptido tumoral expresado junto con moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) en la superficie tumoral. La interacción también incluye la unión de moléculas de adhesión, como la molécula de adhesión intracelular (ICAM-1) con el antígeno asociado a la función leucocitaria 1 (LFA-1) y Fas (CD95) con Fas ligando (CD95L). La destrucción de la célula tumoral es mediada por la liberación de perforinas, esterasas de serinas, interferón γ (IFN- γ), granzima B y/o el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) por los CTLs. *Adaptado de Mitra y col, 2003.*

1.4.1.2. Linfocitos T colaboradores

Las células T colaboradoras CD4⁺ también participan en la inmunidad antitumoral, y son activadas por células presentadoras de antígenos (APCs) que internalizan los antígenos tumorales y los expresan en el contexto de moléculas del CMH-II. Los linfocitos Th1 son de particular interés en la respuesta inmune antitumoral, ya que secretan principalmente IFN- γ , TNF- α e IL-2, citoquinas que activan a los CTLs, a las células NK y a los macrófagos (**Figura 1.16**). La secreción de TNF- α y de IFN- γ por las células Th1 no sólo facilita la activación de los CTL, sino que también induce un aumento de la expresión de moléculas del CMH de clase I por las células tumorales, lo que las hace más susceptibles a la lisis por los CTL. El IFN- γ secretado podría también activar a los macrófagos, que fagocitan también a las células tumorales (Mitra y col, 2003).

Figura 1.16: Respuesta de los linfocitos T colaboradores frente a células tumorales



Las células presentadoras de antígenos (APCs), como los macrófagos y las células dendríticas, fagocitan a las células tumorales y presentan los antígenos en el contexto de moléculas del CMH de clase II, que interactúan con el receptor de células T (TCR) de las células Th. Estas responden secretando citoquinas, que activan otras células inmunes, como células NK y CTL. Los macrófagos también secretan moléculas líticas y TNF- α . Las células dendríticas también secretan IL-12, TNF- α y NO $_2^-$. *Adaptado de Mitra y col, 2003*

Las células T colaboradoras pueden tener también un efecto antitumoral directo a través de la secreción de citoquinas como TNF- α o mediante la acción sobre las células tumorales a través del ligando relacionado con TNF inductor de apoptosis (TRAIL) o vía Fas/FasL. Sin embargo, su efecto antitumoral más importante es ejercido al favorecer la activación de los CTLs. Las células Th activadas expresan transientemente CD40L, el que interactúa con el CD40 en la superficie de las células dendríticas, activándolas e incrementando la expresión de moléculas de CMH y moléculas co-estimuladoras. Esto resulta en el aumento de la producción de citoquinas indispensables para las respuestas de CTLs, tales como la IL-12. Una vez que se generan CTLs efectores, éstos son capaces de reconocer y destruir las células tumorales sin necesidad de co-estimulación (Kennedy y Celis, 2008).

1.4.1.3. Células NK

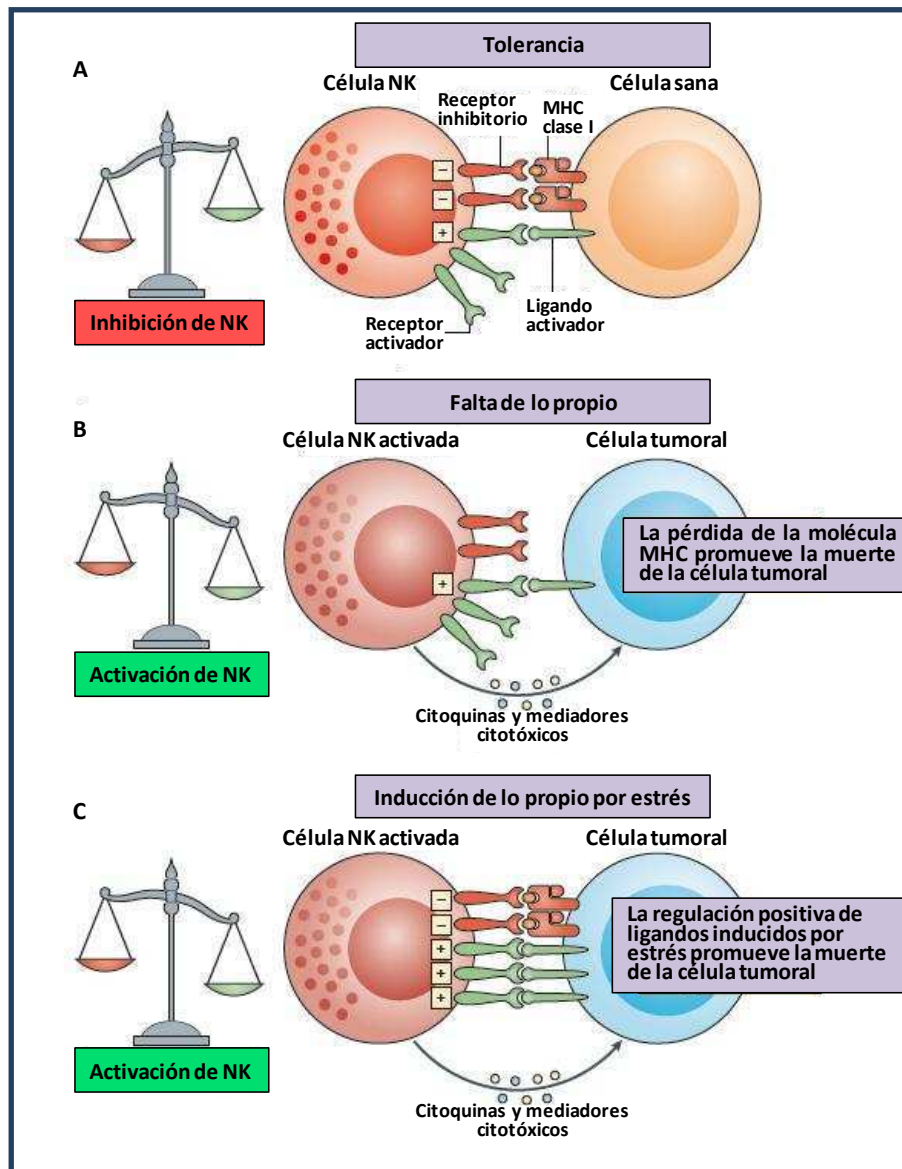
El componente antitumoral más importante en la inmunidad innata está constituido por las células NK. Estas células tienen la capacidad de producir IFN- γ y de esta manera colaboran también en la activación de la inmunidad adaptativa. Sin embargo, su característica más importante es su capacidad de distinguir a las células “estresadas” (células tumorales, células infectadas con algún virus o dañadas por agentes físicos o químicos) de aquellas que son normales. Reciben su nombre porque son células capaces de “matar” a las células que reconocen como extrañas.

Las células NK presentan una gran variedad de receptores que les permiten detectar sus blancos celulares, protegiendo a las células normales. Estos incluyen receptores inhibitorios, activadores, de adhesión y receptores de citoquinas. El reconocimiento del CMH-I suministra señales inhibitorias que impiden que estas células se activen frente a células propias. Las células tumorales frecuentemente presentan una baja o nula expresión del CMH-I, por lo que pueden ser reconocidas por las células NK. Además de los receptores inhibitorios, las células NK también están equipadas con receptores activadores, entre los que se destaca NKG2D. Existen varios ligandos para este receptor, que son proteínas inducidas por estrés y son generalmente expresadas por células tumorales. Es el balance entre la activación de receptores activadores o inhibidores lo que determina la respuesta o no de la célula NK (Vivier y col, 2012; **Figura 1.17**).

Una vez activadas, las células NK liberan perforinas, que generan poros en la membrana plasmática de la célula blanco, y granzimas que ingresan a través de esos poros e inducen la apoptosis o la lisis osmótica de la célula.

Las células NK pueden ser activadas también como consecuencia del estímulo recibido por citoquinas secretadas por macrófagos o células dendríticas, como IL-2, IL-10, IL-15, IL-18, IL-21, IL-23 y los interferones α/β . Esto induce la secreción de IFN- γ , que lleva a la generación de CTLs y a la diferenciación de células T hacia un perfil Th1 (Zwirner y col, 2007)

Figura 1.17: Reconocimiento de células tumorales por las células NK



(A) Las células NK son tolerantes a las células sanas del huésped, ya que la fuerza de las señales activadoras que reciben cuando encuentran este tipo de células es enmascarada por la activación de receptores inhibitorios. (B) frecuentemente las células tumorales pierden la expresión de moléculas CMH-I, por lo que las células NK se activan en respuesta a ellas, ya que no hay más enmascaramiento por CMH-I de las señales activadoras. (C) Las células "estresadas" activan a las NK, ya que aumentan la expresión de ligandos activadores. En ambos casos, la activación de las células NK lleva a la eliminación directa del tumor (mediante la citotoxicidad mediada por NK) o indirecta (por la producción de citoquinas pro-inflamatorias, como IFN- γ). *Adaptado de Vivier y col, 2012.*

1.4.1.4. Células NKT

Las células NKT son un subtipo de células T reguladoras involucradas en diferentes procesos patológicos que incluyen la autoinmunidad, la protección

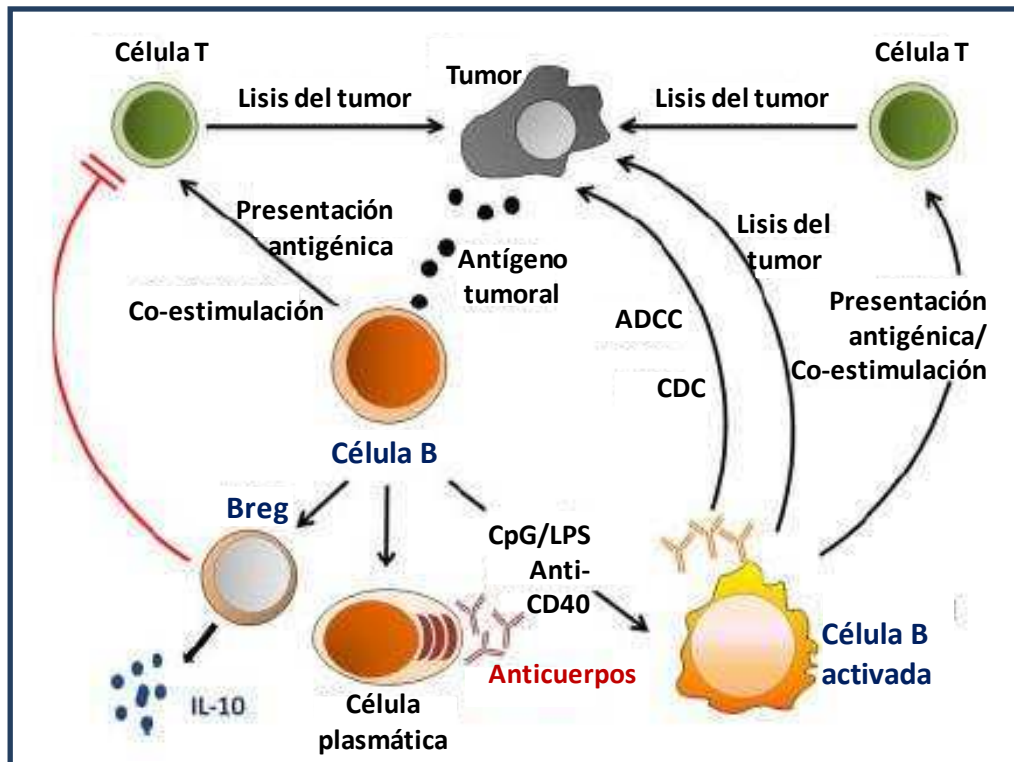
contra tumores e infecciones bacterianas. Su activación resulta en citotoxicidad, proliferación, y producción rápida de citoquinas que activan subsecuentemente varias células inmunes incluyendo células NK, dendríticas, linfocitos B y T. Tienen la capacidad de producir tanto citoquinas Th1 como Th2, así como la de modular la producción de las mismas por otras células inmunocompetentes. Estas células similares a las de la inmunidad innata, comparten además características de aquellas de la inmunidad adaptativa. Reconocen glicolípidos en el contexto de moléculas atípicas del CMH, a saber el CD1d. La lista de glicolípidos capaces de inducir la activación de células NKT está en constante crecimiento e incluye antígenos bacterianos diversos y glicolípidos expresados endógenamente (Joyce y col, 2011). Frecuentemente cumplen funciones opuestas, tanto efectoras como regulatorias que dependen del antígeno involucrado en su inducción. Así, esta interacción puede estar asociada a una alta polarización de tipo Th1 y por ende generar fuertes respuestas antitumorales. (Terabe y Berzofsky, 2008; Aspeslagh y col, 2013).

1.4.1.5. Linfocitos B

El rol de los linfocitos B en la inmunidad antitumoral fue poco estudiado y aun no se tienen resultados definitivos. Sin embargo es claro que estas células cumplen un rol importante en estos procesos y se ha visto en ratones depletados de células B un incremento en el crecimiento de tumores (Di Lillo y col, 2010).

Se han descrito diferentes formas de acción de los linfocitos B frente a la presencia de células tumorales (**Figura 1.18**). Los linfocitos B pueden inducir la regresión tumoral mediante un efecto citotóxico directo sobre las células tumorales, aunque se desconoce aún su mecanismo de acción. Las células B también actúan como APCs, induciendo la respuesta de células T. Sin embargo, el rol más conocido de los linfocitos B es la destrucción de la célula tumoral por la producción de anticuerpos específicos. Esta puede ser mediada por células, entre las que se encuentran las células NK, neutrófilos, células T o macrófagos, o dependiente de complemento (Namm y col, 2012).

Figura 1.18: Respuestas de los linfocitos B frente a células tumorales



Los linfocitos B se activan por el reconocimiento de antígenos tumorales. Esta activación desencadena distintas respuestas, entre las que se encuentra la producción de anticuerpos anti-tumorales, la diferenciación en células B regulatorias (Breg), la lisis de las células tumorales en forma directa o la presentación antigénica a CTLs, que lleva a la activación de estas últimas y a la lisis del tumor. CpG, citosina fosodiéster guanina oligodeoxinucleótidos; LPS, lipopolisacáridos; anti-CD40, anticuerpo monoclonal anti-CD40; ADCC, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos; CDC, citotoxicidad dependiente de complemento. *Adaptado de: Namm y col, 2012.*

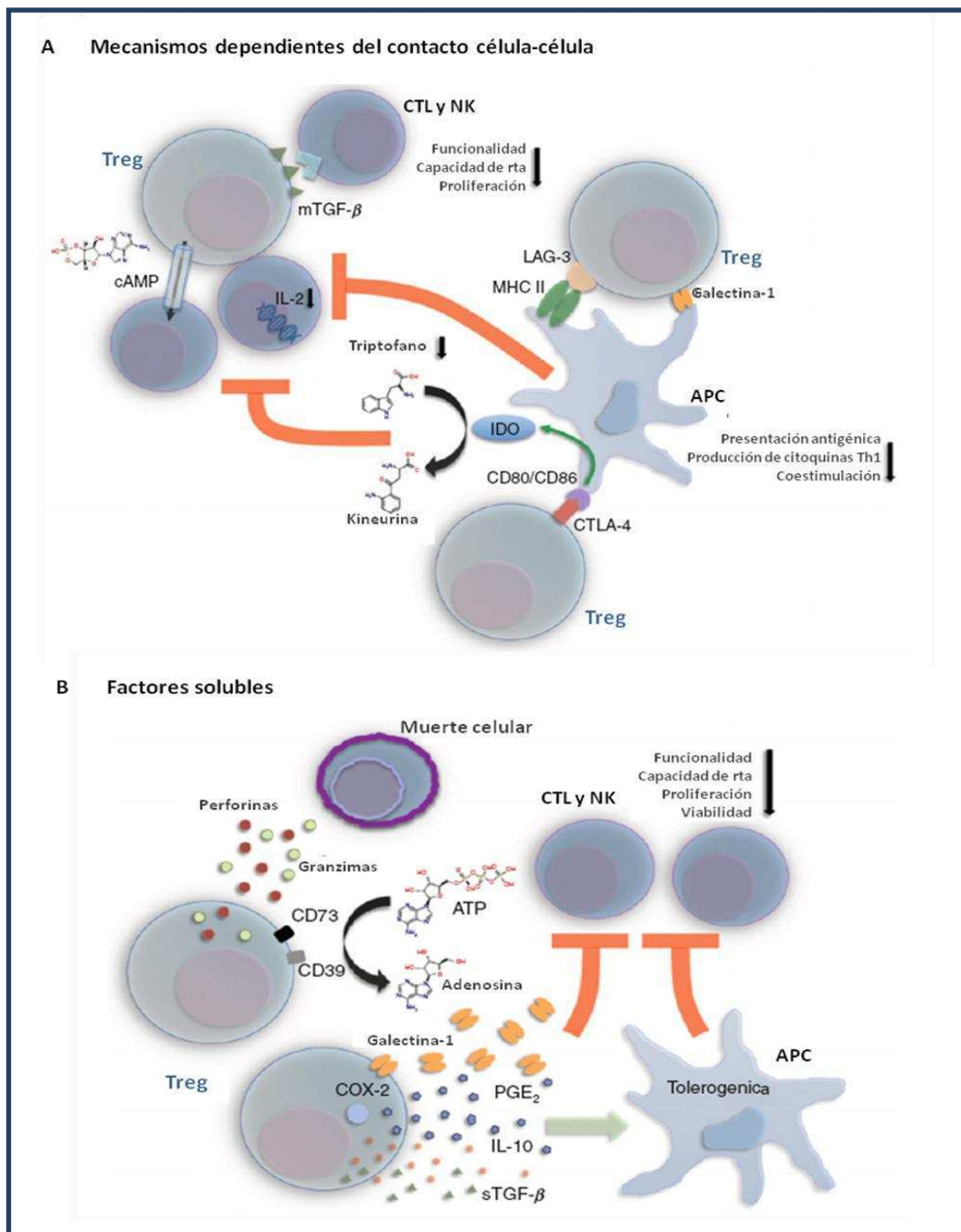
Recientemente se ha descubierto una subpoblación de linfocitos B, productora de IL-10, que actuaría como inmunosupresora, las células B regulatorias (Breg). Se han descrito dos mecanismos de acción distintos para las mismas. Schioppa y col (2011) proponen que, mediante la secreción de IL-10, las células Breg inhiben la capacidad de las células CD8⁺ de secretar IFN- γ frente a un estímulo tumoral. Por otra parte, los resultados obtenidos por Olhanud y col (2011) indican que las Breg inducen la diferenciación de las células T CD4⁺ en células Treg, mediante la producción de TGF- β y el contacto célula-célula. Ambos mecanismos llevan finalmente a la inhibición de la citotoxicidad mediada por células T CD8⁺ (Balkwill y col, 2012).

1.4.1.6. Macrófagos

Los macrófagos tienen diversas funciones en la inmunidad antitumoral, que dependen del microambiente en el que se encuentran. En general, los macrófagos aislados de tumores presentan un fenotipo del tipo M2, secretan bajos niveles de IL-12 y altos niveles de IL-10. Son macrófagos que no producen especies reactivas de nitrógeno, tienen una baja capacidad presentadora y citolítica y producen altos niveles de factores proangiogénicos, metaloproteasas y catepsinas. Debido a esto, contribuyen a la inestabilidad genómica, regulación de la senescencia, promoción de la angiogénesis, remodelación de la matriz extracelular y promoción de la invasión y la metástasis (Biswas y Mantovani, 2010). Sin embargo, también se han detectado en algunos tipos de tumores, macrófagos con fenotipo del tipo M1, que liberan factores antiangiogénicos y tienen la capacidad de lisar los tejidos y células tumorales mediante la liberación de enzimas lisosómicas, intermediarios reactivos de oxígeno y óxido nítrico. Una vez activados, producen citoquinas como TNF- α , que pueden destruir tumores mediante efectos tóxicos directos, y de forma indirecta por sus efectos sobre las vasculatura tumoral (Abbas y col, 2000; Lamagna y col, 2006).

1.4.1.7. Linfocitos T regulatorios (Tregs)

Los linfocitos T regulatorios CD4⁺CD25⁺ (Tregs) fueron identificados por Sakaguchi y col (1995) como un subtipo natural de linfocitos T CD4⁺ (aproximadamente 5-10% de los linfocitos T presentes en sangre periférica) que constitutivamente expresan la molécula CD25 y que suprimen respuestas de linfocitos T efectores (CD4⁺ y CD8⁺) *in vivo*. Se ha sugerido al factor de transcripción forkhead box P3 (FoxP3) como un marcador intracelular confiable de estas células. En pacientes con diferentes tipos de tumores, entre los que se destacan los de pulmón, páncreas, mama, ovario y piel, se encontró un número incrementado de células CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ tanto en circulación como en infiltrados peri- e intratumorales (Illarregui y col, 2007).

Figura 1.19: Supresión de la inmunidad antitumoral mediada por Tregs

(A) Mecanismos de inmunosupresión mediados por el contacto célula-célula de las Tregs con diferentes células del sistema inmune, particularmente células CTL, NK y APCs. **(B)** Las células Tregs liberan citoquinas y otras moléculas que inhiben la actividad de células CTL, NK y APCs. *Adaptado de: Mougiakakos y col, 2010.*

Se conocen diferentes mecanismos a través de los cuales las células Treg median su actividad inmunosupresora (Mougiakakos y col, 2010; **Figura 1.19**). El primer mecanismo descrito fue la inmunosupresión mediada por el contacto

célula-célula. Las Tregs interactúan con células T efectoras y NK a través de un TGF- β de membrana y por medio de “inyecciones” de AMPc. Mediante otros factores de membrana también interactúan con APCs, lo que lleva a la atenuación de la co-estimulación y la presentación antigénica y al aumento de la actividad de indolamina (IDO), que tiene un impacto negativo sobre las células T (**Figura 1.19 A**).

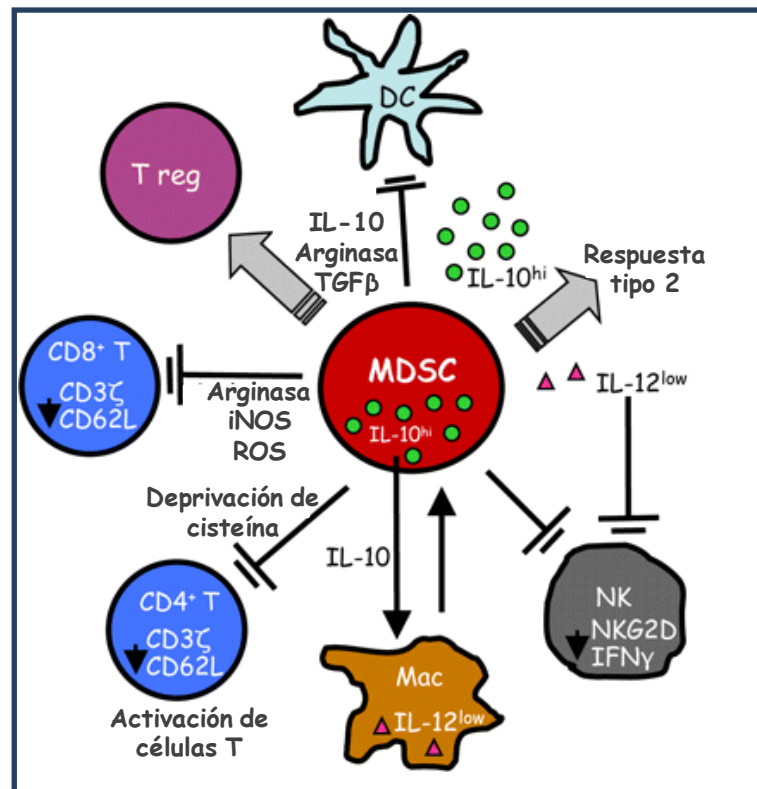
Las Tregs también secretan factores solubles como galectina-1 y prostanglandina E2 (**Figura 1.19 B**), que suprimen la actividad de células T efectoras y NK, o factores como perforinas y granzimas, que inducen la muerte celular de las mismas. Sobre la superficie celular, las Tregs presentan ectoenzimas (CD39, CD73), que median la metabolización del ATP a adenosina, un potencial supresor de células T (Antonioli y col, 2013). Adicionalmente, la actividad de APCs también es inhibida por factores solubles secretados por Tregs, como IL-10 y TGF- β soluble (André y col, 2009).

1.4.1.8. Células supresoras de origen mieloide

Las células supresoras de origen mieloide (MDSC) constituyen una población heterogénea de células mieloides inmaduras compuesta por macrófagos, granulocitos, DCs y otras poblaciones de origen mieloide en estadios tempranos de diferenciación, que ejercen una actividad inmunosupresora en el microambiente tumoral. En ratones, las MDSC se definen como células con un fenotipo Gr-1⁺ CD11b⁺ que se acumulan en el bazo, y en algunos casos en ganglios linfáticos de animales portadores de tumor.

Las MDSC expresan tenores normales de CMH-I, pero niveles significativamente reducidos de CMH-II y de moléculas co-estimuladoras. La actividad funcional de las MDSC se manifiesta a través de su capacidad de inhibir la producción de IFN- γ y por linfocitos T CD8⁺ en respuesta a péptidos provenientes de antígenos tumorales presentados en la superficie de las MDSC (Ilarregui y col, 2007; **Figura 1.20**). Este efecto depende de la expresión de CMH-I por las MDSC y requiere del contacto célula-célula o de la combinación de mediadores como iNOS, ARG1, ciclooxigenasa 2, prostaglandina E2, TGF- β e IL-10 (Khaled y col, 2013).

Figura 1.20: Supresión de la inmunidad antitumoral por MDSC



La activación de células T es suprimida por la producción de arginasa y ROS, la nitración del TCR, deprivación de cisteína y la inducción de células T regulatorias (Tregs). La inmunidad innata es inhibida por la regulación negativa de la IL-12 producida por macrófagos, el aumento de la IL-10 producida por MDSC y la supresión de la citotoxicidad mediada por NK. La presentación antigénica es limitada por la expansión de MDSC a expensas de las células dendríticas. *Adaptado de: Rosenberg y Sinha, 2009.*

La subpoblación de células MDSC Gr-1⁺ CD115⁺, además de ser capaz de inhibir *in vitro* la proliferación de linfocitos T, promueve la expansión de células T regulatorias CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (Tregs) *in vivo* (Huang y col, 2006). Se sabe también que las MDSC regulan la actividad de las células NK, pero los resultados obtenidos hasta el momento son controversiales. Algunos estudios demostraron que las MDSC inhiben la actividad citotóxica de las células NK y su producción de IFN-γ, mediante el bloqueo del receptor NKG2D, necesario para su activación. Sin embargo, otros estudios demuestran que las MDSC expresan Rae-1, el ligando de NKG2D, y por lo tanto, las activan (Ostrand-Rosenberg y Sinha, 2009).

1.4.2. Antecedentes que señalan interacciones entre el eje tiroideo y el sistema inmune

Las interacciones entre las hormonas del eje tiroideo y el sistema inmune han sido principalmente sustentadas por la presencia de TRs en células inmunocompetentes y por las alteraciones de la inmunidad frecuentemente observadas durante las fluctuaciones fisiológicas o patológicas de las HTs (Fabris y col, 1995; Stagi y col, 2005).

Tanto el hipotiroidismo en humanos como el inducido experimentalmente en roedores reducen la actividad tímica, efectos que se revierten mediante el tratamiento con HTs (Fabris y col, 1995). Adicionalmente, se ha demostrado que el hipotiroidismo experimental produce la involución del bazo y de los ganglios linfáticos y deprime las respuestas inmunes humoral y celular (Chatterjee y Chandel, 1983; Ohashi e Itoh, 1994). Se ha descrito en humanos, tanto la supresión de la inmunidad mediada por células en el hipotiroidismo severo, como también el restablecimiento de la función linfocitaria durante el gradual retorno al estado eutiroideo (Schoenfeld y col, 1995). Respecto a los efectos del hipertiroidismo sobre las respuestas celular y humoral la situación no es tan clara. En este sentido, se ha observado tanto el aumento como la reducción de las respuestas primarias de anticuerpos (Fabris y col, 1995) así como también de la proliferación linfocitaria T o B (Chatterjee y Chandel, 1983).

Estudios realizados en nuestro laboratorio en modelos murinos demostraron que los linfocitos B y T de ratones hipertiroideos presentan una mayor proliferación inducida por mitógenos o por antígenos en comparación con animales eutiroideos, lo cual fue relacionado con un incremento en la señalización intracelular, principalmente PKC, implicada en la activación linfocitaria. También se detectó en ratones hipertiroideos un incremento en los niveles de citoquinas que son cruciales en la activación de células T, principalmente IL-2 e IFN- γ luego de una estimulación antígeno específica e IL-6 y TNF- α como resultado de un estímulo inflamatorio (Klecha y col, 2000 y 2006).

Sin embargo, a pesar de que es muy difícil elucidar los efectos de las hormonas tiroideas sobre la respuesta inmune en individuos sanos eutiroideos debido a que

su regulación es dependiente de un conjunto intrincado de interacciones con diversas hormonas y factores, un estudio en individuos sanos de edad avanzada sin patología tiroidea demuestra que la concentración de HTs está asociada positivamente con marcadores de inflamación, células de tipo NK, expresión de IL-6 por monocitos activados, porcentaje de linfocitos T de memoria y aumentada densidad de receptores para IL-2 en células T (Hodkinson y col, 2009). Adicionalmente, se encontró una asociación negativa entre la concentración de HTs y la apoptosis temprana de linfocitos y la relación entre células T *naïve* y CTL (Hodkinson y col, 2009). En ratones envejecidos se observaron resultados similares, indicando que las HTs pueden estar involucradas en una reducción de la respuesta inmune con la edad, que puede ser revertida por el tratamiento con T4 (El-Shaikh y col, 2006).

En base a las evidencias descritas arriba, que avalan indiscutiblemente la existencia de una delicada red de control neuroendócrino de la funcionalidad inmune, resulta de suma importancia tener en cuenta su potencial participación en enfermedades neoplásicas, incluyendo los síndromes linfoproliferativos (Krueger y col, 2002).

2. Hipótesis y Objetivos

2.1. Hipótesis de trabajo

Nuestra hipótesis de trabajo es que las HTs modulan *in vivo* el crecimiento y evolución de los linfomas T a través de la regulación del balance entre proliferación y apoptosis, la regulación de la expresión de proteínas moduladoras del ciclo celular y de la secreción de factores pro- y antiangiogénicos y mediante la modulación de la respuesta inmune antitumoral.

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivos generales

Para comprobar la hipótesis arriba mencionada, los objetivos generales de este trabajo fueron los siguientes:

1. Analizar el efecto *in vitro* del tratamiento de células del linfoma T EL-4 con HTs.
2. Evaluar el efecto del estado tiroideo sobre el crecimiento y desarrollo del linfoma T EL-4 inoculado de forma subcutánea en ratones singéneos, evaluando los mecanismos moleculares implicados.
3. Estudiar el efecto del estado tiroideo sobre la respuesta inmune antitumoral en ratones inoculados con células EL-4.

2.2.2. Objetivos específicos

Para cumplir los objetivos generales planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar *in vitro* el efecto del tratamiento con T4, hormona empleada en los tratamientos *in vivo*, sobre las células del linfoma T EL-4, en particular:
 - a. El efecto del tratamiento con T4 por tiempos cortos sobre la proliferación celular, mediante el análisis de expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA).

- b. El efecto del tratamiento con T4 por tiempos cortos sobre la regulación del ciclo celular, mediante el análisis de los niveles de expresión de ciclinas, inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas y genes supresores tumorales.
 - c. El efecto del tratamiento prolongado (más de 5 días) con T4 en relación a la inducción de la apoptosis, por marcación con Anexina/IP y por la medición de la expresión de genes involucrados en estos procesos.
2. En animales eu-, hipo- e hipertiroideos inoculados subcutáneamente con células EL-4 a fin de obtener tumores sólidos, analizar:
- a. El comportamiento biológico de dichos tumores analizando la latencia, la velocidad de crecimiento y el tamaño tumoral.
 - b. La diseminación tumoral a través de la cuantificación de las metástasis.
 - c. La tasa de proliferación de las células tumorales a través de la expresión de PCNA y la cuantificación de las divisiones celulares en función del tiempo.
 - d. La expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular en los tumores, a fin de encontrar alteraciones en la regulación de la progresión y/o arresto del ciclo celular. Se analizará el perfil de expresión de ciclinas, inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas y genes supresores tumorales.
 - e. El nivel de apoptosis en los tumores sólidos a fin de encontrar una posible correlación en el balance entre proliferación/apoptosis y la velocidad de crecimiento tumoral en los distintos grupos experimentales. Para ello, se analizará la expresión de caspasas claves en los procesos apoptóticos.
 - f. El nivel de angiogénesis y neovascularización en los tumores.
 - g. La expresión de metaloproteasas producidas por las células tumorales con acción sobre la matriz extracelular MMP2 y MMP9 y de sus inhibidores tisulares (Timps).
3. En animales normales, hipo- e hipertiroideos inoculados subcutáneamente con células EL-4 analizar la respuesta inmune antitumoral:

- a. Evaluar el número y distribución de subtipos de células del sistema inmune en los ganglios drenantes del tumor y realizar la comparación con los ganglios no drenantes. En particular, evaluar:
 - i. Distribución de linfocitos B y T (tanto CD4⁺ como CD8⁺)
 - ii. Porcentaje de células NK
 - iii. Distribución de células inmunosupresoras, Treg y MDSC
- b. Cuantificar el infiltrado linfocitario en los tumores y determinar la distribución de las subpoblaciones presentes en el mismo.
- c. Evaluar el número y distribución de los subtipos de células del sistema inmune en bazo.
- d. Determinar la actividad de células NK y de los linfocitos T citotóxicos en bazo.

Estos estudios nos permitieron demostrar la regulación ejercida por el estado tiroideo en el desarrollo y progresión tumoral, evidenciar la participación directa de las HTs sobre el crecimiento del tumor y los mecanismos inmunes que contribuyen a la diseminación de la patología.

3. Materiales y métodos

3.1. Suspensiones celulares y condiciones de cultivo

La línea celular murina EL-4 (American Type Culture Collection–ATCC–, número de catálogo TIB-39, gentil donación del Dr. Norberto Zwirner, IBYME-CONICET) es un linfoma T, CD3+ que expresa el haplotipo H-2b y Thy-1.2 (CD90) y el receptor de células T $\alpha\beta$. Estos marcadores de superficie fueron testeados rutinariamente por citometría de flujo con los anticuerpos correspondientes.

Las células fueron cultivadas en una concentración óptima de $1\text{-}5 \times 10^5$ células/ml en frascos de cultivo T-25 o T-75 (Corning, NY, USA) con medio RPMI 1640 (GIBCO-Life Technologies, Grand Island, NY, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, GIBCO-Life Technologies), 2mM de glutamina (GIBCO-Life Technologies), 100 $\mu\text{g/ml}$ de penicilina y 150 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomina (GIBCO-Life Technologies), en estufa gaseada (Sanyo Electric Co., Osaka, Japón) a 37°C con 5% de CO₂. El medio de cultivo fue renovado cada dos días una vez que las células alcanzaron el crecimiento exponencial.

Cuando se indica en los resultados, también se emplearon células EL-4 sincronizadas o quiescentes por deprivación del SFB en el medio de cultivo (Barreiro Arcos y col 2011) durante 24 hs.

Las células fueron mantenidas como macrocultivos en frascos de cultivo T-25 o T-75 (Corning, NY) para la obtención de extractos celulares para los ensayos de Western Blot o para la extracción de ARN. Las células fueron cultivadas por diferentes tiempos en presencia o ausencia de concentraciones fisiológicas de L-Tiroxina (T4, $1 \times 10^{-7}\text{M}$, SIGMA-Aldrich St. Louis, MO, USA), que fue adicionada al comienzo del cultivo en los experimentos indicados.

3.2. Ensayos *in vitro* en células EL-4

3.2.1. Tratamiento con T4 a tiempos cortos

Para los ensayos a tiempos cortos de cultivo, se utilizaron células quiescentes, previamente mantenidas en medio RPMI con 1% de SFB durante 24 horas. Las células fueron incubadas con T4 ($1 \times 10^{-7}\text{M}$) durante 12, 24 o 30 horas en RPMI con 1 % de SFB. Finalizada la incubación, las células fueron centrifugadas a 400g

durante 5 minutos. El pellet obtenido fue congelado a -20°C para realizar posteriormente la extracción de proteínas o colocado en Tri-Reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, Ohio, USA) para la extracción de ARN.

3.2.2. Tratamiento con T4 a tiempos largos

Los tratamientos a tiempos largos de cultivo con T4 fueron realizados con células EL-4 en crecimiento exponencial. Las mismas fueron incubadas con T4 ($1 \times 10^{-7}\text{M}$), durante 5, 12 o 15 días en RPMI con 10 % de SFB. Finalizado el tiempo de cultivo, 1×10^6 células fueron marcadas con Anexina/IP, según el protocolo que se describirá a continuación. El resto de las células fueron centrifugadas a 400g durante 5 minutos. El pellet obtenido fue congelado a -20°C para realizar posteriormente la extracción de proteínas o colocado en Tri Reagent para la extracción de ARN.

3.2.3. Marcación con Ioduro de Propidio y Anexina V-FITC

Las células cultivadas por 5, 12 o 15 días con T4 ($1 \times 10^{-7}\text{M}$) fueron lavadas con PBS y centrifugadas a 400g durante 5 min. El pellet fue resuspendido en 0,1 ml del buffer de unión a Anexina (HEPES/NaOH 10mM, pH 7,5; NaCl 0,14M; CaCl_2 2,5mM) y luego incubado durante 15 min con 5 μl de Anexina V-FITC (Sigma-Aldrich) y 10 μl de IP 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Sigma-Aldrich). Las células fueron luego analizadas por citometría de flujo, detectando la fluorescencia a 580 nm (IP) y 520 nm (Anexina V-FITC). Mediante el software Flow Jo (Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA) se realizaron, para cada muestra, gráficos de *dot plot*, donde se observa el porcentaje de células que presenta cada una de las marcas y las que tienen doble marca. Los resultados se expresan como % de células en cada condición (sin marca, marcadas con IP, FITC o con ambas marcas) respecto del total de células analizado (Walsh y col, 1998).

3.2.4. Análisis por RT-PCR en Tiempo Real

A partir de células EL-4 resuspendidas en Tri-Reagent, se realizó el protocolo de extracción de ARN según las instrucciones del fabricante. Brevemente, se agregó cloroformo y luego de una centrifugación se obtuvo la fase acuosa, a partir de la

cual el ARN fue precipitado por agregado de isopropanol. Luego de un lavado con etanol 75%, el precipitado fue resuspendido en agua de calidad mili-Q.

La cuantificación del ARN obtenido se realizó mediante el Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) a través de la medición de la absorbancia a 260nm. A fin de detectar posibles contaminaciones, se evaluó también en el Nanodrop la relación entre las absorbancias a 260 y 280nm. Las muestras utilizadas en todos los casos presentaron una relación 260/280 entre 1.7 y 2.1, indicando que las muestras tenían una alta pureza. A su vez, 2 µl del ARN total fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1% coloreado con bromuro de etidio para evaluar la integridad del ARN por detección de las bandas correspondientes a las subunidades pequeña y grande (18S y 28S) de ARN ribosomal, y descartar así su degradación.

Para realizar la retrotranscripción del ARN mensajero (ARNm) se utilizaron 2µg del ARN total. Se utilizó el sistema comercial Omniscript RT kit (Qiagen, Düsseldorf, Alemania) según las instrucciones de los fabricantes, usando como *primer* un oligo dT de 15 nucleótidos de longitud (Biodynamics, Buenos Aires, Argentina). Como control negativo se realizó una transcripción reversa sin enzima para descartar la presencia de ADN genómico en las muestras.

Las secuencias de los *primers* fueron diseñadas usando el software Primer Express 1.5 (PE Biosystems) o el IDT Primer Quest, que incorpora el software Primer3 (version 2.2.3) (Integrated DNA Technologies, Inc). Los *primers* fueron localizados preferentemente en uniones exón-exón o dos exones que tuvieran un intrón entre medio para evitar que se transcriba el ADN genómico y diseñados de manera que los amplicones tuvieran 50-200 bp de longitud (**Tabla 3.I**). Los oligonucleótidos utilizados en estos ensayos fueron comprados a Life Technologies o Biodynamics.

Tabla 3.I: Secuencias de los *primers* utilizados para las RT-PCR cuantitativas en Tiempo Real.

Gen	Secuencias de <i>primers</i>	tm	T(°C)	[primer]
Ciclina A2	5'-GGC CAG CTG AGC TTA AAG AAA C-3' 5'-CGG GTA AAG AGA CAG CTG CAT-3'	58.3 58.1	61	0,8
Ciclina B1	5'-AGG GTC GTG AAG TGA CTG GAA ACA-3' 5'-CTT GGG CAC ACA ACT GTT CTG CAT-3'	60.2 60.3	61	0,8
Ciclina D1	5'-CCA AAA CCA TTC CAT TTC AAA G -3' 5'-CCA ACA CAC ACC AGC AAC ACT -3'	57.2 58.1	61	1
Ciclina D2	5'-ACT TCA AGT TTG CCA TGT ACC CGC-3' 5'-TTC AGC AGC AGA GCT TCG ATT TGC-3'	60.1 60.2	63	0,4
Ciclina D3	5'-TGC GTG CAA AAG GAG ATC AA -3' 5'-TCA CAC ACC TCC AGC ATC CA-3'	59.0 59.7	60	0,8
Ciclina E1	5'-TGC TAC TTG ACC CAC TGG ACT CT-3' 5'-TGG CGT GGC CTC CTT AAC-3'	58.9 58.2	60	0,8
p15/INK4B	5'-TGG GAA ACC TGG AGA GTA GAT GA-3' 5'-GAA TCC CCA CAC ATG ACA GTA CA-3'	58.7 58.3	58	0,8
p16/INK4A	5'-CTC AAC TAC GGT GCA GAT TCG A-3' 5'-CAC CGG GCG GGA GAA-3'	59.0 58.5	58	0,8
p21/Cip1	5'-TGT GGC TCC CTC CCT GTC T-3' 5'-GCAG GGT GCT GTC CCT TCT-3'	59.2 58.8	58	0,8
p27/Kip1	5'-CCT GGC TCT GCT CCA TTT GA-3' 5'-ACG GAT GGA GCG CAA AAC-3'	59.9 58.2	58	0,8
p53	5'-GCA TCC CGT CCC CAT CA-3' 5'-GGA TTG TGT CTC AGC CCT GAA-3'	59.8 58.7	63	0,4
Rb	5'-GGT CTG CCA ACA CCC ACA A-3' 5'-GAT GTC CCA AAT GAT TCA CCA A-3'	58.9 58.2	60	1
PTEN	5'-GGT TCT TGG AAA ACG GTG CTT AT-3' 5'-TGA AAC CTC CCA TGT GCT GAT-3'	59.4 59.0	63	0,4
Bad	5'-CAG GGA GAA GAG CTG ACG TAC A-3' 5'-CCC TCC GTG GCT ATT GCA-3'	65.6 67.2	58	0,8
Bcl-2	5'-TCC CGA TTC ATT GCA AGT TGT A-3' 5'-AAG GCA ACC ACA CCA TCG A-3'	66.2 66.6	58	0,8
Caspasa 3	5'-TGA TGA GGA GAT GGC TTG CCA GAA-3' 5'-ACC TTC CTG TTA ACG CGA GTG AGA-3'	60.3 59.9	63	0,4
β2-microglobulina	5'-GCT ATC CAG AAA ACC CCT CAA -3' 5'-CAT GTC TCG ATC CCA GTA GAC GGT-3'	62.0 62.0	58	1

Secuencias de *primers* diseñados con los softwares Primer Express 1.5 e IDT Primer Quest. Se indica la temperatura de melting (tm) de cada primer en °C, la temperatura a la cual se realizó la PCR (T°C) y la concentración a la cual se utilizó el par de *primers* [primer] en μM.

Las reacciones de PCR en Tiempo Real se llevaron a cabo en un termociclador Rotor Gene-6000 (Corbett, Life Sciences, Sydney, Australia) usando el kit comercial Mezcla Real 2x (Biodynamics), que contiene un colorante verde similar al Sybr Green. Cada reacción fue realizada por triplicado, en un volumen final de 12,5 μl, utilizando como templado 2,5 μl de ADNc diluido (dilución 1:10 de la reacción de transcripción reversa).

Al inicio de la reacción de PCR se desnaturalizó el ADNc a 95°C durante 5 min. Esto fue seguido por 40 ciclos de 10 seg a 95 °C, 15 seg a 58-63 °C (según el par de *primers*) y 20 seg de extensión a 72 °C. La detección de los productos de PCR se realizó finalizados los 20 seg de extensión de cada ciclo, mediante la medición de la fluorescencia originada por la unión del colorante a ADN doble cadena.

Para verificar que la fluorescencia medida sea originada por un solo producto de PCR, y no además por otros productos inespecíficos, finalizados los 40 ciclos de PCR, las reacciones fueron sometidas a un protocolo de disociación por calor (Ririe y col, 1997).

Como puesta a punto del método, se realizaron curvas de diluciones seriadas 1:10 de las muestras con cada par de *primers* para evaluar la eficiencia de la reacción para las condiciones determinadas. Se consideraron adecuadas aquellas condiciones en las cuales la curva presentaba una eficiencia de 90%-105%. También se realizaron curvas de concentración de cada par de *primers* y se determinó que la concentración a utilizar sería la menor a la cual no se observa formación de dímeros y la eficiencia se mantiene entre 90%-105%.

Todas las muestras fueron comparadas contra el gen de referencia de la proteína β_2 -microglobulina, un gen normalizador, usado como control interno para la normalización de los datos, procedimiento necesario para la corrección de las variaciones en calidad y cantidad de ADNc.

Para el análisis de los resultados y el cálculo de las diferencias entre tratamientos se utilizó el software Rotor Gene-6000, mediante el método de $\Delta\Delta Ct$ (Livaka y Schmittgen, 2001).

3.2.5. Análisis de expresión de proteínas por Western Blot

Para la obtención de los extractos proteicos de células EL-4 tratadas con T4, los pellets celulares que habían sido previamente congelados a -20°C, fueron incubados durante 30 min en agitación a 0°C en 100 μ l de una solución con PIPES 20mM, 2- β -mercaptoetanol 10mM, EDTA 2 mM, EGTA 2mM, Igepal 0,5%, conteniendo los siguientes inhibidores de proteasas: fenilmetil sulfonil fluoruro (PMSF) 1 mM, leupeptina 10 μ g/ml, aprotinina 2 μ g/ml, NaF 10mM y NaVO₄ 1mM.

Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a alta velocidad para obtener las fracciones solubles en el sobrenadante. La concentración de proteínas en cada muestra se determinó utilizando un reactivo de Bradford comercial (Bradford Reagent, Sigma-Aldrich) según el protocolo sugerido por el fabricante, con la posterior medición a 595nm en el espectrofotómetro de placas Multiscan Spectrum (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

Para la corrida electroforética, se realizó la desnaturalización de 30 µg de proteínas de cada muestra en solución de carga (SDS 2%, glicerol 10%, Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8; azul de bromofenol 0,2%, 2-β-mercaptoetanol 1%) durante 5 min a 100°C. Luego, las muestras fueron sembradas en geles de poliacrilamida al 7,5%, 10% o 12% para separar dichas proteínas por SDS-PAGE y transferirlas a membranas de PVDF o nitrocelulosa. Como marcador de peso molecular, se utilizó el estándar Full-Range Rainbow (Amersham-GE, Buckinghamshire, Reino Unido). Para corroborar la eficiencia de la carga y de la transferencia, dichas membranas fueron coloreadas con Ponceau S.

Las membranas obtenidas luego de la transferencia fueron bloqueadas con leche descremada 5% en Tris-HCl 100 mM, pH 7,5 y NaCl 0,9% con Tween-20 0,1% (TTBS) durante 1 hora. Posteriormente fueron lavadas con TTBS e incubadas durante la noche a 4°C, con un anticuerpo anti-PCNA o anti β-actina hechos en ratón y conejo, respectivamente (Santa Cruz Biotechnology), y diluidos 1:2000 en BSA 1% en TTBS,

Tras realizar tres lavados con TTBS, las membranas fueron incubadas durante 1 hora con anticuerpos policlonales anti-IgG de conejo o de ratón, según corresponda, hechos en cabra y acoplados a peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology). Las bandas obtenidas para cada proteína fueron detectadas por quimioluminiscencia usando el kit comercial ECL Western Blotting Analysis System (Amersham-GE), y revelando mediante la utilización del documentador de geles Image Quant LAS 4000 (GE Healthcare, Uppsala, Suecia). Finalmente, se realizó un análisis densitométrico de las bandas obtenidas, utilizando el software GelPro Analyzer versión 3.1.00.00 (Media Cybernetics). Los valores obtenidos para cada banda fueron relativizados en todos los casos al valor obtenido para la banda de β-actina.

3.3. Obtención de modelos experimentales *in vivo*

Los animales utilizados fueron adquiridos en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Buenos Aires o en el Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED)-UCA-CONICET. Se emplearon ratones C57Bl/6J (C57) (H-2^b) hembras de 8 semanas de edad, que fueron tratados como se detalla a continuación. Los protocolos experimentales en animales fueron aprobados por el Comité Institucional para Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL), Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

3.3.1. Modelo de Hipertiroidismo

Para lograr el estado hipertiroidico se administró T4 en el agua de bebida de los ratones a tratar, ya que esta hormona sintética constituye el tratamiento estándar de reemplazo hormonal empleado en los pacientes hipotiroideos. Si bien existen evidencias sobre el uso de terapias combinadas de T4 y T3, sigue siendo la T4 la hormona de elección, dada su eficacia y seguridad (Ma y col, 2009; Okosieme, 2011). Por otra parte, la vida media de la tiroxina es mayor que la de la T3, lo que permite lograr una potencia constante y una acción prolongada al ser convertida a T3 en los tejidos periféricos (Mendoza Patino, 2008). Para obtener ratones hipertiroidicos, por lo tanto, se les administró T4 en una concentración de 12 mg/l en el agua de bebida, durante 28 días. Se utilizó la sal sódica de T4 (Sigma-Aldrich) convenientemente disuelta en 0,1N de NaOH, con el agregado inmediato de agua corriente de modo de lograr un pH no mayor a 7,8. Esta concentración de T4 en el agua de bebida durante 28 días genera un aumento en los valores séricos de T4, que va de $5,5 \pm 0,7$ $\mu\text{g/dl}$ en ratones eutiroideos a $32,7 \pm 1,8$ $\mu\text{g/dl}$ en los ratones tratados con esta concentración de T4. También induce un incremento en los valores séricos de T3, pasando de $115 \pm 12,5$ ng/dl en ratones eutiroideos a $423 \pm 47,1$ ng/dl en ratones tratados con T4 en el agua de bebida.

3.3.2. Modelo de Hipotiroidismo

Se conocen tres métodos para promover bajos niveles de HTs *in vivo*: la tiroidectomía, la administración de ¹³¹I y el tratamiento con agentes antitiroideos. Se seleccionó un método que no produjera modificaciones del sistema inmune, de

por sí o a través de otros factores como el estrés provocado en su implementación. Además, se priorizó la practicidad operativa y la reproducibilidad del mismo. Tanto la extirpación quirúrgica de la tiroides como la aplicación del isótopo radiactivo tienen efectos directos sobre el sistema inmune (Ohashi e Itoh, 1994; Ballardín y col, 2002 y 2004) y además ofrecen mayor complejidad desde el punto de vista operativo y de infraestructura, por lo que el tratamiento con drogas antitiroideas resultó ser el más apropiado. Entre los agentes antitiroideos disponibles utilizamos el propiltiouracilo (PTU, Sigma-Aldrich), de reconocida eficacia en el tratamiento de pacientes con hipertiroidismo, considerado de elección incluso en circunstancias particulares como el embarazo y la lactancia (Streetman y Khanderia 2003; Chattaway y Klepser, 2007). La droga *per se* prácticamente no afecta la función inmune, sólo se ha descrito cierta interferencia sobre la proliferación linfocitaria a dosis muy altas, muy superiores a las alcanzadas en plasma en el tratamiento del hipertiroidismo (Hallengren y col, 1980). De todas formas, más recientemente se ha sugerido con énfasis que los efectos observados sobre la inmunidad no serían producidos en forma directa por la droga, sino causados por el déficit de HTs que la misma provoca (Volpe, 2001).

El PTU es una tiourea que interfiere con la oxidación del yodo por interacción con la peroxidasa tiroidea, inhibiendo de esta forma la síntesis de T3 y T4. Adicionalmente, este agente inhibe la deiodinasa involucrada en la conversión periférica de T4 a T3, lo que resulta en una disminución significativa tanto de los niveles plasmáticos de las HTs como en la restricción de su ingreso a las células, reduciendo de este modo su actividad hormonal (Fabris, 1973; Geffner y col, 1975). El fármaco se administró disuelto en el agua de bebida en 0,5 g/l durante 15 días. Es importante destacar que la dosis de PTU empleada está en el rango de la mínima dosis de mantenimiento del estado eutiroideo en pacientes con enfermedad de Graves (Kashiwai y col, 2003).

3.3.3. Determinaciones hormonales en sueros

3.3.3.1. Determinaciones de T3 y T4

Para el dosaje de los niveles de hormonas tiroideas en sangre, los ratones fueron anestesiados en cámara de CO₂ y posteriormente sangrados a través del seno

retro-orbital. La sangre obtenida fue centrifugada y se separó el suero, donde se realizó la determinación de los niveles hormonales de T3 y T4 por técnicas radioinmunoanalíticas empleando kits comerciales para HTs humanas (Immunotech, Praga, República Checa), siguiendo las indicaciones del fabricante. Esto es posible gracias a la alta reactividad cruzada con las hormonas murinas por tratarse de hormonas peptídicas. Brevemente, se utilizaron tubos recubiertos con anticuerpos monoclonales anti- T3 o T4, a los cuales se agregaron las muestras de suero junto con un trazador de T3 o T4 marcado con I^{125} . Se realizó una incubación de 1 hora, en agitación y temperatura ambiente, y luego se aspiró el contenido de los tubos. Los kits proveen calibradores de concentraciones conocidas de T3 y T4, que son procesados de igual manera que los sueros y son utilizados para generar una curva estándar. Posteriormente se determinó la radiactividad de la T3 o T4 unida al anticuerpo en contador de centelleo sólido (Alfanuclear). Los resultados de dosis fueron calculados a partir de las curvas de calibración rectificadas por logit-log, con el programa EXCEL. Se realizaron también los correspondientes controles de calidad internos, intra-ensayo y entre-ensayos.

3.3.3.2. Radioinmunoensayo para la determinación cuantitativa de Tirotrófina (TSH)

Los valores de TSH en suero no pudieron ser cuantificados por métodos comerciales por ser ensayos desarrollados con elevada sensibilidad y especificidad para la TSH humana, sin reacción cruzada con la TSH murina. Por este motivo el dosaje de TSH en los sueros de los ratones se realizó con un radioinmunoensayo puesto a punto con los siguientes reactivos provistos por el Dr. Parlow (National Hormone and Pituitary Program, NIH, USA):

- TSH de rata (NIDDK-rTSH-I-9) (AFP-115428): ampollas de 100 μg de TSH liofilizado, para radioiodinación.
- Antisuero de cobayo anti-TSH murina (AFP98991) en suero normal de cobayo en solución fosfato salina (PBS), provisto liofilizado para reconstituir a 1 ml. $K_a \cong 1 \times 10^{10}$ a $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$.

- Preparación de referencia de TSH de ratón purificada (AFP51718MP) para la preparación de estándares, provista en ampollas de 100 µg.

La radioiodinación directa de la TSH (NIDDK-rTSH-I-9) (AFP-115428) con ^{125}I (New England Nuclear) se realizó empleando el método de Iodogen (1,3,4,6 tetracloro 3,6 difenil glicouril-Sigma Aldrich), desarrollado por Fraker y Speck, (1978). Se realizó la titulación del antisuero para determinar la dilución del mismo a emplear en el ensayo. Así se seleccionó la dilución 1:950000, tal que en ausencia de antígeno frío fuera capaz de unir el 50% del antígeno marcado agregado en trazas (Ekins, 1974). Los calibradores, en un rango de concentraciones entre 20 y 300 ng/ml, se fabricaron a partir de una solución madre preparada con la TSH de referencia (AFP51718MP) solubilizada en PBS con seroalbúmina bovina (BSA) al 1%. Adicionalmente se prepararon muestras de control de calidad empleando sueros hipertiroideos como matriz, con el agregado de cantidades conocidas de TSH. Para que estas muestras pudieran en efecto ser empleadas como muestras de control de calidad, se realizaron 5 ensayos iniciales para establecer su rango de concentraciones.

Para la realización de los ensayos se siguió el siguiente protocolo: Se agregó a cada tubo 0,2 ml de antisuero, 0,15 ml de trazador y 0,05 ml de hormona fría (calibrador o muestra). Luego de un período de incubación de 16 horas en frío (4°C), se separó la fracción unida de la libre por el agregado de un segundo Ac anti-gamma globulina de cobayo, obtenido en cabra (Antibodies Incorporated, California, USA). Se realizó una segunda incubación de media hora y luego se procedió a centrifugar durante 20 minutos a 600g. En cada tubo, la fracción libre presente en el sobrenadante se eliminó por aspiración y se conservó el precipitado para su medición en un contador gamma (Alfanuclear).

Los resultados de dosis fueron calculados a partir de las curvas de calibración rectificadas por logit-log, con el programa EXCEL y posteriormente se realizaron los correspondientes controles intra- y entre-ensayos.

3.3.4. Modelo de linfoma T singeneico

3.3.4.1. Obtención de tumores sólidos

Se utilizó un modelo de trasplante tumoral singeneico en ratones C57Bl/6J (H-2^b) con diferentes estados tiroideos, utilizando la línea celular proveniente de estos mismos ratones, el linfoma EL-4.

Las células del linfoma T EL-4 fueron mantenidas en cultivo, tal como se mencionó previamente (**Sección 3.1**), y antes de la inoculación, fueron lavadas con PBS estéril, contadas usando el colorante de exclusión Azul Tripán (Sigma-Aldrich) y resuspendidas a una concentración de $1,5 \times 10^6$ células/ml en PBS. Posteriormente, 200 μ l de esta suspensión celular fueron inoculados por vía subcutánea de manera de generar un tumor sólido. A partir del día en el cual el tumor comenzaba a ser palpable se midió a diario el ancho y el largo del tumor utilizando un calibre y se calculó el volumen tumoral como $V = \pi/6 \times \text{largo} \times (\text{ancho})^2$.

Al día 10 luego de la inoculación subcutánea, cuando las diferencias en el tamaño tumoral entre los grupos comenzaron a ser significativas, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y los tumores generados fueron extraídos en su totalidad. Se registró el peso de los tumores extraídos y posteriormente el tejido fue dividido para ser utilizado en diferentes experimentos. Por un lado, los tumores fueron fijados en paraformaldehído 4% para ser incluidos luego en parafina y cortados con micrótomo. Por otra parte, se obtuvieron suspensiones celulares por disgregación mecánica de los tumores en una malla metálica de 1mm. Las suspensiones celulares fueron lavadas con PBS y centrifugadas. El pellet resultante fue utilizado para realizar las extracciones de proteínas y ARN totales y para ser analizado por citometría con marcadores específicos.

3.3.4.2. Ensayos de metástasis experimentales

Al realizar la inoculación subcutánea de las células EL-4 encontramos sólo esporádicamente la aparición de metástasis espontáneas en hígado. Dado que los tumores generados son de crecimiento muy rápido y las normas de bienestar animal indican que los animales portadores de tumor deben ser sacrificados al

alcanzar un volumen tumoral de $2,5 \text{ cm}^3$, en este tiempo no se pudo observar la formación de metástasis. Por este motivo, y para estudiar la diseminación de las células del linfoma T EL-4, estas fueron mantenidas en cultivo, tal como se mencionó previamente, y antes de la inoculación fueron lavadas con PBS estéril, contadas usando el colorante de exclusión Azul Tripán y resuspendidas a una concentración de $1,6 \times 10^6$ células/ml en PBS. Se inocularon 300 μl de esta suspensión celular por vía endovenosa. Diez días después los animales fueron sacrificados y se realizó una inspección anatómica para detectar la presencia de nódulos metastásicos en diferentes órganos y tejidos. Los órganos con presencia de nódulos metastásicos fueron fijados en paraformaldehído al 4% en PBS para su posterior análisis histopatológico. Se realizó un recuento del número de nódulos metastásicos presentes en cada órgano mediante observación del órgano completo con lupa.

3.4. Caracterización morfológica y molecular del tumor sólido

3.4.1. Análisis histopatológico de los tumores

Los tumores sólidos formados de manera subcutánea en los ratones con diferentes estados tiroideos fueron extraídos y fijados en paraformaldehído al 4% en PBS durante 24 horas. Luego fueron colocados en etanol 80% durante 2 horas para eliminar el buffer fosfato e inmediatamente después en etanol 96%. Posteriormente, los tejidos fueron incluidos en parafina, según técnicas convencionales, cortados en un micrótopo con un espesor de 5 μm y colocados sobre portaobjetos. Para la coloración y/o marcación de los cortes con anticuerpos específicos, los mismos fueron posteriormente desparafinados con xilol e hidratados por pasajes de 5 minutos a través de distintos alcoholes, en el siguiente orden: etanol absoluto, etanol 96%, etanol 70%, seguidos de un lavado con agua destilada y un lavado con PBS.

Finalizada la coloración o la marcación por inmunohistoquímica, los cortes fueron deshidratados nuevamente, mediante el pasaje por los alcoholes antes mencionados, pero en orden inverso, y colocados en xilol. Posteriormente, se realizó el montaje en Bálsamo de Canadá sintético (Canadax de Biopur, Rosario, Argentina) y se realizó la observación en microscopio óptico.

3.4.1.1. Coloración con hematoxilina-eosina

Luego de la hidratación, los cortes fueron coloreados con solución de hematoxilina (Biopur, Rosario, Argentina) durante 1 min y lavados con agua corriente para permitir el viraje hacia el violeta. Luego, se realizó la coloración con eosina (Biopur, Rosario, Argentina) durante 2 min, seguido de lavados con agua corriente.

3.4.1.2. Coloración tricrómica de Masson

Luego de la hidratación, los cortes fueron coloreados con hematoxilina durante 1 minuto, para teñir los núcleos, y lavados con agua corriente. Posteriormente, fueron coloreados con fucsina punzó, que tiñe citoplasmas, durante 5 minutos, lavados con agua e incubados durante 5 minutos con ácido fosfomolibdico (pH=3), para eliminar las coloraciones inespecíficas. Finalmente, los cortes fueron coloreados con verde luz durante 10 minutos, para teñir el tejido conjuntivo, y lavados con solución acuosa de ácido acético glacial al 1% durante 5 minutos.

3.4.1.3. Inmunohistoquímica

Antes de realizar la inmunohistoquímica (IHQ), los cortes fueron incubados durante 20 min en buffer citrato (citrato de sodio 10mM, pH=6) a 100°C, para realizar la recuperación antigénica y facilitar el desenmascaramiento de antígenos. Luego de dos lavados con agua, se realizó la inhibición de la peroxidasa endógena mediante la incubación de los cortes durante 20 minutos con H₂O₂ 3% en agua. Posteriormente, se realizó el bloqueo de sitios inespecíficos con suero normal de caballo (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), durante 60 min a temperatura ambiente en cámara húmeda. Finalmente, se realizó una incubación durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos que figuran en la **Tabla 3.II**, diluidos en PBS con 5% de suero de caballo (Vectastain ABC Kit), según se muestra en la tabla.

Tabla 3.II: Anticuerpos utilizados para IHQ

Anticuerpo	Fabricante	Origen	Dilución
Caspasa 3 activada	Abcam	conejo	1:50
CD31	Abcam	conejo	1:50
PCNA	Santa Cruz Biotechnology	ratón	1:100

Anticuerpos utilizados para los ensayos de IHQ. Se indica el fabricante, la especie donde se originó el anticuerpo y la dilución en la que fue utilizado en estos ensayos.

Los cortes fueron luego lavados con PBS e incubados durante 1 hora con el anticuerpo biotinilado “Biotinilated Universal Antibody” (Vectastain ABC Kit), hecho en caballo, anti-IgG de ratón e IgG de conejo. Luego de este tiempo, los cortes fueron lavados e incubados durante 30 minutos con el complejo avidina biotina del Vectastain ABC kit. Finalmente, los cortes fueron revelados con el kit comercial Peroxidase Substrate Kit DAB (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), según las instrucciones del fabricante.

3.4.2. Ensayos de división celular del linfoma T creciendo *in vivo*

Las células fueron cultivadas en condiciones normales, como se describió previamente. Antes de implantar los tumores, las células EL-4 fueron coloreadas con carboxifluorescein diacetato succinimidil ester (CFSE) del kit comercial Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit (Life Technologies). Brevemente, las suspensiones celulares se incubaron con CFSE 20 μ M durante 15 minutos a 37°C, se lavaron y se re-incubaron por otros 30 minutos en medio fresco para eliminar el exceso de colorante que no se unió covalentemente a las proteínas celulares. Posteriormente, las células marcadas fueron inoculadas subcutáneamente, tal como se describió anteriormente. Seis días después, los ratones fueron sacrificados y los tumores sólidos formados fueron extraídos y disgregados en una malla metálica de 1 mm. Las suspensiones de células tumorales obtenidas se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con formaldehído al 3,7% en PBS. Luego, se analizaron con un citómetro de flujo BD FACSCalibur por análisis de fluorescencia a 492 nm (Lyons, 1999).

3.4.3. Análisis por RT-PCR en Tiempo Real

Para estudiar la expresión de ARNm en los tumores de ratones con diferentes estados tiroideos, a las suspensiones celulares originadas por disgregación mecánica de los tumores se les agregó Tri Reagent según el procedimiento descrito por el fabricante. Luego, se procedió de la misma manera que se describe en la **Sección 3.2.4**.

Para la amplificación de los genes de interés se utilizaron los *primers* que fueron descritos en la **Tabla 3.I**, sumados a los que se muestran en la **Tabla 3.III**.

Tabla 3.III: Secuencias de los *primers* utilizados para las RT-PCR cuantitativas en Tiempo Real.

Gen	Secuencias de <i>primers</i>	Tm	T(°C)	[primer]
Bax	5'-TGG AGC TGC AGA GGA TGA TTG-3' 5'-AGC TGC CAC CCG GAA GA-3'	67.6 67.2	58	0,8
Bcl-XL	5'-CTG TGC GTG GAA AGC GTA GA-3' 5'-CCA ACT TGC AAT CCG ACT CA-3'	66.3 66.1	58	0,8
MMP-2	5'-TCT GGT GCT CCA CCA CAT ACA ACT-3' 5'-CTG CAT TGC CAC CCA TGG TAA ACA-3'	60.1 60.3	58	0,8
MMP-9	5'-TGA ACA AGG TGG ACC ATG AGG TGA-3' 5'-TAG AGA CTT GCA CTG CAC GGT TGA-3'	60.2 60.3	58	0,8
Timp1	5'-GGT GTG CAC AGT GTT TCC CTG TTT-3' 5'-AAG CAA AGT GAC GGC TCT GGT AGT-3'	60.2 60.4	58	0,8
Timp2	5'-TTT CTA GCC ACA CCA GGC AGA TGA-3' 5'-GGT TTG CTG GGA AGG CAT TTG AGT-3'	60.2 60.2	58	0,8
Timp3	5'-ACC ACT GCT TTG TCC AGG TGT TTG-3' 5'-ATG GAA ATG GTT GTG CCT TCT GCC-3'	60.0 60.3	58	0,8

Secuencias de *primers* diseñados con los softwares Primer Express 1.5 e IDT Primer Quest. Se indica la temperatura de melting (tm) en °C de cada primer, la temperatura a la cual se realizó la PCR (T°C) y la concentración a la cual se utilizó el par de *primers* ([primer]) en unidades µM.

3.4.4. Análisis de expresión de proteínas por Western blot

A partir de suspensiones celulares obtenidas por disrupción mecánica de los tumores se obtuvieron los extractos proteicos y se realizó un SDS-PAGE de la misma manera que se explica en la **Sección 3.2.5**.

Las membranas obtenidas luego de la transferencia fueron bloqueadas con leche descremada 5% en Tris-HCl 100mM, pH 7,5 y NaCl 0,9% con Tween-20 0,1% (TTBS) durante 1 hora. Posteriormente fueron lavadas con TTBS e incubadas con los anticuerpos que figuran en la **Tabla 3.IV**, durante la noche, a 4°C. En todos los casos, los anticuerpos fueron diluidos en 1% de BSA en TTBS.

Tabla 3.IV: Anticuerpos utilizados para Western Blot

Anticuerpo	Fabricante	Origen	Dilución
Ciclina D1	Cell Signaling	conejo	1:1000
Ciclina D3	Cell Signaling	ratón	1:1000
Ciclina E	Cell Signaling	ratón	1:1000
p16	Santa Cruz Biotechnology	conejo	1:500
p27	Santa Cruz Biotechnology	ratón	1:1000
p53	Santa Cruz Biotechnology	ratón	1:1000
PCNA	Santa Cruz Biotechnology	ratón	1:2000
β -actina	Santa Cruz Biotechnology	conejo	1:2000

Anticuerpos utilizados para los ensayos de Western Blot. Se indica el fabricante, la especie donde se originó el anticuerpo y la dilución en la que fue utilizado en estos ensayos.

Tras realizar tres lavados con TTBS, las membranas fueron incubadas durante 1 hora con anticuerpos policlonales anti-IgG de conejo o de ratón, según corresponda, hechos en cabra y acoplados a peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology). Las bandas obtenidas para cada proteína fueron detectadas por quimioluminiscencia usando el kit comercial ECL Western Blotting Analysis System (Amersham-GE), y revelando mediante la utilización del documentador de geles Image Quant. Finalmente, se realizó un análisis densitométrico de las bandas obtenidas, utilizando el software GelPro Analyzer versión 3.1.00.00 (Media Cybernetics). Los valores obtenidos para cada banda fueron relativizados en todos los casos al valor obtenido para la banda de β -actina.

3.4.5. Determinación de la generación de nuevos vasos sanguíneos

Las células EL-4 fueron inoculadas subcutáneamente en el flanco inguinal izquierdo de ratones C57 eu-, hiper- o hipotiroideos. Como control, se realizó también una inoculación de azul tripán en el flanco inguinal derecho, para poder comparar posteriormente el número de vasos sanguíneos presentes en la zona de inoculación del tumor respecto a una zona similar sin presencia de células tumorales. Al día 6, cuando los tumores comenzaban a ser palpables y eran de pequeño tamaño para poder observar los vasos sanguíneos intratumorales, los ratones fueron sacrificados y se realizó una observación de las zonas de los inóculos (tanto derecha como izquierda) para detectar la presencia de vasos sanguíneos, tanto intratumorales como peritumorales. El recuento de vasos sanguíneos se realizó mediante lupa.

3.4.6. Determinación de la actividad de metaloproteasas en sueros mediante zimografía

Se obtuvo la sangre de ratones controles, hiper- e hipotiroideos portadores de tumores de 10 días, según el método descrito previamente, en la **Sección 3.3.3.1**. Los sueros obtenidos fueron diluidos en un buffer conteniendo Tris-HCl 0,01M, glicerol 10%, SDS 0,02g/ml, azul de bromofenol 0,002% y β -mercaptoetanol 0,01% y a partir de estas muestras se realizó un SDS-PAGE en geles de acrilamida al 10% conteniendo 1mg/ml de gelatina. Finalizada la corrida electroforética, los geles fueron incubados 2 veces durante 30 minutos en un buffer conteniendo Tris-HCl 0,05M y tritón X-100 0,025%, seguido de tres lavados de 5 minutos con un buffer Tris-HCl 0,05M. Los geles fueron luego incubados durante 24 horas a 37°C en un buffer de incubación que contenía Tris-HCl 0,05M, NaCl 0,15M y CaCl_2 10mM. Finalizado este tiempo, los geles fueron fijados con una solución de metanol 50% y ácido acético 7%, teñidos con Azul de Coomasie G250 0,25% (Sigma-Aldrich) y fotografiados. Posteriormente se realizó la densitometría de las bandas obtenidas mediante el software GelPro Analyzer versión 3.1.00.00 (Media Cybernetics).

3.5. Estudio del estado inmunológico

Para evaluar el estado del sistema inmune en los animales con diferentes estados tiroideos y portadores de tumores EL-4, se analizaron los bazos, ganglios y tumores con el fin de detectar alteraciones inducidas por exceso o falta de HTs.

3.5.1. Suspensiones de células linfoides

De cada ratón en estudio se obtuvieron el bazo, el ganglio inguinal drenante y el no drenante. Los linfocitos de ganglios y bazos se obtuvieron por disrupción de los órganos en una malla de metal de 1 mm. Las suspensiones celulares obtenidas fueron centrifugadas y lavadas con medio RPMI 1640 suplementado con SFB al 10%, glutamina 2mM y 100µg/ml de estreptomicina (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). En el caso de las suspensiones de células provenientes de bazo, estas fueron previamente incubadas durante 5 minutos en hielo con un buffer conteniendo NH_4Cl 0,15 M, K_2CO_3 10 mM y EDTA 0,13 mM para lisar los glóbulos rojos, y posteriormente centrifugadas. Las células fueron luego contadas con la coloración de exclusión Azul Tripán que permite calcular la viabilidad celular, la cual siempre superó el 95%.

Para obtener los linfocitos infiltrantes en el tejido tumoral, los tumores sólidos formados por inoculación subcutánea de las células EL-4, fueron disgregados en una malla de metal de 1mm. Las suspensiones celulares obtenidas fueron incubadas en PBS y se realizó un recuento de células totales por la coloración con Azul Tripán en cámara de Neubauer. Posteriormente, fue analizada por citometría de flujo la presencia de células inmunes infiltrantes en el tumor mediante marcación con anticuerpos específicos.

3.5.2. Análisis por citometría de flujo

Para realizar el análisis de las subpoblaciones de células inmunes presentes en ganglios, bazos y tumores, luego de ser centrifugadas, las suspensiones celulares obtenidas fueron lavadas con PBS y resuspendidas en buffer de citometría (SFB al 1% y azida al 0,02% en PBS).

3.5.2.1. Detección de marcadores de membrana

Para la detección de marcadores de membrana, 1×10^6 células provenientes de las suspensiones celulares de bazo, ganglios o tumores fueron incubadas durante 30 min a 4°C con los anticuerpos correspondientes a cada subpoblación, como figuran en la **Tabla 3.V**, en un volumen final de 30 μ l por tubo.

Tabla 3.V: Anticuerpos utilizados para la detección de antígenos de membrana por citometría

Anticuerpo	Conjugado a	Fabricante	Para detectar	Dilución
CD3	FITC	eBioscience	Linfocitos T	1:750
CD4	FITC	eBioscience	Linfocitos T colaboradores	1:30
CD8	PE	eBioscience	Linfocitos T citotóxicos	1:30
CD19	FITC	eBioscience	Linfocitos B	1:30
NK1.1	FITC	eBioscience	Células NK	1:30
Gr1	PE	eBioscience	Células supresoras de origen mieloide	1:30
CD11b	APC	eBioscience		1:30
CD4	PE	eBioscience	Linfocitos T regulatorios	1:750
CD25	FITC	eBioscience		1:150

Anticuerpos utilizados para los ensayos de citometría. Se indica el fluorocromo al que está unido el anticuerpo, el fabricante, el subtipo de células inmunes a la que está dirigido y la dilución en la que fue utilizado en estos ensayos.

Luego de la incubación, las muestras fueron lavadas 2 veces con buffer de citometría y fueron fijadas en formaldehído al 1% en PBS. Los distintos subtipos de células inmunes fueron identificados mediante análisis citométrico usando el citómetro de flujo BD FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, California, USA), el PARTEC (Münster, Alemania) o el Accuri (BD Biosciences). Se construyeron los histogramas o *dot plots* correspondientes y se calcularon los porcentajes de cada subpoblación. Para determinar las marcas inespecíficas se usaron los correspondientes controles de isotipo, que nunca superaron el 1%.

3.5.2.2. Detección de FoxP₃ en Tregs

Para realizar la marcación del factor de transcripción FoxP₃, que caracteriza a las células T regulatorias, luego de la marcación de superficie con CD4-PE y CD25-APC, tal como se explicó en la **Sección 3.5.2.1**, las células fueron centrifugadas, lavadas y permeabilizadas durante 30 min a 4°C con el buffer FIX/PERM (eBioscience). Luego, las células fueron lavadas 2 veces en Buffer PERM (eBioscience) y posteriormente incubadas con 1 µl del anticuerpo anti-FoxP₃ (eBioscience) en 30 µl de Buffer PERM. Finalizado este período, las células fueron lavadas con el mismo buffer y luego fijadas con paraformaldehído 1% en PBS. Para el análisis de la subpoblación correspondiente a las células Tregs por citometría de flujo, se seleccionaron las células CD4⁺ y sobre esta población se realizó un *dot plot* con los otros dos marcadores, para determinar la población celular que tuviera la triple marca.

3.5.3. Ensayo de actividad de células NK

Para realizar estos ensayos se utilizaron las células YAC-1 provistas por la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Virginia, USA). Las células YAC-1 fueron mantenidas en cultivo en medio RPMI 1640 suplementado con 10 % de SFB, glutamina 2mM y 100µg/ml de estreptomina. La citotoxicidad de las células NK de los animales de los distintos grupos experimentales contra las células YAC-1 fue evaluada de acuerdo con el método de fragmentación de ADN (Ayres y col 2003; Wunderlich y col, 1997). Brevemente, las células YAC-1 fueron marcadas con 5 µCi de [³H]-Timidina durante 3 horas, antes de llevar a cabo los ensayos de citotoxicidad. Las suspensiones celulares de bazos se obtuvieron como se describió arriba. Se colocaron 1×10^5 células YAC-1 en microplacas de 96 pocillos y se agregaron entre 2×10^6 y 6×10^6 células de bazo en los pocillos para obtener diferentes relaciones de células dianas y efectoras (entre 1:20 y 1:60). Luego se incubó durante 3,5 horas a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Las placas fueron cosechadas sin congelar. El porcentaje de actividad citotóxica se calculó como la relación $NK = 100 \times (SR - ER)/SR$, donde SR es la lisis espontánea y ER es la lisis específica.

3.5.4. Ensayo de actividad citotóxica específica contra células EL-4

Para la evaluación de la actividad citotóxica específica contra las células tumorales se utilizó un método basado en la marcación de células con CFSE (Jedema y col, 2003). Para ello, se obtuvieron suspensiones celulares de bazos provenientes de animales portadores de tumor, que fueron co-cultivados durante 5 días con células EL-4 irradiadas con 30Gy (Centro de irradiación Cebirsa, Buenos Aires, Argentina) en una relación 10:1, con el fin de obtener una expansión de aquellos clones de células T que se activan en presencia de las células tumorales. Finalizado ese período, las células obtenidas fueron co-incubadas con células EL-4 marcadas con 5 μ M de CFSE durante 4 horas (de la misma manera que fue descrito en la **Sección 3.4.2**). El cocultivo resultante fue luego marcado con 10 μ l de IP 50 μ g/ml para la detección de las células lisadas. Se analizó la citotoxicidad por citometría de flujo, considerando lisadas a aquellas células que presentaron doble marca CFSE⁺/IP⁺.

3.6. Análisis estadístico

Para todos los experimentos se calcularon las medias, desviaciones estándares y errores estándares de los grupos. La significancia estadística se evaluó mediante análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías, según corresponda, con contraste de Tukey. Para el análisis de crecimiento tumoral se utilizó el análisis de ANOVA con medidas repetidas. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$. Estos análisis estadísticos se realizaron utilizando la versión GraphPad Prism 5.00 para Windows y el software InfoStat de la Universidad de Córdoba, Argentina (para el análisis de varianza de dos vías).

4. Resultados

En este trabajo analizamos la participación de las HTs en la biología de un linfoma T. Para ello, en primer lugar, se puso en evidencia el efecto directo de T4, hormona empleada en el establecimiento del hipertiroidismo *in vivo*, en el balance entre proliferación y apoptosis de células EL-4 en cultivo. En segundo término se estudió si el estado tiroideo afecta el establecimiento y desarrollo de dicho linfoma creciendo *in vivo* en ratones singeneicos como tumor sólido. En este último caso se estudiaron los mecanismos implicados tanto en la regulación del tamaño tumoral como los vinculados con la generación de metástasis en otros órganos.

4.1. Efectos del tratamiento *in vitro* de células del linfoma T EL-4 con HTs

Hemos descrito previamente que el cultivo de las células del linfoma T BW5147 (H-2^k) con hormonas tiroideas (T3 y T4) induce un incremento en el índice de proliferación celular (Barreiro Arcos y col, 2006). Dado que en los estudios *in vivo* se trabajó con la línea celular EL-4, nos pareció importante conocer si la misma era igualmente susceptible a la modulación por las HTs. Cabe señalar que la línea EL-4 fue originalmente establecida a partir de un tumor inducido por 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno en ratones C57Bl/6N. Son células de fenotipo inmaduro, que no expresan los marcadores de diferenciación CD4 o CD8 en la superficie celular, pero si expresan CD3, CD90 y H-2^d. Además, dado que la hormona que se utiliza para la generación de ratones con estado hipertiroidico es la L-T4, evaluamos sus efectos directos sobre las células EL-4.

4.1.1. Efecto *in vitro* de la tiroxina sobre la proliferación linfocitaria

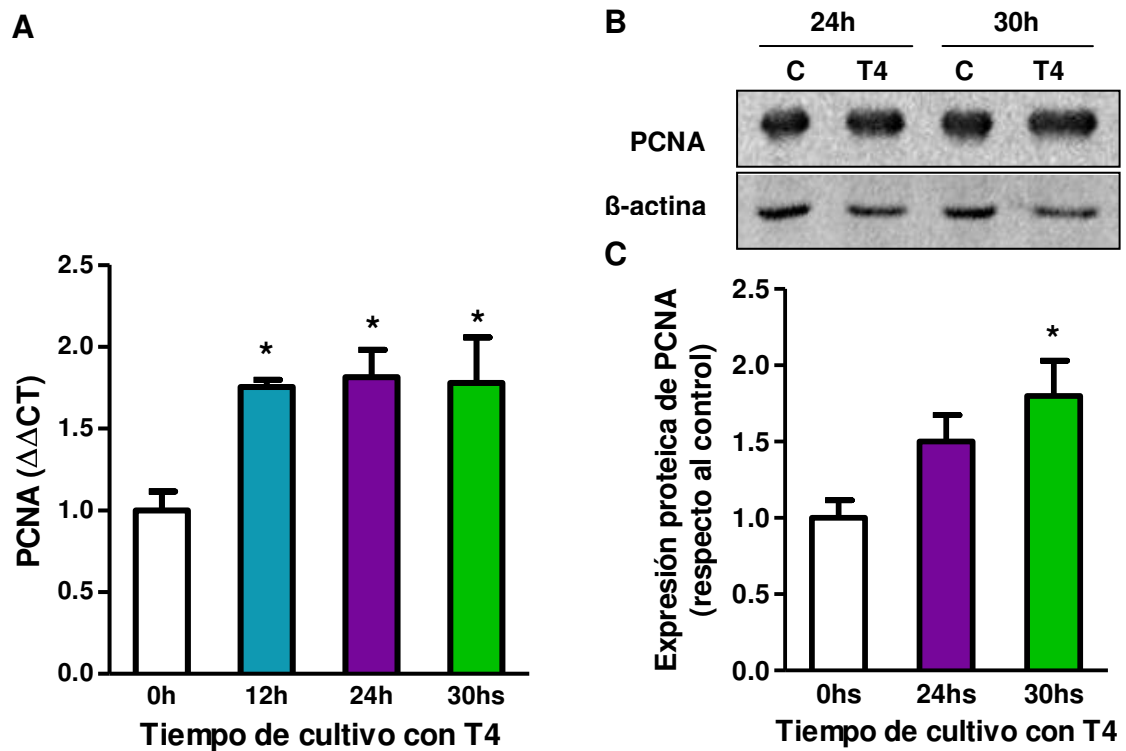
Para corroborar la regulación ejercida por HTs en la línea EL-4, incubamos dichas células con concentraciones fisiológicas de L-T4 (T4, $1 \times 10^{-7} \text{M}$) durante 12, 24 o 30 horas. Posteriormente evaluamos los niveles de expresión genómica y proteica de PCNA, mediante las técnicas de qRT-PCR y western blot respectivamente, como marcadores de células en proliferación.

Los resultados obtenidos indican que el tratamiento de las células EL-4 con T4 induce un incremento de los niveles de expresión genómica de PCNA a partir de las 12 horas de tratamiento, manteniéndose aumentados hasta las 30 horas (**Figura 4.1-A**). Por otra parte, los niveles proteicos del mismo gen se ven

aumentados a partir de las 24 horas de tratamiento con la hormona, siendo esta diferencia aun mayor a las 30 horas (**Figura 4.1-B**).

Por lo tanto, el tratamiento de las células EL-4 con T4 por tiempos cortos, de hasta 30 horas, induce un incremento de los niveles de expresión de PCNA, lo que indicaría un aumento de la proliferación de esta línea celular.

Figura 4.1: Efecto de la T4 sobre la expresión de PCNA en células EL-4



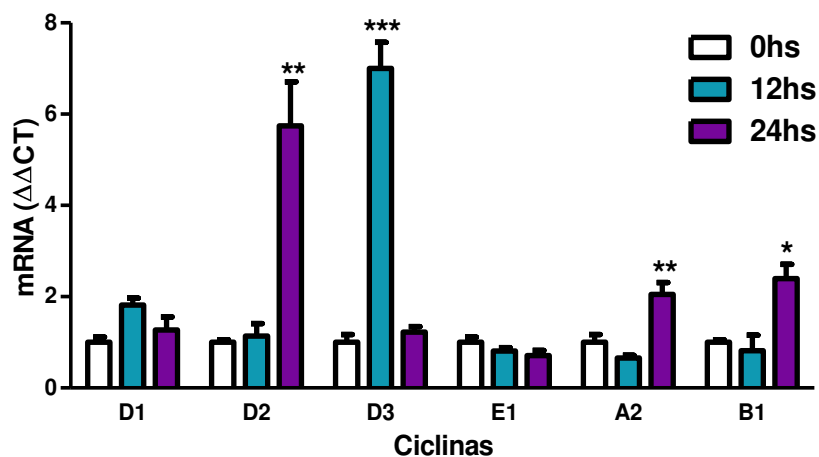
Las células EL-4 fueron arrestadas por privación de SFB durante 24 hs y posteriormente incubadas con T4 ($1 \times 10^{-7} M$) durante los tiempos indicados (0 hs, 12 hs, 24 hs o 30 hs). Posteriormente se extrajo el ARN total o se obtuvieron los extractos proteicos. **Panel A:** Se grafican los resultados obtenidos por qRT-PCR a partir del ARN total, con primers específicos para PCNA, mediante el análisis de $\Delta\Delta Ct$ de $n=3$ ensayos y utilizando como gen normalizador la $\beta 2$ -microglobulina. **Panel B:** Bandas representativas del análisis de western blot realizado sobre los extractos proteicos utilizando un anticuerpo anti-PCNA. **Panel C:** Análisis densitométrico de las bandas correspondientes a $n=3$ ensayos de western blot. * Difieren significativamente del control con $p < 0,05$.

4.1.2. Efectos del tratamiento con tiroxina sobre la regulación del ciclo celular en células EL-4

A continuación evaluamos si el efecto proliferativo de la T4 sobre las células EL-4 es acompañado por una modulación de proteínas reguladoras del ciclo celular. Para ello, incubamos las células durante 12 o 24 horas con T4 y estudiamos los niveles de expresión del ARNm de ciclinas, de inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas y de supresores tumorales por qRT-PCR.

Las ciclinas, proteínas reguladoras del ciclo celular que interactúan en complejos enzimáticos con quinasas dependientes de ciclinas (Cdk) modulando su actividad, muestran patrones de expresión y degradación que contribuyen a la coordinación temporal de cada evento del ciclo. En primer lugar, al evaluar la expresión de las Ciclinas D1, D2 y D3, que regulan la entrada en la fase G₁, encontramos que los niveles de Ciclina D3 estaban aumentados a las 12 horas de tratamiento con T4, mientras que los niveles de expresión de la Ciclina D2 se ven incrementados recién a las 24 horas de tratamiento, sin observarse cambios en la expresión del ARNm de la Ciclina D1 (**Figura 4.2**).

Figura 4.2: Modulación de la expresión de ciclinas en células EL-4 por T4



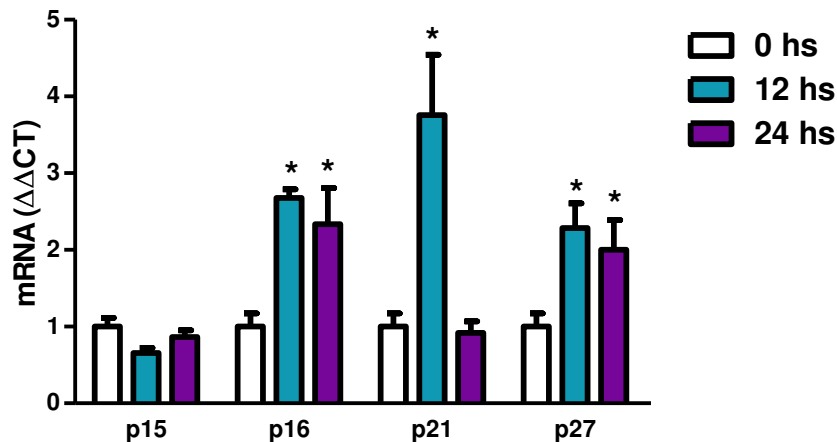
Análisis del patrón de expresión del ARNm de ciclinas en células EL-4 arrestadas y estimuladas por los tiempos indicados (0 hs, 12 hs o 24 hs) con T4 (1×10^{-7} M). Se evaluaron las ciclinas A2, B1, D1, D2, D3 y E1. Se grafican el promedio \pm ES de $n=3$ resultados obtenidos por el análisis de $\Delta\Delta C_t$ utilizando como gen normalizador la $\beta 2$ -microglobulina. Difieren significativamente con * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

También evaluamos la expresión de las Ciclinas E y A, que son importantes para la entrada y progresión en la fase S del ciclo celular. Encontramos un incremento en los niveles de expresión de la Ciclina A2 a las 24 horas de tratamiento con la hormona, pero no observamos cambios en la expresión de la ciclina E1 (**Figura 4.2**).

Dado que la Ciclina B es un regulador de la transición G₂/M, analizamos también sus niveles de expresión genómicos, observándose un incremento en células con 24 horas de tratamiento con T4 (**Figura 4.2**).

Por otra parte, analizamos la expresión de inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CdkIs). Estas proteínas son reguladores claves de la progresión del ciclo celular porque interactúan con los complejos ciclina-Cdk e impiden la actividad de las Cdk, limitando el avance a través de las fases del ciclo.

Figura 4.3. Modulación de los niveles de expresión de inhibidores de quinasas en células EL-4 por T4



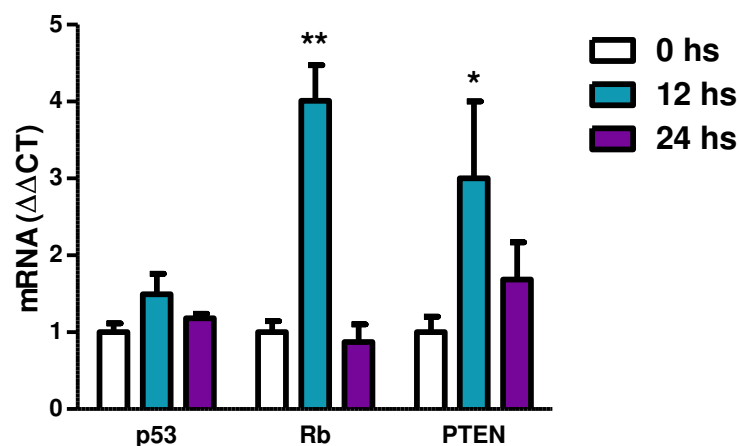
Análisis por qRT-PCR de células EL-4 tratadas con T4 (1×10^{-7} M) por los tiempos indicados (0 hs, 12 hs o 24 hs). Se evaluaron los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas p15, p16, p21 y p27. Se grafican los resultados obtenidos por el análisis de $\Delta\Delta C_t$ de $n=3$ ensayos, utilizando como gen normalizador la $\beta 2$ -microglobulina. * Difieren significativamente con $p < 0,05$.

Encontramos un aumento significativo de p27/Kip1 y p16/INK4A, dos inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas que regulan el ingreso en la fase G₁, en células con 12 y 24 horas de tratamiento con T4 (**Figura 4.3**). Por el contrario, no observamos diferencias en los niveles de expresión de p15/INK4B, que también

es un importante inhibidor de la progresión de la fase G₁ (**Figura 4.3**). En cuanto a p21/Cip1, inhibidor de la progresión de la fase S, observamos un incremento de sus niveles de ARNm a las 12 horas de tratamiento, pero no a las 24 horas (**Figura 4.3**).

Existen varios genes supresores tumorales cuya expresión se encuentra alterada en linfomas. Entre estos genes se encuentran p53, Rb, y PTEN, cuya expresión también evaluamos en células tratadas con T4 por 12 y 24 horas. Como se observa en la **Figura 4.4**, el tratamiento con T4 durante 12 horas indujo un importante aumento de los niveles del ARNm tanto de Rb como PTEN, pero no de p53. Este aumento fue revertido a las 24 horas, obteniéndose niveles de expresión similares al control.

Figura 4.4: Modulación de los niveles de expresión de genes supresores tumorales en células EL-4 por T4



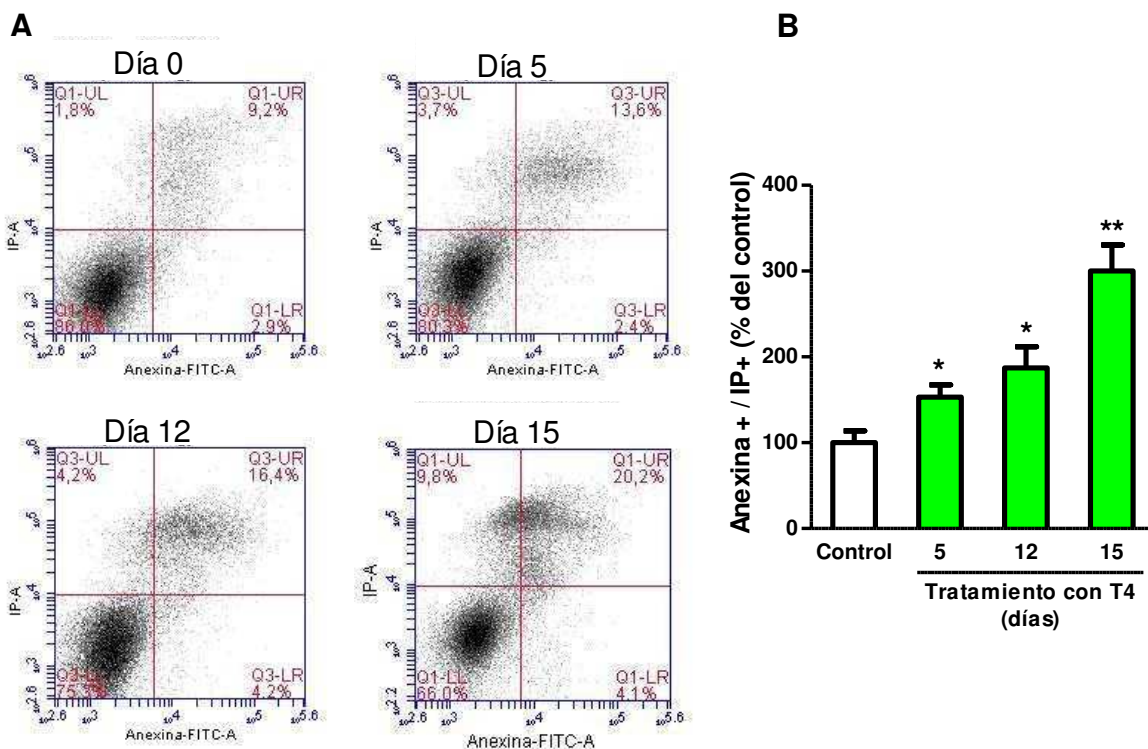
Evaluación de la modulación por T4 ($1 \times 10^{-7} \text{M}$) de la expresión de los ARNm de las proteínas supresoras de tumores Rb, p53 y PTEN a distintos tiempos (0 hs, 12 hs o 24 hs). Se muestran los resultados obtenidos por el análisis de $\Delta\Delta\text{Ct}$, utilizando como gen normalizador la $\beta 2$ -microglobulina, de $n=3$ ensayos independientes. Difieren significativamente con * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.1.3. Inducción de apoptosis en células EL-4 por tratamiento prolongado con tiroxina

A pesar de los resultados obtenidos que indican que las HTs son capaces de activar la proliferación de linfomas T, se ha visto también en nuestro laboratorio que el tratamiento *in vitro* del linfoma T BW5147 puede inducir procesos

apoptóticos que llevan a la muerte celular. Estos efectos fueron observados en incubaciones por tiempos prolongados (mayores a 5 días) con T4 (Barreiro Arcos y col, 2013). Por este motivo, evaluamos también el efecto del tratamiento crónico con T4 sobre las células EL-4.

Figura 4.5: Inducción de muerte celular por el tratamiento con T4 por tiempos prolongados



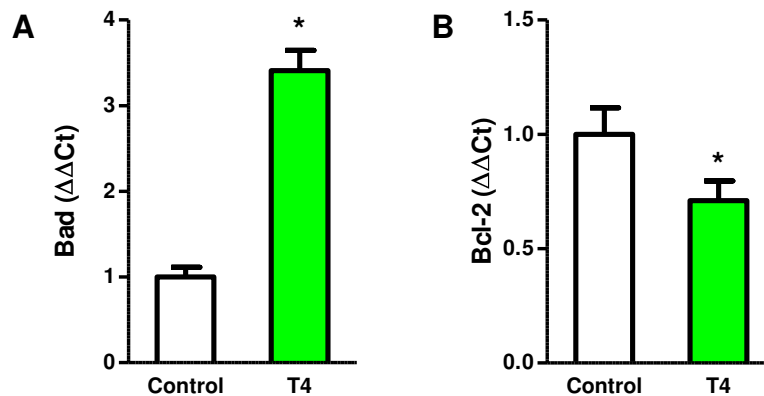
Células EL-4 fueron incubadas con T4 ($1 \times 10^{-7} \text{M}$) durante los tiempos indicados (5, 12 o 15 días) y posteriormente marcadas con Anexina-FITC y Ioduro de Propidio (IP). En el **panel A** se muestran dot plots representativos de los análisis por citometría realizados para células sin tratamiento (Control) y células tratadas con T4 por 5, 12 y 15 días. En el **panel B** se grafican los datos correspondientes a $n=3$ experimentos independientes (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Los resultados del análisis por citometría de flujo, obtenidos por marcación de las células con Anexina-FITC y Ioduro de Propidio, muestran que el tratamiento con T4 indujo la muerte celular a partir del día 5, siendo este efecto más importante aún al día 15 luego de iniciado el tratamiento (**Figura 4.5**).

Para confirmar que los efectos observados por el tratamiento crónico con T4 se deban efectivamente a la inducción de procesos apoptóticos y no a otros tipos de

muerte celular, evaluamos los niveles de expresión del ARNm de proteínas de la familia Bcl-2, que regulan la permeabilización de la membrana externa mitocondrial y, por lo tanto, los procesos de apoptosis.

Figura 4.6: Modulación de los niveles de expresión de proteínas de la familia Bcl-2 por tratamiento prolongado con T4

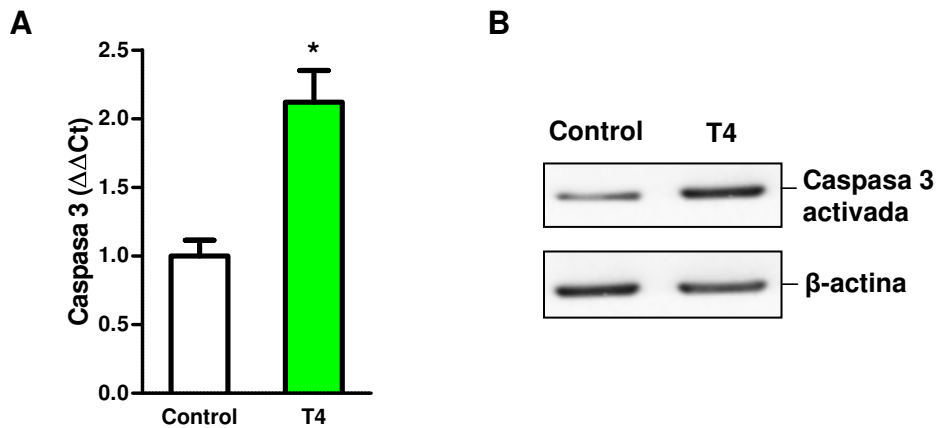


Se extrajo el ARN total de células EL-4 que fueron incubadas con T4 ($1 \times 10^{-7} \text{M}$) durante 15 días y se realizó una qRT-PCR con primers específicos para la proteína proapoptótica Bad (**A**) y la proteína antiapoptótica Bcl-2 (**B**). Se grafican los resultados de $n=3$ ensayos independientes obtenidos por el análisis de $\Delta\Delta\text{Ct}$ utilizando como gen normalizador la $\beta 2$ -microglobulina. * Difieren significativamente del control con $p < 0,05$.

El análisis de la expresión del ARNm por qRT-PCR en células tratadas durante 15 días con T4 mostró un aumento en los niveles de la proteína proapoptótica Bad y una reducción de los niveles de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (**Figura 4.6**), lo cual concuerda con los procesos que se llevan a cabo en la célula al producirse la activación de la apoptosis.

Otro de los factores que analizamos en las células tratadas con T4 por 15 días fue el nivel de expresión de la caspasa 3, caspasa efectora de las vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis. De acuerdo con lo esperado, observamos un incremento en la expresión de dicha caspasa (**Figura 4.7**).

Figura 4.7. Modulación de los niveles de expresión de caspasas por tratamiento prolongado con T4



Las células EL-4 fueron incubadas con T4 ($1 \times 10^{-7} M$) durante 15 días. Posteriormente se extrajo el ARN total y se realizó una qRT-PCR con primers específicos para la caspasa 3 o se obtuvieron las proteínas totales para evaluar los niveles proteicos de la caspasa por western blot. **Panel A:** Se grafican los resultados de $n=3$ ensayos independientes obtenidos mediante el análisis de $\Delta\Delta Ct$ utilizando como gen normalizador la $\beta 2$ -microglobulina. * Difieren significativamente del control con $p < 0,05$. **Panel B:** se muestran bandas representativas de $n=2$ ensayos de western blot revelados con un anticuerpo anti-caspasa 3.

Como conclusión de los resultados obtenidos *in vitro*, podemos afirmar que la T4 induce la proliferación de la línea celular de linfoma T EL-4 a tiempos cortos de cultivo. Sin embargo, el tratamiento crónico con la hormona por tiempos mayores a 5 días induce mecanismos que llevan a la muerte celular.

4.2. Modulación del crecimiento tumoral del linfoma T EL-4 por el estado tiroideo

Los resultados obtenidos *in vitro* muestran la regulación del crecimiento del linfoma T EL-4 por el tratamiento con tiroxina. Partiendo de estos resultados, nos resultó de interés evaluar si existe una modulación del crecimiento tumoral *in vivo* por el estado tiroideo. Por este motivo desarrollamos modelos murinos de hipertiroidismo e hipotiroidismo, en los que se evaluó la regulación del crecimiento del linfoma T EL-4 por el estado tiroideo y su relación con el exceso o deficiencia de hormonas tiroideas respectivamente.

4.2.1. Establecimiento de los modelos de hiper- e hipotiroidismo en ratones C57Bl/6J

Con el fin de desarrollar modelos murinos con diferentes estados tiroideos utilizamos ratones C57Bl/6J (H-2^b), singeneicos con la línea celular EL-4. La obtención de animales hipertiroideos se realizó mediante el tratamiento de los ratones con T4 en el agua de bebida durante 28 días, mientras que el estado de hipotiroidismo se logró por el tratamiento con un agente antitiroideo, el propiltiouracilo (PTU) en el agua de bebida durante 14 días tal como se detalló en Materiales y Métodos.

4.2.1.1. Verificación del estado tiroideo en los modelos experimentales establecidos

Una vez finalizado el tratamiento correspondiente a cada grupo experimental y para corroborar el estado tiroideo de los animales, realizamos la medición de las hormonas del eje tiroideo en los sueros de los ratones de los diferentes modelos experimentales.

De acuerdo a lo esperado, los animales hipertiroideos (tratados con T4) tuvieron niveles séricos de T3 y T4 mayores que los animales controles eutiroideos, mientras que los ratones tratados con PTU, alcanzaron valores significativamente menores para ambas hormonas (**Tabla 4.I**). Los niveles de TSH fueron muy bajos (y por debajo del menor estándar de la curva dosis-respuesta) en el

hipertiroidismo, en cambio aquellos obtenidos para los animales tratados con PTU fueron significativamente superiores a los basales (**Tabla 4.I**).

Tabla 4.I: Evaluación del eje HPT en los distintos modelos experimentales

Estado tiroideo	T3 (ng/dl)	T4 (μ g/dl)	TSH (ng/ml)
Eutiroideos	115 \pm 12.5	5.5 \pm 0.7	47.8 \pm 5.4
Hipertiroideos	423 \pm 47.1*	32.7 \pm 1.8*	<20
Hipotiroideos	60.6 \pm 10.2*	<1.0	64.2 \pm 6.8*

Los niveles séricos de las hormonas tiroideas T3, T4 y TSH fueron determinados en animales controles o luego del tratamiento con T4 (hipertiroideos) o el agente antitiroideo PTU (hipotiroideos), mediante técnicas de RIA. Se muestran los valores promedio de cada grupo \pm ES. * Difiere significativamente del grupo control con $p < 0,05$.

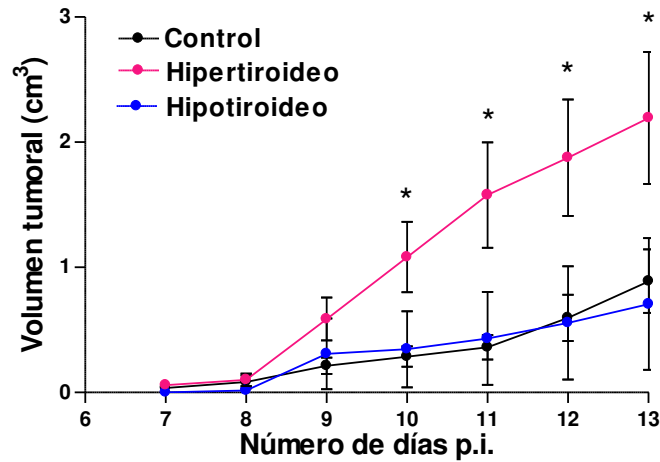
Estos resultados indican que las dosis administradas, tanto de T4 como del agente antitiroideo, son las adecuadas para lograr animales con regulación positiva o negativa del eje tiroideo tal como fuera demostrado previamente por nuestro grupo en ratones endocriados Balb/c (H-2^d) (Klecha y col, 2000 y 2006).

4.2.2. El estado tiroideo regula el crecimiento tumoral

Para evaluar si el estado tiroideo interviene en la regulación del desarrollo y evolución del linfoma T EL-4 inoculamos subcutáneamente las células EL-4 en ratones control, hiper- e hipotiroideos con el fin de obtener tumores sólidos.

No encontramos diferencias en la latencia de aparición del tumor, siendo de 6 \pm 1 días para los tres grupos en estudio (datos no mostrados). Por otra parte, los ratones hipotiroideos presentaron una tasa de crecimiento tumoral similar al grupo control, mientras que los ratones hipertiroideos mostraron una mayor velocidad de crecimiento tumoral en comparación con los otros dos grupos experimentales, evidenciada por un aumento más rápido del volumen de dichos tumores. Esta diferencia en los tamaños tumorales comenzó a ser significativa a partir del día 10 post-inoculación del tumor (**Figura 4.8**).

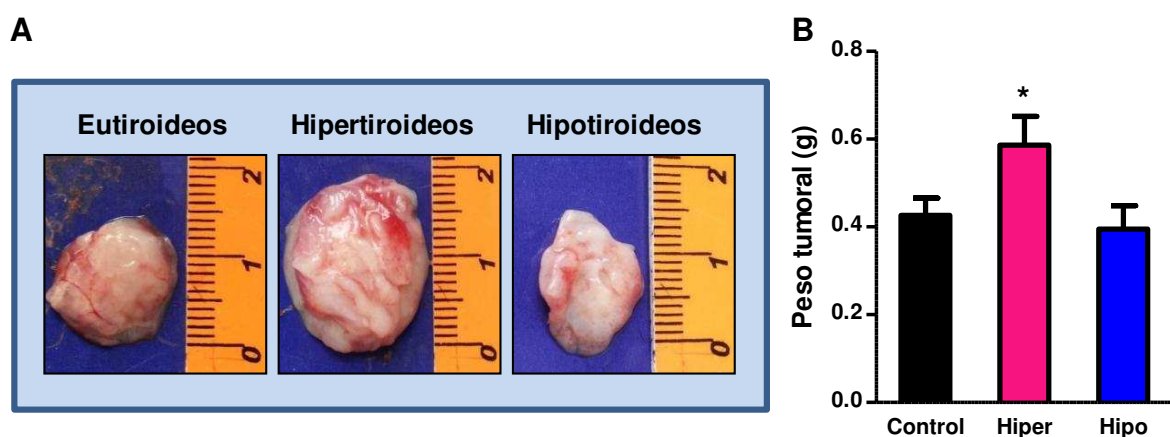
Figura 4.8: Efecto del estado tiroideo en la progresión tumoral



Ratones controles, hipertiroideos o hipotiroideos fueron inoculados subcutáneamente con 3×10^5 células EL-4. Se determinó el volumen tumoral a distintos días p.i., tal como se describió en Materiales y Métodos. Se muestran los valores promedio de 8 ratones por grupo \pm ES. * Difiere significativamente del grupo control con $p < 0,05$.

Por este motivo, decidimos realizar todos los estudios posteriores a los 10 días luego de la inoculación de las células EL-4. El peso de los tumores al momento de la eutanasia en ratones hipertiroideos fue en promedio un $38 \pm 6\%$ mayor que en los controles (Figura 4.9).

Figura 4.9: Tamaño tumoral al día 10 post-inoculación

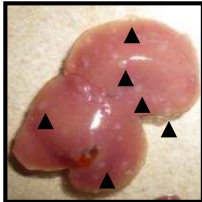



A los 10 días post-inoculación subcutánea de las células EL-4, los tumores sólidos formados fueron extirpados y pesados. En el **panel A** se muestra una fotografía representativa del tumor extirpado para cada grupo experimental. El **panel B** corresponde a la media del peso tumoral de 8 ratones por grupo \pm ES. * Difiere significativamente del grupo control con $p < 0,05$.

4.2.3. Modulación de la generación y desarrollo de metástasis por el estado tiroideo

Dado que uno de los procesos fundamentales en la evolución del proceso tumoral es el establecimiento de metástasis en diferentes órganos o tejidos, evaluamos también si el estado tiroideo es capaz de regular la formación de las mismas. Para ello realizamos un test de metástasis experimentales que consiste en la inoculación endovenosa de las células.

Tabla 4.II: Modulación por el estado tiroideo del desarrollo de metástasis en diferentes órganos

Estado tiroideo	A		B	
	Hígado	Riñón	Hígado	Riñón
Controles (n=16)	68,8 %	87,5 %		
Hipertiroideos (n=19)	36,8 %	78,9 %		
Hipotiroideos (n=17)	61,2 %	94,1 %		

Ratones controles, hiper- e hipotiroideos fueron inoculados por vía endovenosa con 5×10^5 células EL-4. A los diez días post-inoculación se observó la presencia de nódulos metastásicos en diferentes órganos. Se determinó el porcentaje de ratones con presencia de nódulos metastásicos en hígado o riñón, respecto al total de ratones utilizados en los ensayos. **Panel B:** Fotografías representativas de los hígados y riñones con presencia de nódulos metastásicos.

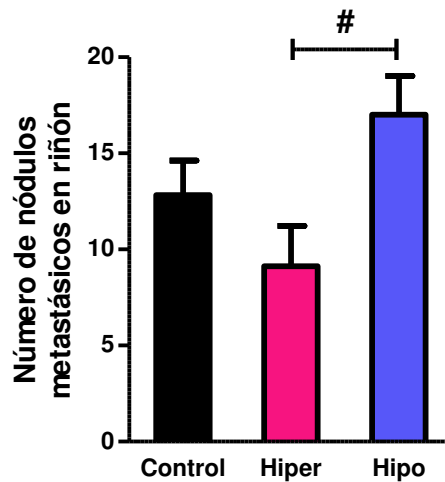
El test de metástasis experimentales generalmente da origen a metástasis en pulmón, ya que es el primer sitio donde las células tumorales ingresan a la microcirculación y a partir de allí pueden ser extravasadas y colonizar el tejido. Sin embargo, en el análisis anatómico de los ratones inoculados con células EL-4 no detectamos metástasis pulmonares pero si observamos nódulos metastásicos en hígado y riñones.

De los ratones controles, el 68,8% desarrolló metástasis hepáticas. Valores similares se obtuvieron para los ratones hipotiroideos, mientras que este porcentaje se redujo casi a la mitad en ratones hipertiroideos (**Tabla 4.II**). Por otra parte, el porcentaje de animales con metástasis renales fue aun mayor para los

tres grupos, siendo los ratones hipotiroideos los que presentaron la mayor prevalencia (**Tabla 4.II**).

No sólo observamos diferencias en cuanto al porcentaje de ratones que desarrollaron metástasis, sino que también existen diferencias en el número de nódulos metastásicos presentes en los riñones. Este número (**Figura 4.10**) fue significativamente mayor en ratones hipotiroideos respecto a los hipertiroideos. Estos últimos presentaron también menor número de metástasis que los controles, aunque las diferencias no resultaron estadísticamente significativas.

Figura 4.10. Modulación por el estado tiroideo de la cantidad de nódulos metastásicos renales



Los ratones fueron inoculados por vía endovenosa con 5×10^5 células EL-4. A los diez días post-inoculación se determinó el número de nódulos metastásicos renales. # Difieren significativamente con $p < 0,05$.

Por lo tanto, los niveles de HTs en circulación son capaces de regular también el establecimiento y desarrollo de metástasis. Los resultados obtenidos sugieren que el estado de hipotiroidismo favorece los procesos que llevan al establecimiento de las metástasis, mientras que el hipertiroidismo reduce la capacidad de las células tumorales de colonizar otros tejidos.

4.3. Acción del estado tiroideo sobre el crecimiento del tumor primario

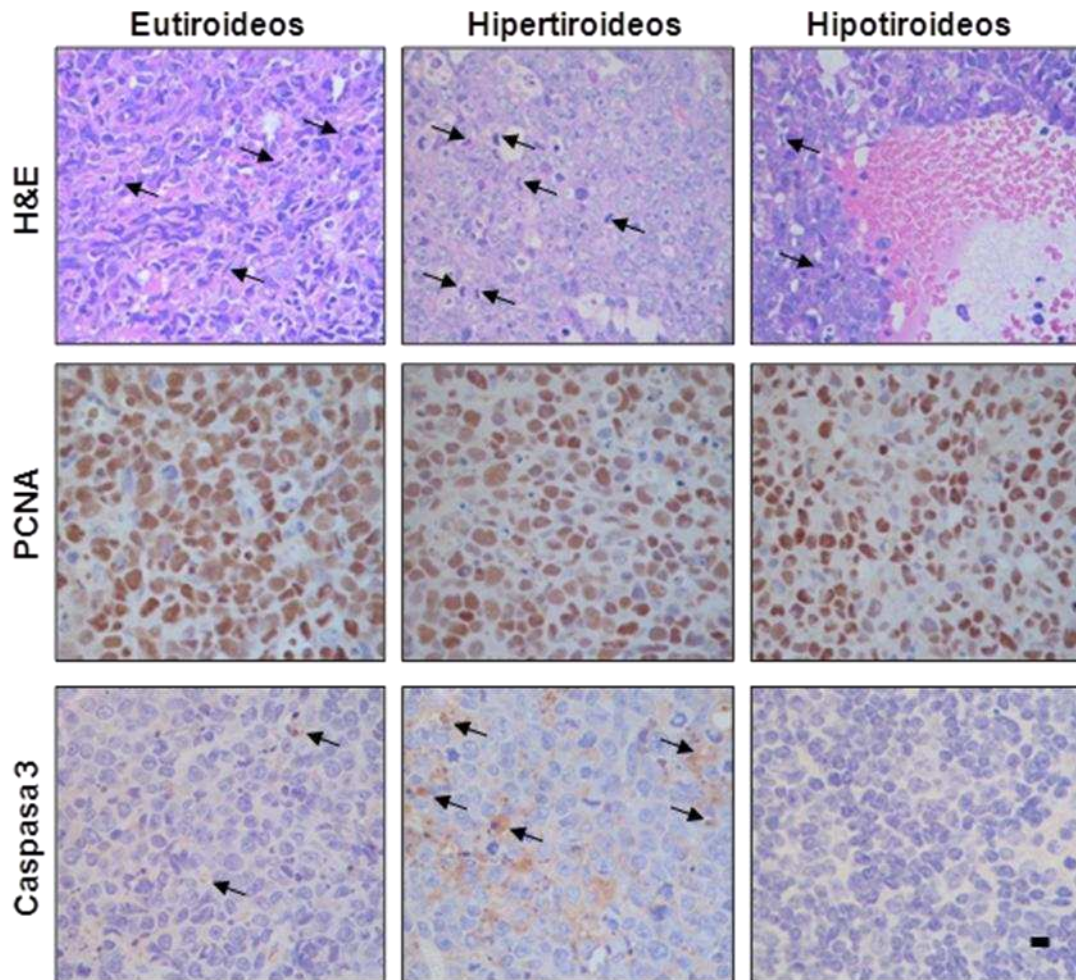
Habiéndose observado diferencias en el crecimiento tumoral y desarrollo de metástasis entre ratones con diferentes estados tiroideos, el siguiente objetivo fue estudiar los factores que se encuentran afectados por HTs en el tumor primario. Para ello, analizamos a nivel celular y molecular los efectos del exceso o deficiencia de HTs en el tumor sólido generado por inoculación subcutánea de células de linfoma T EL-4.

4.3.1. Caracterización de los tumores sólidos EL-4 de ratones con diferente estado tiroideo

Con el fin de determinar las características generales de los tumores EL-4 creciendo en ratones con diferentes estados tiroideos, realizamos una tinción con Hematoxilina y Eosina (H&E) de cortes de los tumores que habían sido previamente fijados y parafinados. El análisis histológico determinó que los tumores de los tres grupos experimentales están compuestos mayoritariamente por células de linfoma indiferenciadas, con muy poca presencia de otros tipos celulares. Presentan abundantes mitosis, núcleos aberrantes y una marcada anisocariosis. También se observa una elevada vascularización y bajos niveles de necrosis (**Figura 4.11**).

Los tumores de los ratones hipertiroideos, en particular, presentan un número de mitosis mayor que los otros dos grupos y una mayor vascularidad. También se observaron núcleos con intensa picnosis, cariorexis e hipocromasia, lo cual indica una mayor muerte celular. Los tumores de ratones hipotiroideos, por otra parte, muestran núcleos hiper- e hipocromáticos, con áreas de hemorragia difusa y daño vascular. Además presentan una mayor área de necrosis (**Figura 4.11**).

Figura 4.11: Análisis histológico de los tumores de ratones con diferente estado tiroideo



	Controles	Hipertiroideos	Hipotiroideos
Nº de mitosis / campo	2,8±0,8	5,2±0,5*	0,5±0,3*
Nº de células positivas para caspasa 3 / campo	4,2±1,6	6,8±1,5*	1,0±0,7*
% de necrosis	15,0±8,7	21,3±6,9	33,3±8,3*

Imágenes representativas de cortes en parafina de tumores de ratones controles, hiper- e hipotiroideos teñidos con hematoxilina y eosina (H&E) o marcados con anticuerpos específicos para PCNA y caspasa 3 mediante técnicas de inmunohistoquímica (IHQ). Las imágenes fueron obtenidas en un aumento de 630X. Las puntas de flecha indican las mitosis en cortes con H&E y las células positivas para caspasa 3 en cortes de IHQ. **Tabla:** Se muestran los promedios ± ES de n=4 cortes. * Difiere del control con p<0,05.

Para corroborar lo observado por la tinción con H&E, utilizamos métodos de inmunohistoquímica (IHQ) para detectar mediante anticuerpos específicos células positivas para PCNA o caspasa 3 activada, y así determinar la presencia de células en activa proliferación o células que están sufriendo procesos de apoptosis, respectivamente.

Como se puede observar en la **Figura 4.11**, en las áreas no necróticas los animales controles, hipertiroideos e hipotiroideos presentaron similar expresión de PCNA, siendo positivos para PCNA aproximadamente el 90% de los núcleos. Esto indicaría una alta tasa proliferativa en los tumores de los tres grupos en estudio.

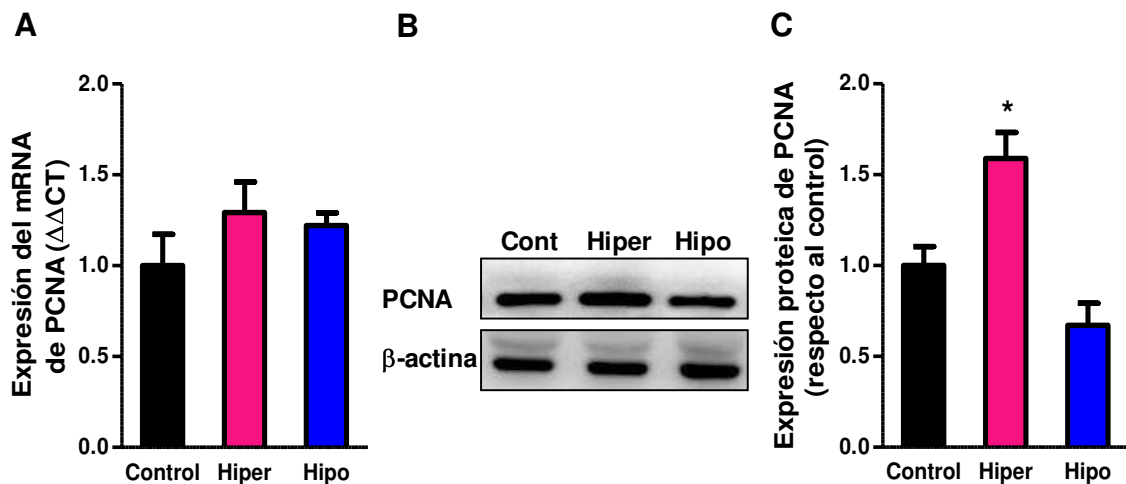
Sin embargo, los tumores de ratones hipertiroideos presentaron una mayor expresión de caspasa 3 activada, lo que indicaría que estos tumores presentan una mayor muerte celular al día 10 luego de la inoculación tumoral.

4.3.2. Modulación de la expresión de PCNA en tumores por el estado tiroideo

Como vimos, no se pudieron establecer diferencias en los niveles de PCNA mediante el análisis por IHQ. Por este motivo, realizamos ensayos de qRT-PCR y western blot a partir de muestras de tumores de los tres grupos experimentales, para evaluar la existencia de diferencias en los niveles de expresión tanto genómica como proteica de dicho antígeno.

A pesar de no observar diferencias significativas en los niveles de expresión del ARNm, detectamos un incremento de los niveles proteicos de PCNA en ratones hipertiroideos (**Figura 4.12**), lo que podría ser indicativo de una mayor tasa de proliferación en los tumores de ratones de este grupo experimental.

Figura 4.12: Expresión de PCNA en tumores de ratones con diferente estado tiroideo



Se obtuvieron los tumores de ratones control, hipertiroideos (Hiper) e hipotiroideos (Hipo) a los 10 días p.i. Se realizó la extracción de su ARN total y de las proteínas. **Panel A:** Se grafican los resultados obtenidos por qRT-PCR a partir del ARN total con primers específicos para PCNA, mediante el análisis de $\Delta\Delta\text{Ct}$ de $n=3$ ensayos y utilizando como gen normalizador la $\beta 2$ -microglobulina. **Panel B:** Bandas representativas del análisis de western blot realizado sobre los extractos proteicos utilizando un anticuerpo anti-PCNA. **Panel C:** Análisis densitométrico de las bandas correspondientes a $n=3$ ensayos de western blot. * Difiere significativamente del control con $p<0,05$.

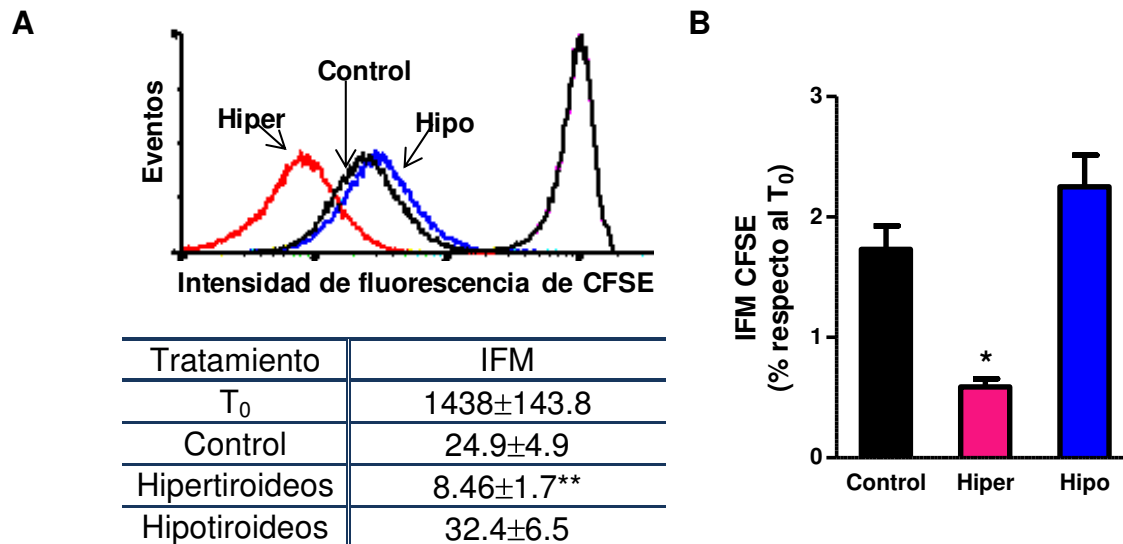
4.3.3. Modulación por el estado tiroideo de la proliferación de células EL-4 creciendo *in vivo*.

Para asegurarnos de que la tasa de proliferación de las células EL-4, creciendo como tumor sólido, se encuentre efectivamente modulada por el estado tiroideo, realizamos una tinción de las células EL-4 con el trazador CFSE antes de su inoculación subcutánea. El CFSE es un colorante fluorescente verde que se une espontánea e irreversiblemente a las proteínas intracelulares. A medida que las células proliferan, el CFSE se distribuye equitativamente entre las células hijas, y por lo tanto, la cantidad de colorante presente en el citosol se reduce a la mitad.

Seis días después de la inoculación de las células marcadas, obtuvimos suspensiones celulares a partir de los tumores, que fueron analizadas por citometría de flujo. Las células EL-4 que crecieron en animales hipertiroideos mostraron una intensidad media de fluorescencia menor que aquellas provenientes de animales controles e hipotiroideos (**Figura 4.13**), lo que indica

que estas células se dividieron una mayor cantidad de veces. Por lo tanto, los tumores sólidos EL-4 tienen una mayor tasa de proliferación cuando crecen en animales hipertiroideos.

Figura 4.13: Intensidad de fluorescencia de CFSE en células EL-4 creciendo como tumor sólido en animales con distinto estado tiroideo

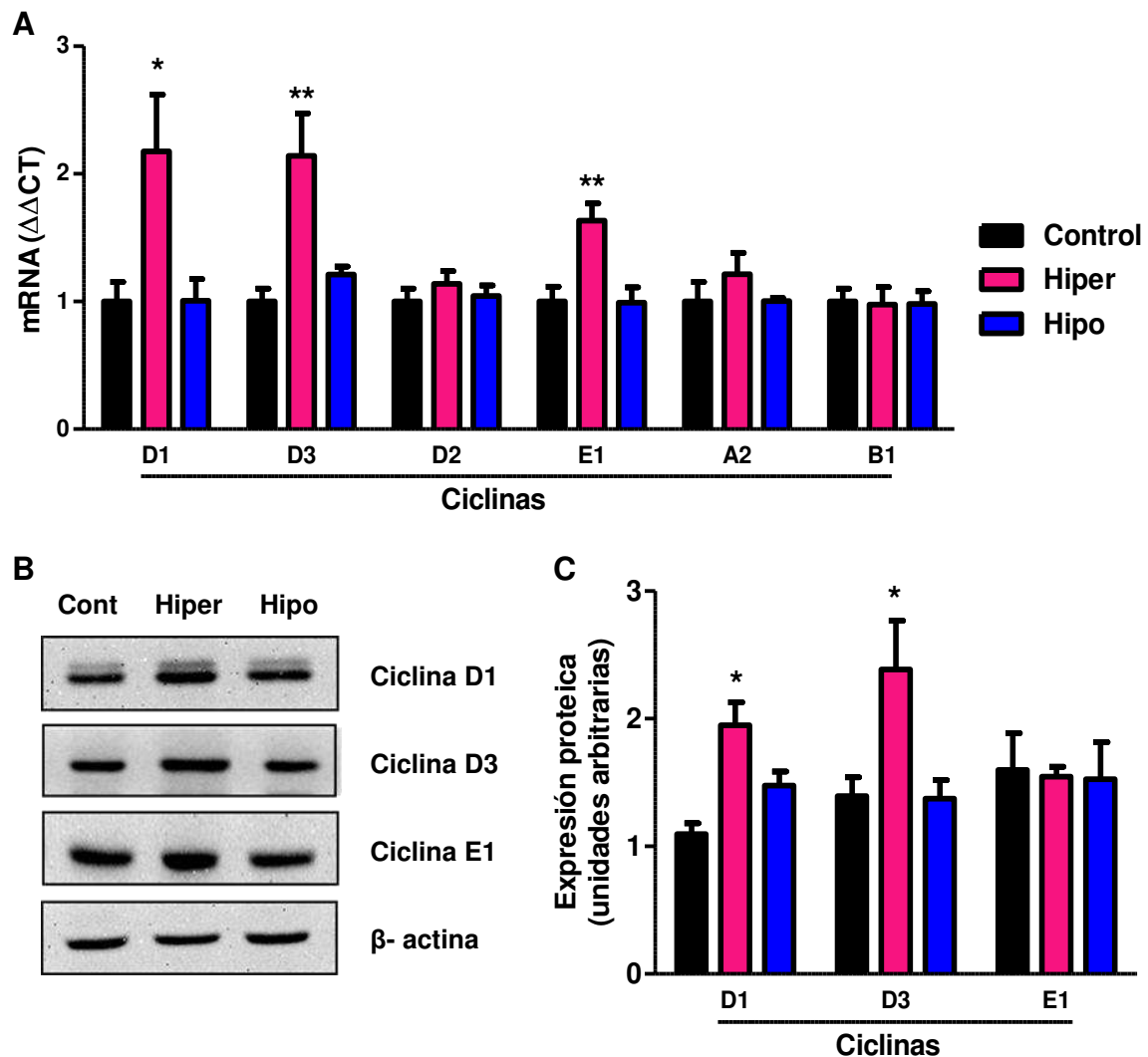


Las células EL-4 fueron marcadas con CFSE e inoculadas s.c. en ratones control, hipertiroideos (Hiper) e hipotiroideos (Hipo). Seis días post-inoculación, se extrajo el tejido tumoral y se cuantificó la intensidad de fluorescencia del CFSE por citometría de flujo. En el **panel A** se muestra un histograma representativo de 4 experimentos independientes; T₀ representa la intensidad de fluorescencia de CFSE en las células EL-4 previa su inoculación en los animales. En la **tabla** se muestran las intensidades de fluorescencia medias (IFM) para cada grupo. En el **panel B** se grafica el % de IFM respecto al T₀ para cada grupo experimental. Difieren significativamente del grupo control con *p<0,05 y **p<0,01.

4.3.4. Modulación por el estado tiroideo de proteínas reguladoras del ciclo celular en tumores EL-4

El aumento en la tasa proliferativa de las células creciendo en ratones hipertiroideos podría ser explicado por una regulación diferencial del ciclo celular. Como observamos *in vitro*, las HTs pueden afectar el ciclo celular, mediante la modulación de la expresión de sus proteínas reguladoras. Por lo tanto, evaluamos los niveles de expresión genómica y proteica de reguladores del ciclo celular, a saber las ciclinas, los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas y los supresores tumorales.

Figura 4.14: Expresión diferencial de genes de ciclinas en tejido tumoral de ratones eutiroideos, hipertiroideos e hipotiroideos.

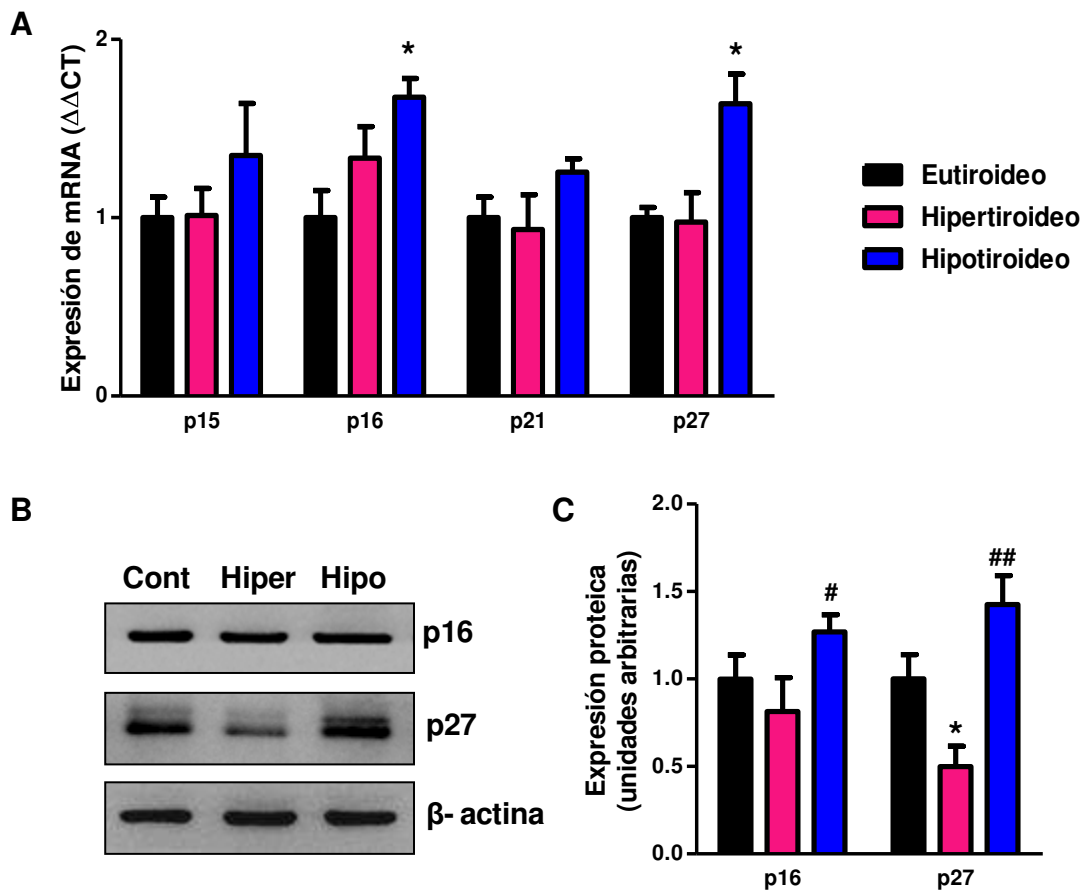


A partir de tumores de 10 días provenientes de ratones control, hipertiroideos (Hiper) e hipotiroideos (Hipo) se realizó la extracción del ARN total y de las proteínas. **Panel A:** Determinación de los niveles del ARNm de las ciclinas D1, D2, D3, E1, A2 y B1 mediante qRT-PCR. Se muestra el resultado del análisis por $\Delta\Delta C_t$, utilizando como gen normalizador la β_2 -microglobulina, correspondiente a 4 ensayos independientes. **Panel B:** Bandas representativas de 4 experimentos independientes de western blot para el análisis de la expresión proteica de las ciclinas D1, D3 y E1 utilizando como proteína normalizadora la β -actina. **Panel C:** Gráfico de barras correspondiente a la media \pm ES del análisis densitométrico de las bandas obtenidas para cada grupo experimental. Difieren significativamente del grupo control con * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$.

Encontramos un incremento en los niveles de expresión de las ciclinas D1, D3 y E1 sólo en animales hipertiroideos, mientras que las ciclinas D2, A y B no se vieron reguladas en ninguno de los grupos (**Figura 4.14**). Las ciclinas D son las reguladoras principales de la transición G_0/G_1 y su actividad es crucial para la

progresión del ciclo hacia la fase S, junto con la ciclina E, que se une y activa la Cdk2 en la fase G₁ del ciclo celular y favorece la transición G₁/S. Por lo tanto, el aumento de los niveles de expresión de estas ciclinas en los tumores de ratones hipertiroideos podría favorecer el aumento de la tasa proliferativa de los mismos.

Figura 4.15: Expresión diferencial de inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas en tumores de ratones eu-, hiper- e hipotiroideos.

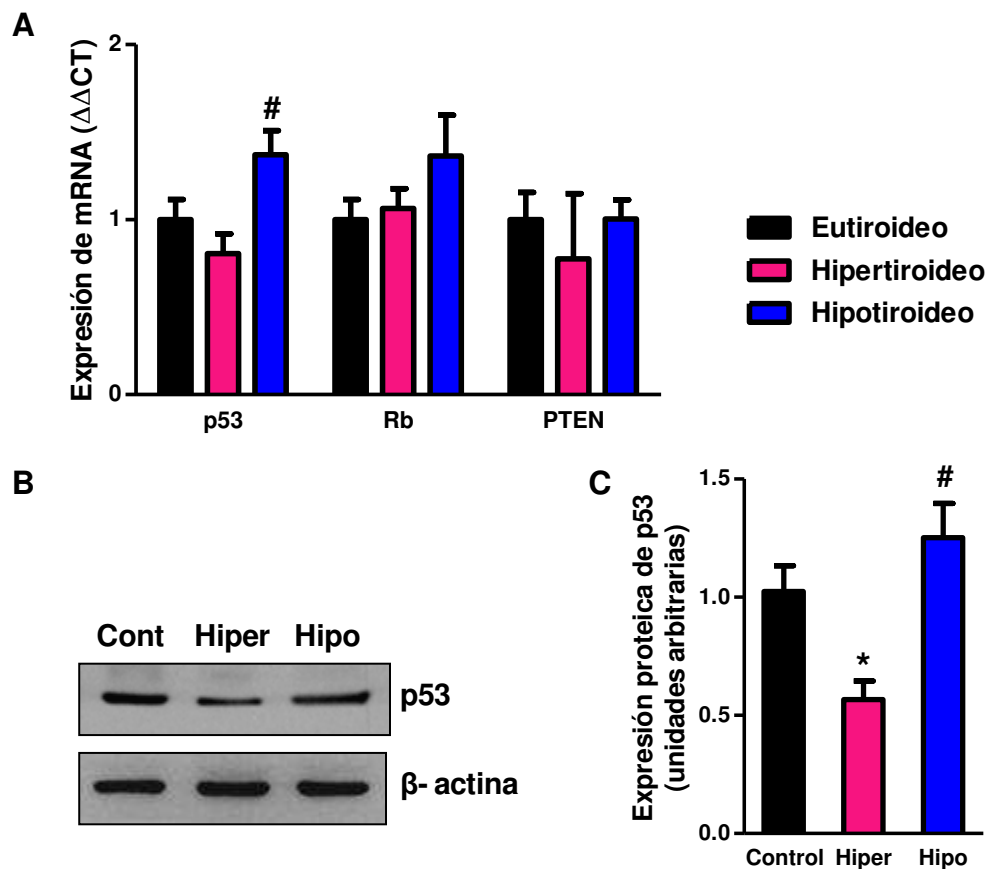


A partir de tumores de 10 días provenientes de ratones control, hipertiroideos (Hiper) e hipotiroideos (Hipo) se realizó la extracción del ARN total y de las proteínas. **Panel A:** Niveles de expresión del ARNm de los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas p15/INK4B, p16/INK4A, p21/Cip1 y p27/Kip1 mediante qRT-PCR. Se muestra la media \pm ES de 3 ensayos independientes analizados por $\Delta\Delta C_t$ utilizando como gen normalizador al de la $\beta 2$ -microglobulina. **Panel B:** Bandas representativas de 4 ensayos de western blot para determinar la expresión proteica de los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas p16/INK4A y p27/Kip1 utilizando como proteína normalizadora la β -actina. **Panel C:** Gráfico de barras correspondiente a la media \pm ES del análisis densitométrico de las bandas obtenidas para cada grupo experimental. Difieren significativamente del grupo control con * $p < 0,05$; difieren significativamente del hipertiroideo con # $p < 0,01$ y ## $p < 0,05$.

Evaluamos también en los tumores los niveles de expresión de los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas. La proteína p16/INK4A que inhibe al complejo

Cdk4-Ciclina D en la fase G₁ del ciclo y p27/Kip1 que inhibe al complejo Cdk2-Ciclina E/A en las fases G₁/S se vieron aumentados en tumores de ratones hipotiroideos. Por su parte, p15/INK4B y p21/Cip1, que actúan como inhibidores de las fases G₁ y G₂ respectivamente, no se vieron modulados en ninguno de los grupos (**Figura 4.15**).

Figura 4.16: Expresión diferencial de genes supresores tumorales en tejido tumoral de ratones eutiroides, hipertiroideos e hipotiroideos.



A partir de tumores de 10 días provenientes de ratones control, hipertiroideos (Hiper) e hipotiroideos (Hipo) se realizó la extracción del ARN total y de las proteínas. **Panel A:** Evaluación de los niveles de expresión del ARNm de los reguladores de ciclo celular p53, Rb y PTEN mediante qRT-PCR. Se muestra el resultado del análisis de 3 ensayos por $\Delta\Delta Ct$, utilizando como gen normalizador la $\beta 2$ -microglobulina. **Panel B:** Bandas representativas de 3 ensayos de western blot para la determinación de los niveles proteicos de p53 utilizando como proteína normalizadora la β -actina. **Panel C:** Gráfico de barras correspondiente a la media \pm ES del análisis densitométrico de las bandas obtenidas para cada grupo experimental. * Difiere significativamente del control o [#] difiere del hipotiroideo con $p < 0,05$.

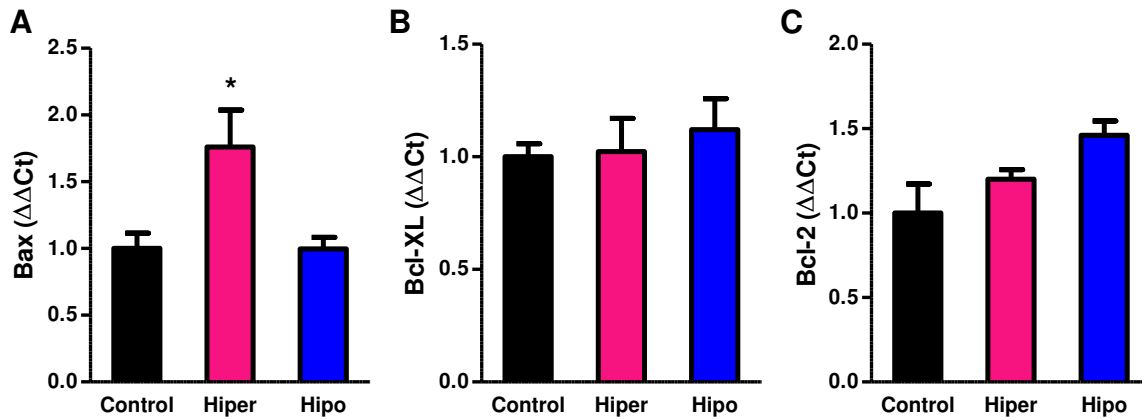
En el caso de los genes supresores tumorales que son los encargados de proteger a las células de transformaciones malignas mediante la inhibición del ciclo celular, evaluamos aquellos que, como dijimos anteriormente, se encuentran más comúnmente alterados en linfomas, p53, Rb y PTEN. Únicamente observamos una regulación en los niveles de expresión de p53 que se encuentran aumentados en tumores de animales hipotiroideos en comparación con los tumores de ratones hipertiroideos, los que a su vez están disminuidos respecto de los valores hallados en tumores controles (**Figura 4.16**). No se encontraron diferencias en la expresión de PTEN o Rb en ninguno de los grupos estudiados.

4.3.5. Modulación por el estado tiroideo de proteínas involucradas en apoptosis en tumores EL-4

Sin embargo, el desarrollo y la progresión tumoral no dependen solamente del grado de proliferación de las células tumorales sino que existe entre otros factores un balance entre proliferación y apoptosis que participa en el avance tumoral. Como hemos visto en la **Figura 4.11**, los tumores de ratones hipertiroideos tienen un mayor número de células de morfología compatible con procesos apoptóticos y además hay un mayor porcentaje de células que expresan caspasa 3 activada. Por este motivo y para confirmar la existencia de apoptosis en los tumores de ratones hipertiroideos, analizamos algunos factores relacionados con este proceso.

En primer lugar, estudiamos los niveles de expresión de proteínas de la familia Bcl-2 que hemos visto modificados *in vitro* por el tratamiento con T4 a tiempos largos (**Figura 4.6**). Los tumores de ratones hipertiroideos mostraron un aumento en la expresión del ARNm de la proteína antiapoptótica Bax pero no se observaron diferencias en cuanto a los niveles de expresión de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL (**Figura 4.17**).

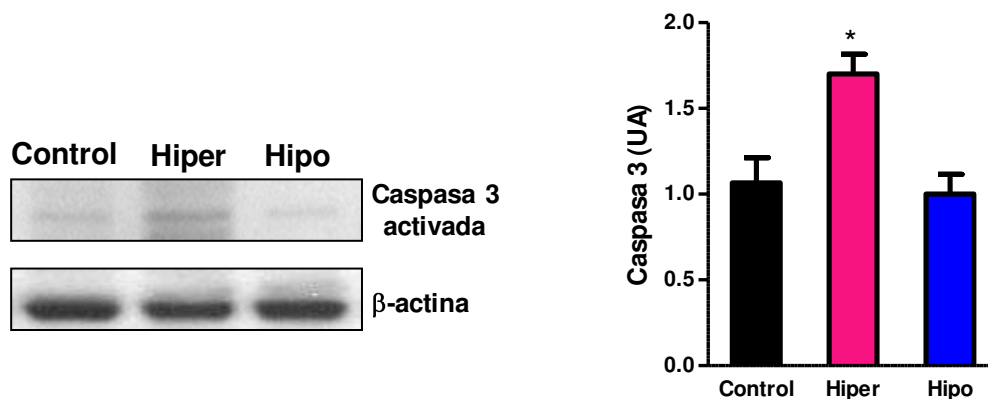
Figura 4.17: Expresión diferencial del ARNm de proteínas de la familia Bcl-2 en tumores de animales con diferentes estados tiroideos



A partir de ARN total de tumores de ratones control, hipertiroideos (Hiper) e hipotiroideos (Hipo), se determinaron los niveles de expresión del ARNm de la proteína proapoptótica Bax (**A**) y de las proteínas antiapoptóticas Bcl-XL (**B**) y Bcl-2 (**C**) mediante qRT-PCR. Se muestra el resultado del análisis por $\Delta\Delta Ct$ de 4 ensayos independientes utilizando como gen normalizador la β_2 -microglobulina. * Difieren significativamente del grupo control con $p < 0,05$.

Al activarse, Bax se une a la membrana mitocondrial y desencadena la pérdida del potencial de membrana mitocondrial que lleva a la liberación del citocromo c y a la activación de caspasa 3. El análisis por western blot demostró una mayor expresión de caspasa 3 activada en los tumores de ratones hipertiroideos respecto a los otros dos grupos experimentales (**Figura 4.18**) en concordancia con lo observado previamente por IHQ.

Figura 4.18: Expresión diferencial de caspasa 3 activada en tumores de animales con diferentes estados tiroideos



A partir de extractos de proteínas de tumores de ratones control, hipertiroideos (Hiper) e hipotiroideos (Hipo) se realizó un western blot utilizando un anticuerpo anti-caspasa 3 activada. **Panel A:** Bandas representativas del análisis de western blot. **Panel B:** Análisis densitométrico de las bandas correspondientes a $n=4$ ensayos de western blot. * Difiere significativamente del control con $p<0,05$.

Por lo tanto, los tumores creciendo en ratones hipertiroideos presentan un incremento tanto en la proliferación como en la apoptosis celular. Sin embargo, el balance entre estos dos procesos que ocurren simultáneamente en el tumor, debe llevar finalmente a un incremento en la velocidad de crecimiento tumoral.

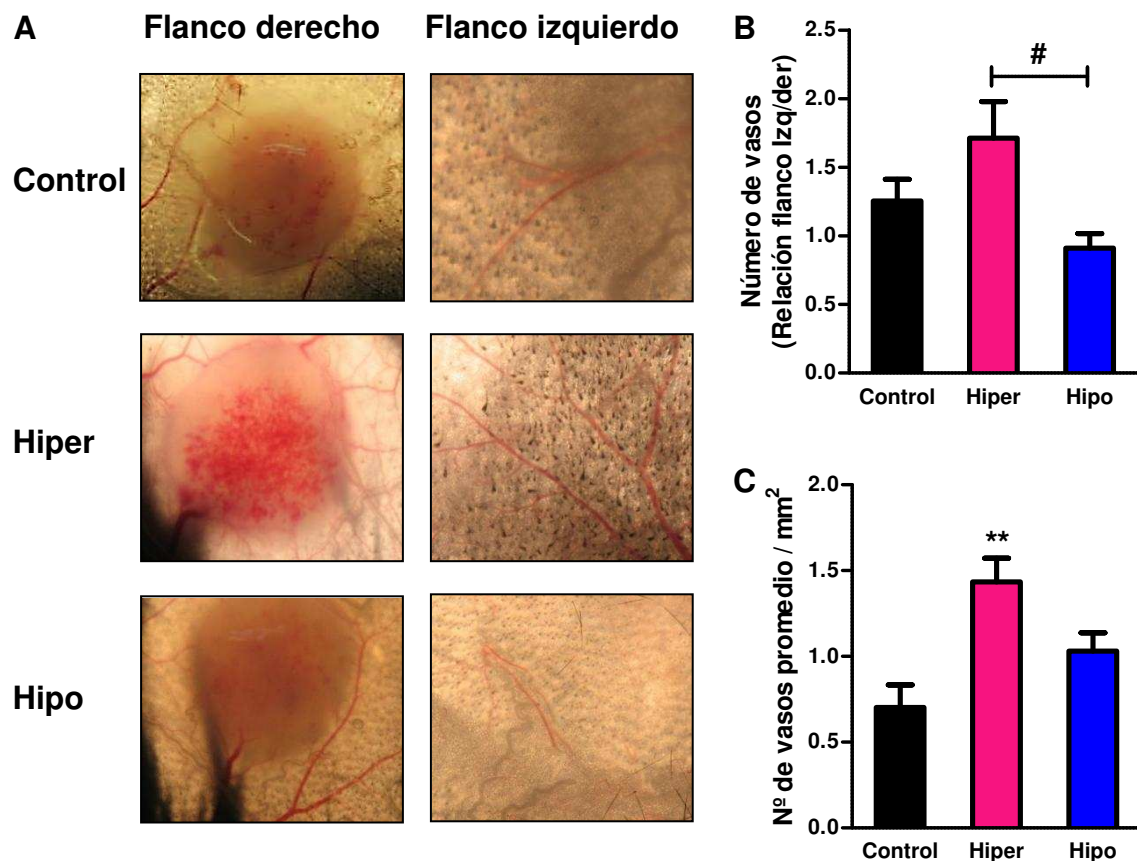
4.3.6. Modulación por el estado tiroideo de la angiogénesis en tumores EL-4

El crecimiento tumoral, la invasión y las metástasis son procesos que se encuentran altamente asociados con la angiogénesis. La formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes promueve el crecimiento tumoral ya que le aporta oxígeno, nutrientes y remueve catabolitos que pueden ser tóxicos para las células.

Para evaluar si la angiogénesis tumoral es modulada por el estado tiroideo, en primer lugar se realizó el recuento mediante observación por lupa del número de vasos en la zona de la piel donde se encontraba el tumor y se comparó con la misma zona en el flanco opuesto del ratón. Cabe señalar que dicho recuento se realizó en la zona peritumoral por la imposibilidad de contabilizar los numerosos vasos de pequeño calibre ubicados en el tumor al momento de conseguir su detección por palpación (**Figura 4.19**). En la figura indicada, puede apreciarse

que los animales hipertiroideos presentaron una mayor vascularización a nivel general en las zonas de piel evaluadas. Particularmente en el tumor y en las zonas circundantes, este grupo también presentó una mayor vascularización respecto al lado control.

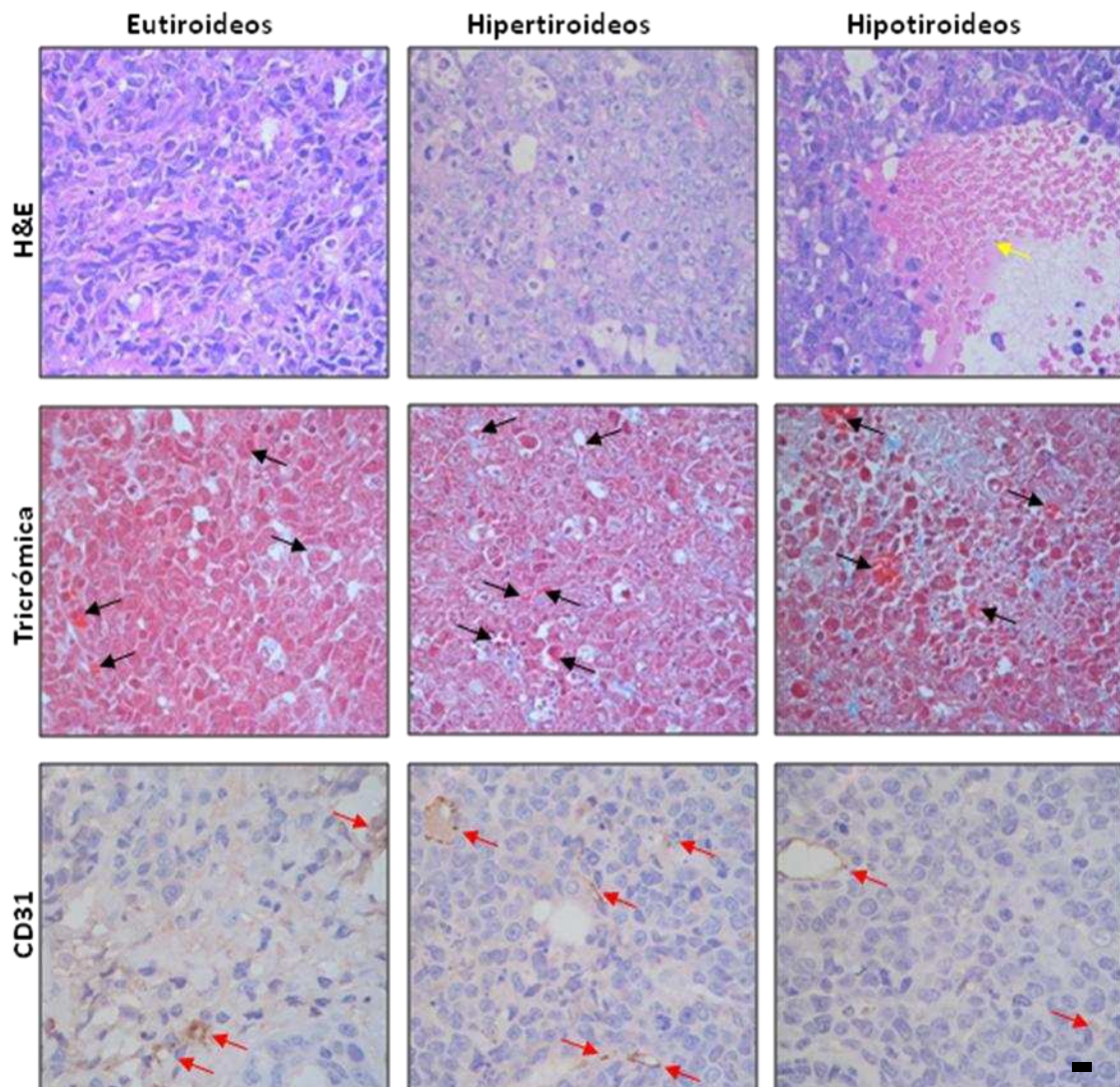
Figura 4.19: Efecto del estado tiroideo en la angiogénesis tumoral



Las células EL-4 fueron inoculadas s.c. en ratones control, hipertiroideos (Hiper) o hipotiroideos (Hipo). Al día 6 post-inoculación, cuando los tumores eran palpables, se realizó la observación de los vasos sanguíneos peritumorales con lupa. **Panel A:** Fotografía representativa de 3 ensayos independientes con 4 ratones por grupo. **Panel B:** Número medio \pm ES de vasos sanguíneos por área en el flanco inguinal derecho (con tumor) relativo al flanco inguinal izquierdo (inoculado con PBS). #Diferencia significativa ($p < 0,05$). **Panel C:** Número promedio \pm ES de vasos sanguíneos por área en los flancos derecho e izquierdo. **Difiere significativamente del control con $p < 0,01$.

También evaluamos el grado de angiogénesis en los tumores de 10 días p.i. en cortes del tejido. Realizamos una tinción con Tricrómica de Masson que tiñe con verde las fibras de colágeno y por lo tanto, permite detectar los vasos sanguíneos con mayor facilidad. También realizamos una marcación por IHQ con CD31, una proteína que se encuentra expresada principalmente en células endoteliales y que es utilizada comúnmente como marcador de angiogénesis.

Figura 4.20: Análisis histológico de tumores de ratones con diferente estado tiroideo para detectar angiogénesis



	Control	Hipertiroideo	Hipotiroideo
Nº de vasos por campo	4,87±0,37	6,00±0,45*	3,33±0,17*

Imágenes representativas de cortes en parafina de tumores de ratones controles, hipertiroideos e hipotiroideos teñidos con hematoxilina y eosina (H&E) y Tricrómica de Masson o marcados con anticuerpos específicos para CD31 mediante técnicas de IHQ. Las imágenes fueron obtenidas en un aumento de 630X. Las flechas negras indican microvasos, la flecha amarilla indica un área de hemorragia y las flechas rojas indican marca positiva para CD31. **Tabla:** Media ± ES de la cuantificación de los vasos sanguíneos en 4 cortes de tumores de cada grupo experimental.

*Difiere significativamente del control con $p < 0,05$.

Como puede observarse en la **Figura 4.20**, los tumores de ratones hipertiroideos presentan una mayor vascularización que los controles mientras que los tumores de ratones hipotiroideos presentan un nivel de vascularización menor.

Por lo tanto, los tumores de ratones hipertiroideos presentan una mayor angiogénesis tumoral, lo que permitiría una mejor distribución de los nutrientes y del oxígeno entre las células tumorales favoreciendo por ende su crecimiento. Lo contrario se da en los tumores de ratones hipotiroideos, que presentan una reducida vascularización con zonas de hemorragia y daño vascular perjudiciales para el crecimiento y desarrollo tumoral (**Figura 4.20**).

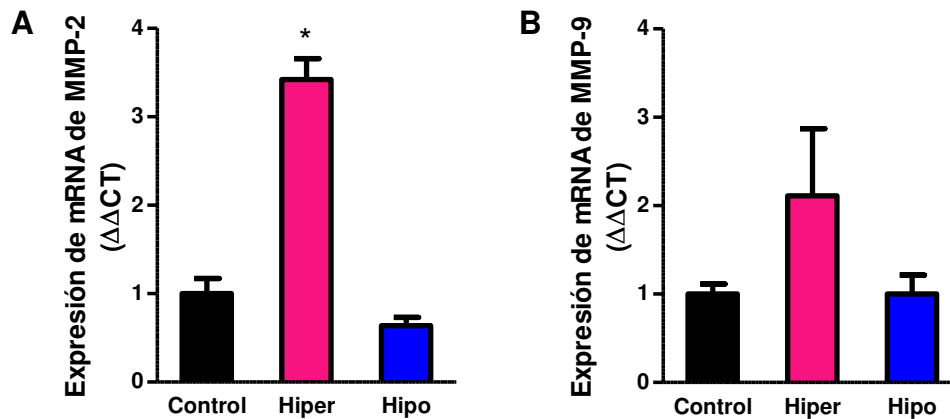
4.3.7. Modulación por el estado tiroideo de metaloproteasas de matriz y sus inhibidores tisulares en tumores EL-4

Las metaloproteasas de matriz (MMPs) son miembros de un grupo de enzimas capaces de degradar proteínas de la matriz extracelular como el colágeno y participan en diversos procesos de remodelación tisular.

Se evaluaron los niveles de expresión de las metaloproteasas 2 y 9 que son de gran importancia en los procesos de angiogénesis y metástasis, en tumores de 10 días provenientes de ratones con diferentes estados tiroideos.

La expresión de MMP-2 se encuentra significativamente aumentada en tumores de ratones hipertiroideos y también se observa un aumento en la expresión de MMP-9 aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa (**Figura 4.21**).

Figura 4.21: Modulación de la expresión de metaloproteasas de matriz por el estado tiroideo

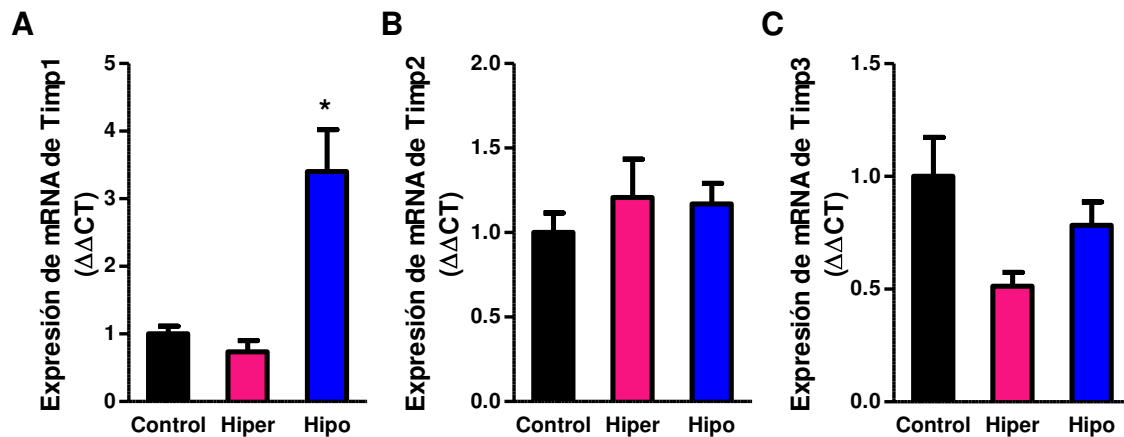


Evaluación de los niveles de ARNm de la metaloproteasa de matriz 2 (MMP-2) (A) y la metaloproteasa de matriz 9 (MMP-9) (B) por qRT-PCR en tumores de 10 días provenientes de animales eutiroideos (control), hipertiroideos (Hiper) o hipotiroideos (Hipo). Se grafican los resultados obtenidos mediante análisis del $\Delta\Delta Ct$ para 3 ensayos independientes utilizando como gen normalizador la β_2 -microglobulina. * Difiere significativamente de los valores en animales eutiroideos con $p < 0,05$.

La actividad de estas proteasas se encuentra regulada por sus inhibidores tisulares (Timp) que se unen a su sitio catalítico impidiendo su actividad. Y es la relación entre los niveles de MMPs y Timp la que determina la actividad proteolítica en la matriz extracelular.

Al analizar los niveles de expresión de los Timp 1, 2 y 3 en los tumores provenientes de los animales de los tres grupos experimentales, observamos un incremento sólo de Timp1 en tumores de ratones hipotiroideos sin verse modificada la expresión de Timp 2 y 3 en ninguno de los grupos experimentales.

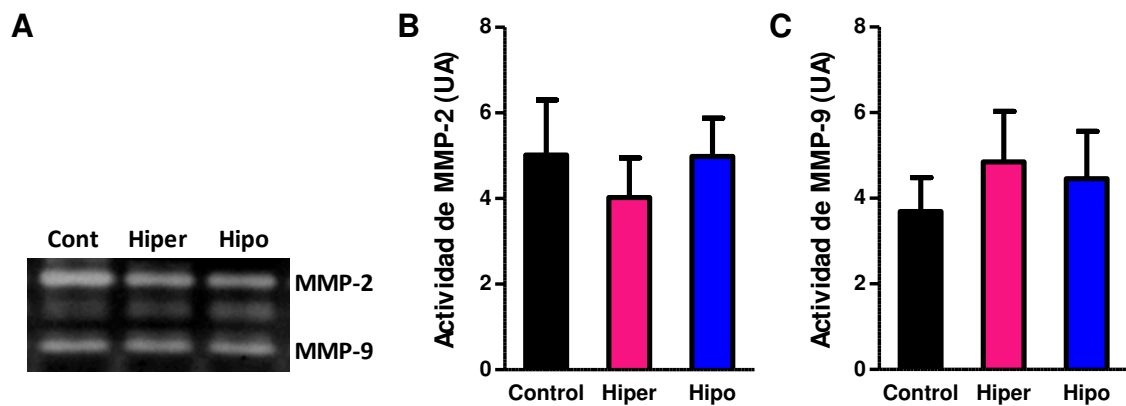
Figura 4.22: Modulación de la expresión de inhibidores de metaloproteasas de matriz por el estado tiroideo



Evaluación de los niveles de ARNm de los inhibidores tisulares de MMPs, Timp 1 (A), Timp 2 (B) y Timp 3 (C) por qRT-PCR en tumores de 10 días provenientes de animales eutiroideos (control), hipertiroideos (Hiper) o hipotiroideos (Hipo). Se grafican los resultados obtenidos por el análisis del $\Delta\Delta C_t$ de 3 ensayos independientes utilizando como gen normalizador la β_2 -microglobulina. *Difiere significativamente de los valores en animales eutiroideos con $p < 0,05$.

Se conoce que los niveles séricos de MMPs pueden estar alterados en diversas condiciones patológicas, entre las cuales se encuentran diversos tipos de cáncer y en general están relacionadas con un mal pronóstico (Nikkola y col, 2005). Por este motivo analizamos la actividad de las MMPs 2 y 9 en los sueros de ratones portadores de tumor. Tal como se observa en la **Figura 4.23**, no existe regulación en los niveles séricos de MMPs en ninguno de los grupos.

Figura 4.23: Modulación de la actividad de metaloproteasas séricas por el estado tiroideo



Zimografía en geles de poliacrilamida copolimerizados con gelatina de sueros de ratones control, hipotiroideos (Hipo) e hipertiroideos (Hiper) portadores de tumores EL-4, obtenidos a los diez días post-inoculación. Las bandas de degradación de la gelatina fueron reveladas mediante tinción con Coomassie Blue y los resultados mostrados son la media \pm ES de 4 determinaciones independientes.

Por lo tanto, los ratones hipertiroideos presentaron tumores con elevada expresión de metaloproteasas y mayor angiogénesis, lo cual en general está relacionado con un mayor crecimiento tumoral y mayor desarrollo de metástasis. Los tumores de ratones hipotiroideos, por el contrario, tienen una reducida vascularización y sólo muestran un aumento en los niveles de expresión de inhibidores de MMPs. Sin embargo, a pesar de estos resultados, el desarrollo de metástasis es menor en ratones hipertiroideos que en los hipotiroideos, señalando la participación de otros factores modulados por las HTs que regulan la diseminación tumoral.

4.4. El estado tiroideo modula la inmunidad antitumoral

Es conocido que el sistema inmune juega un rol crítico en la vigilancia contra el desarrollo de tumores. Por otra parte, en trabajos realizados en nuestro laboratorio se ha visto que el estado tiroideo es capaz de modular la actividad del sistema inmune (Klecha y col, 2000, 2005 y 2006).

En esta parte del trabajo estudiamos la respuesta inmune antitumoral en ratones control, hiper- e hipotiroideos, inoculados con células EL-4, para elucidar su participación en las diferencias observadas en el crecimiento y diseminación tumoral entre estos grupos.

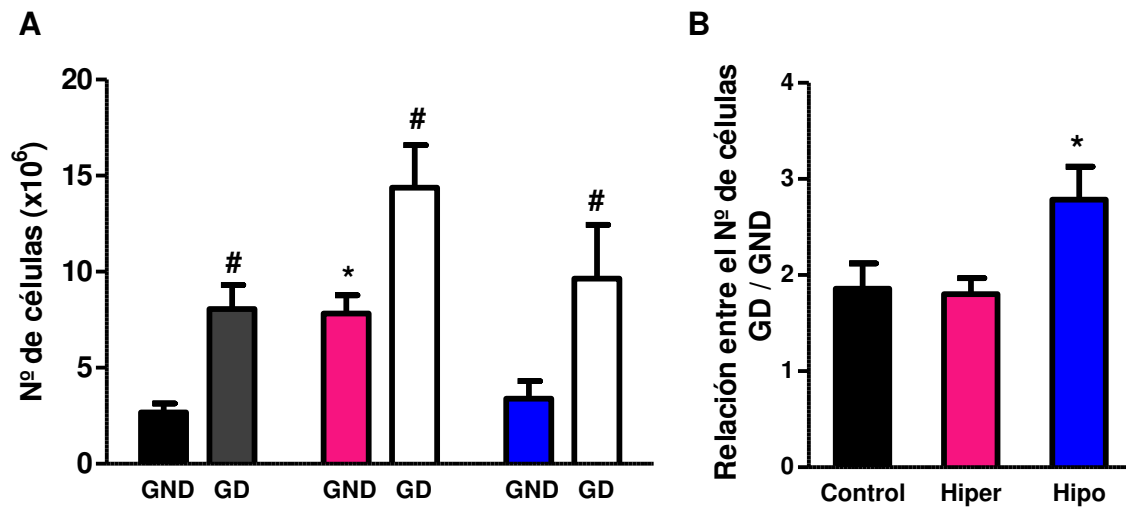
4.4.1. El estado tiroideo modula la respuesta inmune en el tumor primario

Frente a un estímulo tumoral, las células inmunes migran hacia el ganglio linfático más cercano, para luego actuar sobre la zona afectada. Como consecuencia de esto, en general los ganglios linfáticos drenantes aumentan de tamaño durante el establecimiento de un tumor.

4.4.1.1. Evaluación del efecto del estado tiroideo sobre los ganglios linfáticos

Por este motivo, en primer lugar y en animales con distinto estado tiroideo portadores de tumor, realizamos la extracción de los ganglios inguinales linfáticos tanto drenante (GD) como el contralateral, no drenante (GND) y se realizó un recuento de células. Todos los recuentos de animales hipertiroideos fueron significativamente mayores que los de los otros dos grupos (**Figura 4.24-A**), indicando que los altos niveles de hormonas tiroideas circulantes inducen un aumento del tamaño de los ganglios linfáticos en dichos animales. En los tres grupos estudiados observamos además un mayor número de células en el GD respecto del GND, siendo esta diferencia del doble en ratones controles e hipertiroideos y del triple en animales hipotiroideos (**Figura 4.24-B**). Este último dato podría estar relacionado con una mayor reactividad del sistema inmune local frente al tumor primario en ratones hipotiroideos.

Figura 4.24: Número de células en los ganglios de ratones eu-, hiper- o hipotiroideos portadores de tumores de 10 días.



Se determinó el número total de células mononucleares en ganglios de ratones control, hipertiroideos (Hiper) o hipotiroideos (Hipo) mediante la tinción con el colorante de exclusión Azul Tripán y recuento en cámara de Neubauer. **Panel A:** Número de células en el ganglio inguinal drenante (GD) del tumor y en el ganglio inguinal no drenante (GND) de ratones de los tres grupos experimentales. **Panel B:** Relación entre el número de células del ganglio drenante y el no drenante de cada ratón. * Difieren del grupo control con $p < 0,05$ y # difiere del correspondiente ganglio no drenante con $p < 0,05$.

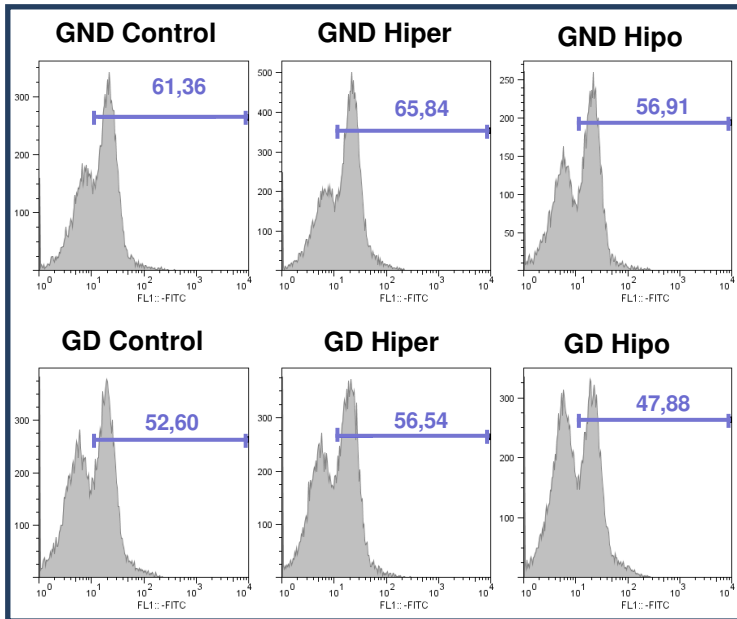
4.4.1.1.1. Modulación de la distribución de subpoblaciones linfocitarias en ganglios drenante y no drenante por el estado tiroideo

La composición y características del microambiente tumoral varían ampliamente y son importantes en determinar la respuesta inmune antitumoral. Por ejemplo, algunas células del sistema inmune, incluyendo células NK y linfocitos T efectores, son capaces de generar potentes respuestas antitumorales. Sin embargo, las células tumorales frecuentemente inducen microambientes inmunosupresores que favorecen el desarrollo de poblaciones inmunosupresoras de células inmunes, como las células supresoras de origen mieloide (MDSC) y las células T regulatorias. El resultado de la regulación de los componentes del sistema inmune es un factor fundamental en la progresión tumoral.

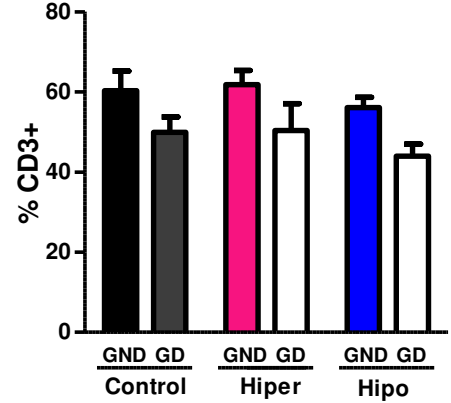
Se analizó la distribución de las subpoblaciones linfocitarias en GD y GND de ratones eu-, hiper- e hipotiroideos mediante la marcación de las suspensiones celulares obtenidas con anticuerpos específicos y posterior análisis por citometría de flujo.

Figura 4.25: Distribución de subpoblaciones linfocitarias en ganglios de ratones control, hiper- e hipotiroideos portadores de tumor

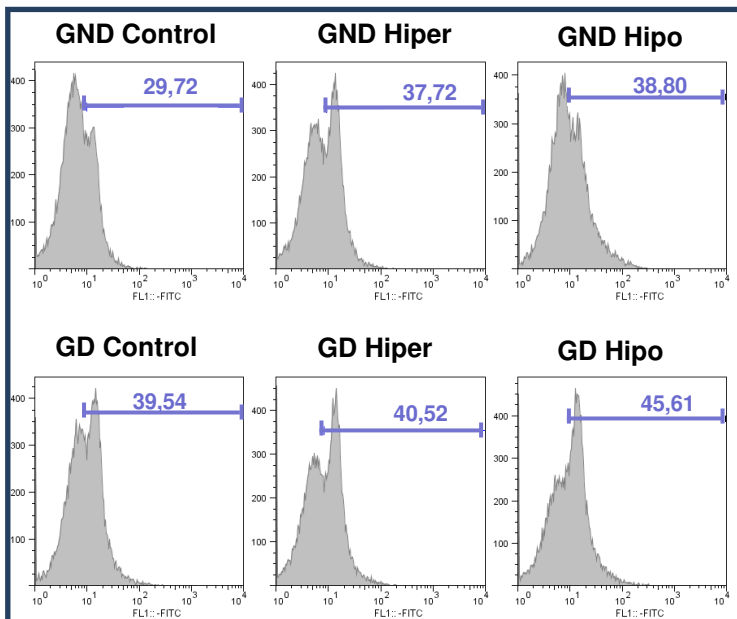
A



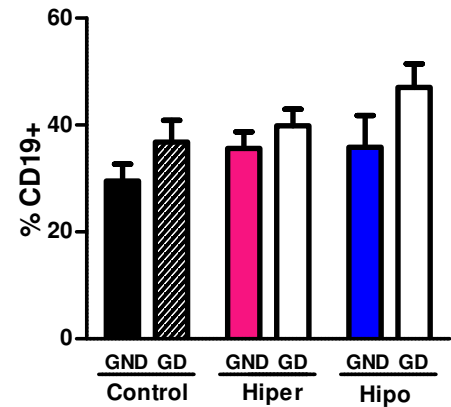
B



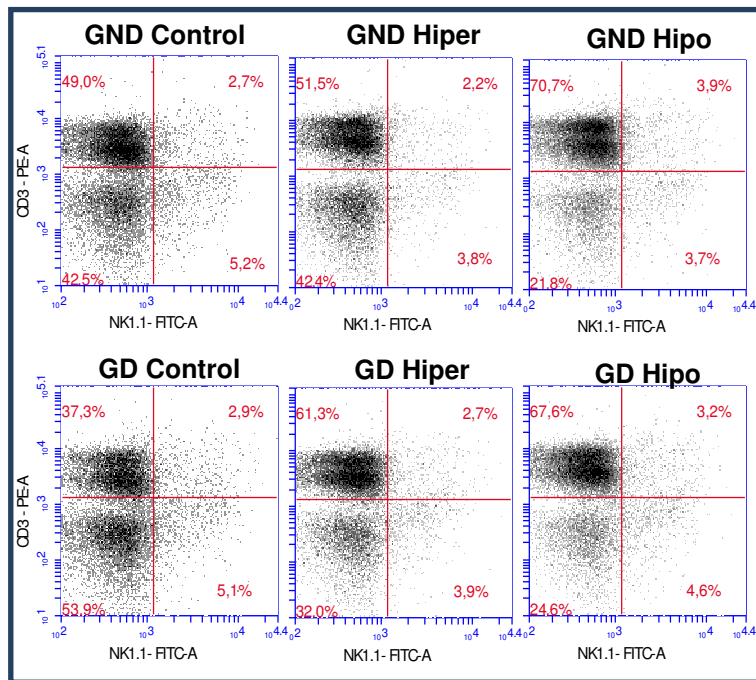
C



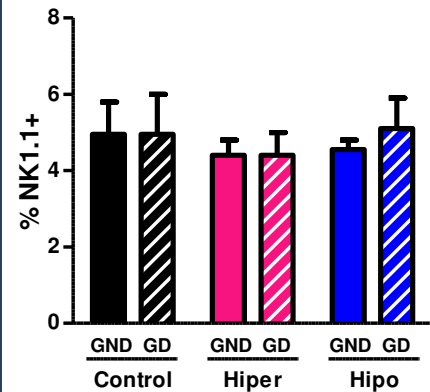
D



E



F



Se obtuvieron los ganglios inguinales drenante (GD) y no drenante (GND) de ratones controles, hipertiroideos (Hiper) e hipotiroideos (Hipo) portadores de tumores de 10 días. Las suspensiones celulares obtenidas fueron marcadas con anticuerpos específicos unidos a fluorocromos para su posterior análisis por citometría de flujo. Se muestran histogramas representativos de las células de GD y GND de cada grupo marcados con CD3-FITC (A), CD19-FITC (C) y NK1.1-FITC (E). En los gráficos de barras se muestra la media \pm ES (n=4) de los porcentajes de células correspondientes a cada subpoblación: CD3⁺ (B), CD19⁺ (D) y NK1.1⁺ (F).

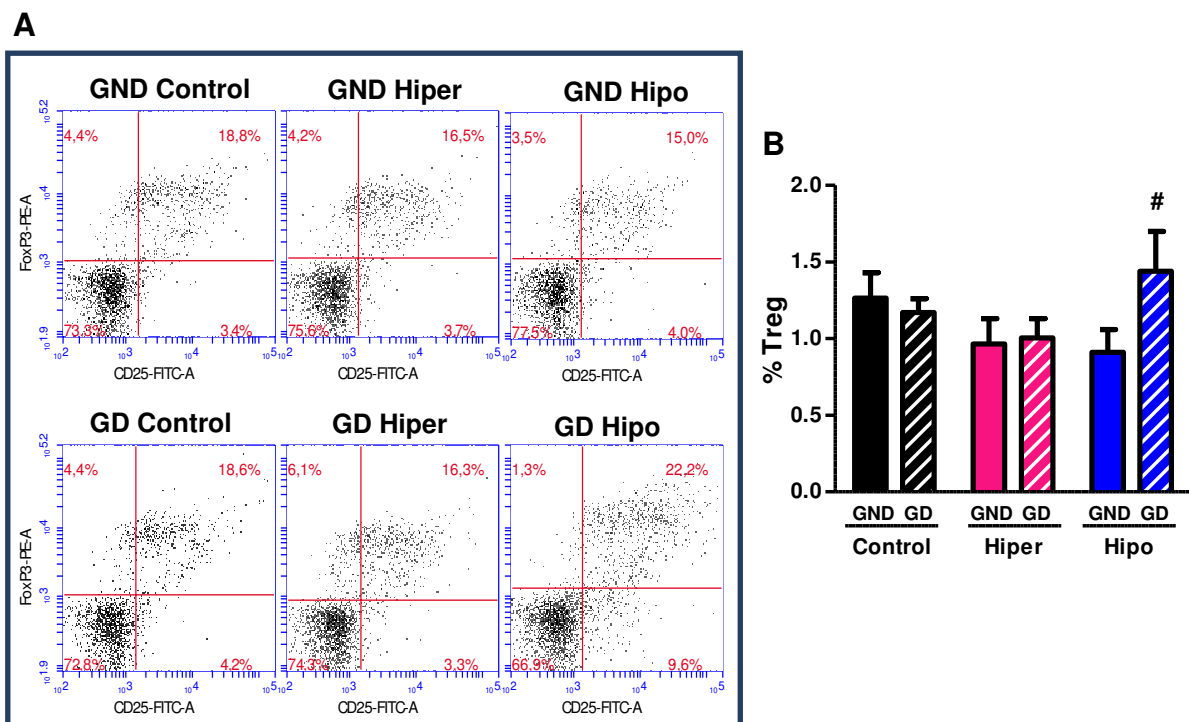
En todos los grupos el porcentaje de linfocitos T (CD3⁺) se vio disminuido en GD respecto al GND, a expensas de un aumento en los porcentajes de linfocitos B (CD19⁺) (Figura 4.25), lo que podría deberse a una migración de las células T hacia el tumor para ejercer su actividad citotóxica. Sin embargo, los porcentajes de células CD4⁺ y CD8⁺, y por ende la relación CD4⁺/CD8⁺ tanto en GND como en GD fue similar para todos los grupos (Figura 4.25-B y D).

Por otra parte, el número de células NK en ganglios fue muy bajo y no se observaron diferencias en la distribución de las mismas entre los grupos en estudio (Figura 4.25-F).

4.4.1.1.2. Modulación de la distribución de células inmunosupresoras en ganglios por el estado tiroideo

En cuanto a las poblaciones de células inmunosupresoras, no se detectó en ganglio la presencia de células MDSC pero sí de Tregs. Los porcentajes de Tregs fueron similares en GD y GND de ratones control e hipertiroideos pero los ratones hipotiroideos mostraron un incrementado porcentaje de Tregs en el GD (**Figura 4.26**).

Figura 4.26: Porcentaje de Tregs en ganglios de ratones control, hiper- e hipotiroideos portadores de tumor

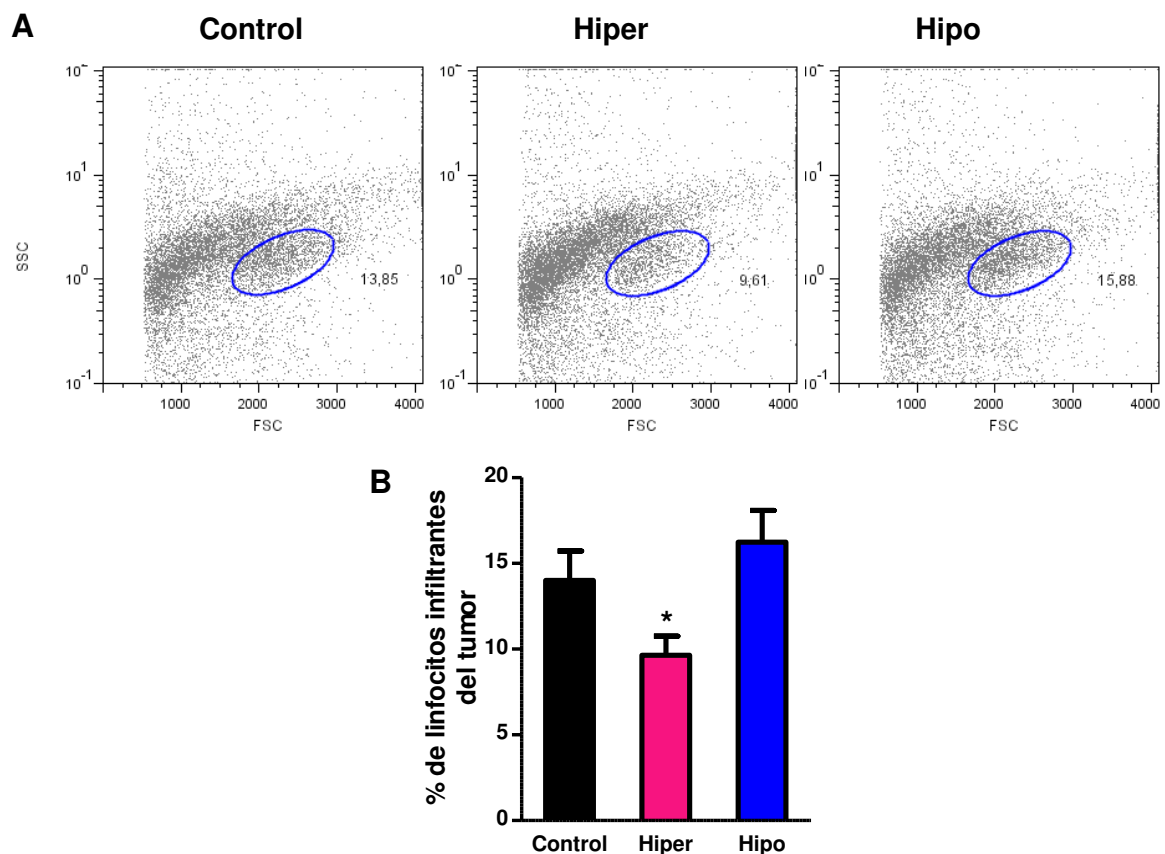


Se obtuvieron los ganglios inguinales drenante (GD) y no drenante (GND) de ratones controles, hipertiroideos (Hiper) e hipotiroideos (Hipo) portadores de tumores de 10 días. Las suspensiones celulares obtenidas fueron marcadas con anticuerpos específicos: CD4-APC, CD25-FITC y FoxP3-PE para detectar células T regulatorias (Tregs) por citometría de flujo. En el **panel A** se muestran los dot plots representativos de los GD y GND para cada grupo, correspondientes a CD25-FITC vs. FoxP3-PE de las células CD4⁺. Los gráficos de barras del **panel B** corresponden al valor medio \pm ES del porcentaje de células CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ de los GD y GND de cada grupo experimental (n=3). [#] Difiere significativamente del ganglio no drenante (GND) con p<0,05.

4.4.1.2. Evaluación del efecto del estado tiroideo sobre el infiltrado tumoral

La respuesta inmune en el microambiente tumoral es uno de los factores cruciales en la progresión de enfermedades neoplásicas. En general, una mayor infiltración de células inmunes correlaciona con un mejor pronóstico (Loi, 2013; Whiteside, 2013). Por este motivo analizamos la presencia de subpoblaciones positivas para CD4, CD8 y CD19 en el infiltrado linfocitario tumoral (TIL) de ratones control, hiper- e hipotiroideos. Cabe recordar que las células de origen T, EL-4, no expresan CD4 ni CD8, por lo que esta marcación nos permitió evaluar solo los TIL sin marcación de las células tumorales. Para ello, los tumores fueron disgregados mecánicamente, marcados con anticuerpos específicos para cada una de las subpoblaciones linfocitarias y analizados por citometría de flujo.

Figura 4.27: Modulación del infiltrado tumoral por el estado tiroideo



Se extrajeron los tumores de 10 días de ratones control, hipertiroideos (Hiper) e hipotiroideos (Hipo) y se prepararon suspensiones celulares que fueron analizadas por citometría de flujo. **Panel A:** Dot plot correspondiente al “forward scatter” vs “side scatter” representativo de cada grupo. El “gate” mostrado (círculo azul) corresponde a las células que conforman el infiltrado linfocitario del tumor. **Panel B:** Media \pm ES del porcentaje de células infiltrantes en 4 animales por grupo. * Difiere del grupo control con $p < 0,05$.

El análisis por citometría de flujo del “forward scatter” vs. “side scatter” mostró una población minoritaria de células que se diferenciaron del resto por su tamaño y granularidad, formando una nube separada (óvalo azul en la **Figura 4.27–A**) que fue la que tuvo marca positiva para los tres anticuerpos.

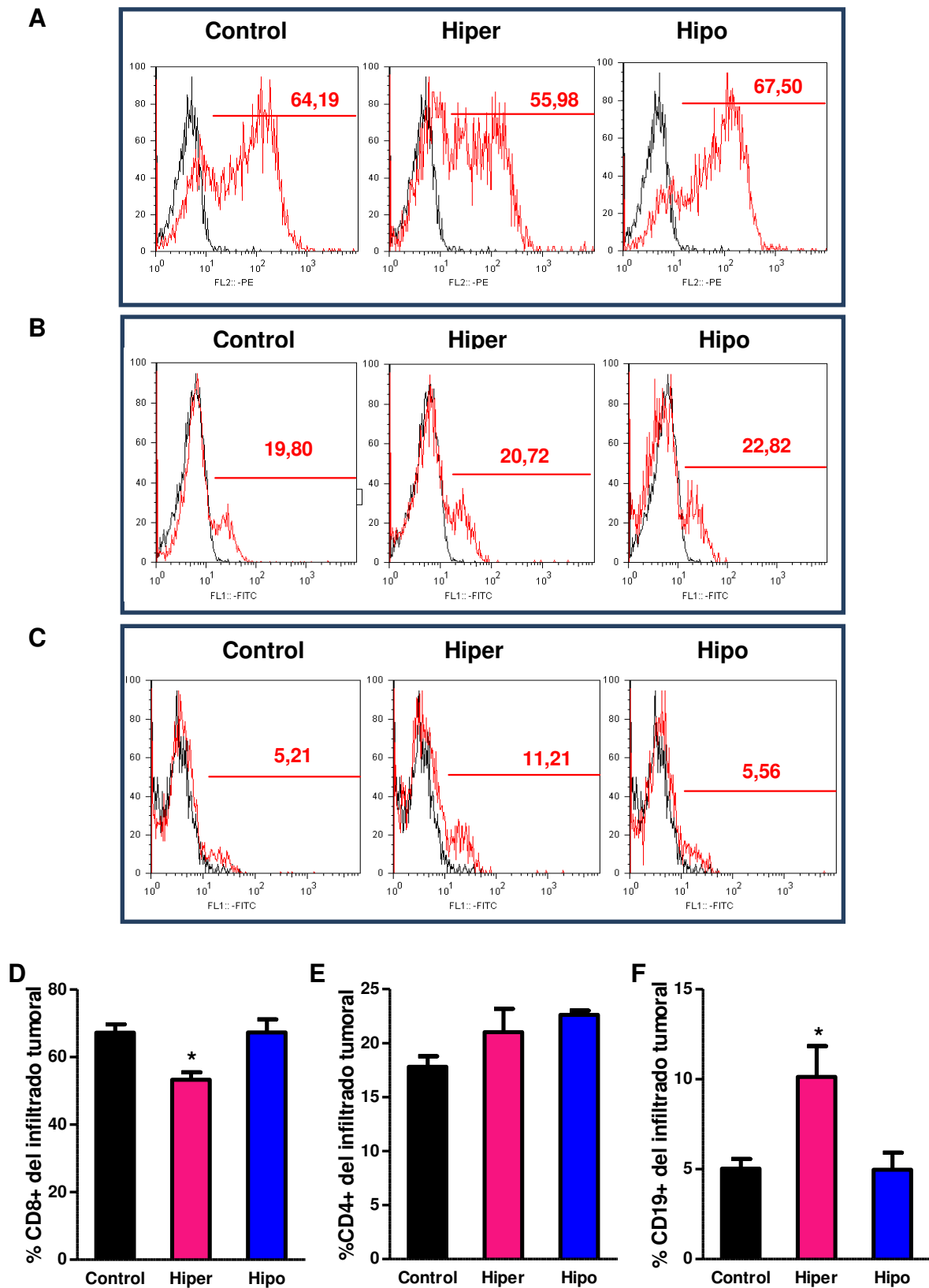
Como puede observarse en la **Figura 4.27**, el porcentaje de células infiltrantes fue menor en tumores de ratones hipertiroideos respecto a los tumores de los otros dos grupos experimentales.

4.4.1.2.1. Modulación de la distribución de subpoblaciones linfocitarias en el infiltrado tumoral por el estado tiroideo

El análisis de la composición de subpoblaciones linfocitarias en el TIL sólo mostró diferencias en los animales hipertiroideos, que presentaron un menor porcentaje de células CD8⁺ respecto a los otros dos grupos, sin modificaciones en la proporción de células T helper (CD4⁺) (**Figura 4.28**). También se observó en tumores de ratones hipertiroideos un incremento en el porcentaje de linfocitos B (CD19⁺) (**Figura 4.28**).

Por otra parte, al realizar marcaciones para evaluar la presencia de células inmunosupresoras, no se detectaron MDSC ni Tregs en el infiltrado tumoral de estos ratones.

Figura 4.28: Distribución de subpoblaciones linfocitarias en el infiltrado tumoral de ratones con diferente estado tiroideo



A partir de tumores de 10 días de ratones control, hipertiroideos (Hiper) e hipotiroideos (Hipo) se prepararon suspensiones celulares, que fueron marcadas con anticuerpos específicos unidos a fluorocromos y posteriormente analizadas por citometría de flujo. En los **paneles A, B y C** se muestran en color rojo los histogramas representativos para cada grupo experimental de las células marcadas con CD8-PE (**A**), CD4-FITC (**C**) y CD19-FITC (**E**). Los histogramas de color negro corresponden al control de isotipo. Los gráficos de barras de los **paneles B, D y F** corresponden a la media \pm ES de cada grupo experimental (n=4) de los porcentajes de células positivas (respecto del total de células) para cada subpoblación: CD8⁺ (**D**), CD4⁺ (**E**) y CD19⁺ (**F**). *Difiere significativamente del grupo control con $p < 0,05$.

Todos estos resultados indican que el estado tiroideo es capaz de modular la respuesta inmune antitumoral en la zona del tumor primario. A pesar de no observarse diferencias a nivel del ganglio drenante, los ratones hipertiroideos presentaron tumores con un menor infiltrado linfocitario. Este infiltrado, a su vez contiene una menor proporción de células T citotóxicas y una proporción mayor de linfocitos B respecto a los otros dos grupos. Estos datos, en conjunto, señalarían una reducida actividad antitumoral en la zona del tumor primario en ratones con elevados niveles de hormonas tiroideas que podría estar relacionada con el mayor crecimiento tumoral.

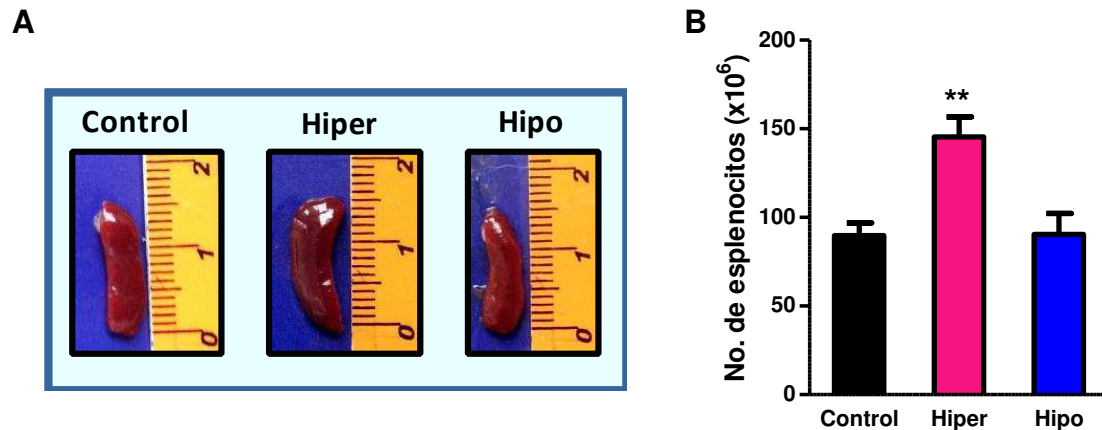
4.4.2. El estado tiroideo modula el sistema inmune a nivel sistémico

La diseminación celular y la formación de metástasis también están reguladas entre otros factores, por la actividad del sistema inmune a nivel sistémico. Cuando una célula tumoral ingresa al torrente sanguíneo y pretende colonizar otros tejidos, son las células inmunes en circulación las que actúan para impedirlo.

Por este motivo, evaluamos si el estado tiroideo es capaz de alterar la distribución y funcionalidad de las células inmunes del bazo en respuesta al desafío tumoral.

A simple vista, al extraer los bazos de los ratones, pudimos observar que los animales hipertiroideos tienen bazos de mayor tamaño (**Figura 4.29-A**). El recuento de esplenocitos fue acorde a esta observación ya que, al igual que los ganglios linfáticos, los ratones hipertiroideos presentaron una mayor cantidad de células en bazo. De hecho, el número de esplenocitos en ratones hipertiroideos portadores de tumor fue aproximadamente un 50% mayor con respecto a los valores hallados en los otros dos grupos experimentales (**Figura 4.29-B**).

Figura 4.29: Número de esplenocitos en los bazos de ratones eu-, hiper- o hipotiroideos portadores de tumores de 10 días.

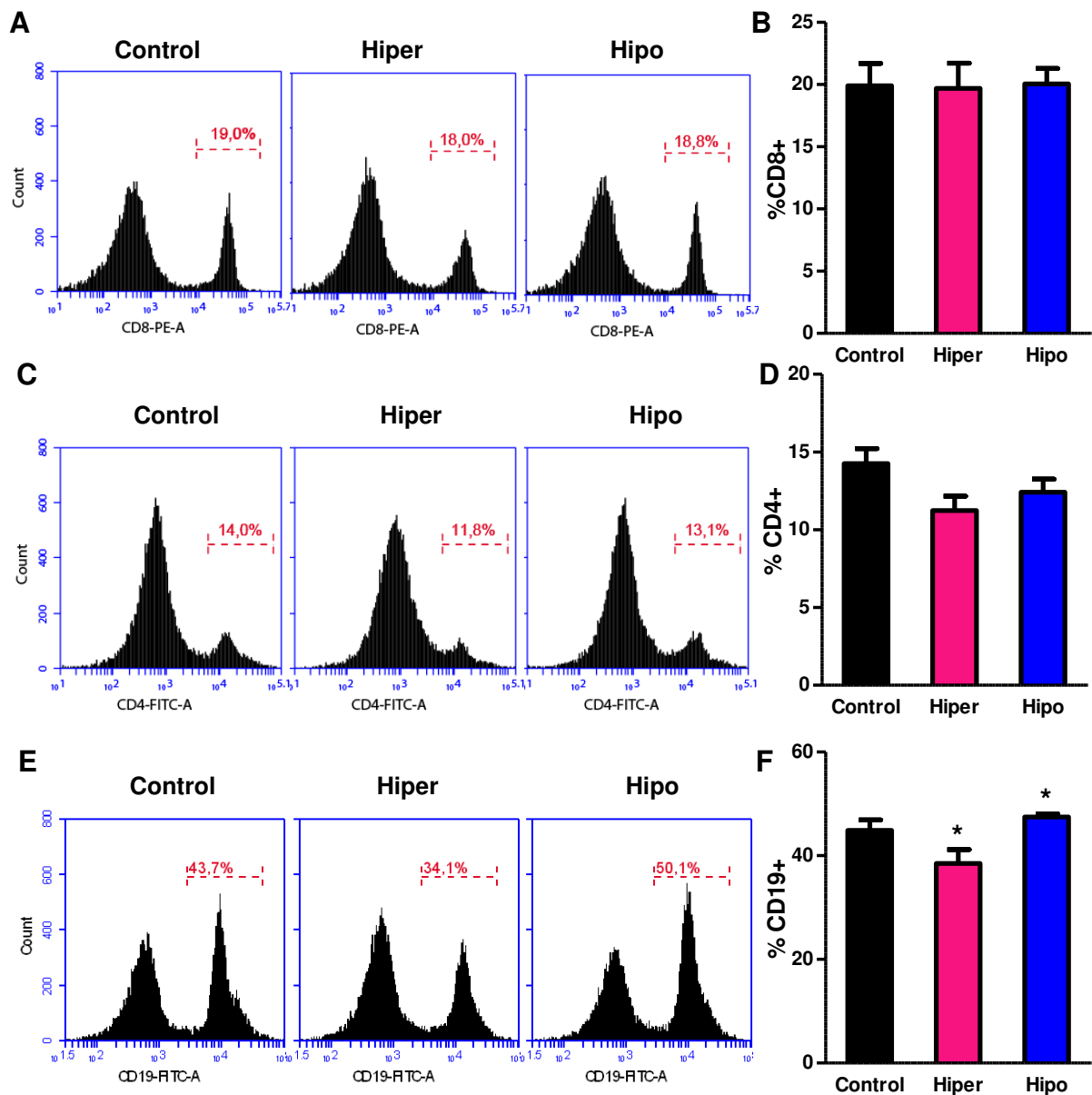


Se obtuvieron los bazos de ratones control, hiper- (Hiper) o hipotiroideos (Hipo) 10 días después de ser inoculados con células EL-4 y se determinó el número total de esplenocitos mediante la tinción de las células con el colorante de exclusión Azul Tripán y recuento en cámara de Neubauer. **Panel A:** Fotografías representativas de los bazos obtenidos en cada grupo experimental. La escala mostrada se encuentra en centímetros. **Panel B:** Se grafica el número de esplenocitos de cada grupo experimental como la media \pm ES de 8 ratones por grupo. ** Difieren del grupo control con $p < 0,01$.

4.4.2.1. Modulación de la distribución de subpoblaciones linfocitarias en bazo por el estado tiroideo

Al analizar la distribución de subpoblaciones linfocitarias en los bazos de ratones portadores de tumores de 10 días por citometría de flujo, no encontramos diferencias en cuanto a la distribución de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ (**Figura 4.30-A y C**), ni en la relación entre ellos, que fue aproximadamente igual a 1. Pero sí encontramos diferencias en la proporción de linfocitos B (CD19⁺), que se vio reducida en ratones hipertiroideos pero aumentada en ratones hipotiroideos (**Figura 4.30 E**).

Figura 4.30: Modulación de la distribución de subpoblaciones linfocitarias en bazos de ratones portadores de tumor por el estado tiroideo

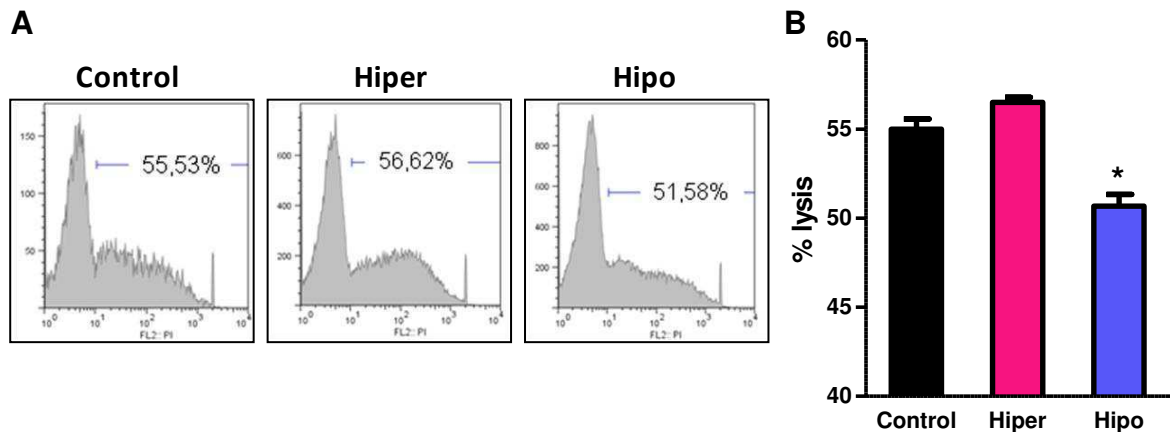


A partir de bazos de ratones control, hiper- (Hiper) e hipotiroideos (Hipo), portadores de tumores de 10 días se prepararon suspensiones celulares que fueron marcadas con anticuerpos específicos unidos a fluorocromos y posteriormente analizados por citometría de flujo. Se muestran histogramas representativos para cada grupo experimental de los esplenocitos marcados con CD8-PE (A), CD4-FITC (C) y CD19-FITC (E). Los gráficos de barras indican el porcentaje de células positivas para cada subpoblación: CD8⁺ (B), CD4⁺ (D) y CD19⁺ (F). Se grafica la media \pm ES de cada grupo experimental (n=4). * Difiere significativamente del grupo control con $p < 0,05$.

Analizamos también la actividad citotóxica específica contra las células EL-4 mediada por células T CD8⁺ en animales con distinto estado tiroideo, mediante la marcación con CFSE de células EL-4 enfrentadas a células citotóxicas. Estas

últimas fueron amplificadas previamente por cultivo *in vitro* de esplenocitos con células tumorales irradiadas. La citotoxicidad se evaluó por citometría de flujo y se determinó el % de lisis tal como se indicó en Materiales y Métodos.

Figura 4.31: El estado tiroideo modula la actividad citotóxica de células CD8⁺



Se obtuvieron los esplenocitos de ratones eutiroides (Control), hipertiroideos (Hiper) e hipotiroideos (Hipo) portadores de tumores de 10 días. Para evaluar la actividad citotóxica específica las células fueron estimuladas *in vitro* con células EL-4 irradiadas durante 5 días y luego incubadas durante 4 horas con células EL-4 marcadas con CFSE. Finalmente, fueron marcadas con Ioduro de Propidio (IP) y analizadas por citometría de flujo. Se consideró positivas para la lisis a aquellas células que presentaban doble marca. **Panel A:** Histogramas representativos de cada grupo correspondientes a la marcación con IP, para el gate de células CFSE positivas. **Panel B:** Gráfico de barras de la media \pm ES de 4 animales por grupo. * Difiere significativamente del grupo control con $p < 0,05$.

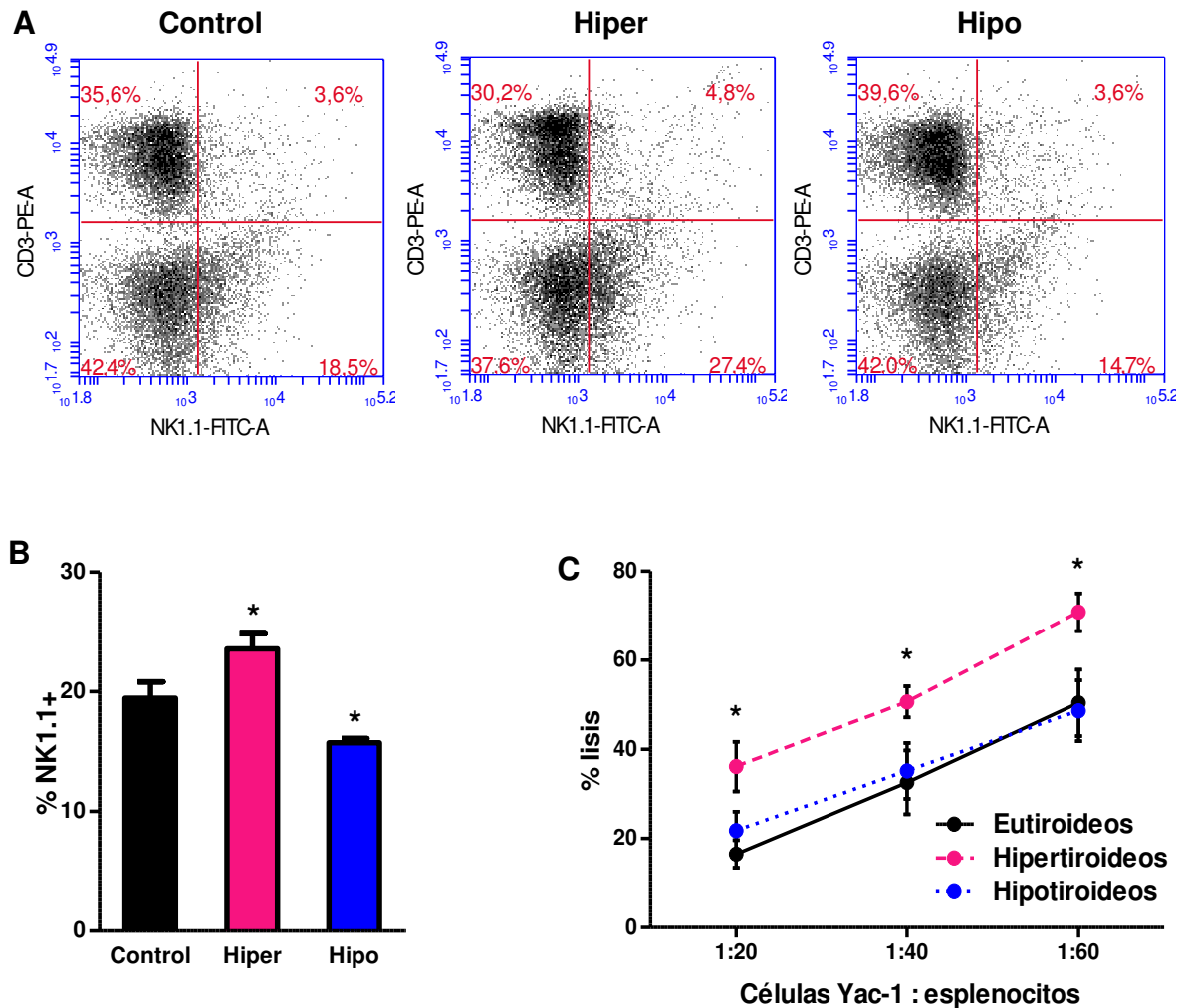
A pesar de no verse modificada la proporción de linfocitos CD8⁺ en los ratones hipotiroideos, estos mostraron una menor actividad citotóxica específica contra células EL-4 en comparación con los otros dos grupos experimentales (**Figura 4.31**). Por ello, se puede concluir que existen factores modulados por hormonas tiroideas que regularían la actividad antitumoral de los linfocitos T CD8⁺ en estos animales.

4.4.2.2. Modulación de células NK en bazo por el estado tiroideo

Como componente importante de la inmunidad innata, también analizamos el número y actividad de células NK en bazos de ratones portadores de tumor. El análisis realizado por citometría de flujo, mediante la marcación de los

esplenocitos con el anticuerpo NK1.1, indicó que el porcentaje de células NK en ratones hipertiroideos es mayor al grupo control y que este porcentaje se encuentra disminuido en ratones hipotiroideos (**Figura 4.32 A y B**).

Figura 4.32: El estado tiroideo modula el número y la actividad de células NK



Se obtuvieron suspensiones celulares de bazo de ratones eu- (Control), hiper- (Hiper) e hipotiroideos (Hipo) portadores de tumores de 10 días. **Panel A:** Las células fueron marcadas con el anticuerpo específico para células NK, el NK1.1-FITC y analizadas por citometría de flujo. Se muestran los histogramas representativos para cada grupo experimental. **Panel B:** Se muestra el gráfico de barras correspondiente a la media \pm ES del porcentaje de células NK1.1⁺ de 4 ensayos independientes. **Panel C:** Se realizó el ensayo de citotoxicidad por liberación de [³H]-Timidina, como se indica en Materiales y Métodos. Los valores expresan la media \pm ES del porcentaje de lisis para diferentes relaciones de célula blanco:efectora, luego de ser cultivadas durante 3,5 horas. * Difieren significativamente del grupo control con $p < 0,05$.

Para analizar la actividad lítica de estas células realizamos un ensayo de citotoxicidad empleando como blanco células YAC-1, previamente marcadas con [³H]-Timidina, que fueron enfrentadas con diferentes cantidades de esplenocitos provenientes de ratones con distinto estado tiroideo y portadores de tumor, tal como se describe en materiales y métodos.

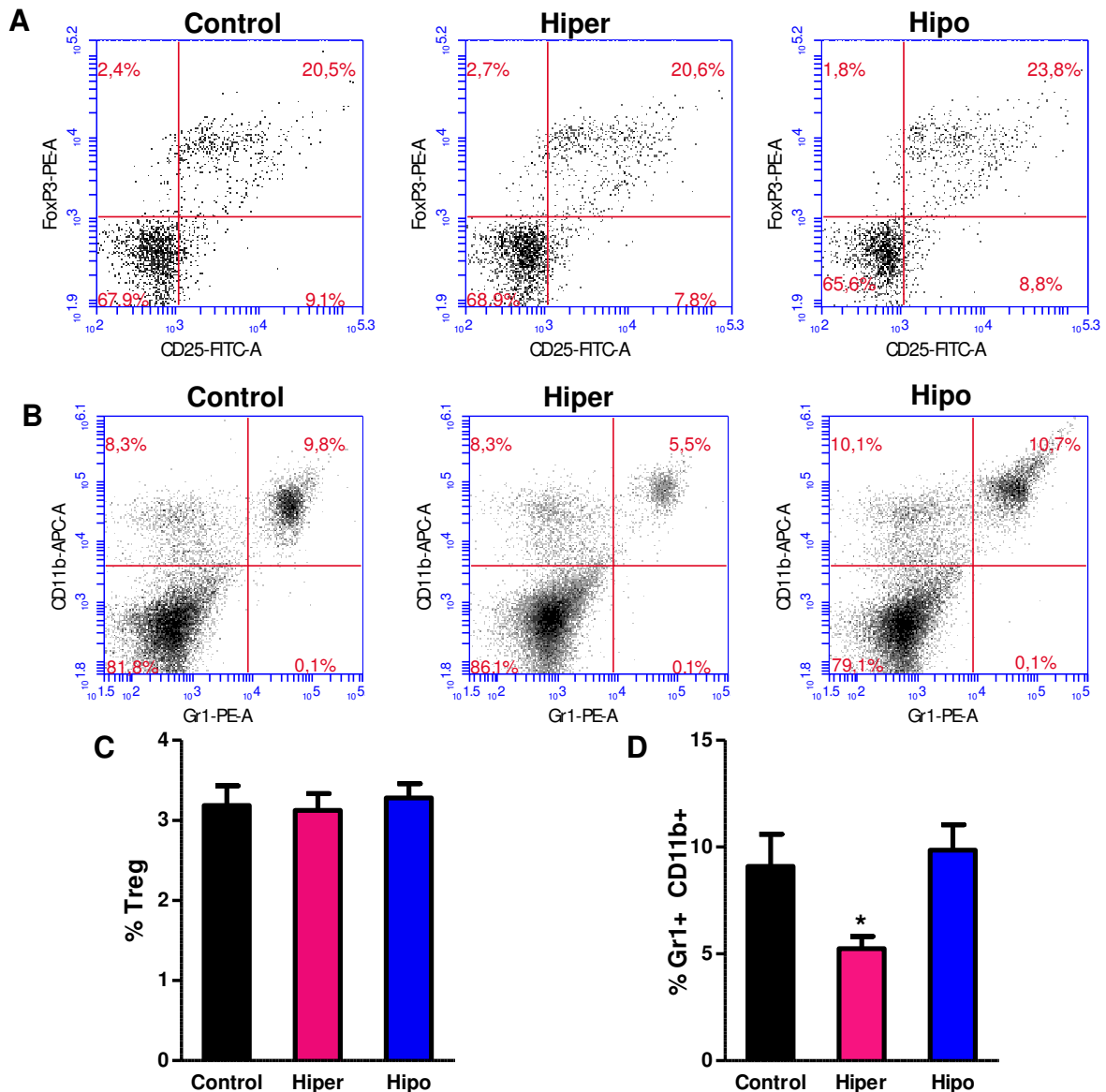
En la **Figura 4.32-C** se pueden observar los resultados obtenidos que muestran un aumento en la actividad citotóxica de células NK provenientes de bazo de ratones hipertiroideos en comparación con células provenientes de bazo de los otros dos grupos en estudio (**Figura 4.32-C**).

4.4.2.3. Modulación de la distribución de poblaciones inmunosupresoras en bazo por el estado tiroideo

Las células supresoras de origen mieloide (MDSC) ejercen una actividad inmunosupresora en el microambiente tumoral por inhibir la producción de IFN- γ por linfocitos T CD8⁺ (Khaled y col, 2013). Comprobamos que el estado tiroideo es capaz de modular los niveles de MDSC en bazo, ya que se observó un porcentaje disminuido de estas células en animales hipertiroideos en comparación con los otros dos grupos (**Figura 4.33**).

Las células T regulatorias (Tregs) también se encuentran involucradas en la inmunidad antitumoral, ya que promueven el crecimiento tumoral mediante la disminución de la respuesta antitumoral a través múltiples mecanismos. Sin embargo, la distribución de estas células no se vio modulada por el estado tiroideo en los animales a los 10 días p.i. de células EL-4 (**Figura 4.33**).

Figura 4.33: Distribución de subpoblaciones inmunosupresoras en bazos de ratones portadores de tumor



Se obtuvieron suspensiones celulares de bazos de ratones eu- (Control), hiper- (Hiper) e hipotiroideos (Hipo) portadores de tumores de 10 días que fueron marcadas con anticuerpos específicos fluorescentes y posteriormente analizadas por citometría de flujo. En los **paneles A y B** se muestran gráficos representativos para cada grupo experimental: **(A)** Dot plots de CD25-FITC vs. FoxP3-PE para el gate de células CD4-APC⁺; **(B)** Gr1-PE vs. CD11b-APC. Los gráficos de barras corresponden a la determinación de los porcentajes de células positivas para cada subpoblación: **(C)** Células T regulatorias (Tregs), CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ y **(D)** células supresoras tumorales de origen mieloide (MDSC), Gr1⁺ CD11b⁺. Se grafica la media ± ES para cada grupo experimental (n=4). * Difiere significativamente del grupo control con p<0,05.

Estos resultados muestran que el estado tiroideo es capaz de regular la actividad antitumoral también a nivel sistémico, como demuestra el análisis de los bazos de ratones portadores de tumor. Los ratones hipertiroideos presentan bazos más

grandes y, por lo tanto, mayor cantidad de células disponibles para reaccionar frente a un antígeno tumoral. A su vez, los bazo de estos ratones presentan un aumentado número y actividad citotóxica de células NK, una menor proporción de linfocitos B y MDSC, lo cual es indicador de una mayor respuesta antitumoral a nivel sistémico, que podría explicar la menor generación de metástasis en este grupo experimental. Por otra parte, los bazo de ratones hipotiroideos tienen una reducida actividad citotóxica de células CD8+ y un menor número de células NK que junto con una aumentada cantidad de células B, podría explicar por qué en ratones hipotiroideos hay un mayor desarrollo metastásico.

Todos estos resultados demuestran que la respuesta inmune antitumoral se encuentra modulada por el estado tiroideo. Esto puede ser crítico para el desarrollo y la evolución de neoplasias y podría ser de importancia en la terapéutica de la patología tumoral.

5. Discusión

Una compleja relación entre el tumor y el sistema inmune y endócrino del huésped participa de la regulación del desarrollo y del crecimiento tumoral. Mediante la producción de citoquinas y hormonas, derivadas tanto del huésped como del tumor, se orquesta la evolución y diseminación de la patología (Reiche y col, 2004; Hammacher y col, 2005). Los linfomas de células T no son una excepción, dado que las citoquinas derivadas de las células de dichos linfomas son capaces de modular la respuesta inmune antitumoral, favoreciendo la progresión tumoral (Shu y col, 2010). Las células tumorales también se encuentran expuestas a un complejo microambiente parácrino y endócrino, compuesto por una variedad de factores de crecimiento, citoquinas y hormonas elaboradas por células vecinas o distales (Singh y Singh, 2009). Recientemente encontramos en nuestro laboratorio que entre esos factores se encuentran las hormonas tiroideas (Barreiro Arcos y col, 2011 y 2013).

En este trabajo de tesis evaluamos los mecanismos involucrados en la regulación del crecimiento y diseminación de un linfoma T inducidos por el estado tiroideo. Los resultados obtenidos *in vitro* indican que las HTs pueden regular directamente el crecimiento tumoral mediante un efecto dual, donde a tiempos cortos de cultivo las HTs median el incremento de la proliferación celular, pero el tratamiento prolongado con las hormonas lleva a la muerte celular por apoptosis. Asimismo, los estudios realizados *in vivo* en ratones controles, hiper- e hipotiroideos también muestran un efecto dual del estado tiroideo sobre el desarrollo tumoral. El hipertiroidismo induce un aumento en la velocidad de crecimiento tumoral mediado por la regulación positiva del ciclo celular y de la proliferación, del aumento en la expresión de metaloproteasas y angiogénesis tumoral y una reducción del infiltrado de células inmunes en el tumor. Por otra parte, los ratones hipotiroideos presentan una mayor diseminación tumoral, debida principalmente a la reducción de la actividad antitumoral a nivel sistémico y posiblemente a la regulación del balance entre proliferación y apoptosis, que evita la muerte de las células tumorales en circulación.

El primer trabajo que relaciona a las hormonas tiroideas con el desarrollo tumoral fue publicado por Beatson en 1896, quién utilizó extractos de la glándula tiroides como complemento para el tratamiento de un carcinoma mamario. En los años

sucesivos se ha puesto mucho esfuerzo experimental, clínico y epidemiológico para poder definir y clarificar esta relación (Hercbergs y col, 2010). Sin embargo, los resultados obtenidos aun son controversiales.

Hace más de 30 años, Guernsey y col (1980) encontraron que la remoción de T3 y T4 del suero suprimía la transformación neoplásica inducida por rayos X en líneas celulares en cultivo, sin modificar la supervivencia celular. Más aún, la adición de T3 al medio depletado de hormonas restablecía la frecuencia de transformación esperada. Borek y col (1983) también encontraron que la T3 facilitaba la carcinogénesis química. Goodman y col (1980) utilizaron PTU para inducir el hipotiroidismo en ratas, lo que redujo el riesgo de cáncer de mama luego de la exposición a 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA). El reemplazo hormonal llevó a un incremento de un 78% en la incidencia de cáncer de mama. Estos estudios no fueron tenidos en cuenta durante un largo tiempo debido al tradicional concepto de la acción genómica de las HTs sobre la transcripción de genes relacionados con la homeostasis de las células normales. Por este motivo, durante muchos años no se realizaron estudios clínicos que relacionaran la hipo- o hiperfunción tiroidea con el riesgo de desarrollar cáncer (Hercbergs y col, 2010).

Recientemente se ha descrito un receptor para hormonas tiroideas ubicado en la membrana plasmática, que contribuiría a la proliferación celular, la integrina $\alpha_v\beta_3$. Estudios realizados en líneas humanas de cáncer de mama (Tang y col, 2004), de tiroides papilar y folicular (Lin y col, 2006), de glioma U-87 MG (Lin y col, 2009) y de cáncer de pulmón (Meng y col, 2011), demostraron que el tratamiento con concentraciones fisiológicas de T3 y T4 lleva a la activación de ERK1/2 y posteriormente induce la proliferación celular, evidenciada por una acumulación de PCNA. Estos efectos se vieron bloqueados por el tratamiento de las células con RGD, un péptido que impide la unión de las HTs a la integrina $\alpha_v\beta_3$. Sin embargo, los efectos de las hormonas tiroideas sobre el desarrollo de linfomas no han sido estudiados.

5.1. Efectos directos de las HTs sobre el crecimiento del linfoma T EL-4

Los linfomas de células T son un grupo heterogéneo de desórdenes clínicos linfoproliferativos agresivos de considerable variación clínica, morfológica, inmunofenotípica y genética. Incluyen aproximadamente el 10-15% del total de las neoplasias linfoides (de Leval y Gaulard, 2011) y tienen una incidencia anual aproximada de 1,77 casos por cada 100.000 habitantes (Dearden y col, 2011). Estos linfomas resultan de la proliferación clonal de linfocitos T. Usualmente afectan a adultos y son más frecuentes en hombres que en mujeres. La gran mayoría de los pacientes con linfomas T tiene mal pronóstico, debido a la combinación de un curso clínico agresivo y a la falta de tratamientos específicos (Foss y col, 2011).

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio demuestran que el tratamiento *in vitro* del linfoma T murino BW5147 (BW, H-2^k) con HTs induce un aumento en la proliferación celular, que es mediado tanto por efectos genómicos como no genómicos de estas hormonas (Barreiro Arcos y col, 2006 y 2011). Sin embargo, el intento de conseguir un modelo tumoral con esta línea de linfoma en ratones singeneicos AKR (cepa murina donde se originó la línea) o C3H, ambas cepas de haplotipo H-2^k, fracasó ya que no pudimos obtener tumores sólidos. Por ende, decidimos trabajar con la línea de linfoma T murino EL-4, con la que fue factible generar tumores sólidos en ratones C57Bl/6J, y al igual que la línea celular BW, fue originada a partir de un linfoma de células T inmaduras o timoma. (Basile y col, 2008).

Cuando confirmamos *in vitro* las acciones de las HTs en las células EL-4, encontramos que el tratamiento de las mismas con concentraciones fisiológicas de T4 también llevó al aumento en la proliferación celular, evidenciada por incremento en los niveles de expresión de PCNA a partir de las 12 horas de cultivo. Estos resultados refuerzan las observaciones anteriores y demuestran que las HTs tienen un rol importante en el desarrollo de los linfomas, a través de la modulación de mecanismos que controlan el crecimiento y división celular.

El mecanismo más importante en la regulación del crecimiento celular es el control del ciclo celular, que se ha visto modulado por HTs en otros tipos celulares. En células GC de hipófisis de rata, por ejemplo, el tratamiento con T3 estimula el crecimiento celular mediante la reducción del tiempo de duplicación principalmente debido a un drástico acortamiento de la fase G₁ del ciclo celular (Barrera-Hernandez y col, 1999). Asimismo en cardiomiocitos de rata, el tratamiento con T3 induce su entrada al ciclo celular mediante un incremento en la expresión de la ciclina D1 (Ledda-Columbano y col, 2006). En base a estos antecedentes, evaluamos el efecto del tratamiento de células EL-4 *in vitro* con HTs sobre los niveles de expresión de reguladores del ciclo celular.

Como ya mencionamos en la introducción, las ciclinas son miembros de una familia de proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular, que forman complejos con Cdks, activándolas. Sus niveles de expresión varían de acuerdo con el estadio del ciclo en el que se encuentre dicha célula: cuando su concentración es baja, la función de su correspondiente Cdk se encuentra inhibida (Malumbres y Barbacid, 2001; Lim y Kaldis, 2013). Por lo tanto, el pasaje de las células por los distintos puntos de control del ciclo celular depende, entre otras cosas, de la concentración de diferentes ciclinas. Para nuestra sorpresa, la ciclina D1 no se vio modulada por el tratamiento con HTs *in vitro*, a pesar de que el aumento de esta ciclina ha sido ampliamente relacionado con la regulación del ciclo celular por HTs en diversos tipos celulares (Verga Falzacappa y col, 2006; Ledda-Columbano y col, 2006; Zhang y col, 2012). No obstante, el tratamiento de las células EL-4 durante 12 horas con HTs indujo un incremento en la expresión de la ciclina D3 que, al igual que la ciclina D1, está involucrada en la regulación de la entrada a la fase G₁ del ciclo celular. La expresión de esta ciclina retornó a valores basales a las 24 horas de cultivo, cuando se detectó un aumento en los niveles de expresión de las ciclinas D2, A2 y B1, que participan respectivamente en la entrada a la fase G₁, en la progresión a través de la fase S y en la transición G₂/M.

Sin embargo, la progresión del ciclo celular no sólo depende de los niveles de expresión de ciclinas, sino que también está regulado de forma negativa por inhibidores de Cdks y proteínas supresoras de tumores (Johnson y Walker, 1999;

Węsierska-Gądek y col, 2011), los cuales también se vieron modulados por el tratamiento de las células EL-4 con HTs *in vitro*. En las células cultivadas por 12 y 24 horas con HTs se observó un incremento en los niveles de expresión de p16 y p27, ambos encargados de inhibir la actividad de Cdk4 mediante diferentes mecanismos, regulando así de forma negativa la entrada en la fase G₁ del ciclo celular. Encontramos también un aumento de p21 a las 12 horas de cultivo con HTs, efecto que fue revertido a las 24 horas. Esta proteína inhibe directamente la actividad de las enzimas de los complejos ciclina-Cdk2 y ciclina-Cdk4, regulando el avance en el punto de control G₁/S del ciclo celular. También juega un papel crítico en la replicación y en la reparación de daños al ADN durante la fase S del ciclo celular gracias a su capacidad de interacción con la ADN polimerasa.

La expresión de p21 se encuentra normalmente regulada por p53, mecanismo mediante el cual la célula detiene el ciclo celular como respuesta a un estímulo apropiado. No observamos alteraciones en los niveles de expresión de este supresor tumoral durante las 24 horas de cultivo con HTs, pero sí detectamos un aumento en los niveles de expresión de otros dos supresores de tumores, Rb y PTEN, a las 12 horas de tratamiento, que retornaron a los valores basales a las 24 horas de cultivo con las hormonas. La función normal del Rb es detener la división celular mediante la captura de los factores de transcripción E2F involucrados en la replicación del ADN, mientras que PTEN detiene la progresión del ciclo celular mediante la inhibición de la vía de señalización intracelular Akt/PKB.

Se ha demostrado en hepatocitos aislados el incremento en la expresión de ciclinas D y p21 junto con un aumento de la actividad de Rb inducida por mitógenos (Ilyin y col, 2003). Adicionalmente, el tratamiento *in vitro* con factores que inducen cambios en los niveles de expresión de las proteínas reguladoras del ciclo celular puede llevar a la transformación o al aumento del fenotipo maligno de otros tipos celulares (Hu y col, 2009; Mukherjee y col, 2010). Más aún, se ha visto que la carcinogénesis mamaria inducida por DMBA involucra un aumento en la expresión de ciclinas D y E, junto con p21 (Jang y col, 2000). Por lo tanto, los resultados obtenidos por la incubación de las células EL-4 *in vitro* durante 12 y 24 horas con HTs indican una desregulación del ciclo celular, donde se produce un

aumento en la expresión tanto de los reguladores positivos del ciclo celular, como de los reguladores negativos del mismo. Del balance entre estas proteínas parece depender el destino de las células EL-4 que, tal como indican nuestros resultados en las primeras 30 horas de cultivo con HTs, lleva a la proliferación, contribuyendo de esta manera a la supervivencia de esta línea celular.

Sin embargo, además de su efecto proliferativo, se ha visto también un efecto pro-apoptótico de las HTs. Está ampliamente comprobado que estas hormonas son fundamentales para inducir la muerte celular durante la metamorfosis en anfibios (Ishizuya-Oka, 2011). Más aún, se ha visto que el tratamiento con concentraciones fisiológicas de HTs induce la muerte celular por apoptosis en líneas celulares de hipófisis de rata (Yehuda-Shnaidman y col, 2005; Chiloeches y col, 2008) y de la línea celular mamaria MCF-7 (Sar y col, 2011). Sin embargo, lo que resulta más importante aún es el efecto observado por Mihara y col (1999) sobre linfocitos T humanos. El tratamiento de células Jurkat tanto con T3 como con T4 durante 14 días indujo la apoptosis celular, mediada por un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), la despolarización de la mitocondria y la reducción en la expresión proteica de Bcl-2. Resultados similares fueron obtenidos al tratar células T de pacientes sanos con T3 durante 5 días y al incubar linfocitos T de pacientes con la enfermedad de Graves durante 24 horas, lo que indicaría que la exposición crónica a HTs acelera la apoptosis tanto *in vitro* como *in vivo*. Ensayos realizados con células BW en nuestro laboratorio indican que el tratamiento con HTs durante más de 5 días induce apoptosis mediada por un aumento en la actividad de iNOS, en la generación de especies reactivas de oxígeno y en la despolarización de la membrana mitocondrial (Barreiro Arcos y col, 2013). La apoptosis linfocitaria, inducida por diversos estímulos, utiliza a la caspasa 3 como un efector clave, que amplifica la señal de la caspasa 9, activa PARP y lleva finalmente a la muerte de la célula (Shao y col, 2012).

En concordancia con estas observaciones, el tratamiento prolongado del linfoma T EL-4 con T4 indujo un aumento en la apoptosis celular a partir del día 5 de cultivo, tal como indican los ensayos de medida por citometría mediante la marcación con Anexina-FITC junto con Ioduro de Propidio. Este incremento en la apoptosis fue acompañado por un aumento en la expresión de la proteína pro-

apoptótica Bad y de las caspasas 3 y 9, junto con una reducción en la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2.

Por lo tanto, aunque parezcan contradictorios, los resultados obtenidos por el tratamiento de las células EL-4 *in vitro* con concentraciones fisiológicas de HTs, señalan un efecto dependiente del tiempo de cultivo y probablemente relacionado con la regulación del ciclo celular. Dado que las hormonas regulan positivamente tanto la expresión de las ciclinas como la de sus inhibidores y supresores tumorales, el efecto parece depender del balance entre estas proteínas a lo largo del tratamiento. Durante las primeras horas de cultivo, en el balance debe predominar la expresión de ciclinas, por lo que se observa un incremento en la proliferación celular. Sin embargo, a tiempos más largos de cultivo la desregulación del ciclo celular puede llevar a las células a la apoptosis. Entre los reguladores del ciclo celular, p21 y p53 son los que más frecuentemente se han asociado con inducción de la apoptosis (Cox, 1997), aunque también se ha demostrado un efecto pro-apoptótico de p27 (Katayose y col, 1997) y de p16 que, independientemente del estado de p53, lleva a la activación del efector E2F1 (Wu y Yu, 2009). En este sentido, en células humanas de leucemia promielocítica tratados con 3,4-DHPEA se ha visto un incremento inicial de las ciclinas D3 seguido del aumento de los Cdkls p21 y p27, lo que se vio relacionado con una reducción de la proliferación y un incremento en la apoptosis celular (Fabiani y col, 2008).

Estos resultados nos dan una idea de cómo el exceso de HTs en circulación puede afectar a las células del linfoma T. Sin embargo, los tumores que se desarrollan en un individuo están compuestos además por un complejo microambiente tumoral que contiene diferentes tipos celulares, factores solubles, moléculas de señalización y componentes de la matriz extracelular (Catalano y col, 2013), todos ellos fundamentales en el desarrollo tumoral. Por este motivo, el objetivo principal de este trabajo fue evaluar *in vivo* la modulación por el estado tiroideo del desarrollo del linfoma T EL-4.

5.2. Modelos murinos para la evaluación de los efectos del estado tiroideo sobre el desarrollo del linfoma T EL-4 *in vivo*.

Existen numerosos estudios clínicos que pretenden determinar la relación entre el estado tiroideo del paciente y la predisposición al desarrollo de enfermedades neoplásicas, sin embargo no se han obtenido aún resultados concluyentes. Por ejemplo, se ha descrito al hipertiroidismo como un factor de riesgo en el desarrollo de cáncer de ovario (Ness y col, 2000), de pulmón y próstata (Hallevik y col, 2009) y de páncreas (Ko y col, 2007).

Por otra parte, algunos autores describen al hipotiroidismo como un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer hepático (Reddy y col, 2009) y de mama (Reddy y col, 2009; Kuijpers y col, 2005). En contraste con estos resultados, se ha asociado al hipotiroidismo clínico con una mayor supervivencia en varios tipos de procesos malignos aunque los mecanismos involucrados son desconocidos (Toms y col, 1998). En concordancia con estos últimos resultados, Cristofanilli y col (2005) han descrito una reducida incidencia de carcinoma mamario en pacientes con hipotiroidismo primario, mientras que Hercbergs (1999) ha sugerido que el hipotiroidismo incrementaría la predisposición a que se genere una regresión de los neoplasmas, tanto espontánea como inducida por terapia, a través de un mecanismo apoptótico.

Varias evidencias indican que el cáncer puede ocasionalmente permanecer en estado "dormido" por largos periodos en pacientes hipotiroideos y que la terapia de reemplazo hormonal conduce a la reactivación de la enfermedad, al normalizarse el estado tiroideo (Theodossiou y Schwarzenberger, 2000). Así, se ha documentado una mayor incidencia de carcinomas renales en mujeres hipotiroideas tratadas con levotiroxina (Rosenberg, 1990). No obstante, el uso de levotiroxina se ha asociado también con un menor riesgo de desarrollar cáncer de colon (Rennert y col, 2010).

Un reciente meta-análisis de diferentes estudios clínicos mostró que el hipotiroidismo no se hallaría asociado con el riesgo de desarrollar cáncer de mama y que la terapia de reemplazo hormonal no reduciría su prevalencia

(Angelousi y col, 2012). Sin embargo, los autores sugieren que estos resultados no son concluyentes dada la heterogeneidad de los estudios analizados.

Probablemente la variabilidad en los resultados obtenidos por los diferentes grupos de investigación se deba a que existen patologías tiroideas con diversos orígenes, que podrían afectar de manera distinta el establecimiento y desarrollo de tumores. Los análisis acerca de la relación entre hormonas tiroideas y tumores en humanos involucra principalmente a pacientes con enfermedades autoinmunes, como las enfermedades de Hashimoto y Graves que llevan al hipo- e hipertiroidismo respectivamente. Estas son dos de las patologías tiroideas más comunes, originadas en la desregulación del sistema inmune (Brown, 2013). Estos trabajos no establecen si los efectos observados son generados por la acción directa de las HTs o por la autoinmunidad subyacente. En este sentido, la autoinmunidad en pacientes hipertiroideos está relacionada principalmente con anticuerpos contra el receptor de TSH, que imitan la acción de esta hormona, por lo que pueden alterar también la funcionalidad del sistema inmune tal como fue demostrado para la TSH *per se* (Wang y Klein, 2001), y por ende, también puede afectar el desarrollo tumoral.

El objetivo de nuestro trabajo fue evaluar la acción directa del exceso o defecto de HTs sobre el desarrollo tumoral, independientemente de las alteraciones del sistema inmune propias de patologías autoinmunes. Los resultados obtenidos de modelos animales de hipo- e hipertiroidismo sin una condición autoinmune son de gran valor, ya que no sólo muestran la importancia de los niveles circulantes de hormonas en el desarrollo tumoral, sino que también sugieren su participación en los desórdenes tiroideos autoinmunes. Para ello, los animales hipotiroideos fueron generados mediante la administración de PTU al 0,05 % en el agua de bebida durante 15 días. Este agente antitiroideo actúa bloqueando la síntesis de HTs e inhibiendo la deiodinación periférica de T4 a T3. Es importante destacar que la dosis de PTU empleada está en el rango de la mínima dosis de mantenimiento del estado eutiroideo en pacientes con enfermedad de Graves (Kashiwai y col, 2003). Por otra parte, para inducir altos niveles de HTs, los ratones fueron tratados *in vivo* con T4 en el agua de bebida, ya que esta hormona es la habitualmente usada como reemplazo hormonal en pacientes hipotiroideos (Ma y col, 2009).

Esto se debe principalmente a que su vida media es mayor a la de T3, obteniéndose una potencia constante y una acción prolongada por ser convertida a T3 en los tejidos periféricos. Para corroborar el adecuado establecimiento de los estados de hipo- e hipertiroidismo, se dosaron los niveles hormonales en el suero de los animales que recibieron los tratamientos indicados. Así, se comprobó que los animales hipotiroideos presentaron bajas concentraciones de HTs circulantes, acompañadas por altos valores de TSH, mientras que los ratones hipertiroideos presentaron concentraciones séricas de HTs aproximadamente 7 veces por encima de los niveles de los ratones controles, y valores prácticamente indetectables de TSH sérica.

Con respecto al modelo tumoral, los ratones C57Bl/6J fueron inoculados con células EL-4 en forma subcutánea, para el desarrollo de tumores sólidos. Cabe destacar que el 100% de los ratones inoculados subcutáneamente desarrollaron tumores sólidos a partir del día 5 posterior a la inoculación de las células. La elevada velocidad de crecimiento de los tumores generados impidió la detección de metástasis espontáneas en la mayoría de los animales, ya que los mismos debieron ser sacrificados antes del establecimiento de las mismas. Por lo tanto, la diseminación tumoral fue evaluada mediante el test de metástasis experimentales.

Los animales hipotiroideos presentaron una velocidad de crecimiento tumoral similar a la de los controles eutiroideos, sin embargo mostraron una mayor diseminación tumoral. Así, en este grupo hubo una mayor proporción de ratones con metástasis hepáticas y un aumento del número de metástasis renales respecto a los otros dos grupos en estudio. Por el contrario, los ratones hipertiroideos desarrollaron tumores sólidos de mayor tamaño que los hipo- o eutiroideos, aunque tuvieron menor incidencia de metástasis hepáticas y un menor número de metástasis renales.

Si bien generalmente el mayor tamaño tumoral está relacionado con un aumento de la diseminación tumoral e invasión de tejidos (Maffuz y col, 2006; Minn y col, 2007), nuestros resultados muestran un efecto dual del estado tiroideo sobre el desarrollo de este linfoma, afectando de forma diferencial el crecimiento del tumor primario y la diseminación de células tumorales. En concordancia con nuestros resultados, Martínez Iglesias y col (2009) observaron en ratones inoculados con

células humanas de hepatocarcinoma (SK-hep1) y de cáncer de mama (MDA-MB-468) que el hipotiroidismo reduce el crecimiento del tumor primario, pero incrementa la formación de metástasis pulmonares evaluada mediante el test de metástasis experimentales. Sin embargo y por tratarse el modelo empleado de un trasplante xenogéneo de células humanas en ratón, los autores debieron utilizar animales nude en donde no es posible evaluar la participación de la inmunidad antitumoral en estos efectos. De esta manera, todos los experimentos realizados a continuación se avocaron a dilucidar los mecanismos por los cuáles el estado tiroideo es capaz de regular el crecimiento y la diseminación tumoral incluyendo la regulación ejercida sobre la inmunidad antitumoral.

5.3. Mecanismos por los cuales el estado tiroideo modula el crecimiento tumoral

En primer lugar, analizamos las alteraciones inducidas por el estado tiroideo sobre el crecimiento tumoral *in vivo*, con especial interés en la regulación de la proliferación celular, la apoptosis, la angiogénesis tumoral y la respuesta inmune antitumoral, que pudieran explicar las diferencias en el tamaño tumoral de los ratones de los distintos grupos experimentales.

En la dinámica tumoral aparece un desequilibrio entre proliferación y muerte celular. La expresión alterada de proteínas implicadas en la regulación y la ejecución de la apoptosis y del ciclo celular ha sido demostrada en varios tipos de linfomas, así como la importancia del nivel de apoptosis y de proliferación en la agresividad clínica de los síndromes linfoproliferativos (Sánchez-Beato y col, 2003; Agostinelli y col, 2008). Como hemos visto, el tratamiento *in vitro* de las células EL-4 con T4 induce un incremento tanto de la proliferación celular como de la apoptosis, que es dependiente del tiempo de cultivo. Por este motivo, analizamos la regulación del balance entre la proliferación y la apoptosis en los tumores sólidos creciendo en los distintos grupos experimentales.

El análisis histopatológico realizado sobre cortes de tumores provenientes de ratones controles, hipo e hiper, indicó que los mismos eran muy homogéneos,

compuestos principalmente por células de linfoma altamente indiferenciadas y con una reducida presencia de otros tipos celulares. Todos los tumores mostraron un elevado grado de vascularización y una alta tasa proliferativa con bajos niveles de apoptosis y necrosis.

En particular, los tumores de ratones hipertiroideos presentaron un mayor recuento de mitosis respecto a los tumores de animales eutiroideos y mayores niveles proteicos de PCNA. Más aún, la tinción de las células EL-4 con el colorante CFSE indicó la existencia de un mayor número de divisiones celulares en los tumores de ratones hipertiroideos respecto a los otros dos grupos experimentales. Sin embargo, también se observó en estos tumores un incrementado porcentaje de células con características compatibles con procesos apoptóticos, lo cual fue corroborado mediante inmunohistoquímica y western blot, utilizando un anticuerpo contra la caspasa 3 activada. Dado que las alteraciones de los factores pro- y antiapoptóticos, en particular Bax y Bcl-2, están a menudo asociadas con el pronóstico de linfomas T, (Zhang y col, 2003; Cheng y col, 2008; Eischen y col, 2002), evaluamos su expresión y detectamos un incremento en los niveles de ARNm de la proteína pro-apoptótica Bax en ratones hipertiroideos. Esta proteína se une a la membrana externa mitocondrial, formando poros que generan una despolarización de la membrana mitocondrial, la salida del citocromo c y el reclutamiento de la caspasa 9, que lleva finalmente a la activación de la caspasa 3 y a la apoptosis celular. Estos resultados concuerdan con las observaciones realizadas *in vitro*, donde el tratamiento con T4 indujo tanto la proliferación como la apoptosis de las células EL-4.

En los cortes de los tumores provenientes de ratones hipotiroideos, por otra parte, se pudo observar un elevado porcentaje de necrosis respecto a los otros dos grupos, junto con un menor recuento de mitosis. Sin embargo, no se detectaron diferencias en cuanto al número de divisiones de las células EL-4 en el tumor, ni en los niveles de expresión de PCNA. Si bien no se encontraron variaciones significativas en los niveles de expresión de factores involucrados en la regulación de la apoptosis, se encontró un menor porcentaje de células positivas para caspasa 3 activada en este grupo respecto del control.

Además del desequilibrio entre proliferación y apoptosis, en los procesos de linfomagénesis T se han descrito numerosas alteraciones a nivel de las proteínas reguladoras del ciclo celular, que a su vez, contribuyen al desbalance entre el crecimiento y la muerte de las células tumorales. Por este motivo, y dado que las HTs modulan la expresión de estas proteínas en las células EL-4 *in vitro*, evaluamos los niveles de expresión de las mismas en los tumores provenientes de los ratones controles, hiper- e hipotiroideos.

La ciclina D1, por ejemplo, ha sido ampliamente relacionada con la linfomagénesis de células T, y varios grupos han asociado su regulación positiva con un mal pronóstico en pacientes con linfomas linfoblásticos (Zukerberg y col, 1995; Kanavaros y col, 2001; Mao y col, 2006). Los ratones hipertiroideos presentaron tumores con elevada expresión de esta ciclina que regula la entrada a la fase G₁ del ciclo celular. Adicionalmente, se observó también un incremento en la expresión de la ciclina D3 en ratones hipertiroideos, cuyo incremento también está relacionado con la linfomagénesis T y cuya sobreexpresión está asociada con una baja sobrevida (Doglioni y col, 1998; Møller y col, 2001). Si bien no se registraron diferencias en los niveles de expresión de la ciclina D2, se observó que los tumores de ratones hipertiroideos presentaban un aumento en los niveles de expresión del ARNm de la ciclina E, encargada de la regulación de la transición entre las fases G₁ y S. El incremento en su expresión también es importante en la linfomagénesis T, en cooperación con una reducción en los niveles de expresión de p27 (Karsunky y col, 1999; Geisen y col, 2003).

En los últimos años, se ha comenzado a develar el papel clave que cumple p27 en la generación y evolución de linfomas de células T (Martins y Berns, 2002; Geisen y col, 2003; Kang-Decker y col, 2004; Cheng y col, 2008). Se ha visto en ratones transgénicos que la deficiencia en esta proteína lleva a la hiperplasia de células T y al desarrollo de linfomas T espontáneos (Cheng y col, 2008). Se ha observado un aumento de la expresión de p27 en tumores de ratones hipotiroideos, sin embargo, no se encontraron diferencias en relación a la expresión de esta proteína en el hipertiroidismo experimental. Estos resultados concuerdan con las observaciones realizadas *in vitro*, donde el incremento en los niveles de HTs indujo tanto la proliferación como la apoptosis de las células EL-4.

Asimismo, evaluamos también en todos los tumores la expresión de otros inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas, como p15, p16 y p21. Encontramos aumento de la expresión de p16 en tumores de ratones con hipotiroidismo. Reportes previos también relacionan a este Cdk1 con desórdenes linfoproliferativos (Zhang y col, 2007; Nagasawa y col, 2006; Navas y col, 2002). Sin embargo, los niveles de expresión de p15 y p21 no se vieron modificados en los tumores de ninguno de los grupos estudiados, a pesar que se ha sugerido que p21 está implicado en la evolución de linfomas derivados de células T (el-Deiry y col, 1994; Kanavaros y col, 2001).

Por otra parte, evaluamos también los niveles de expresión de los genes supresores tumorales, cuya expresión se encuentra más frecuentemente desregulada en linfomas T, entre los que se encuentran PTEN (Opavsky y col, 2007), Rb (Pérez de Castro y col, 1999; Kanavaros y col, 2001; Mao y col, 2006) y p53, siendo este último un marcador clave en la progresión de linfomas linfoblásticos (Kanavaros y col, 2001; Møller y col, 2002; Verschuren, 2004). Nuestros resultados indican que el estado tiroideo es capaz de modular sólo la expresión de p53, que se encuentra aumentado en tumores de ratones hiporespecto a aquellos de animales hipertiroideos.

Por lo tanto, los altos niveles de hormonas tiroideas en circulación regulan positivamente la expresión de las ciclinas D1, D3 y E en linfomas T, que permiten la entrada a las fases G₁ y S del ciclo celular, mientras que niveles bajos de hormonas inducen un aumento en los niveles de expresión de p16, p27 y p53, proteínas que regulan negativamente la progresión del ciclo celular. De acuerdo con nuestros resultados, existen en bibliografía algunos trabajos que evalúan *in vivo* la modulación de la expresión de reguladores del ciclo celular en otros procesos fisiológicos no neoplásicos y muestran resultados similares a los obtenidos en este trabajo. Por ejemplo, Pibiri y col (2001) observaron en un modelo de regeneración hepática, donde hay una muy elevada tasa proliferativa, que el hipertiroidismo induce un aumento en la expresión de PCNA, junto con la ciclina D1, aunque no observaron variaciones en los niveles de las ciclinas D3 y E, ni en p21 o p27. Alisi y col (2005) también analizaron el efecto del estado tiroideo en la regulación del ciclo celular durante la regeneración hepática en ratas

y observaron un aumento en la expresión de las ciclinas D1, E y A y una disminución en p16 y p27 en ratas hipertiroideas. En tanto el hipotiroidismo provocó una reducción en la expresión de las mismas ciclinas acompañada de un aumento de p16, p27 y p53. Más aún, en animales alimentados con una dieta suplementada con T3 se ha detectado un incremento de PCNA y ciclina D1 junto con la reducción de p27 en hepatocitos y acinos pancreáticos (Ledda-Columbano y col, 2005; Kowalik y col, 2010).

Los efectos observados sobre la modulación del ciclo celular por el estado tiroideo pueden explicar el aumento en la proliferación y velocidad de crecimiento tumoral en ratones hipertiroideos, ya que el incremento en la expresión de ciclinas favorece la entrada de las células al ciclo celular y, por ende, lleva a una mayor división celular. Por otra parte, a pesar de no observarse diferencias en el tamaño tumoral de los ratones hipotiroideos respecto de los controles, el análisis histopatológico mostró una disminución en el número de mitosis de los tumores a los 10 días p.i. en estos animales. Esto podría deberse a la regulación positiva de los inhibidores del ciclo celular, los que limitarían la progresión del mismo y, por ende, la división de las células tumorales.

Como mencionamos en la introducción, una de las características fundamentales de la tumorigénesis es también la formación de nuevos vasos sanguíneos a través del proceso de angiogénesis. La nueva vasculatura permite la llegada de oxígeno y nutrientes a las células, facilitando la proliferación de las células tumorales (Folkman, 1995)

La observación mediante lupa de los tumores de 6 días, tiempo al que los mismos comienzan a hacerse palpables, mostró un incremento de la angiogénesis peritumoral en ratones hipertiroideos. Sin embargo, no se pudo realizar un recuento de los vasos dentro de los tumores, ya que estos no se veían muy definidos, probablemente debido a que en las primeras etapas de la angiogénesis los vasos recientemente formados aun no presentan matriz extracelular ni membrana basal, por lo que se originan fugas que dan lugar a pequeñas hemorragias (Weiss y col, 2012). Por este motivo, analizamos posteriormente la presencia de vasos sanguíneos en cortes de tumores de 10 días por tinción tricrómica. A pesar de que todos los tumores se vieron altamente irrigados, los

tumores de ratones hipertiroideos presentaron un número significativamente mayor de vasos sanguíneos que los ratones control. Una característica importante de destacar fue que los tumores de ratones hipotiroideos presentaron un menor número de vasos sanguíneos, junto con mayores áreas de hemorragias que los otros dos grupos experimentales.

Para corroborar las observaciones histopatológicas, realizamos también inmunohistoquímicas de los cortes de tumores utilizando un anticuerpo anti-CD31. CD31/ PECAM-1 es un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas que se encuentra altamente expresado en la superficie de las células endoteliales, aunque también se expresa en plaquetas y leucocitos (Jackson, 2003). Junto con CD34 representan dos de los marcadores moleculares establecidos utilizados para la evaluación de la densidad de la microvasculatura en diversos tipos de tumores (Sharma y col, 2013; Ozerdem y col, 2013; Molinský y col, 2013). Los resultados obtenidos concuerdan con las observaciones realizadas por tinción tricrómica, observándose un incremento en la marca positiva para CD31 en tumores hipertiroideos y una reducción de esta marcación en los hipotiroideos.

De la misma manera, se ha asociado a las HTs con la inducción de angiogénesis en tejidos normales y tumorales. Entre ellos, se ha descrito la inducción de angiogénesis por HTs en cerebro, tanto *in vitro* como *in vivo*, dependiente de VEGF-1 y FGF-2 (Zhang y col, 2010). También en hepatocitos, células de hepatoma y carcinomas de riñón y pulmón se observó un aumento en la producción de VEGF inducida por la unión de T3 al heterodímero TR β /RXR (Otto y Fandrey, 2008). Sin embargo, una gran cantidad de evidencia indica que el efecto proangiogénico de las HTs es mediado por su receptor de membrana, la integrina $\alpha_v\beta_3$. En este sentido, Bergh y col (2005) han descrito un aumento en la angiogénesis inducida por T4 en un modelo de membrana corioalantoidea (CAM) de pollo, que fue revertido por la co-incubación con un anticuerpo contra la integrina $\alpha_v\beta_3$. La activación de esta integrina por HTs lleva a la activación de pERK, responsable de la fosforilación de serinas de numerosos factores de transcripción, que llevan al aumento de la expresión de moduladores clásicos de la angiogénesis como FGF-2, VEGF y Ang-2 (Pinto y col 2011). Más aún, la utilización de T4 acoplada a agarosa para evitar su internalización, mostró el

mismo efecto proangiogénico que la T4 libre sobre el modelo de CAM (Davis y col, 2004).

La angiogénesis es un proceso altamente regulado, controlado por el balance entre moléculas regulatorias positivas y negativas. Cuando se pierde el balance, ocurre un “*switch* angiogénico”, que resulta en la proliferación de las células endoteliales y es controlado por factores genéticos, por el reclutamiento de células inflamatorias y por interacciones de receptores de adhesión con las MMPs (Pinto y col, 2011). Las MMPs más importantes en el proceso de angiogénesis son la MMP-2 y la MMP-9, que pueden degradar la matriz extracelular, permitiendo la invasión de células endoteliales y la formación de vasos sanguíneos. Además, a través de un mecanismo poco descrito, pueden incrementar la biodisponibilidad del factor proangiogénico VEGF (Egeblad y Werb, 2002). Los tumores de ratones hipertiroideos mostraron un incremento en los niveles de expresión de MMP-2 y MMP-9, mientras que en los tumores de ratones hipotiroideos se detectó un incremento en la expresión de Timp1, un inhibidor de la actividad de las MMPs. Existen resultados previos que relacionan el aumento de los niveles circulantes de HTs con un incremento en la expresión de MMPs. Se ha visto en ratas, por ejemplo, que la administración de T4 induce el remodelado del miocardio a través del aumento en la expresión de MMP-2 y MMP-9 y de la reducción de la expresión de Timp-1 y 2 (Tang y col, 2008). Por otra parte, el tratamiento de un hepatoma con T3 incrementa la expresión de metaloproteasas, incluyendo MMP-2, MMP-7 y MMP-9, vía la activación de TRAIL (Chi y col, 2012), mientras que en células de superficie epitelial de ovario se observó un aumento en la expresión de la MMP9 inducida por el tratamiento con T3 (Rae y col, 2008). Los elevados niveles de HTs en circulación en nuestro modelo, por lo tanto, podrían colaborar también en la angiogénesis tumoral mediante el aumento de la expresión de MMPs, contrario a lo que ocurre en el hipotiroidismo, donde se incrementan los niveles de sus inhibidores.

Actualmente es sabido que para la evolución de los linfomas se requieren tanto factores intrínsecos a las células, entre los que se encuentran las alteraciones genómicas, y factores que son extrínsecos y que provienen del microambiente tumoral (Rosenquist y col, 2013). Las células malignas son capaces de reclutar

una gran variedad de tipos celulares, incluyendo fibroblastos, células inmunes inflamatorias y células endoteliales, a través de la producción y secreción de factores de crecimiento y citoquinas. Este conjunto de células y moléculas componen el microambiente tumoral (Devaud y col, 2013).

Entre los componentes más importantes del microambiente tumoral se encuentran las células del sistema inmune, que pueden cumplir dos funciones muy diferentes en el desarrollo tumoral. Por una parte, son capaces de generar un ambiente inflamatorio que facilita el crecimiento celular y la formación de metástasis (Mantovani, 2009), pero también son fundamentales en la erradicación de la formación y progresión de neoplasias incipientes, tumores en fase tardía y micrometástasis, mediante el proceso de inmunovigilancia (Swann y Smyth, 2007).

La hipótesis de la vigilancia inmunológica antitumoral postula que una de las principales funciones del sistema inmune es la de reconocer a las células neoplásicas y eliminarlas (Burnet, 1970). Esta afirmación implica que en ausencia de una respuesta inmune efectiva debería existir una mayor incidencia de cáncer con un peor pronóstico. Así, se ha observado un aumento en la incidencia de ciertos tipos de tumores en individuos de edad avanzada con un sistema inmune senescente (Malaguarnera, 2010), en pacientes trasplantados, que se encuentran inmunosuprimidos (Vajdic y van Leeuwen, 2009a) y en pacientes con inmunodeficiencia adquirida por VIH (Vajdic y van Leeuwen, 2009b).

El estado tiroideo modula algunos componentes del sistema inmune. En tal sentido, se ha observado en ratones hipotiroideos una menor reactividad linfocitaria B y T frente a un estímulo mitogénico específico, evidenciada por una disminución en la proliferación celular (Chatterjee y Chandel, 1983; Fabris y col, 1995; Klecha y col, 2006), mientras que en ratones hipertiroideos la reactividad linfocitaria frente a mitógenos selectivos se encuentra incrementada (Klecha y col, 2006). Adicionalmente, frente a un desafío antigénico específico de células T, Klecha y col (2006) han observado un incremento y una disminución en la producción de IL-2 e IFN γ en ratones hiper- e hipotiroideos, respectivamente, mientras que un estímulo pro-inflamatorio indujo un incremento en la producción de IL-6 y TNF- α en ratones hipertiroideos. También se ha detectado en animales

estresados y portadores de un linfoma T, una reducción en la actividad citotóxica específica contra las células tumorales y una disminución en la producción de las citoquinas antitumorales TNF- α e IFN- γ , mediada por una disminución de los niveles circulantes de T3, que fue revertida por administración de T4 a fin de restablecer el estado eutiroideo (Frick y col, 2009).

A partir de estos antecedentes, evaluamos si el estado tiroideo es capaz de modular la respuesta inmune antitumoral en nuestro modelo de linfoma T, lo que podría aportar aun más datos para explicar los mecanismos por los cuales el estado tiroideo regula el desarrollo tumoral. Para ello, analizamos algunos de los componentes del sistema inmune que intervienen en la respuesta antitumoral, mediante el análisis de la distribución de subpoblaciones de células inmunes en el ganglio drenante del tumor y en el infiltrado linfocitario de los tumores de ratones inoculados con el linfoma T EL-4.

El ganglio drenante (GD) del tumor es el ganglio linfático que se encuentra más próximo al mismo, por lo que es considerado un sitio crítico en la inmunología tumoral. Anatómicamente es el primer lugar hacia donde migran los antígenos tumorales y de donde derivan las células dendríticas presentadoras de dichos antígenos al sistema inmune *naive*. Esta interacción es la que decide si se activan los mecanismos efectores antitumorales o si se induce la tolerancia inmunológica (Munn y Mellor, 2006).

Es importante destacar que los ganglios de los ratones hipertiroideos presentaron un mayor tamaño que los de los otros dos grupos experimentales, lo cual se asoció a un mayor número de células inmunes. Esta característica ya fue observada hace varias décadas por Ulmann y col (1963), quienes describieron la hiperplasia del tejido linfoide tanto en animales de experimentación como en pacientes con hipertiroidismo. Además, en los ratones de los tres grupos experimentales el GD presentaba un mayor número de células que el ganglio contralateral no drenante (GND), lo cual indica que existe reclutamiento de los componentes del sistema inmune hacia el sitio donde se implantó el tumor. En pacientes es común encontrar un agrandamiento de los ganglios linfáticos aun antes de que el tumor sea detectable, compuesto por células inmunes reactivas contra el tumor (Marzo y col, 1999). En ratones hipotiroideos esta diferencia fue

aun mayor, por lo que el hipotiroidismo induciría el reclutamiento de células inmunes hacia el GD del tumor.

Analizamos entonces la proporción de subpoblaciones de células inmunes en el GD y lo comparamos con el GND de ratones inoculados subcutáneamente con las células EL-4. No detectamos diferencias entre los grupos experimentales en relación a los porcentajes de linfocitos T (CD3⁺), linfocitos B (CD19⁺) o células NK. Es importante destacar que tampoco se observaron diferencias en la proporción de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, tal como fue observado por Klecha y col (2006) en ratones controles, hiper- e hipotiroideos.

Sin embargo, a pesar de no observarse cambios en la composición de subpoblaciones en el GD, la composición del infiltrado de células inmunes en el tumor es frecuentemente un indicador de la progresión de los linfomas. Por este motivo, evaluamos por citometría de flujo el infiltrado linfocitario de los tumores sólidos de los ratones con diferentes estados tiroideos. En primer lugar registramos una población diferenciada de células que se destacaba por su tamaño y granularidad, a la que definimos como el infiltrado tumoral. Los tumores de ratones hipertiroideos presentaron una menor proporción de estas células inmunes infiltrantes respecto a los otros dos grupos experimentales. Este infiltrado linfocitario estaba compuesto mayoritariamente por células T CD8⁺, aunque también se detectaron células CD4⁺ y, en menor medida, células CD19⁺.

Al comparar la composición de subpoblaciones linfocitarias infiltrantes en el tumor en los distintos estados tiroideos, detectamos en los tumores hipertiroideos una menor proporción de células T CD8⁺, mientras que la proporción de células CD4⁺ fue igual en los tumores de los tres grupos experimentales. Además, el hipertiroidismo generó un incremento en la cantidad de linfocitos B (CD19⁺). Este último resultado es relevante, ya que se ha reportado un subtipo de células B que es capaz de inhibir la actividad antitumoral mediada por células T y se han detectado también células B regulatorias, capaces de estimular la diferenciación de células T hacia Tregs, y por ende, inhibir la actividad de las células T citotóxicas (Namm y col, 2012). Por lo tanto, el aumento de células B en el infiltrado tumoral podría estar relacionado con una disminución en la inmunidad antitumoral en este grupo.

Los elevados niveles de HTs en circulación tienen un importante efecto sobre la composición del microambiente tumoral, reduciendo el infiltrado linfocitario en el tumor y, en particular, el porcentaje de células T citotóxicas. Estas observaciones contribuyen a la dilucidación de los mecanismos involucrados en la modulación del crecimiento tumoral por el estado tiroideo, ya que la reducción de la citotoxicidad en el tumor en ratones hipertiroideos podría favorecer su crecimiento. Asimismo, estos hallazgos son de gran importancia, ya que tanto en linfomas Hodgkin como no Hodgkin, la vigilancia inmunológica efectiva depende principalmente de la presencia de infiltrado linfocitario tumoral, especialmente de células citotóxicas y T reguladoras, que pueden servir como un valor pronóstico en este tipo de neoplasias. Se ha descrito así, que un infiltrado linfocitario con más de 23% de células CD4⁺ está asociado a un mejor pronóstico en pacientes con linfomas B y un bajo número de linfocitos T CD8⁺ en el infiltrado tumoral indicaría un curso clínico desfavorable (Ansell y col, 2001; Keane y col, 2013). También en el caso de los linfomas foliculares, la sobrevida de los pacientes parece correlacionarse con las características moleculares de las células inmunes no neoplásicas presentes en el tumor en el momento del diagnóstico, de manera que la presencia de células T, junto con células dendríticas y monocitos, se relaciona a una mayor sobrevida (Dave y col, 2004). Asimismo, en pacientes con leucemia linfocítica crónica se han asociado niveles aumentados de células NK y células T, acompañados de una baja relación CD4⁺/CD8⁺, a una mayor sobrevida (Gonzalez Rodríguez y col, 2010).

En conclusión, los estudios realizados sobre el tumor obtenido por inoculación subcutánea de las células EL-4, demuestran que el incrementado tamaño tumoral observado en ratones hipertiroideos se debe a la modulación por HTs de diversos mecanismos celulares. El hipertiroidismo induce un aumento en la proliferación de las células tumorales, posiblemente determinada por la regulación del ciclo celular, y un incremento en la angiogénesis tumoral, que facilita la llegada de nutrientes a las células y evita así la necrosis del tumor. Además, el infiltrado linfocitario tumoral también se encuentra reducido en ratones hipertiroideos lo que contribuye al crecimiento del tumor.

Sin embargo, todas estas características de los tumores de ratones hipertiroideos están frecuentemente asociadas a un incremento en la formación de metástasis (Gupta y Massague, 2006), contrario a lo que observamos en este trabajo, donde los ratones con hipotiroidismo experimental presentan un mayor desarrollo de metástasis. Por este motivo, evaluamos también en nuestros modelos experimentales otros factores que podrían estar relacionados con la modulación por el estado tiroideo del proceso metastásico.

5.4. Mecanismos por los cuales el estado tiroideo modula la generación de metástasis.

El proceso de metástasis es responsable de más del 90% de la mortalidad por cáncer, pero los mecanismos involucrados en esta etapa del desarrollo tumoral aún no están muy claros (Smith y Kang, 2013). Requiere una larga cadena de eventos, que incluyen la invasión, intravasación, supervivencia en la circulación, dispersión hacia tejidos distantes, extravasación hacia el parénquima y la colonización de órganos vitales. Cada uno de estos eventos limita el proceso, ya que una falla en alguno de ellos puede frenar el proceso completo (Gupta y Massague, 2006).

En este trabajo no evaluamos la formación de metástasis espontáneas, dado que el tumor sólido EL-4 es de crecimiento muy rápido, por lo que al tiempo en el que los ratones fueron sacrificados, rara vez se podían detectar. Sin embargo, a pesar de no poder realizar un análisis estadístico, la frecuencia de aparición de metástasis espontáneas en ratones hipotiroideos fue mayor que en los otros dos grupos experimentales, detectándose pequeños nódulos metastásicos en hígado (datos no mostrados). Por lo tanto, con el fin de analizar la diseminación de estas células, realizamos el test de metástasis experimentales, por el cual las células EL-4 inoculadas dan origen a metástasis en hígado y riñón (Nakagawa y col, 1998; Ding y col, 2001; Cruz-Munoz y col, 2006). Por su pequeño tamaño, la colonización preferencial de estos órganos no se debe a que las células queden atrapadas en la microcirculación hepática o renal, sino que está determinada por la interacción entre moléculas de adhesión específicas (Ding y col, 2001).

El test de metástasis experimentales permite evaluar como es el comportamiento de las células tumorales luego de su ingreso en circulación, ya que las células son inoculadas por vía endovenosa, lo que permite evaluar la supervivencia de estas células en la circulación sanguínea y su capacidad de dispersión hacia tejidos distantes, de extravasación hacia el parénquima y de colonización de órganos vitales.

Nuestros resultados indican que el estado tiroideo es capaz de modular la formación de metástasis, ya que se observaron diferencias en la generación de nódulos metastásicos entre ratones controles, hiper- e hipotiroideos. En particular, un menor número de ratones hipertiroideos desarrollaron metástasis hepáticas en comparación con los controles y los hipotiroideos, aunque la cantidad de ratones que desarrollaron metástasis renales fue similar en todos los grupos. Sin embargo, los ratones hipotiroideos presentaron una mayor cantidad de nódulos metastásicos en riñón que los controles y la diferencia fue aún mayor cuando se comparó con lo observado en ratones hipertiroideos.

Se ha estimado que sólo aproximadamente el 0,01% de las células tumorales que se intravasan a circulación sobreviven y establecen micrometástasis en sitios distantes (Joyce y Pollard, 2009). Estos bajos niveles de supervivencia de las células tumorales en circulación son atribuidos predominantemente al estrés mecánico, a la muerte celular por falta de contacto célula-célula o a la citotoxicidad mediada por células en la microcirculación (Gassmann y Haier, 2008).

Por lo tanto, una de las posibles explicaciones para nuestras observaciones sobre la modulación del desarrollo de metástasis por el estado tiroideo es el efecto de las HTs sobre el balance entre proliferación celular y apoptosis de las células EL-4. Como observamos *in vitro*, el tratamiento de estas células con HTs por tiempos cortos de cultivo induce un incremento en la proliferación celular, pero tratamientos más prolongados con las hormonas llevan a la apoptosis. En los tumores sólidos de ratones hipertiroideos también observamos una regulación positiva tanto de la proliferación celular como de la apoptosis, donde prevalece el efecto proliferativo, probablemente debido a la interacción con el microambiente tumoral. La supervivencia en circulación de la célula tumoral es una de las fases

más importantes en el proceso de metástasis. Y podría ocurrir que los niveles aumentados de HTs en ratones hipertiroideos induzcan la apoptosis de las células EL-4 en circulación algunos días después de ser inoculadas, lo que limitaría el establecimiento de metástasis. Mientras que los bajos niveles de HTs en el hipotiroidismo evitarían la muerte de células tumorales por apoptosis, por lo que el número de células en circulación permanecería elevado, existiendo una mayor probabilidad de que estas puedan extravasar y colonizar diferentes tejidos. Apoya esto lo observado por Mihara y col (2009) en células de sangre periférica humana de pacientes con enfermedad de Graves, quienes describieron una mayor apoptosis en linfocitos T circulantes que los provenientes de individuos eutiroideos.

Adicionalmente, en los tumores sólidos de los ratones hipertiroideos observamos un aumento en la expresión de MMPs, que relacionamos con niveles aumentados de angiogénesis localizada en este grupo experimental. Sin embargo, la actividad de las metaloproteasas se ha visto frecuentemente asociada también a los procesos de invasión y metástasis. Cumplen roles tanto en los procesos de migración de las células, como en el establecimiento de las mismas en tejidos distantes para luego formar las metástasis (Egeblad y Werb, 2002). Los niveles séricos aumentados de metaloproteasas en pacientes con melanoma se han visto asociados a una mayor progresión de los mismos, ya que facilita el desarrollo de metástasis (Nikkola y col, 2005). Sin embargo, a pesar de observarse una modulación en la expresión de las MMPs en los tumores de ratones hipertiroideos, la medición de la actividad de metaloproteasas en sueros de ratones con diferentes estados tiroideos inoculados con células EL-4, no arrojó diferencias entre los grupos experimentales.

Por otra parte, en cada paso del proceso de metástasis se requiere de la asociación y colaboración entre las células tumorales, células inmunes y otros componentes del microambiente tumoral (Smith y Kang, 2013). El sistema inmune puede actuar a nivel local sobre el tumor sólido o sobre las células tumorales durante la intravasación hacia el torrente sanguíneo. Pero también puede tener acciones a nivel sistémico, afectando a las células tumorales que se encuentran en la sangre o invadiendo órganos y tejidos. El rol del sistema inmune en estos

procesos no es sólo la eliminación de las células tumorales, sino por el contrario, puede tener efectos protumorales a través de la activación de células inmunosupresoras (Ruffell y col, 2010).

Como ya mencionamos previamente, el análisis de la composición de subpoblaciones linfocitarias en los ganglios drenantes de los tumores no mostró diferencias entre los grupos en estudio en relación a los porcentajes de células CD3+, CD19+ o NK. Sin embargo, pudimos detectar un incremento en el porcentaje de células Tregs en los ganglios drenantes de ratones hipotiroideos. Estas células están involucradas en el control de la inmunidad periférica e inducen la tolerancia inmunológica mediante la supresión de la inmunidad. Existen numerosas evidencias que indican un número elevado de Tregs en pacientes con tumores sólidos y algunas neoplasias hematológicas, lo que lleva a un microambiente inmunosupresor que reduce la respuesta inmune antitumoral en el paciente (Beyer y Schultze 2006). Sin embargo el rol de las Tregs en el desarrollo de linfomas aun no está del todo claro. En pacientes con leucemia linfocítica, por ejemplo, se ha visto un aumentado número de Tregs (Giannopoulos y col, 2008; Lad y col, 2013), que se incrementa progresivamente con el avance de la enfermedad (D'Arena y col, 2011). Sin embargo, en pacientes con linfoma folicular, la presencia de Tregs infiltrantes en los ganglios linfáticos involucrados predice una mayor sobrevida (Carreras y col, 2006). En linfomas Hodgkin un número reducido de Tregs está asociado a una peor prognosis de la enfermedad (Alvaro y col, 2005), mientras que en pacientes con mieloma múltiple se vieron reducidos tanto el número como la función de las Tregs (Prabhala y col, 2006).

El incremento de Tregs en los ganglios drenantes de tumores de ratones hipotiroideos podría estar relacionado con una supresión de la actividad de linfocitos T citotóxicos en ese sitio, lo que podría facilitar el escape de células tumorales desde el tumor sólido hacia la circulación y llevar finalmente a un mayor establecimiento y desarrollo de metástasis. Si bien en nuestro estudio el proceso de intravasación no estaría contemplado, el mayor número de metástasis espontáneas encontradas en ratones hipotiroideos podría ser atribuido a este hecho.

Adicionalmente, evaluamos la distribución de subpoblaciones de células inmunes en bazo de ratones portadores de tumor, como un indicador de la respuesta inmune sistémica inducida por la inoculación subcutánea del tumor. Tal como se vio en los ganglios linfáticos de los ratones hipertiroideos, el tamaño del bazo también se encuentra aumentado en este grupo experimental, lo que podría relacionarse con un mayor número de células inmunocompetentes en ratones hipertiroideos. Este agrandamiento del bazo se ha reportado previamente en algunos pacientes con hipertiroidismo y en animales tratados con T4 (Marynick, 1982; Hassman y col, 1985).

Los principales efectores de las respuestas inmunes antitumorales son los linfocitos T CD8⁺, que desempeñan una función de vigilancia identificando y destruyendo las células con potencial maligno a través del reconocimiento de antígenos extraños que les son presentados en asociación con moléculas del CMH de clase I (Mitra y col, 2003). Los linfocitos T CD4⁺ también pueden ejercer acciones antitumorales, colaborando con los linfocitos CD8⁺ o bien mediante el reconocimiento directo de los antígenos presentados en la superficie tumoral, seguido por la secreción de citoquinas de tipo Th1 o mediante una actividad citotóxica directa (Handrup y col, 2013). Por este motivo evaluamos en los bazo de ratones portadores de tumor la distribución de las subpoblaciones T involucradas en la respuesta antitumoral. No encontramos diferencias en la proporción de linfocitos T CD4⁺ ni CD8⁺ entre los tres grupos en estudio. Sin embargo, observamos una reducción en la actividad citotóxica específica contra células EL-4 de los esplenocitos de ratones hipotiroideos respecto a los otros dos grupos experimentales. Por lo tanto, los bajos niveles circulantes de HTs inhiben la actividad citotóxica de las células T CD8⁺, sin afectar su distribución en el bazo.

Además de las poblaciones de células T evaluamos también en los bazo de estos ratones la modulación por el estado tiroideo de la distribución de linfocitos B, dado que se ha descrito que intervienen en la inmunidad antitumoral, aunque el rol que cumplen en este tipo de respuesta aun no está del todo claro (Di Lillo y col, 2010). Se sabe que pueden inducir la regresión tumoral mediante diferentes mecanismos (Namm y col, 2012), pero también pueden inhibir la actividad de CTLs, a través de mecanismos regulatorios (Schioppa y col, 2011). En

comparación con el control, los bazos de ratones hipotiroideos presentaron una mayor proporción de células B, mientras que en los bazos de los ratones hipertiroideos se detectó un menor porcentaje de estas células.

Adicionalmente, evaluamos el rol de la inmunidad innata en la respuesta inmune frente a las células EL-4. Las células NK son de particular interés, ya que se ha visto que son capaces de eliminar células tumorales de circulación y son importantes durante las etapas de iniciación y de metástasis de diversos procesos neoplásicos (Smyth y col, 2002). Los bazos de ratones hipertiroideos presentaron una mayor proporción de células NK que los de ratones controles, lo que se vio acompañado de un incremento en la actividad citotóxica de estas células contra las células YAC-1. En los bazos de ratones hipotiroideos, por el contrario, observamos un menor porcentaje de células NK, sin modificaciones de su actividad citotóxica con respecto al control. Estos resultados indican que el estado tiroideo tiene un efecto también sobre la inmunidad innata, dado que altos niveles de HTs circulantes inducen un aumento en la respuesta inmune de las células NK, mientras que niveles bajos de HTs presentan el efecto contrario.

Además de la respuesta antitumoral, como ya mencionamos anteriormente, existen algunos componentes del sistema inmune que ejercen efectos inmunosupresores, induciendo la tolerancia inmunológica frente a un estímulo tumoral. Las células inmunosupresoras más importantes en la respuesta inmune antitumoral son las Tregs. Observamos un aumento de Tregs en los ganglios drenantes de ratones hipotiroideos, aunque no encontramos diferencias en la proporción de células Tregs en los bazos de los ratones con distintos estados tiroideos. Sin embargo, hallamos una disminución en la proporción de células supresoras de origen mieloide (MDSC) en bazos de ratones hipertiroideos.

Las MDSC componen otra población inmune fundamental para la supresión de la respuesta inmune antitumoral, cuyo mecanismo de acción es mediado por la producción de óxido nítrico y Arginasa-1. No existen muchos estudios clínicos que relacionen la presencia de células MDSC con el desarrollo de linfomas. Sin embargo, Tadmor y col (2013) han descripto un incremento de MDSC en la médula ósea de pacientes con linfomas B. Adicionalmente, en estudios realizados con animales, se ha visto que la inoculación de un linfoma T induce un incremento

en el número de MDSC tanto en el bazo como en circulación, pero el tratamiento con inhibidores del metabolismo de la arginasa lleva a un incremento en la respuesta inmune antitumoral, reduciendo el tamaño del tumor (Capuano y col, 2009). Se han detectado también MDSC intratumorales que producen quimiocinas que inducen la migración de las Tregs hacia el tumor y favorecen así el crecimiento de los linfomas inoculados en ratón (Schlecker y col, 2012). Por lo tanto, la disminución en los niveles de MDSC de los bazos de ratones hipertiroideos, lleva a reducir la inmunosupresión a nivel sistémico, lo que podría contribuir a la generación de una mejor respuesta antitumoral en este grupo experimental.

Nuestros resultados indican claramente que el estado tiroideo modula la respuesta antitumoral a nivel sistémico, lo que podría favorecer las diferencias observadas entre los distintos grupos experimentales en relación a la formación y desarrollo de metástasis. Estas observaciones, junto con la modulación mediada por el estado tiroideo del balance entre proliferación y apoptosis, podrían explicar cómo los niveles de HTs pueden afectar la diseminación de células de linfoma y la colonización de nuevos tejidos.

Sin embargo, aun quedan algunos pasos en el proceso de metástasis que deben ser estudiados en profundidad en nuestro modelo. En los últimos años ha surgido una amplia variedad de evidencias que sugieren que las células tumorales pueden adquirir características mesenquimales que les otorgan un fenotipo migratorio a través de un mecanismo denominado transición epitelio-mesenquimal (Polyak y Weinberg, 2009). Este fenotipo se origina por alteraciones en las cascadas de transducción de señales que activan factores de transcripción específicos (Smith y Kang, 2013). En este sentido, Martínez-Iglesias y col (2009) han observado en animales inoculados con un hepatocarcinoma o con células de cáncer de mama, que el hipotiroidismo incrementa el fenotipo mesenquimal en los tumores, lo que lleva finalmente a un aumento en la invasión y en la formación de metástasis. Esto está actualmente en estudio en nuestro laboratorio.

Adicionalmente, se ha descrito recientemente que algunos tumores tienen la capacidad de generar un ambiente inmunosupresor *per se* mediante la secreción de diversos factores. Entre ellos, factores solubles para moléculas efectoras que

bloquean la función de las células T (Groh y col, 2002), citoquinas que impiden el reconocimiento de las células tumorales por las células T o que desvían la respuesta inmune hacia un perfil Th2, que es menos efectiva contra las células tumorales (Smyth y col, 2004), o de otros factores como las galectinas, que impiden la actividad y supervivencia de las células T (Rubinstein y col, 2004). Sería de gran importancia evaluar si el estado tiroideo es capaz de modular en los tumores la producción de algunos de estos factores, ya que actualmente se están generando estrategias terapéuticas orientadas hacia la modificación del microambiente tumoral, que faciliten una respuesta inmune más efectiva en la destrucción del tumor durante las inmunoterapias (Devaud y col, 2013)

Por lo tanto, la comprensión de los factores que regulan la progresión tumoral y la relación entre las células tumorales y el microambiente tumoral, entre los que se encuentran las hormonas tiroideas, puede ser fundamental en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que contribuyan a un mejor pronóstico para el tratamiento de pacientes oncológicos.

6. Conclusiones

Los HTs son capaces de modular la fisiología de las células de linfoma T estudiadas, ejerciendo sobre las mismas un efecto dual. En base a los resultados obtenidos por el tratamiento *in vitro* de las células EL-4 con T4 y por la inoculación de estas células *in vivo* en modelos murinos de hiper- e hipotiroidismo, podemos concluir que:

1- Las HTs modulan *in vitro* el crecimiento de las células EL-4 de forma dual, dependiendo del tiempo de cultivo en presencia de la hormona:

- ✓ A tiempos cortos inducen un aumento en la proliferación celular, evidenciado por un aumento de PCNA entre las 12 y las 30 horas de cultivo.
- ✓ A tiempos largos, mayores de 5 días, inducen la apoptosis celular, mediada por la reducción de Bcl-2 y el aumento de Bad y la activación de caspasa 3.
- ✓ Estos efectos son mediados por la modulación de la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular, observándose un incremento tanto de ciclinas como de inhibidores de ciclinas y supresores tumorales.

2- El estado tiroideo modula el crecimiento y la diseminación tumoral, ya que:

- ✓ El hipertiroidismo lleva a un incremento en la velocidad de crecimiento tumoral.
- ✓ El hipotiroidismo induce una mayor diseminación tumoral, que se encuentra disminuida en ratones hipertiroideos.

Los **mecanismos involucrados** en estos efectos son:

En animales hipertiroideos (Figura 6.1):

- **El incremento en la velocidad de crecimiento tumoral** se debe a la regulación positiva del ciclo celular, del balance entre proliferación y apoptosis y de la angiogénesis, ya que en los tumores de estos ratones se observó:
 - ✓ Aumento en la expresión de las ciclinas D1, D3 y E1, junto con una reducción en la expresión de p16, p27 y p53, acompañado del aumento en el número de divisiones celulares, evidenciadas por la marcación de las células con CFSE.

- ✓ Aumento en el número de mitosis junto con un aumento en la expresión de PCNA que indican mayor proliferación, así como también aumento en la expresión de caspasa 3 activada y Bax que indican una mayor apoptosis.
 - ✓ Aumento en la angiogénesis peri- e intratumoral acompañado de un incremento en los niveles de expresión de CD31 y MMPs.
 - ✓ Disminución del infiltrado tumoral, compuesto a su vez por un menor porcentaje de células CD8⁺ y un mayor porcentaje de células CD19⁺.
- **La reducción de la diseminación tumoral**, lo que podría relacionarse con las siguientes observaciones:
- ✓ El tratamiento de las células por tiempos prolongados con HTs lleva a la apoptosis celular, lo que podría afectar la sobrevivencia de las células EL-4 en circulación.
 - ✓ El aumento en el porcentaje y actividad de células NK en bazo, que lleva a un aumento en la actividad citotóxica a nivel sistémico.
 - ✓ La disminución de MDSC en ratones hipertiroideos, lo cual reduce la inmunosupresión a nivel sistémico, favoreciendo la actividad citotóxica de las células inmunes.

En ratones hipotiroideos (Figura 6.2):

- Si bien **no se observaron diferencias en la velocidad de crecimiento tumoral** respecto de los tumores controles, dichos tumores evidenciaron algunas modificaciones en la regulación del ciclo celular y en el balance entre proliferación y apoptosis, no reflejadas en variaciones en el tamaño del tumor. Dichas alteraciones son:
- ✓ Disminución en el número de mitosis, junto con un aumento en los niveles de expresión de p16, p27 y p53, reguladores negativos del ciclo celular.
 - ✓ Disminución en la apoptosis celular por marcación con caspasa 3 activada, pero un incremento en el porcentaje de necrosis en el tejido tumoral.
 - ✓ Aumento en los niveles de expresión de Timp1, lo que sugiere que podría existir una regulación negativa la angiogénesis.

- **Un incremento en la diseminación tumoral**, relacionado con:
 - ✓ El aumento en el porcentaje de Tregs en GD de estos ratones, que indica un incremento de la inmunosupresión a nivel local, lo que podría facilitar el escape tumoral.
 - ✓ La disminución en la actividad citotóxica específica contra células EL-4 de los esplenocitos, lo que indica una reducida respuesta antitumoral a nivel sistémico.

Por lo tanto, en este trabajo de tesis hemos demostrado que el estado tiroideo es capaz de modular de forma dual el crecimiento de los linfomas T, dado que el hipertiroidismo induce un aumento en el tamaño de los tumores primarios, pero el hipotiroidismo lleva a una mayor diseminación. Estos resultados no sólo contribuyen al conocimiento de la linfomagénesis T, sino que además sugieren la importancia de monitorear los niveles hormonales en pacientes con esta patología. Asimismo podrían sentar las bases para proponer la modulación del eje tiroideo como coadyuvante de las quimioterapias que actualmente se emplean en el tratamiento de linfomas.

Figura 6.1. Efecto del hipertiroidismo sobre el crecimiento y diseminación celular

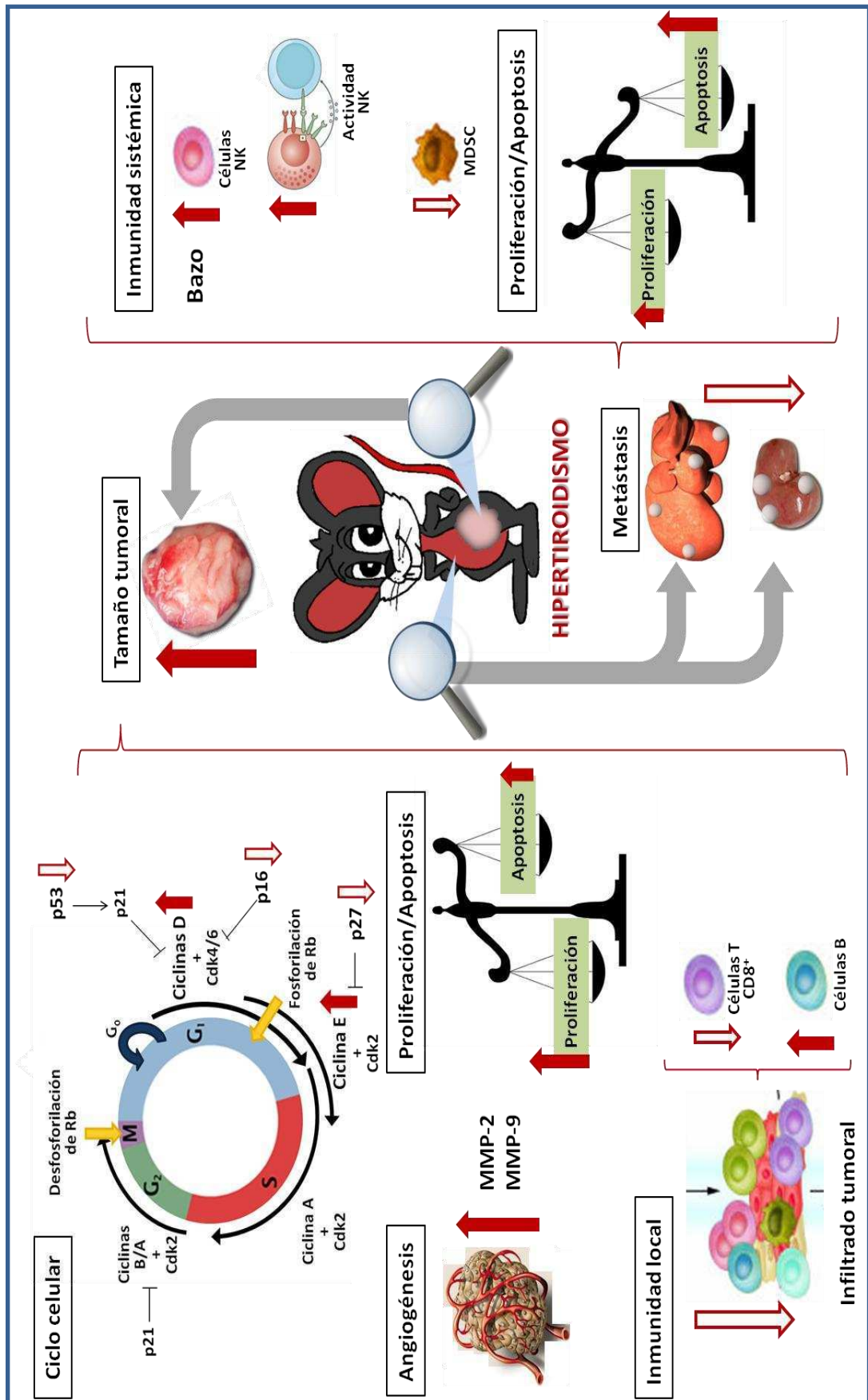
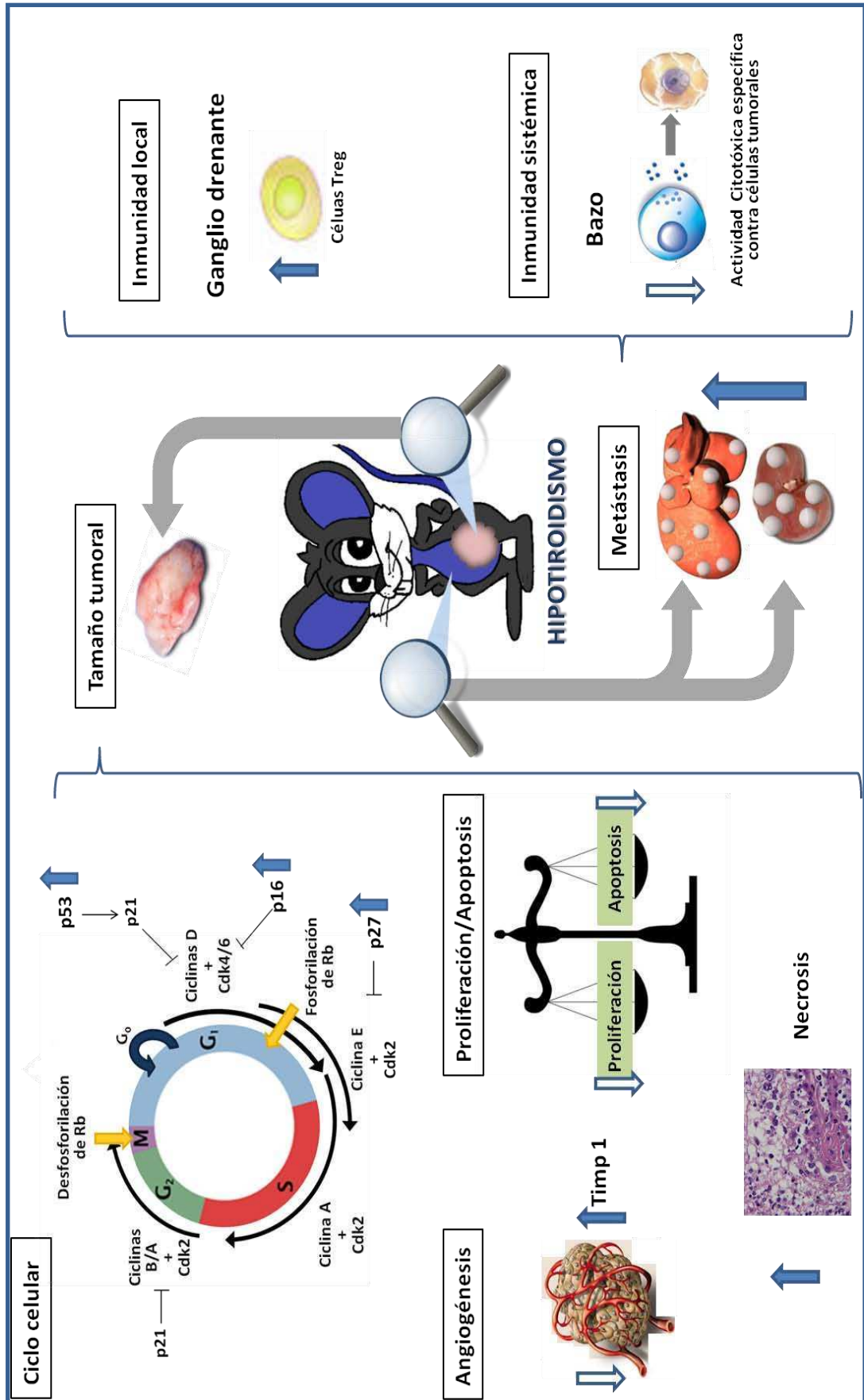


Figura 6.2. Efecto del hipotiroidismo sobre el crecimiento y diseminación celular



7. Abreviaturas

ADCC , citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos	CTL , linfocito T citotóxico
ADN , ácido desoxirribonucleico	DBD , dominio de unión al ADN
ADNc , ácido desoxirribonucleico complementario	DCs , Células dendríticas
AILT , linfoma de células grandes anaplásico	DIT , diiodotirosinas
ALCL , linfoma de células T angioinmunoblástico	DMBA , 7,12-dimetilbenzantraceno
AMPc , adenosina monofosfato ciclica	DR5 , receptor de muerte 5
Ang-1 , angiopoyeina 1	ER , receptor de estrógenos
Ang-2 , angiopoyetina 1	ERK1/2 , quinasa reguladora de señales extracelulares 1/2
ANOVA , análisis de varianza	ER-α , receptor de estrógenos α
Apaf-1 , factor de activación de proteasas apoptóticas 1	ES , error estándar
APCs , células presentadoras de antígenos	FGF , factor de crecimiento de fibroblastos
ARG1 , arginasa 1	FITC , isotiocianato de fluoresceína
ARN , ácido ribonucleico	FoxP3 , forkhead box P3 (factor de transcripción)
ARNm , ARN mensajero	FSH , hormona folículo estimulante
ATP , adenosina trifosfato	GD , ganglio drenante
ATPasa , adenosina trifosfatasa	GLUT1 , transportador de glucosa 1
Breg , linfocitos B regulatorios	GND , ganglio no drenante
C57 , cepa C57Bl/6	H&E , hematoxilina y eosina
CD , <i>cluster</i> de diferenciación	HIF1α , factor inducible por hipoxia
CD40L , ligando de CD40	Hiper , hipertiroideos
CDC , citotoxicidad dependiente de complemento	Hipo , hipotiroideos
Cdk , quinasa dependiente de ciclinas	HPT , hipotálamo-pituitario-adrenal
Cdkl , inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas	HTs , hormonas tiroideas
CFSE , Carboxifluorescein Diacetato Succinimidil Ester	ICAM-1 , molécula de adhesión intracelular 1
CIP , proteína de interacción con Cdk	IDO , indolamina 2,3-dioxigenasa
CMH , complejo mayor de histocompatibilidad	IFM , intensidad de fluorescencia media
CMH-I , complejo mayor de histocompatibilidad de clase I	IFN , interferón
CMH-II , complejo mayor de histocompatibilidad de clase II	IHQ , Inmunohistoquímica
CpG , citosina fosfodiéster guanina oligodeoxinucleótidos;	IL , interleuquina
	iNOS , óxido nítrico sintasa inducible
	IP , yoduro de propidio
	KIP , proteína inhibitoria de quinasas
	LBD , dominio de unión al ligando
	LFA-1 , antígeno asociado a la función linfocitaria 1

LH , hormona leuteneizante	Rb , retinoblastoma
LPS , lipopolisacáridos	ROS , especies reactivas del oxígeno
L-T4 , L-Tiroxina	RPMI , medio Roswell Park Memorial Institute
MAPK , proteínas quinasas activadas por mitógenos	RXR , receptor X retinoide
MDSC , células supresoras de origen mieloide	SFB , suero fetal bovino
MICA/B , antígenos relacionados a CMH clase I A y B	sMICA/B , MICA/B soluble
MIT , moniodotirosinas	SN , sistema nervioso
MMPs , metaloproteasas de matriz	SNC , sistema nervioso central
NIS , simporter Na ⁺ /I ⁻	STAT-1α , transductores de señales y activadores de la transcripción 1 α
NK , células <i>natural killer</i> , asesinas naturales	T3 , L-triiodotironina
NKT , células T <i>natural killer</i>	T4 , L-tiroxina
NOS , óxido nítrico sintasa	TBG , globulina transportadora de HTs
NPV , núcleo paraventricular	TCR , receptor de células T
PBS , buffer fosfato salino	Tg , tiroglobulina
PCNA , antígeno nuclear de proliferación celular	TGFβ , factor de crecimiento transformante β
PCR , reacción en cadena de la polimerasa	Th , célula T colaboradora
PE , ficoeritrina	TIL , linfocitos infiltrantes del tumor
PI3K , fosfatidil inositol 3 quinasa	Timp , inhibidores tisulares de metaloproteasas
PIP₃ fosfatidilinositol (3, 4, 5)-trifosfato (PIP ₃)	TNF , factor de necrosis tumoral
PKB , proteína quinasa B	TPO , peroxidasa tiroidea
PKC , proteína quinasa C	TRAIL , ligando relacionado a TNF inductor de apoptosis
PLC , fosfolipasa C	TRE , elementos de respuesta a hormona tiroidea
PTCL , linfoma de células T periféricas	Tregs , células T regulatorias
PTCL-NOS , linfoma de células T periféricas no especificado de otro modo	TRH , Hormona liberadora de tirotrófina;
PTEN , homólogo de fosfatasa y tensina	TRs , receptores clásicos para HTs TSH
PTU , propiltiouracilo	TSH , tirotrófina
qRT-PCR , reacción de cadena de la polimerasa cuantitativa con retrotranscripción	TTR , transtiretina
RAE1 , transcripto temprano de ácido retinoico 1	ULBP , proteína de unión a UL16
	VEGF , factor de crecimiento del endotelio vascular
	VIH , virus de inmunodeficiencia humana

8. Bibliografía

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. (2000) *Inmunología Celular y Molecular*. Editorial McGraw Hill Interamericana, 4° Edición.
- Agostinelli C, Piccaluga PP, Went P, Rossi M, Gazzola A, Righi S, Sista T, Campidelli C, Zinzani PL, Falini B, Pileri SA (2008). Peripheral T cell lymphoma, not otherwise specified: the stuff of genes, dreams and therapies. *J. Clin. Pathol.* 61: 1160-1167.
- Alisi A, Demori I, Spagnuolo S, Pierantozzi E, Fugassa E, Leoni S. (2005). Thyroid status affects rat liver regeneration after partial hepatectomy by regulating cell cycle and apoptosis. *Cell Physiol Biochem.* 15(1-4):69-76.
- Alisi A, Demori I, Spagnuolo S, Pierantozzi E, Fugassa E, Leoni S. (2005) Thyroid status affects rat liver regeneration after partial hepatectomy by regulating cell cycle and apoptosis. *Cell Physiol Biochem.* 15(1-4):69-76.
- Alvaro T, Lejeune M, Salvadó MT, Bosch R, García JF, Jaén J, Banham AH, Roncador G, Montalbán C, Piris MA. (2005) Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. *Clin Cancer Res.* 11(4):1467-73.
- André S, Tough DF, Lacroix-Desmazes S, Kaveri SV, Bayry J. (2009) Surveillance of antigen-presenting cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells in autoimmunity: immunopathogenesis and therapeutic implications. *Am J Pathol.* 174(5):1575-87.
- Angelousi AG, Anagnostou VK, Stamatakis MK, Georgiopoulos GA, Kontzoglou KC. (2012) Mechanisms in endocrinology: primary HT and risk for breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Endocrinol.* 166(3):373-81.
- Ansell SM, Stenson M, Habermann TM, Jelinek DF, Witzig TE. (2001). CD4+ T-cell immune response to large B -cell non-Hodgkin's lymphoma predicts patient outcome. *J. Clin. Oncol.* 19:720 -726.
- Antonioli L, Pacher P, Vizi ES, Haskó G. (2013) CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med.* 19(6):355-67.
- Aranda A y Pascual A. (2001) Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev.* 81(3): 1269-304.
- Armitage JO (2013) The aggressive peripheral T-cell lymphomas. *Am J Hematol.* 88(10):910-918
- Aspeshlagh S, Nemcovic M, Pauwels N, Venken K, Wang J, Van Calenbergh S, Zajonc DM, Elewaut D. (2013) Enhanced TCR footprint by a novel glycolipid increases NKT-dependent tumor protection. *J Immunol.* 191(6): 2916-25.
- Ayres FM, Narita M, Takahashi M, Alldawi L, Liu A, Osman Y, Abe T, Yano T, Sakaue M, Toba K, Furukawa T, Aizawa Y. (2003) A comparative study of the JAM test and 51Cr-release assay to assess the cytotoxicity of dendritic cells on hematopoietic tumor cells. *Immunol. Invest.* 32: 219-227.
- Balazs C, Leovey A, Szabo M, Bako G. (1980). Stimulating effect of triiodothyronine on cell-mediated immunity. *Eur J Clin Pharmacol* 17:19-23.
- Balkwill F, Montfort A, Capasso M. (2013) B regulatory cells in cancer. *Trends Immunol.* 34(4):169-73.
- Ballardin M, Barsacchi R, Bodei L, Caraccio N, Cristofani R, Di Martino F, Ferdeghini M, Kusmic C, Madeddu G, Monzani F, Rossi AM, Sbrana I, Spanu A, Traino C, Barale R. (2004) Oxidative and genotoxic damage after radio-iodine therapy of Graves' hyperthyroidism. *Int J Radiat Biol.* 80(3):209-16.

- Ballardin M, Gemignani F, Bodei L, Mariani G, Ferdeghini M, Rossi AM, Migliore L, Barale R. (2002) Formation of micronuclei and of clastogenic factor(s) in patients receiving therapeutic doses of iodine-131. *Mutat Res.* 514(1-2):77-85
- Barreiro Arcos ML, Gorelik G, Klecha A, Genaro AM, Cremaschi GA. (2006) Thyroid hormones increase inducible nitric oxide synthase gene expression downstream from PKC-zeta in murine tumor T lymphocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* (2):C327-36.
- Barreiro Arcos ML, Sterle HA, Paulazo MA, Valli E, Klecha AJ, Isse B, Pellizas CG, Farias RN, Cremaschi GA. (2011) Cooperative nongenomic and genomic actions on thyroid hormone mediated-modulation of T cell proliferation involve up-regulation of thyroid hormone receptor and inducible nitric oxide synthase expression. *J Cell Physiol.* 226(12):3208-18.
- Barreiro Arcos ML, Sterle HA, Vercelli C, Valli E, Cayrol MF, Klecha AJ, Paulazo MA, Diaz Flaqué MC, Franchi AM, Cremaschi GA (2013). Induction of apoptosis in T lymphoma cells by long-term treatment with thyroxine involves PKC ζ nitration by nitric oxide synthase. *Apoptosis.*
- Barrera-Hernandez G, Park KS, Dace A, Zhan Q, Cheng SY. (1999) Thyroid hormone-induced cell proliferation in GC cells is mediated by changes in G1 cyclin/cyclin-dependent kinase levels and activity. *Endocrinology.* 140(11):5267-74.
- Bartkova J, Zemanova M, Bartek J. (1996) Abundance and subcellular localisation of cyclin D3 in human tumors. *Int J Cancer* 1996;65:323–327.
- Bassett J, Harvey C, Williams G. (2003). Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. *Mol Cell Endocrinol.* 213(1):1-11.
- Beatson, GT. (1896) On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: Suggestions for a new method of treatment, with illustrative cases. *The Lancet* 148 (3802):104–107. Publicado originalmente como volumen 2, artículo 3802.
- Bergh JJ, Lin HY, Lansing L, Mohamed SN, Davis FB, Mousa S, Davis PJ. (2005) Integrin α V β 3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology.* 146(7):2864-71.
- Besedovsky H y del Rey A. (2007) Named Series: Twenty Years of Brain, Behavior, and Immunity. *Physiology of psychoneuroimmunology: A personal view.* Brain, Behavior, and Immunity, 21: 34–44.
- Beyer M, Schultze JL. (2006) Regulatory T cells in cancer. *Blood.* 108(3):804-11.
- Biswas SK, Mantovani A. (2010) Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol.* 11(10):889-96.
- Bloehr H, Bregengaard C, Povlsen JV. (1992) Triiodothyronine stimulates growth of peripheral blood mononuclear cells in serumfree cultures in uremic patients. *Am J Nephrol* 12(3):148-154.
- Borek C, Guernsey DL, Ong A, Edelman IS. (1983) Critical role played by thyroid hormone in induction of neoplastic transformation by chemical carcinogens in tissue culture. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 80:5749–5752.
- Brown RS. (2013) Autoimmune thyroiditis in childhood. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 5 Suppl 1:45-9.
- Brtko J, Filipčík P, Knopp J, Sedláková V, Rauová L. (1992) Thyroid hormone responsiveness of the L1210 murine leukemia cell line. *Acta Endocrinol (Copenh),* 126: 374-377.

- Burnet FM. (1970) The concept of immunological surveillance. *Prog. Exp. Tumor Res.* 13: 1-27.
- Buschges R, Weber RG, Actor B, Lichter P, Collins VP, Reifenberger G. (1999) Amplification and expression of cyclin D genes (cyclin D1, CCND2 and cyclin D3) in human malignant gliomas. *Brain Pathol* 9:435–442.
- Capuano G, Rigamonti N, Grioni M, Freschi M, Bellone M. (2009) Modulators of arginine metabolism support cancer immunosurveillance. *BMC Immunol.* 10:1.
- Carr F, Reid A, Wessendorf M. (1993) A cryptic peptide from the preprothyrotropin-releasing hormone precursor stimulates thyrotropin gene expression. *Endocrinology* 133: 809-14.
- Carreras J, Lopez-Guillermo A, Fox BC, Colomo L, Martinez A, Roncador G, Montserrat E, Campo E, Banham AH. (2006) High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Blood.* 108(9):2957-64.
- Casimiro MC, Pestell RG. (2012) Cyclin d1 induces chromosomal instability. *Oncotarget.* 3(3):224-225.
- Catalano V, Turdo A, Di Franco S, Dieli F, Todaro M, Stassi G. (2013) Tumor and its microenvironment: A synergistic interplay. *Semin Cancer Biol.* pii: S1044-579X(13)00083-7.
- Chatterjee S y Chandel AS. (1983). Immunomodulatory role of thyroid hormones: in vivo effect of thyroid hormones on the blastogenic response to lymphoid tissue. *Acta Endocrinológica*, 103: 95-100.
- Chattaway JM y Klepser TB. (2007) Propylthiouracil versus methimazole in treatment of Graves' disease during pregnancy. *Ann Pharmacother.* 41(6):1018-22.
- Chatterjee S, Chandel AS. (1983) Immunomodulatory role of thyroid hormones: in vivo effect of thyroid hormones on the blastogenic response to lymphoid tissue. *Acta Endocrinologica* 103:95–100.
- Chatterjee S, Chandel AS. (1983) Immunomodulatory role of thyroid hormones: in vivo effect of thyroid hormones on the blastogenic response to lymphoid tissue. *Acta Endocrinologica.* 103: 95–100.
- Cheng N, van de Wetering CI, Knudson CM. (2008) p27 deficiency cooperates with Bcl-2 but not Bax to promote T-cell lymphoma. *PLoS One.* 3(4):e1911.
- Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ. (2010) Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev.* 31(2):139-70
- Chi HC, Chen SL, Liao CJ, Liao CH, Tsai MM, Lin YH, Huang YH, Yeh CT, Wu SM, Tseng YH, Chen CY, Tsai CY, Chung IH, Chen WJ, Lin KH. (2012) Thyroid hormone receptors promote metastasis of human hepatoma cells via regulation of TRAIL. *Cell Death Differ.* 19(11):1802-14.
- Chiloeches A, Sánchez-Pacheco A, Gil-Araujo B, Aranda A, Lasa M (2008) Thyroid hormone-mediated activation of the ERK/dual specificity phosphatase 1 pathway augments the apoptosis of GH4C1 cells by down-regulating nuclear factor-kappaB activity. *Mol Endocrinol* 22(11):2466–2480. doi:10.1210/me.2008-0107
- Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, Green DR. (2004) Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membraneporabilization and apoptosis. *Science.* 303(5660):1010-4.
- Corbetta S, Eller-Vainicher C, Vicentini L, Lania A, Mantovani G, Beck-Peccoz P, Spada A. (2007). Modulation of cyclin D1 expression in human tumoral parathyroid cells:

- effects of growth factors and calcium sensing receptor activation. *Cancer Lett.* 255(1):34-41.
- Coto CE (2007) Inhibición de la apoptosis de los linfocitos como nueva forma de combatir enfermedades infecciosas graves. *Revista Química Viva*, 1: 9-16
- Cox LS. (1997) Multiple pathways control cell growth and transformation: overlapping and independent activities of p53 and p21Cip1/WAF1/Sdi1. *J Pathol.* 183(2):134-40.
- Cristofanilli M, Yamamura Y, Kau SW, Bevers T, Strom S, Patangan M, Hsu L, Krishnamurthy S, Theriault RL, Hortobagyi GN. (2005) Thyroid hormone and breast carcinoma. Primary hypothyroidism is associated with a reduced incidence of primary breast carcinoma. *Cancer.* 103(6):1122-8.
- Cruz-Munoz W, Sanchez OH, Di Grappa M, English JL, Hill RP, Khokha R. (2006) Enhanced metastatic dissemination to multiple organs by melanoma and lymphoma cells in *timp-3*^{-/-} mice. *Oncogene.* 25(49):6489-96.
- D'Arena G, Laurenti L, Minervini MM, Deaglio S, Bonello L, De Martino L, De Padua L, Savino L, Tarnani M, De Feo V, Cascavilla N. (2011) Regulatory T-cell number is increased in chronic lymphocytic leukemia patients and correlates with progressive disease. *Leuk Res.* 35(3):363-8.
- Darras VM, Van Herck SL. (2012) Iodothyronine deiodinase structure and function: from ascidians to humans. *J Endocrinol.* 215(2):189-206.
- Davis F, Tang H, Shih A, Keating T, Lansing L, Hercbergs A, Fenstermaker R, Mousa A, Mousa S, Davis P, Lin H. (2006). Acting via a cell surface receptor, thyroid hormone is a growth factor for glioma cells. *Cancer Res.*, 66(14): 7270-5.
- Davis FB, Mousa SA, O'Connor L, Mohamed S, Lin HY, Cao HJ, Davis PJ. (2004) Proangiogenic action of thyroid hormone is fibroblast growth factor-dependent and is initiated at the cell surface. *Circ Res.* 94(11):1500-6.
- Davis P, Davis F, Mousa S, Luidens M, Lin H. (2011). Membrane receptor for thyroid hormone: physiologic and pharmacologic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 51:99-115.
- Davis PJ, Leonard JL, Davis FB. (2008) Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Front Neuroendocrinol.* 29(2):211-8.
- Davis SL. (1998). Environmental modulation of the immune system via the endocrine system. *Domestic Animal Endocrinology* 15: 283-289.
- de Leval L, Gaulard P (2011) Tricky and Terrible T-Cell Tumors: These are Thrilling Times for Testing: Molecular Pathology of Peripheral T-Cell Lymphomas. *Hematology* 2011: 336-343.
- de Leval L, Gaulard P. (2011) Tricky and Terrible T-Cell Tumors: These are Thrilling Times for Testing: Molecular Pathology of Peripheral T-Cell Lymphomas. *Hematology* 2011: 336-343.
- Dearden CE, Jonson R, Pettengell R, Devereux S, Cwynarski K, Whittaker S, McMillan A, British Committee for Standards in Haematology (2011) Guidelines for the management of mature T-cell and NK-cell neoplasms (excluding cutaneous T-cell lymphoma). *Br J Haematol* 153: 451–485.
- Dearden CE, Jonson R, Pettengell R, Devereux S, Cwynarski K, Whittaker S, McMillan A, British Committee for Standards in Haematology. (2011) Guidelines for the management of mature T-cell and NK-cell neoplasms (excluding cutaneous T-cell lymphoma). *Br J Haematol* 153: 451–485.

- Devaud C, John LB, Westwood JA, Darcy PK, Kershaw MH. (2013) Immune modulation of the tumor microenvironment for enhancing cancer immunotherapy. *Oncoimmunology*. 2(8):e25961.
- DiLillo DJ, Yanaba K, Tedder TF. (2010) B cells are required for optimal CD4+ and CD8+ T cell tumor immunity: therapeutic B cell depletion enhances B16 melanoma growth in mice. *J Immunol*. 184(7):4006-16.
- Ding L, Sunamura M, Kodama T, Yamauchi J, Duda DG, Shimamura H, Shibuya K, Takeda K, Matsuno S. (2001) In vivo evaluation of the early events associated with liver metastasis of circulating cancer cells. *Br J Cancer*. 85(3):431-8.
- Dişel U, Beşen A, Karadeniz C, Mertsoylu H, Sezer A, Köse F, TanerSümbül A, Gürkut O, Muallaoğlu S, Abali H, Ozyilkan O. (2012) Prevalence of thyroid dysfunction in untreated cancer patients: a cross-sectional study. *Med Oncol*. 29(5):3608-13.
- Dogliani C, Chiarelli C, Macrí E, Dei Tos AP, Meggiolaro E, Dalla Palma P, Barbareschi M. (1998) Cyclin D3 expression in normal, reactive and neoplastic tissues. *J Pathol*. 185(2):159-66.
- Dorshkind K y Horseman N. (2000) The roles of prolactin, growth hormone, insulin like growth factor-1, and thyroid hormones in lymphocyte development and function: insights from genetic models of hormone and hormone receptor deficiency. *Endocrine Reviews* 21: 292-312.
- Dorshkind K y Horseman ND. (2001) Anterior pituitary hormones, stress, and immune system homeostasis. *Bioessays* 23: 288-294.
- Dumont J, Opitz R, Christophe D, Vassart G, Roger P, Maenhaut C. (2008) Chapter 1 – The Phylogeny, Ontogeny, Anatomy and Regulation of the Iodine Metabolizing Thyroid. De Groot L, *Thyroid Disease Manager*.
- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. (2002) Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 3(11):991-8.
- Egeblad M, Werb Z. (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2(3):161-74.
- Eischen CM, Rehg JE, Korsmeyer SJ, Cleveland JL. (2002) Loss of Bax alters tumor spectrum and tumor numbers in ARF-deficient mice. *Cancer Res*. 62(7):2184-91.
- el-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, Pietsenpol JA, Burrell M, Hill DE, Wang Y, et al. (1994). WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res*. 54: 1169-1174.
- El-Shaikh KA, Gabry MS, Othman GA. (2006) Recovery of age-dependent immunological deterioration in old mice by thyroxine treatment. *J Anim Physiol Anim Nutr* 2006; 90: 244-54.
- Fabiani R, Rosignoli P, De Bartolomeo A, Fuccelli R, Morozzi G. (2008) Inhibition of cell cycle progression by hydroxytyrosol is associated with upregulation of cyclin-dependent protein kinase inhibitors p21(WAF1/Cip1) and p27(Kip1) and with induction of differentiation in HL60 cells. *J Nutr*. 138(1):42-8.
- Fabris N, Mocchegiani E, Provinciali M. (1995) Pituitary-thyroid axis and the immune system: a reciprocal neuroendocrine-immune interaction. *Hormone Research*. 43: 29-38.
- Fabris N, Mocchegiani E, Provinciali M. (1995) Pituitary-thyroid axis and immune system: a reciprocal neuroendocrine-immune interaction. *Hormone Research* 43:29–38.
- Fabris N. (1973) Immunodepression in thyroid-deprived animals. *Clin Exp Immunol*. 15(4): 601-611.

- Faggiano A, Del Prete M, Marciello F, Marotta V, Ramundo V, Colao A. (2011) Thyroid diseases in elderly. *Minerva Endocrinol.* 36(3):211-31.
- Figuerola-Vega N, Sanz-Cameno P, Moreno-Otero R, Sánchez-Madrid F, González-Amaro R, Marazuela MJ. (2009) Serum levels of angiogenic molecules in autoimmune thyroid diseases and their correlation with laboratory and clinical features. *Clin Endocrinol Metab.* 94(4):1145-1153.
- Floor SL, Dumont JE, Maenhaut C, Raspe E. (2012) Hallmarks of cancer: of all cancer cells, all the time? *Trends Mol Med.* 18(9):509-15.
- Folkman J. (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med.* 1(1):27-31.
- Foss FM, Zinzani PL, Vose JM, Gascoyne RD, Rosen ST, Tobinai K (2011) Peripheral T-cell lymphoma. *Blood.* 117: 6756-6767.
- Foss FM, Zinzani PL, Vose JM, Gascoyne RD, Rosen ST, Tobinai K. (2011) Peripheral T-cell lymphoma. *Blood.* 117: 6756-6767.
- Foster M, Jensen E, Montecino Rodríguez E, Leathers H, Horseman N and Dorshkind K. (2000). Humoral and cell-mediated immunity in mice with genetic deficiencies of prolactin, growth hormone, insulin like growth factor I, and thyroid hormone. *Clinical Immunology*, 96: 140-149.
- Franklyn JA. (1999) Thyroid disease and its treatment: short- and long-term consequences. *J R Coll Physicians Lond.* 33(6):564-7.
- Frick LR, Rapanelli M, Bussmann UA, Klecha AJ, Arcos ML, Genaro AM, Cremaschi GA. (2009) Involvement of thyroid hormones in the alterations of T-cell immunity and tumor progression induced by chronic stress. *Biol Psychiatry* 65:935-42.
- Gaitonde DY, Rowley KD, Sweeney LB. (2012) Hypothyroidism: an update. *Am Fam Physician.* 86(3):244-51.
- Galderisi U, Jori FP, Giordano A. (2003) Cell cycle regulation and neural differentiation. *Oncogene.* 22(33):5208-19.
- Gassmann P, Haier J. (2008) The tumor cell–host organ interface in the early onset of metastatic organ colonisation. *Clin Exp Metastasis* 25:171–181.
- Geffner DL, Azukizawa M, Hershman JM. (1975) Propylthiouracil blocks extrathyroidal conversion of thyroxine to triiodothyronine and augments thyrotropin secretion in man. *J Clin Invest.* 55(2):224-9
- Geisen C, Karsunky H, Yücel R, Möröy T. (2003) Loss of p27(Kip1) cooperates with cyclin E in T-cell lymphomagenesis. *Oncogene.* 22(11):1724-9.
- Geisen C., Karsunky H., Yücel R., Möröy T. (2003). Loss of p27(Kip1) cooperates with cyclin E in T-cell lymphomagenesis. *Oncogene.* 22: 1724-1729.
- Ghahremani MF, Goossens S, Nittner D, Bisteau X, Bartunkova S, Zwolinska A, Hulpiau P, Haigh K, Haenebalcke L, Drogat B, Jochemsen A, Roger PP, Marine JC, Haigh JJ. (2013) p53 promotes VEGF expression and angiogenesis in the absence of an intact p21-Rb pathway. *Cell Death Differ.* 20(7):888-97
- Giani C, Fierabracci P, Bonacci R, Gigliotti A, Campani D, De Negri F, Cecchetti D, Martino E, Pinchera A. (1996). Relationship between breast cancer and thyroid disease: relevance of autoimmune thyroid disorders in breast malignancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 81(3):990-4.
- Giannopoulos K, Schmitt M, Kowal M, Wlasiuk P, Bojarska-Junak A, Chen J, Rolinski J, Dmoszynska A. (2008) Characterization of regulatory T cells in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Oncol Rep.* 20(3):677-82.

- Gogakos A, Duncan Bassett J, Williams G (2010). Thyroid and bone. *Arch Biochem Biophys.* 503 (1): 129-36.
- Gonzalez-Rodriguez AP, Contesti J, Huergo-Zapico L, Lopez-Soto A, Fernández-Guizán A, Acebes-Huerta A, Gonzalez-Huerta AJ, Gonzalez E, Fernandez-Alvarez C, Gonzalez S. (2010) Prognostic significance of CD8 and CD4 T cells in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 51(10):1829-36.
- Goodman AD, Hoekstra SJ, Marsh PS. (1980). Effects of hypothyroidism on the induction and growth of mammary cancer induced by 7,12-dimethylben(a)anthracene in the rat. *Cancer Res*, 40:2336–2342.
- Gore A y Roberts L. *Neuroendocrine Systems*, en Bloom F, McConnel S, Roberts J, Spitzer N, Zigmond M (Eds). (2003) *Fundamental neuroscience-2nd edition* (Chapter 40). Academic Press (An imprint of Elsevier Science), pp1031-1037.
- Grasberger H, Refetoff S. (2011) Genetic causes of congenital hypothyroidism due to dysghormonogenesis. *Curr Opin Pediatr.* 23(4):421-8.
- Graves P y Davies T. New insights into the thyroid-stimulating hormone receptor. The major antigen of Graves' disease. (2000) *Endocrinol Metab Clin North Am.* 29(2): 267-86.
- Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. (2002) Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature.* 419:734-8.
- Grossmann M, Weintraub B, Szkudlinski M. (1997) Novel insights into the molecular mechanisms of human thyrotropin action: structural, physiological, and therapeutic implications for the glycoprotein hormone family. *Endocr Rev.*18: 476-501.
- Guernsey DL, Ong A, Borek C. (1980) Thyroid hormone modulation of X-rayinduced in vitro neoplastic transformation. *Nature (London)*, 288: 591–592.
- Gupta GP, Massagué J. (2006) Cancer metastasis: building a framework. *Cell.* 127(4):679-95.
- Hadrup S, Donia M, Thor Straten P. (2013) Effector CD4 and CD8 T cells and their role in the tumor microenvironment. *Cancer Microenviron.* 6(2):123-33.
- Hadrup S, Donia M, Thor Straten P. (2013) Effector CD4 and CD8 T cells and their role in the tumor microenvironment. *Cancer Microenviron.* 6(2):123-33.
- Hallengren B, Forsgren A, Melander A. (1980) Effects of antithyroid drugs on lymphocyte function in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.*51(2):298-301.
- Hammacher A, Thompson EW, Williams ED (2005) Interleukin-6 is a potent inducer of S100P, which is up regulated in androgen-refractory and metastasis prostate cancer. *Int J Biochem Cell Biol.* 37: 442–450.
- Hanahan D, Weinberg RA. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell.* 100: 57-70.
- Hanahan D, Weinberg RA. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 144(5):646-74.
- Hannon GJ, Beach D. (1994) p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature.* 371:257–261.
- Harbour JW, Dean DC. (2000) Chromatin remodeling and Rb activity. *Curr Opin Cell Biol.* 12(6):685-9.
- Harbour JW, Dean DC. (2000) Chromatin remodeling and Rb activity. *Curr Opin Cell Biol.* 12(6):685-9.

- Hassman R, Weetman AP, Gunn C, Stringer BM, Wynford-Thomas D, Hall R, McGregor AM. (1985) The effects of hyperthyroidism on experimental autoimmune thyroiditis in the rat. *Endocrinology*. 116(4):1253-8.
- Hayslip J, Montero A. (2006) Tumor suppressor gene methylation in follicular lymphoma: a comprehensive review. *Mol Cancer*. 5:44.
- He W, Wang X, Chen L, Guan X. (2012) A crosstalk imbalance between p27(Kip1) and its interacting molecules enhances breast carcinogenesis. *Cancer Biother Radiopharm*. 27(7):399-402
- Hellevik AI, Asvold BO, Bjørø T, Romundstad PR, Nilsen TI, Vatten LJ. (2009) Thyroid function and cancer risk: a prospective population study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 18(2):570-4.
- Hercbergs A. (1996) The thyroid gland as an intrinsic biologic response-modifier in advanced neoplasia--a novel paradigm. *In Vivo*. 10(2):245-7.
- Hercbergs A. (1999) Spontaneous remission of cancer--a thyroid hormone dependent phenomenon? *Anticancer Res*. 19(6A):4839-44.
- Hercbergs y col, 2010
- Hernando E, Nahlé Z, Juan G, Diaz-Rodriguez E, Alaminos M, Hemann M, Michel L, Mittal V, Gerald W, Benezra R, Lowe SW, Cordon-Cardo C. (2004) Rb inactivation promotes genomic instability by uncoupling cell cycle progression from mitotic control. *Nature*. 430(7001):797-802.
- Hodkinson CF, Simpson EEA, Beattie JH, O'Connor JM, Campbell DJ, Strain JJ, Wallace JM. (2009) Preliminary evidence of immune function modulation by thyroid hormones in healthy men and women aged 55–70 years. *J Endocrinol* 202: 55–63.
- Hu L, Ibrahim S, Liu C, Skaar J, Pagano M, Karpatkin S. (2009) Thrombin induces tumor cell cycle activation and spontaneous growth by down-regulation of p27Kip1, in association with the up-regulation of Skp2 and MiR-222. *Cancer Res*. 69(8):3374-81.
- Huang B, Pan PY, Li Q, Sato AI, Levy DE, Bromberg J, Divino CM, Chen SH. (2006) Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res*. 66: 1123-31
- Hulbert A. (2000) Thyroid hormones and their effects: a new perspective. *Biol. Rev.* 75: 519-631.
- Ilarregui JM, Crocci DO, Toscano MA, Bianco GA, Salatino M, Rabinovich GA (2007) Integrando el universo de células regulatorias en el cáncer. Un obstáculo crítico para el éxito de estrategias de inmunoterapia. *Medicina (Buenos Aires)*; 67 (II): 25-31
- Ilyin GP, Glaise D, Gilot D, Baffet G, Guguen-Guillouzo C. (2003) Regulation and role of p21 and p27 cyclin-dependent kinase inhibitors during hepatocyte differentiation and growth. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 285(1):G115-27.
- Imanishi Y, Hosokawa Y, Yoshimoto K, Schipani E, Mallya S, Papanikolaou A, Kifor O, Tokura T, Sablosky M, Ledgard F, Gronowicz G, Wang TC, Schmidt EV, Hall C, Brown EM, Bronson R, Arnold A. (2001) Primary hyperparathyroidism caused by parathyroid-targeted overexpression of cyclin D1 in transgenic mice. *J Clin Invest*. 107(9):1093-102.
- Ishizuya-Oka A. (2011) Amphibian organ remodeling during metamorphosis: insight into thyroid hormone-induced apoptosis. *Dev Growth Differ*. 53(2):202-12.

- Jackson DE. (2003) The unfolding tale of PECAM-1. *FEBS Lett.* 540(1-3):7-14.
- Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Isaacson PG (2008) Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery. *Blood* 112: 4384–4399.
- Jang TJ, Kang MS, Kim H, Kim DH, Lee JI, Kim JR. (2000) Increased expression of cyclin D1, cyclin E and p21(Cip1) associated with decreased expression of p27(Kip1) in chemically induced rat mammary carcinogenesis. *Jpn J Cancer Res.* 91(12):1222-32.
- Jedema I, van der Werff NM, Barge RM, Willemze R, Falkenburg JH. (2004) New CFSE-based assay to determine susceptibility to lysis by cytotoxic T cells of leukemic precursor cells within a heterogeneous target cell population. *Blood.* 103(7):2677-82
- Johnson DG, Walker CL. (1999) Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 39:295-312.
- Joyce JA, Pollard JW. (2009) Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 9:239–252.
- Joyce S, Girardi E, Zajonc DM. (2011) NKT cell ligand recognition logic: molecular basis for a synaptic duet and transmission of inflammatory effectors. *J. Immunol.* 187: 1081–89.
- Kanavaros P, Bai M, Stefanaki K, Poussias G, Rontogianni D, Zioga E, Gorgoulis V, Agnantis NJ. (2001). Immunohistochemical expression of the p53, mdm2, p21/Waf-1, Rb, p16, Ki67, cyclin D1, cyclin A and cyclin B1 proteins and apoptotic index in T-cell lymphomas. *Histol. Histopathol.* 16: 377-386.
- Kang-Decker N, Tong C, Boussouar F, Baker DJ, Xu W, Leontovich AA, Taylor WR, Brindle PK, van Deursen JM. (2004) Loss of CBP causes T cell lymphomagenesis in synergy with p27Kip1 insufficiency. *Cancer Cell.* 5(2):177-89.
- Karsunky H, Geisen C, Schmidt T, Haas K, Zevnik B, Gau E, Möröy T. (1999) Oncogenic potential of cyclin E in T-cell lymphomagenesis in transgenic mice: evidence for cooperation between cyclin E and Ras but not Myc. *Oncogene.* 18(54):7816-24.
- Kashiwai T, Hidaka Y, Takano T, Tatsumi KI, Izumi Y, Shimaoka Y, Tada H, Takeoka K, Amino N. (2003) Practical treatment with minimum maintenance dose of anti-thyroid drugs for prediction of remission in Graves' disease. *Endocr J.* 50(1):45-9.
- Kashiwai T, Hidaka Y, Takano T, Tatsumi KI, Izumi Y, Shimaoka Y, Tada H, Takeoka K, Amino N. (2003) Practical treatment with minimum maintenance dose of anti-thyroid drugs for prediction of remission in Graves' disease. *Endocr J.* 50(1):45-9.
- Katayose Y, Kim M, Rakkar AN, Li Z, Cowan KH, Seth P. (1997) Promoting apoptosis: a novel activity associated with the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Cancer Res.* 57(24):5441-5.
- Keane C, Gill D, Vari F, Cross D, Griffiths L, Gandhi M. (2013) CD4(+) tumor infiltrating lymphocytes are prognostic and independent of R-IPI in patients with DLBCL receiving R-CHOP chemo-immunotherapy. *Am J Hematol.* 88(4):273-6.
- Keast D y Taylor K. (1982). The effect of tri-iodothyronine on the phytohaemagglutinin response of T lymphocyte. *Clin Exp Immunol* 47:217-220.
- Kennedy R, Celis E (2008). Multiple roles for CD4+ T cells in anti-tumor immune responses. *Immunol Rev.* 222: 129-144.
- Khaled YS, Ammori BJ, Elkord E. (2013) Myeloid-derived suppressor cells in cancer: recent progress and prospects. *Immunol Cell Biol.* 91(8):493-502.

- Khaled YS, Ammori BJ, Elkord E. (2013) Myeloid-derived suppressor cells in cancer: recent progress and prospects. *Immunol Cell Biol.* 91(8):493-502.
- Klecha AJ, Barreiro Arcos ML, Genaro AM, Gorelik G, Silberman DM, Caro R, Cremaschi GA. (2005) Different mitogen-mediated Beta-adrenergic receptor modulation in murine T lymphocytes depending on the thyroid status. *Neuroimmunomodulation.* 12(2):92-9.
- Klecha AJ, Genaro AM, Gorelik G, Barreiro Arcos ML, Silberman DM, Schuman M, Garcia SI, Pirola C, Cremaschi GA. (2006) Integrative study of hypothalamus-pituitary-thyroid-immune system interaction: thyroid hormone-mediated modulation of lymphocyte activity through the protein kinase C signaling pathway. *J Endocrinol.* 189(1):45-55.
- Klecha AJ, Genaro AM, Lysionek AE, Caro RA, Coluccia AG, Cremaschi GA. (2000) Experimental evidence pointing to the bidirectional interaction between the immune system and the thyroid axis. *Int J Immunopharmacol.* 22(7):491-500.
- Ko AH, Wang F, Holly EA. (2007) Pancreatic cancer and medical history in a population-based case-control study in the San Francisco Bay Area, California. *Cancer Causes Control.* 18(8):809-19.
- Kowalik MA, Perra A, Pibiri M, Cocco MT, Samarut J, Plateroti M, Ledda-Columbano GM, Columbano A. (2010) TRbeta is the critical thyroid hormone receptor isoform in T3-induced proliferation of hepatocytes and pancreatic acinar cells. *J Hepatol.* 53(4):686-92.
- Kucharz EJ, Kotulska A, Kopeć M, Stawiarska-Pieta B, Pieczyrak R. (2003) Serum level of the circulating angiogenesis inhibitor endostatin in patients with hyperthyroidism or hypothyroidism. *Wien Klin Wochenschr.* 115(5-6):179-81.
- Kuijpers JL, Nyklíctek I, Louwman MW, Weetman TA, Pop VJ, Coebergh JW. (2005) Hypothyroidism might be related to breast cancer in post-menopausal women. *Thyroid.* 15(11):1253-9.
- Lad DP, Varma S, Varma N, Sachdeva MU, Bose P, Malhotra P. (2013) Regulatory T-cells in B-cell chronic lymphocytic leukemia: their role in disease progression and autoimmune cytopenias. *Leuk Lymphoma.* 54(5):1012-9.
- Lamagna C, Aurrand-Lions M, Imhof BA (2006) Dual role of macrophages in tumor growth and angiogenesis. *J Leuk Biol.* 80(4):705-13
- Lane DP. (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature.* 358(6381):15-6.
- Leach FS, Elledge SJ, Sherr CJ, Willson JKV, Markowitz S. (1993) Amplification of cyclin genes in colorectal carcinomas. *Cancer Res* 53:1986–1989.
- Ledda-Columbano GM, Molotzu F, Pibiri M, Cossu C, Perra A, Columbano A. (2006) Thyroid hormone induces cyclin D1 nuclear translocation and DNA synthesis in adult rat cardiomyocytes. *FASEB J.* 20(1):87-94.
- Ledda-Columbano GM, Perra A, Pibiri M, Molotzu F, Columbano A. (2005) Induction of pancreatic acinar cell proliferation by thyroid hormone. *J Endocrinol.* 185(3):393-9.
- Lee S, Privalsky M. (2005). Heterodimers of retinoic acid receptors and thyroid hormone receptors display unique combinatorial regulatory properties. *Mol Endocrinol.* 19(4): 863-78.
- Lester Reed H. (2001) Thyroid Physiology: Síntesis and release, iodine metabolism, binding and transport. En Becker K. (Ed). Principles and practice of endocrinology and metabolism. 3rd Edition. Wartofsky L. (Ed). Part III. The thyroid gland. Chapter 30. Lippincott Williams y Wilkins Publishers. pp 314-318.

- Lim S, Kaldis P. (2013) Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development*. 140(15):3079-93.
- Lin HY, Sun M, Tang HY, Lin C, Luidens MK, Mousa SA, Incerpi S, Drusano GL, Davis FB, Davis PJ. (2009) L-Thyroxine vs. 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and cell proliferation: activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Am J Physiol Cell Physiol*. 296(5):C980-91
- Lin HY, Tang HY, Shih A, Keating T, Cao G, Davis PJ, Davis FB. (2007) Thyroid hormone is a MAPK-dependent growth factor for thyroid cancer cells and is anti-apoptotic. *Steroids*. 2007 Feb;72(2):180-7. Epub 2006 Dec 15.
- Lin X, Ryu KY, Jhiang SM. (2004) Cloning of the 5'-flanking region of mouse sodium/iodide symporter and identification of a thyroid-specific and TSH responsive enhancer. *Thyroid* 14:19-27.
- Lipinski MM, Jacks T. (1999) The retinoblastoma gene family in differentiation and development. *Oncogene*.18(55):7873-82.
- Livak KJ, Schmittgen TD. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 25(4):402-8.
- Livolsi V. (2001) Morphology of the thyroid gland. En Becker K. (Ed). Principles and practice of endocrinology and metabolism. 3rd Edition. Wartofsky L. (Ed). Part III. The thyroid gland. Chapter 29. Lippincott Williams y Wilkins Publishers. pp 311-313.
- Loi S. (2013) Tumor-infiltrating lymphocytes, breast cancer subtypes and therapeutic efficacy. *Oncoimmunology*. 2(7):e24720.
- Lyons A.B. (1999). Divided we stand: tracking cell proliferation with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Immunol. Cell Biol*. 77: 509-515.
- Ma C, Xie J, Huang X, Wang G, Wang Y, Wang X, Zuo S. (2009) Thyroxine alone or thyroxine plus triiodothyronine replacement therapy for hypothyroidism. *Nucl Med Commun*. 30(8): 586-93
- Ma C, Xie J, Huang X, Wang G, Wang Y, Wang X, Zuo S. (2009) Thyroxine alone or thyroxine plus triiodothyronine replacement therapy for hypothyroidism. *Nucl Med Commun*. 30(8): 586-93.
- Maffuz A, Barroso-Bravo S, Nájera I, Zarco G, Alvarado-Cabrero I, Rodríguez-Cuevas SA. (2006) Tumor size as predictor of microinvasion, invasion, and axillary metastasis in ductal carcinoma in situ. *J Exp Clin Cancer Res*. 25(2):223-7.
- Malaguarnera L, Cristaldi E, Malaguarnera M. (2010) The role of immunity in elderly cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 74(1):40-60.
- Malumbres M, Barbacid M. (2001) To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nature Rev Cancer*. 1: 222-231.
- Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F (2008). Cancer-related inflammation. *Nature* 454:436-444).
- Mantovani A. (2009) Cancer: Inflaming metastasis. *Nature*. 457(7225):36-7.
- Mao X, Orchard G, Vonderheid EC, Nowell PC, Bagot M, Bensussan A, Russell-Jones R, Young BD, Whittaker SJ. (2006). Heterogeneous abnormalities of CCND1 and RB1 in primary cutaneous T-Cell lymphomas suggesting impaired cell cycle control in disease pathogenesis. *J. Invest. Dermatol*. 126: 1388-1395.
- Martínez-Iglesias O, García-Silva S, Regadera J, Aranda A. (2009) Hypothyroidism enhances tumor invasiveness and metastasis development. *PLoS One*. 4(7):e6428.

- Martins C.P., Berns A. (2002). Loss of p27(Kip1) but not p21(Cip1) decreases survival and synergizes with MYC in murine lymphomagenesis. *EMBO J.* 21: 3739-3748.
- Marynick SP. (1982) Splenomegaly in thyrotoxicosis. *JAMA.* 247(20):2782.
- Marzo AL, Lake RA, Lo D, Sherman L, McWilliam A, Nelson D, Robinson BW, Scott B. (1999) Tumor antigens are constitutively presented in the draining lymph nodes. *J Immunol.* 162(10):5838-45.
- Meng R, Tang HY, Westfall J, London D, Cao JH, Mousa SA, Luidens M, Hercbergs A, Davis FB, Davis PJ, Lin HY. (2011) Crosstalk between integrin $\alpha\beta3$ and estrogen receptor- α is involved in thyroid hormone-induced proliferation in human lung carcinoma cells. *PLoS One.* 6(11):e27547.
- Mihara S, Suzuki N, Wakisaka S, Sekita N, Hoshino T, Sakane T. (1999) Effects of thyroid hormones on apoptotic cell death of human lymphocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 1378-1385.
- Mihara S, Suzuki N, Wakisaka S, Suzuki S, Sekita N, Yamamoto S, Saito N, Hoshino T, Sakane T. (1999) Effects of thyroid hormones on apoptotic cell death of human lymphocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* 84(4):1378-85.
- Minn AJ, Gupta GP, Padua D, Bos P, Nguyen DX, Nuyten D, Kreike B, Zhang Y, Wang Y, Ishwaran H, Foekens JA, van de Vijver M, Massagué J. (2007) Lung metastasis genes couple breast tumor size and metastatic spread. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(16):6740-5.
- Mirzayans R, Andrais B, Hansen G, Murray D. (2012) Role of p16(INK4A) in Replicative Senescence and DNA Damage-Induced Premature Senescence in p53-Deficient Human Cells. *Biochem Res Int.* 2012:951574
- Mirzayans R, Andrais B, Scott A, Murray D. (2012) New insights into p53 signaling and cancer cell response to DNA damage: implications for cancer therapy. *J Biomed Biotechnol.* 2012:170325.
- Mitra R, Singh S, Khar A. (2003) Antitumour immune responses. *Expert Rev Mol Med.*5(3):1-19.
- Mohn A, Di Marzio A, Cerruto M, Angrilli F, Fioritoni C, Chiarelli F. (2001) Euthyroid sick syndrome in children with Hodgkin disease. *Pediatr Hematol Oncol.* 18(3):211-5.
- Molinský J, Klánová M, Maswabi B, Soukup T, Trněný M, Nečas E, Živný J, Klener P. (2013) In vivo growth of mantle cell lymphoma xenografts in immunodeficient mice is positively regulated by VEGF and associated with significant up-regulation of CD31/PECAM1. *Folia Biol (Praha)* 59(1):26-31.
- Møller MB, Nielsen O, Pedersen NT. (2002). Frequent alteration of MDM2 and p53 in the molecular progression of recurring non-Hodgkin's lymphoma. *Histopathology.* 41: 322-330.
- Møller MB, Nielsen O, Pedersen NT. Cyclin D3 expression in non-Hodgkin lymphoma. (2001) Correlation with other cell cycle regulators and clinical features. *Am J Clin Pathol.* 115(3):404-12.
- Morshed SA, Latif R, Davies TF. (2012) Delineating the autoimmune mechanisms in Graves' disease. *Immunol Res.* 54(1-3):191-203.
- Mougiakakos D, Choudhury A, Lladser A, Kiessling R, Johansson CC. (2010) Regulatory T cells in cancer. *Adv Cancer Res.* 107:57-117.
- Mukherjee S, Manna S, Pal D, Mukherjee P, Panda CK. (2010) Sequential loss of cell cycle checkpoint control contributes to malignant transformation of murine

- embryonic fibroblasts induced by 20-methylcholanthrene. *J Cell Physiol.* 224(1):49-58.
- Munn DH, Mellor AL. (2006) The tumor-draining lymph node as an immune-privileged site. *Immunol Rev.* 213:146-58.
- Murakami A, Tanaka H. (1991) Identification of RB and p53 mutations in mouse lymphoma cell lines. *Mol Carcinog.* 4(5):354-7.
- Nagai H, Kinoshita T, Ichikawa A, Murate T. (2002) Malignant Lymphoma and Tumor Suppressor Genes. *J. Clin. Exp. Hemathopatol* 42(1):11-24
- Nagasawa T, Zhang Q, Raghunath PN, Wong HY, El-Salem M, Szallasi A, Marzec M, Gimotty P, Rook AH, Vonderheid EC, Odum N, Wasik MA. (2006). Multi-gene epigenetic silencing of tumor suppressor genes in T-cell lymphoma cells; delayed expression of the p16 protein upon reversal of the silencing. *Leuk. Res.* 30: 303-312.
- Nakagawa R, Motoki K, Nakamura H, Ueno H, Iijima R, Yamauchi A, Tsuyuki S, Inamoto T, Koezuka Y. (1998) Antitumor activity of alpha-galactosylceramide, KRN7000, in mice with EL-4 hepatic metastasis and its cytokine production. *Oncol Res.* 10(11-12):561-8.
- Nakanishi K, Taniguchi Y, Onji M. (1999) Triiodothyronine enhances expression of the interleukin-2 receptor alpha chain. *Endocr J.* 46(3): 437-42.
- Namm JP, Li Q, Lao X, Lubman DM, He J, Liu Y, Zhu J, Wei S, Chang AE. (2012) B lymphocytes as effector cells in the immunotherapy of cancer. *J Surg Oncol.* 105(4):431-5.
- Navas IC, Algara P, Mateo M, Martínez P, García C, Rodríguez JL, Vanaclocha F, Barrientos N, Iglesias L, Sánchez L, Piris MA, Ortiz-Romero P. (2002). p16(INK4a) is selectively silenced in the tumoral progression of mycosis fungoides. *Lab. Invest.* 82: 123-132.
- Ness RB, Grisso JA, Cottreau C, Klapper J, Vergona R, Wheeler JE, Morgan M, Schlesselman JJ. (2000) Factors related to inflammation of the ovarian epithelium and risk of ovarian cancer. *Epidemiology.* 11(2):111-7.
- Nikkola J, Vihinen P, Vuoristo MS, Kellokumpu-Lehtinen P, Kähäri VM, Pyrhönen S. (2005) High serum levels of matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-1 are associated with rapid progression in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res.* 11(14):5158-66.
- Oetting A, Yen PM. (2007) New insights into thyroid hormone action. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 21(2): 193-208.
- Ohashi H e Itoh M. (1994) Effects of thyroid hormones on lymphocyte phenotypes in rats: changes in lymphocyte subsets related to thyroid function. *Endocrine Regulations,* 29: 117-123.
- Ohashi H e Itoh M. (1994). Effects of thyroid hormones on lymphocyte phenotypes in rats: changes in lymphocyte subsets related to thyroid function. *Endocrine Regulations ,* 29: 117-123.
- Okosieme OE. (2011) Thyroid hormone replacement: current status and challenges. *Expert Opin Pharmacother.* 12(15): 2315-28
- Olkhanud PB, Damdinsuren B, Bodogai M, Gress RE, Sen R, Wejksza K, Malchinkhuu E, Wersto RP, Biragyn A. (2011) Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4⁺ T cells to T-regulatory cells. *Cancer Res.* 71(10):3505-15.

- Ong M, Malkin D, Malkin A. (1986). Alteration of lymphocyte reactivity by thyroid hormones. *Int J Immunopharmacol*, 8: 755-762.
- Opavsky R, Wang SH, Trikha P, Raval A, Huang Y, Wu YZ, Rodriguez B, Keller B, Liyanarachchi S, Wei G, Davuluri RV, Weinstein M, Felsher D, Ostrowski M, Leone G, Plass C. (2007). CpG island methylation in a mouse model of lymphoma is driven by the genetic configuration of tumor cells. *PLoS Genet*. 3: 1757-1769.
- Orford KW, Scadden DT. (2008) Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell-cycle regulation. *Nat Rev Genet*. 115-28.
- Ostrand-Rosenberg S, Sinha P. (2009) Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J Immunol*. 182(8):4499-506.
- Otto T, Fandrey J. (2008) Thyroid hormone induces hypoxia-inducible factor 1alpha gene expression through thyroid hormone receptor beta/retinoid x receptor alpha-dependent activation of hepatic leukemia factor. *Endocrinology*. 149(5):2241-50.
- Ozerdem U, Wojcik EM, Duan X, Erşahin Ç, Barkan GA. (2013) Prognostic utility of quantitative image analysis of microvascular density in prostate cancer. *Pathol Int*. 63(5):277-82.
- Pérez de Castro IP, Malumbres M, Santos J, Pellicer A, Fernández-Piqueras J. (1999). Cooperative alterations of Rb pathway regulators in mouse primary T cell lymphomas. *Carcinogenesis*. 20: 1675-1682.
- Pibiri M, Ledda-Columbano GM, Cossu C, Simbula G, Menegazzi M, Shinozuka H, Columbano A. (2001) Cyclin D1 is an early target in hepatocyte proliferation induced by thyroid hormone (T3). *FASEB J*. 15(6):1006-13.
- Pinto M, Soares P, Ribatti D. (2011) Thyroid hormone as a regulator of tumor induced angiogenesis. *Cancer Lett*. 301(2):119-26.
- Polyak K, Weinberg RA (2009) Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 9:265–273.
- Prabhala RH, Neri P, Bae JE, Tassone P, Shamma MA, Allam CK, Daley JF, Chauhan D, Blanchard E, Thatte HS, Anderson KC, Munshi NC. (2006) Dysfunctional T regulatory cells in multiple myeloma. *Blood*. 107(1):301-4.
- Rae MT, Gubbay O, Kostogiannou A, Price D, Critchley HO, Hillier SG. (2007) Thyroid hormone signaling in human ovarian surface epithelial cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 92(1):322-7.
- Reddy A, Dash C, Leerapun A, Mettler TA, Stadheim LM, Lazaridis KN, Roberts RO, Roberts LR. (2007) Hypothyroidism: a possible risk factor for liver cancer in patients with no known underlying cause of liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 5(1):118-23.
- Reiche EM, Nunes SC, Morimoto HK (2004) Stress, depression, the immune system, and cancer. *Lancet Oncol*. 5: 617–625.
- Reid JR, Wheeler SF. (2005) Hyperthyroidism: diagnosis and treatment. *Am Fam Physician*. 72(4):623-30.
- Rennert G, Rennert HS, Pinchev M, Gruber SB. (2010) A case-control study of levothyroxine and the risk of colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst*. 102(8):568-72.
- Riedel C, Levy O, Carrasco N. (2001) Post-transcriptional regulation of the sodium/iodide symporter by thyrotropin. *J Biol Chem*, 276: 21458-63.
- Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. (1997) Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem*. **245**: 154-

160. Streetman DD y Khanderia U. (2003) Diagnosis and treatment of Graves disease. *Ann Pharmacother.* 37(7-8):1100-9.
- Risau W. (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 386(6626):671-4.
- Roberti A, Macaluso M, Giordano A. (2009) Alterations in Cell Cycle Regulatory Genes in Breast Cancer. *Breast Cancer in the Post-Genomic Era. Current Clinical Oncology,* 55-77
- Rosenberg AG, Dexeus F, Swanson DA, von Eschenbach AC. (1990) Relationship of thyroid disease to renal cell carcinoma. An epidemiologic study. *Urology.* 35(6):492-8.
- Rosenquist R, Davi F, Stamatopoulos K. (2013) Antigens in lymphoma development- Current knowledge and future directions. *Semin Cancer Biol.* pii: S1044-579X(13)00098-9.
- Rubinstein N, Alvarez M, Zwirner NW, Toscano MA, Ilarregui JM, Bravo A, Mordoh J, Fainboim L, Podhajcer OL, Rabinovich GA. (2004) Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer Cell.* 5:241-51
- Ruffell B, DeNardo DG, Affara NI, Coussens LM. (2010) Lymphocytes in cancer development: polarization towards pro-tumor immunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21(1):3-10.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, et al (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune disease. *J Immunol,* 155, 1151-64.
- Sakai A, Thieblemont C, Wellmann A, Jaffe ES, Raffeld M. (1998) PTEN gene alterations in lymphoid neoplasms. *Blood.* 92(9):3410-5.
- Samuels MH. (2012) Subacute, silent, and postpartum thyroiditis. *Med Clin North Am.* 96(2):223-33.
- Sánchez-Beato M, Sánchez-Aguilera A, Piris MA. (2003). Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas. *Blood.* 101: 1220-1235.
- Sar P, Peter R, Rath B, Das Mohapatra A, Mishra SK. (2011) 3, 3'5 Triiodo L thyronine induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells, repressing SMP30 expression through negative thyroid response elements. *PLoS One.* 6(6):e20861
- Schioppa T, Moore R, Thompson RG, Rosser EC, Kulbe H, Nedospasov S, Mauri C, Coussens LM, Balkwill FR. (2011) B regulatory cells and the tumor-promoting actions of TNF- α during squamous carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci* 108(26):10662-7.
- Schlecker E, Stojanovic A, Eisen C, Quack C, Falk CS, Umansky V, Cerwenka A. (2012) Tumor-infiltrating monocytic myeloid-derived suppressor cells mediate CCR5-dependent recruitment of regulatory T cells favoring tumor growth. *J Immunol.* 189(12):5602-11.
- Schoenfeld P, Myers J, Myers L, LaRocque J. (1995) Suppression of cell-mediated immunity in hypothyroidism. *South Med J.* 88(3): 347-9.
- Shao N, Zou J, Li J, Chen F, Dai J, Qu X, Sun X, Ma D, Ji C. (2012) Hyper-activation of WNT/b-catenin signaling pathway mediates anti-tumor effects of histone deacetylase inhibitors in acute T lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 53(9):1769–1778.

- Sharma B, Singh N, Gupta N, Lal P, Pande S, Chauhan S. (2013) Diagnostic Modalities of Precancerous and Cancerous Cervical Lesions with Special Emphasis on CD31 Angiogenesis Factor as a Marker. *Patholog Res Int.* 2013:243168.
- Shu ST, Martin CK, Thudi NK, Dirksen WP, Rosol TJ (2010) Osteolytic bone resorption in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 51(4): 702–714.
- Siddon AJ, Torres R, Rinder HM, Smith BR, Howe JG, Tormey CA. (2012) Normalized CCND1 expression has prognostic value in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol.* 158(4):551-3.
- Singh V, Singh SM (2009) Progressive tumor growth-associated altered tumor microenvironment: implications in a tumor stage-dependent modulation in survival of a murine T cell lymphoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 135(8):1015-1024.
- Slee EA, Adrain C, Martin SJ. (1999) Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ.* 6(11):1067-74.
- Smith HA, Kang Y. (2013) The metastasis-promoting roles of tumor-associated immune cells. *J Mol Med (Berl).* 91(4):411-29.
- Smyth MJ, Cretney E, Kershaw MH, Hayakawa Y. (2004) Cytokines in cancer immunity and immunotherapy. *Immunol Rev.* 202:275-93
- Smyth MJ, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H. (2002). New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2: 850-861.
- Sonnenschein C, Soto AM. (2013) The aging of the 2000 and 2011 Hallmarks of Cancer reviews: a critique. *J Biosci.* 38(3):651-63.
- Soussi T. (2001) p53 protein, biological and clinical aspects. *Encyclopedic Reference of Cancer.* pp 669-675
- Stagi S, Azzari C, Bindi G, Galluzzi F, Nanni S, Salti, Vierucci A. (2005) Undetectable serum IgA and low IgM concentration in children with congenital hypothyroidism. *Clin Immunol.* 116 (1): 94-8.
- Sulis ML, Parsons R. (2003) PTEN: from pathology to biology. *Trends Cell Biol.* 13(9):478-83.
- Swann JB, Smyth MJ. (2007) Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest.* 117(5): 1137–1146.
- Tadmor T, Fell R, Polliack A, Attias D. (2013) Absolute monocytosis at diagnosis correlates with survival in diffuse large B-cell lymphoma-possible link with monocytic myeloid-derived suppressor cells. *Hematol Oncol.* 31(2):325-31.
- Takano Y, Kato Y, van Diest PJ, Masuda M, Mitomi H, Okayasu I. (2000) Cyclin D2 overexpression and lack of p27 correlate positively and cyclin E inversely with a poor prognosis in gastric cancer cases. *Am J Pathol* 156:585-594.
- Tang HY, Lin HY, Zhang S, Davis FB, Davis PJ. (2004) Thyroid hormone causes mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of the nuclear estrogen receptor. *Endocrinology.* 145(7):3265-72.
- Tang XY, Liu Q, Dai DZ, Dai Y. (2008) CPU0213, a novel endothelin receptor antagonist, suppresses the upregulation of matrix metalloproteinases and connexin 43 in hyperthyroid myocardium. *Pharmacol Rep.* 60(4):524-31.
- Terabe M, Berzofsky JA. (2008) The role of NKT cells in tumor immunity. *Adv Cancer Res.* 277-348.

- Theodossiou C, Schwarzenberger P. (2000) Propylthiouracil reduces xenograft tumor growth in an athymic nude mouse prostate cancer model. *Am J Med Sci.* 319(2):96-9.
- Theodossiou C, Skrepnik N, Robert EG, Prasad C, Axelrad TW, Schapira DV, Hunt JD. (1999) Propylthiouracil-induced hypothyroidism reduces xenograft tumor growth in athymic nude mice. *Cancer.* 86(8):1596-601.
- Tognini S, Marchini F, Dardano A, Polini A, Ferdeghini M, Castiglioni M, Monzani F. (2010) Non-thyroidal illness syndrome and short-term survival in a hospitalised older population. *Age Ageing.* 39(1):46-50.
- Toms SA, Hercbergs A, Liu J, Kondo S, Haqqi T, Casey G, Iwasaki K, Barnett GH, Barna BP. (1998) Antagonist effect of insulin-like growth factor I on protein kinase inhibitor-mediated apoptosis in human glioblastoma cells in association with bcl-2 and bcl-xL. *J Neurosurg.* 88(5):884-9.
- Ultmann JE, Hyman GA, Calder B. (1963) The occurrence of lymphoma in patients with long-standing hyperthyroidism. *Blood.* 21:282-97.
- Vajdic CM, van Leeuwen MT. (2009 a) Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation. *Int J Cancer.* 125(8):1747-54.
- Vajdic CM, van Leeuwen MT. (2009 b) What types of cancers are associated with immune suppression in HIV? Lessons from solid organ transplant recipients. *Curr Opin HIV AIDS.* 4(1):35-41.
- Verga Falzacappa C, Panacchia L, Bucci B, Stigliano A, Cavallo MG, Brunetti E, Toscano V, Misiti S. (2006) 3,5,3'-triiodothyronine (T3) is a survival factor for pancreatic beta-cells undergoing apoptosis. *J Cell Physiol.* 206(2):309-21.
- Verschuren EW, Hodgson JG, Gray JW, Kogan S, Jones N, Evan GI. (2004) The role of p53 in suppression of KSHV cyclin-induced lymphomagenesis. *Cancer Res.* 64(2):581-9.
- Vivier E, Ugolini S, Blaise D, Chabannon C, Brossay L. (2012) Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat Rev Immunol.* 12(4):239-52.
- Volpe R. (2000) The immunomodulatory effects of anti-thyroid drugs are mediated via actions on thyroid cells, affecting thyrocyte-immunocyte signalling: a review. *Current Pharmaceutical Design* 7: 451–460
- Walsh GM, Dewson G, Wardlaw AJ, Levi-Schaffer F, Moqbel R. (1998) A comparative study of different methods for the assessment of apoptosis and necrosis in human eosinophils. *J Immunol Methods.* 217(1-2):153-63.
- Wang, HC, Klein, JR. (2001) Immune function of thyroid stimulating hormone and receptor. *Crit Rev Immunol.* 21:323-37.
- Weiss A, den Bergh Hv, Griffioen AW, Nowak-Sliwinska P. (2012) Angiogenesis inhibition for the improvement of photodynamic therapy: the revival of a promising idea. *Biochim Biophys Acta.* 1826(1):53-70.
- Węsierska-Gądek J, Maurer M, Zulehner N, Komina O (2011) Whether to target single or multiple CDKs for therapy? That is the question. *J Cell Physiol.* 226(2): 341-49
- Węsierska-Gądek J, Maurer M, Zulehner N, Komina O (2011) Whether to target single or multiple CDKs for therapy? That is the question. *J Cell Physiol.* 226(2): 341-49
- Whiteside TL. (2013) Immune responses to cancer: are they potential biomarkers of prognosis? *Front Oncol.* 3:107.
- William BM, Armitage JO (2013) International analysis of the frequency and outcomes of NK/T-cell lymphomas. *Best Pract Res Clin Haematol.* 26(1):23-32.

- Williams G. (2008) Neurodevelopmental and neurophysiological actions of thyroid hormone. *J Neuroendocrinol.* 2008, 20(6):784-94.
- Wu Z, Yu Q. (2009) E2F1-mediated apoptosis as a target of cancer therapy. *Curr Mol Pharmacol.* 2(2):149-60
- Wunderlich J, Shearer G, Livingstone A. (1997). *Current Protocols in Immunology* 3.11.1-3.11.20. John Wiley & Sons, Inc. New York.
www.thyroidmanager.com
- Yehuda-Shnaidman E, Kalderon B, Bar-Tana J (2005) Modulation of mitochondrial transition pore components by thyroid hormone. *Endocrinology* 146(5):2462–2472. doi:10.1210/en.2004-1161
- Yen P. (2001) Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiological Reviews*, 81: 1097-1142.
- Yen PM, Ando S, Feng X, Liu Y, Maruvada P, Xia X. (2006) Thyroid hormone action at the cellular, genomic and target gene levels. *Mol Cell Endocrinol*, 246 (1-2): 121-7.
- You SH, Liao X, Weiss RE, Lazar MA. (2010) The interaction between nuclear receptor corepressor and histone deacetylase 3 regulates both positive and negative thyroid hormone action in vivo. *Mol Endocrinol.* 24(7):1359-67.
- Zhang B, Zhang A, Zhou X, Webb P, He W, Xia X. (2012) Thyroid hormone analogue stimulates keratinocyte proliferation but inhibits cell differentiation in epidermis. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 25(4):859-69.
- Zhang C, Toulev A, Kamarashev J, Qin JZ, Dummer R, Döbbeling U. (2007). Consequences of p16 tumor suppressor gene inactivation in mycosis fungoides and Sézary syndrome and role of the bmi-1 and ras oncogenes in disease progression. *Hum. Pathol.* 38: 995-1002.
- Zhang CL, Kamarashev J, Qin JZ, Burg G, Dummer R, Döbbeling U. (2003) Expression of apoptosis regulators in cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) cells. *J Pathol.* 200(2):249-54.
- Zhang L, Cooper-Kuhn CM, Nannmark U, Blomgren K, Kuhn HG. (2010) Stimulatory effects of thyroid hormone on brain angiogenesis in vivo and in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab.* 30(2):323-35.
- Zukerberg LR, Yang WI, Arnold A, Harris NL (1995). Cyclin D1 expression in non-Hodgkin's lymphomas. Detection by immunohistochemistry. *Am. J. Clin. Pathol.* 103: 756-760.
- Zwirner NW, Fuertes MB, Girart MV, Domaica CI, Rossi LE. (2007) Cytokine-driven regulation of NK cell functions in tumor immunity: role of the MICA-NKG2D system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 18(1-2):159-70.