

UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**ROL INMUNOMODULADOR DE LA ACTIVACIÓN DEL
RECEPTOR DE MINERALOCORTICOIDES POR
CORTICOSTERONA**

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado académico de Magíster en Bioquímica, área de especialización Clínica Aplicada, y Memoria para optar al título profesional de Bioquímica por:

NICOLE ALEJANDRA LETELIER TORRES

Director de Tesis: Dr. Alexis Kalergis Parra

SANTIAGO- CHILE

JULIO 2014

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE MAGÍSTER Y TÍTULO DE BIOQUÍMICO

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por la candidata:

NICOLE ALEJANDRA LETELIER TORRES

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en bioquímica, área de especialización Clínica Aplicada y al título de Bioquímica, en el examen público rendido el día _____ del 2014.

Director de Tesis:

Dr. Alexis Kalergis.

Comisión Informante de Tesis:

Dr. Javier Puente (Presidente).

Dr. Dante Miranda.

Dr. Luis Michea.

*“Todo lo que soy, se lo debo a mi Madre.
Atribuyo todos mis éxitos en esta vida a la
enseñanza moral, intelectual
y física que recibí de ella”.*

(George Washington)

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	7
PUBLICACIONES	9
BECAS Y FINANCIAMIENTO	9
BECAS	9
FINANCIAMIENTO	9
ABREVIATURAS	10
RESUMEN	13
ABSTRACT	15
1.- INTRODUCCIÓN.	17
1.1 Células Dendríticas (DCs).	19
1.2 Receptores Corticoesteroidales: Receptor de glucocorticoides (GR) y receptor de mineralocorticoides (MR).	21
1.3 Efectos de las hormonas corticoesteroidales sobre el sistema inmune.	25
1.4 Efectos de los corticoesteroides sobre las DCs.	28
1.5 Activación de MR en DCs y su rol en el desarrollo de hipertensión.	30
1.6 Efectos de la activación de MR y la expresión de HO-1.	32
1.7 Respuestas no genómicas en la vías de señalización de los corticoesteroides	33
2.-HIPÓTESIS	36
2.1 Objetivo general	36
2.2 Objetivos específicos.	36
3.- MATERIALES	37
3.1 Equipamiento	37
3.2 Reactivos de cultivo celular	37
3.3 Reactivos químicos	37
3.4 Anticuerpos	38
3.5 Buffers	38
3.6 Implementos de plástico.	38
3.7 Software	38
3.8 Animales	38

4.- METODOLOGÍA	39
4.1 Animales	39
4.2 Cultivo primario de células dendríticas derivadas de médula ósea (bm-DCs)	39
4.3 Extracción de ARN total, generación de ADNc y qPCR.....	39
4.4 Expresión de marcadores de maduración y moléculas co-estimuladoras.....	40
4.5 Análisis de datos.	40
5.- RESULTADOS	41
5.1 Estandarización de la generación de células dendríticas derivadas de médula ósea.	41
5.2 La estimulación con LPS aumenta los niveles de ARNm de 11 β HSD2, MR, GPR30 y GR β en bm-DCs.	44
5.3 Linfocitos B presentan niveles detectables de ARNm para MR y GPR30 pero no para 11 β HSD2.	51
5.4 Espironolactona aumenta levemente la expresión de HO-1 en bm-DCs.	53
5.5 El tratamiento con corticosterona/RU486 disminuye la expresión de PDL-1 y aumenta la expresión de CD40 en bm-DCs.	55
6.- DISCUSIÓN	61
6.1 Estandarización de la generación de células dendríticas derivadas de médula ósea (bm-DCs).	61
6.2 La estimulación con LPS aumenta los niveles de ARNm de 11 β HSD2, MR, GPR30 y GR β en bm-DCs.	61
6.3 Linfocitos B presentan niveles detectables de ARNm para MR y GPR30 pero no para 11 β HSD2.	63
6.4 Espironolactona aumenta levemente los niveles de ARNm de HO-1 en bm-DCs.	64
6.5 El tratamiento con corticosterona/RU486 disminuye la expresión de PDL-1 y aumenta la expresión de CD40 en bm-DCs.	65
7.- CONCLUSIONES	68
BIBLIOGRAFÍA	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Relación entre el sistema endocrino y el sistema inmune.....	18
Figura 2: Estados de diferenciación de las DCs.....	20
Figura 3: Interacción entre GR, MR y sus ligandos.....	24
Figura 4: Efectos de los glucocorticoides sobre las células del sistema inmune.	26
Figura 5: Efecto de la activación de MR sobre la diferenciación de macrófagos.	27
Figura 6: Efectos de la activación de MR en macrófagos y DCs.....	29
Figura 7: Modelo de la interacción entre MR y GPR30 en VSMCs.....	34
Figura 8. Obtención de bm-DCs a partir de progenitores derivados de médula ósea.....	41
Figura 9. Caracterización de las bm-DCs por FACS.....	42
Figura 10. Caracterización molecular de las bm-DCs durante el día 5.....	43
Figura 11: Determinación de los niveles de ARNm de MR, GPR30, 11 β HSD2, GR α y GR β	44
Figura 12: bm-DCs estimuladas y no estimuladas con LPS presentan niveles detectables de ARNm de GRPR30 y 11 β HSD2.....	45
Figura 13: LPS aumenta levemente los niveles de ARNm de GPR30 pero no los de 11 β HSD2 en bm-DCs.....	46
Figura 14: La selección de bm-DCs por cell sorting enriqueció la población CD11c +.....	47
Figura 15: LPS incrementa la expresión de CD86 e IA/IE en bm-DCs purificadas mediante cell sorting.....	47
Figura 16: El estímulo con LPS incrementa los niveles de ARNm de 11 β HSD2, MR y de GPR30 en bm-DCs purificadas mediante cell sorting.....	48
Figura 17: bm-DCs estimuladas y no estimuladas con LPS presentan niveles detectables de ARNm para GR α	49

Figura 18: El estímulo con LPS aumenta los niveles de ARNm de GR β pero no los de GR α en bm-DCs.....	50
Figura 19: Los productos de qPCR de β -actina, MR, GPR-30, 11 β HSD2, GR α y GR β son específicos.	50
Figura 20: Determinación de los niveles de ARNm de 11 β HSD2, MR y GPR-30 en linfocitos B.	51
Figura 21: Linfocitos B purificados por cell sorting presentan niveles detectables de ARNm para MR y GPR30.....	52
Figura 22: Determinación de la expresión de HO-1 en bm-DCs estimuladas con espironolactona.....	53
Figura 23: Espironolactona aumenta levemente la expresión de HO-1 en bm-DCs.....	54
Figura 24: Determinación de CD86, CD40, IA/IE y PDL-1 en bm-DCs estimuladas con corticosterona o corticosterona/RU486.....	55
Figura 25: Corticosterona disminuye la expresión de PDL-1 en bm-DCs.	56
Figure 26: El tratamiento con corticosterona y/o RU486 /SPIRO no afecta la viabilidad de las bm-DCs.	57
Figure 27: El tratamiento con corticosterona/RU486 aumenta los niveles de expresión de CD40 pero no los de CD86 en bm-DCs.....	59
Figura 28: El tratamiento con corticosterona/RU486 no altera los niveles de expresión de los marcadores PDL-1 e IA/IE en bm-DCs.....	60

AGRADECIMIENTOS

La presente Tesis es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas leyendo, opinando, corrigiendo, y acompañándome tanto en los momentos de crisis como en los momentos de felicidad.

Debo comenzar por agradecer a mi Mamá por el gran amor que me tiene, por el apoyo ilimitado e incondicional que siempre me ha dado en todas mis decisiones, por estar ahí cada vez que mi convicción flaquea, por tener siempre la fortaleza de salir adelante sin importar los obstáculos (y por haberme inculcado esa misma fortaleza) y por haberme formado como una persona de bien, entre otros tantos agradecimientos, ya que en realidad no hay palabras en este mundo para agradecerle.

A mi hermano y la hermosa familia que ha formado (en especial por hacerme tía de unas hermosas sobrinas) quienes me acompañaron en esta aventura que significó venir a Santiago para ser Bioquímica, y que de forma incondicional, entendieron mis malos momentos. También a mi hermana y su familia, por estar siempre a pesar de los malos momentos.

Esta aventura que comenzó hace más de 6 años esta llegando a su fin y no puedo dejar de mencionar a mis amigos de la universidad: Carlos Rivera, Hugo Díaz, Alejandra Alvarado, Fernanda Cuevas, Pablo Barattini, Montserrat Peñaloza, Miguel Maureira, Rodrigo Leyton y Mauricio Valdivia. A quienes agradezco por ser parte significativa de mi vida, por haber hecho el papel de una familia verdadera en todo momento, por su apoyo, por su comprensión, por confiar y creer en mí, por haber hecho de mi etapa universitaria un trayecto de vivencias que nunca olvidaré, y sobre todo por su amistad. También, quisiera dar las gracias a toda mi generación de BQs por todos los buenos momentos que compartimos, llenos del cariño y amistad que me han brindado en estos 6 y más años.

A mis compañeros/amigos del laboratorio: Fabián Vega, Karen Bohmwald/Janyra Espinoza, Daniela Becerra, Juan Pablo Mackern, Sebastián Riquelme, Bruno Ramírez, Javiera Obreque, Claudia Rivera, Margarita Lay y Andy Torres por darme su ayuda y amistad durante todo este tiempo, y por permitirme entrar en su vida durante estos casi tres años de convivir dentro y fuera del laboratorio.

También me gustaría agradecer a esas personas que por circunstancias extrañas del destino conocí y que me han apoyado en esta última y difícil etapa de mi tesis. Estoy muy agradecida por haberlas conocido y por habernos convertido en amigos/as.

A mis profesores de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, por entregarme los conocimientos y herramientas necesarias para dedicarme a la ciencia, pero también, las herramientas necesarias para ser una “persona” y no solo una científica. Gracias por estar en aquellos momentos donde todo se veía gris, en especial durante el desarrollo de esta tesis, gracias por apoyarme, aconsejarme y ayudarme a cargar con las consecuencias de mis “impulsivas decisiones”. Agradezco también, a los miembros de la Comisión de esta tesis por sus valorables sugerencias que contribuyeron al mejoramiento y ordenamiento del presente trabajo, y por supuesto, debo mencionar el apoyo financiero prestado por CONICYT, que me otorgó una beca de magíster por 2 años y a mi querida Universidad de Chile que me permitió ser una “*hija de Bello*”.

En este sentido, me parece muy importante agradecer a mi tutor, Dr. Alexis Kalergis por recibirme en su laboratorio, darme la oportunidad de trabajar en su equipo, por creer en mis capacidades, por su contribución a mi formación como científica, en especial, por todos los consejos y discusiones científicas sostenidas en estos más de 2 años.

En resumen, durante el desarrollo de esta tesis hubo momentos difíciles, dulces y muy felices en los que no solo me he desarrollado como bioquímica, ya que este ha sido un proyecto a nivel personal más que profesional, y debo decir que ha sido una experiencia enriquecedora y de gran crecimiento porque *“cuando menos lo esperamos, la vida nos coloca delante un desafío que pone a prueba nuestro coraje y nuestra voluntad de cambio”* (Paulo Coelho). En definitiva, solo puedo agradecer a todas y cada una de las personas que han vivido conmigo la realización de esta tesis, con sus altos y bajos, y que no necesito nombrar porque tanto ellas como yo sabemos que desde los más profundo de mi corazón, les agradezco el haberme brindado todo su apoyo, colaboración, ánimo, y sobre todo, su cariño y amistad.

Nicole Alejandra Letelier Torres

PUBLICACIONES

Immune system alterations by aldosterone during hypertension: From clinical observations to molecular mechanisms. N Muñoz-Durango, M F. Barake, **NA Letelier**, Carmen Campino, Carlos Fardella and AM. Kalergis. Curr Mol Med. 2013 Apr 12

BECAS Y FINANCIAMIENTO

BECAS

2012-2014: Beca de arancel completa otorgada por la Dirección de Postgrado y Postítulo. Facultad de Ciencias químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

2012-2014: Beca para estudios de Magíster en Chile, año académico 2012, otorgada por CONICYT.

FINANCIAMIENTO

Núcleo Milenio de Inmunología e Inmunoterapia (P04/030-F)

ABREVIATURAS

ACK: Buffer de lisis de glóbulos rojos.

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

ADNc: Ácido Desoxirribonucleico complementario.

AMM: Activación alternativa de macrófagos.

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico.

APC: Célula presentadora de antígenos.

Ang-II: Angiotensina II.

ARN: Ácido Ribonucleico.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

bm-DCs: Células dendríticas derivadas de médula ósea.

BSA: Albúmina de suero bovino.

CO: Monóxido de carbono.

COPP: Protoporfirina de cobalto.

CORT: Corticosterona.

CS: Síndrome de Cushing.

CTGF: Factor de Crecimiento de tejido conectivo.

CTL: Linfocitos T citotóxicos.

DCs: Células dendríticas.

Dex: Dexametasona.

DOCA: Acetato de Deoxicorticosterona.

E2: Estrógeno.

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidermal.

ELISA: Ensayo inmuno-absorbente ligado a enzima.

FACS: Citometría de flujo.

FITC: Isotiocianato de Fluoresceína.

GCs: Glucocorticoides.

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de Granulocitos-Macrófagos.

GR: Receptor de glucocorticoides.

GR α : Isoforma alfa del receptor de glucocorticoides.

GR β : Isoforma beta del receptor de glucocorticoides.

GPR30: Receptor acoplado a proteína G 30.

11 β HSD1: 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1.

11 β HSD2: 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2.

HCMAs: Microarterias coronarias humanas.

HO-1: Hemooxigenasa tipo 1.

HRE: Elementos de respuesta a hormonas.

IA/IE: Análogo murino de MHC-II.

IFN- γ : Interferón gamma.

IL: Interleuquina.

IRF3: Factor 3 de regulación de interferón.

KO: *Knock out*.

KO MR: *Knock out* para el receptor de mineralocorticoides.

LPS: Lipopolisacárido.

M1: Macrófagos tipo 1.

M2: Macrófagos tipo 2.

MFI: Intensidad de Fluorescencia Media.

MHC-I: Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo 1.

MHC-II: Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo 2.

Mo-DCs: Células dendríticas derivadas de monocitos.

MPP: Metaloproteinasa.

MR: Receptor de Mineralocorticoides.

nM: Nanomolar.

NAD $^{+}$: Nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada).

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida).

NFAT: Factor nuclear de células T activadas.

NF- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

PAMPs: Patrones Moleculares Asociados a Patógenos.

Pb: Pares de bases nucleotídicas.

PBMCs: Célula mononuclear de sangre periférica.

PBS: Solución salina tamponada con fosfato.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PDL-1: Ligando 1 de muerte celular programada (Programmed cell death ligand 1).

PE: Ficoeritrina.

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa.

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en con retrotranscripción previa del ARN.

RAG^{-/-}: *Knock out* para el gen activador de la recombinasa.

RAW: Línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7.

ROS: Especies Reactivas de oxígeno.

RU486: Mifepristona.

SNPP: Protoporfirina de estaño.

SPIRO: Espironolactona.

TCR: Receptor de Célula T.

TGF- β : Factor de crecimiento tumoral beta.

Th17: Célula T ayudante17.

TLR: Receptor tipo toll (*Toll-like receptor*).

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa.

Treg: Células T Reguladoras.

uM: Micromolar.

UT: Sin tratamiento (Untreated).

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular.

VSMCs: Células del músculo liso vascular.

WT: *Wild type* ("de tipo silvestre").

RESUMEN

El inicio de la respuesta inmune adaptativa depende de la interacción específica entre células T CD4⁺ naïve y células presentadoras de antígenos (APCs). De todas las APCs, las células dendríticas (DCs) juegan un rol fundamental en la iniciación y regulación de la respuesta inmune adaptativa. Su función principal es la de capturar, procesar los antígenos y presentarlos a los linfocitos B y T para que éstos inicien la repuesta inmunológica. En este contexto, previamente nuestro grupo de investigación demostró que las DCs expresan el receptor de mineralocorticoides (MR), cuya activación por aldosterona induce la secreción de IL-6 y TGF- β , aumenta su capacidad para activar células CD8⁺ y promueve la polarización de las células T CD4⁺ hacia un perfil TH17 (rol pro-inflamatorio).

Diversos estudios han evidenciado que productos del sistema nervioso y endocrino pueden tener efectos importantes sobre la función de las DCs. De este modo, se ha demostrado que la activación de MR por aldosterona genera una respuesta pro-inflamatoria y la activación del receptor de glucocorticoides (GR) por cortisol (corticosterona en modelo murino) genera una respuesta anti-inflamatoria. Sin embargo, la interacción entre estos receptores es más compleja, ya que cortisol puede unirse a MR con igual afinidad que aldosterona; no obstante, en algunos tejidos como el riñón existe una enzima que le confiere a MR selectividad por aldosterona denominada 11 β hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2 (11 β HSD2), aunque en diversas células del sistema inmune se ha descrito la ausencia de esta enzima. Tradicionalmente, los glucocorticoides (GCs) han sido ampliamente utilizados en el tratamiento de enfermedades inflamatorias generando, a través de la activación de GR, una potente inhibición de la respuesta inmune. Pero, a pesar de los beneficios antiinflamatorios postulados, en pacientes que presentan un exceso de GCs han sido observados efectos adversos como hipertensión y daño cardiovascular. En estos casos, se ha propuesto que un exceso de GCs podría promover la excesiva activación MR, aumentando la respuesta pro-inflamatoria.

Recientemente, se ha descrito en células del músculo liso vascular (VSMCs) un nuevo receptor capaz de activarse por hormonas corticosteroidales: el Receptor Acoplado a Proteína G-30 (GPR30), que en células endoteliales puede ser activado por estrógenos, aldosterona o cortisol, y cuya expresión no ha sido descrita en DCs. Por lo tanto, el efecto neto de aldosterona y cortisol dependerá de la concentración de cada ligando, el contexto celular y los niveles de expresión relativa de cada receptor en cada célula inmune, entre otros múltiples factores.

Otro antecedente que centró nuestra atención fue que espinolactona (SPIRO), un antagonista competitivo de MR, sería capaz de inducir la expresión de hemo oxigenasa-1 (HO-1), enzima cuya actividad tiene efectos antioxidantes, anti-inflamatorios y anti-apoptóticos. Diversos

estudios demuestran que las DCs expresan HO-1 y que esta expresión disminuye drásticamente como resultado del proceso de maduración y que la sobreexpresión de HO-1 en DCs, inhibe la maduración y la función pro-inflamatoria inducida por LPS. En este contexto, las DCs juegan un rol clave en la regulación de la inmunidad adaptativa y la activación de las células T, por lo tanto, el efecto de la HO-1 sobre la regulación de la función de las DCs puede ser altamente relevante para modular la respuesta inmune adaptativa.

Basándonos en estos antecedentes nuestra hipótesis central fue que "corticosterona, a través de la señalización de MR, aumenta la capacidad de las células dendríticas para activar células T". En primer lugar, para caracterizar nuevos moduladores de la función de las DCs, determinamos la expresión relativa de MR, 11 β HSD2, GPR30 y las dos isoformas de GR por qRT-PCR, observando que DCs derivadas de médula ósea (bm-DCs) presentan niveles detectables de ARNm para estas proteínas, los cuales aumentaron cuando se indujo la maduración con LPS, a excepción de la isoforma GR α , cuyos niveles no varían con el proceso de maduración. Posteriormente, nos propusimos detectar la expresión de ARNm de MR, 11 β HSD2 y GPR30 en otro tipo celular que cumple funciones de APC: los linfocitos B. Purificamos linfocitos B a partir de esplenocitos y mediante qRT-PCR determinamos los niveles de cada ARNm. Los datos obtenidos sugieren que los linfocitos B presentan niveles detectables de ARNm para GPR30 y MR, pero no para 11 β HSD2. Como un objetivo adicional, nos propusimos determinar si espinolactona es capaz de aumentar los niveles de ARNm de HO-1 en bm-DCs, sin embargo, los datos que obtuvimos no son concluyentes, ya que solo se observó un ligero aumento en la expresión de HO-1. Por otro lado, centrándonos en nuestro objetivo principal, generamos bm-DCs y las estimulamos con corticosterona más RU486 (antagonista de GR) para promover la unión a MR, y luego analizamos los cambios en su fenotipo. En este caso, los datos sugieren que los estímulos utilizados no afectan significativamente la viabilidad de las bm-DCs y que el tratamiento previo con RU486 y posteriormente con corticosterona, disminuye la expresión de PDL-1 y aumenta la expresión de CD40 en bm-DCs.

Finalmente, los datos obtenidos en esta tesis no nos permiten concluir categóricamente que corticosterona es capaz de activar MR e inducir un fenotipo pro-inflamatorio en las DCs, pero la disminución en la expresión de PDL-1 y el aumento de CD40 sugieren que las DCs tienden a adquirir dicho fenotipo. De manera significativa, nuestros resultados sugieren que las DCs expresan 2 proteínas que no habían sido descritas en este tipo celular: GPR30 y 11 β HSD2, las cuales abren una nueva posibilidad de regulación de la función de las DCs.

ABSTRACT

The initiation of the adaptive immune response depends on the specific interaction between T cells naïve CD4⁺ and antigen presenting cells (APCs). Of all the APCs, dendritic cells (DCs) play a critical role in the initiation and regulation of adaptive immune response. Their main function is to capture and process antigens and present them to T and B lymphocytes to initiate these immune response. In this context, previously, our research group showed that the DCs express the mineralocorticoid receptor (MR), and that its activation by aldosterone induce the secretion of IL-6 and TGF- β , increases its ability to activate CD8⁺ T cells and promotes polarization of CD4⁺ T cells toward a Th17 profile (associated with the inflammatory role).

Diverse studies have shown that products and processes of the nervous and endocrine systems can have significant effects on the function of DCs. Thus, it has been shown that activation of MR by aldosterone generates a pro-inflammatory response, and the activation of the glucocorticoid receptor (GR) by cortisol (corticosterone in murine model) generates an anti-inflammatory response. However, the interaction between these receptors is more complex because cortisol can bind to MR with equal affinity that aldosterone; nevertheless, in some tissues, such as kidney, exists an enzyme that confers selectivity to MR by aldosterone called 11- β -hidroxysteroid dehydrogenase type 2 (11 β HSD2), although in various cells of the immune system has been described the absence of this enzyme. Traditionally, glucocorticoids (GCs) have been widely used in the treatment of inflammatory diseases by generating, through the activation of GR, a potent inhibition of the immune response. But despite the postulated anti-inflammatory benefits in patients, with an excess of GCs have been observed adverse effects such as hypertension and cardiovascular damage. In these cases, it is suggested that an excess of GCs may promote excessive activation MR, increasing the pro-inflammatory response.

Recently, it has been described in vascular smooth muscle cells (VSMCs) a new receptor that can be activated by corticosteroids hormones: G-protein coupled receptor-30 (GPR30). In endothelial cells, this receptor can be activated by estrogen, aldosterone or cortisol, but its expression has not been described in DCs. Thus, the net effect of aldosterone and cortisol depend on the concentration of each ligand, the cellular context and the relative expression levels in each immune cell, among other factors.

Other antecedent that focused our attention was that spinolactone (SPIRO), a competitive

antagonist of MR, would be capable of inducing the expression of heme oxygenase-1 (HO-1), an inducible enzyme by ligand and has antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic activity in kidney cells. Several studies show that DCs express HO-1, and that this expression decreases drastically as a result of the maturation process and that the overexpression of HO-1 in DCs inhibits maturation and pro-inflammatory function induced by LPS. In this context, DCs play a key role in the regulation of adaptive immunity and T cell activation, so the effect of HO-1 on the regulation of the function of the DCs may be highly relevant to modulate the adaptive immune response.

Based on this background, our central hypothesis was that "corticosterone through MR signalling enhances the ability of dendritic cells to activate T cells". First, to characterize in DCs novel modulators of the function expression, we determined the RNA relative levels of MR, 11 β HSD2, GPR30 and the two isoforms of GR by qRT-PCR, observing that bone marrow-derived DCs (bm-DCs) have detectable levels of mRNA for these proteins, which are increased when maturation was induced by LPS, with the exception of GR α isoform, whose levels of expression does not change by this maturation process. Later, we decided to detect mRNA expression of MR, 11 β HSD2 and GPR30 in another cell type which act as APCs: B-lymphocytes. Our data suggest that B-lymphocytes have detectable RNA levels for GPR30 and MR, but not for 11 β HSD2. As a further object, we wanted to determine if spironolactone is able to increase HO-1 mRNA levels in bm-DCs, however, we obtained inconclusive data, as only a slight increase was observed in the HO-1 mRNA levels. On the other hand, focusing on our main aim, we generated bm-DCs and stimulated them with corticosterone and RU486 (a GR antagonist) to promote binding to MR and then we analysed changes in phenotype. In this case, the data suggest that the stimuli does not significantly affect the viability of the bm-DCs and that pre-treatment with RU486 and subsequently with corticosterone, decreases the expression of PDL-1 and increases expression of CD40 in bm-DCs.

Finally, the data obtained in this thesis does not allow us to conclude categorically that corticosterone is able to activate of MR and induce a pro-inflammatory phenotype in DCs, but the decrease in expression of PDL-1 and increase in the CD40 levels suggests that DCs tend to acquire the pro-inflammatory phenotype. Significantly, our results suggest that DCs express two new proteins that had not been described in this cell type: GPR30 and 11 β HSD2, which open a new possibility for regulating the DCs function.

1.- INTRODUCCIÓN.

El sistema inmune está compuesto por diversos mecanismos implicados en la eliminación de patógenos invasores y en la prevención de ataque contra los tejidos propios, preservando la integridad del organismo a través de una red dinámica de diversas células y moléculas encargadas del proceso de reconocimiento altamente específico del antígeno que permite asegurar la destrucción de agentes peligrosos sin generar daños a los tejidos propios (1-3).

Tradicionalmente, el sistema inmune se divide en dos: la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa. Las células del sistema inmune innato, tales como células dendríticas (DCs), macrófagos y neutrófilos, responsables de iniciar la respuesta inmune de acción rápida, pueden reconocer una diversidad limitada de moléculas a través de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) conservados para un gran número de patógenos, incluido el lipopolisacárido (LPS), que son reconocidos por receptores específicos, como los *Toll like Receptors* (TLRs) y proteínas del sistema del complemento (3-5). Sin embargo, debido al limitado número de moléculas que es capaz de reconocer, una respuesta eficiente contra los patógenos se logra mediante la combinación de la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa.

La inmunidad adaptativa tiene la ventaja de ser altamente específica y de generar memoria inmunológica (6-9). Está constituida por células especializadas, llamadas células presentadoras de antígeno (APCs), que son las encargadas de capturar y procesar a los patógenos, exponiendo los antígenos en moléculas superficiales especializadas, llamadas complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). De todas las APCs, las DCs juegan un rol fundamental, ya que tienen la capacidad única de activar células T *naïve*.

Considerando el rol clave de las DCs en la generación de la respuesta inmune, diversas investigaciones se han centrado en la búsqueda de moléculas que puedan modular su función. Los agentes moduladores de la función de las DCs más estudiados son los glucocorticoides (GCs) y sus receptores, los cuales han sido involucrados en la etiología y progresión en enfermedades como la, inflamación, hipertensión y fibrosis cardíaca(10). Los GCs, como el cortisol, tienen efectos tanto inhibitorios como estimuladores sobre los diversos componentes de la respuesta inmune, a través de una gran variedad de mecanismos moleculares, por lo tanto, la respuesta de las células del sistema inmune a los GCs es altamente variable. Una posible explicación para estas acciones pleiotrópicas es que una alta concentración de cortisol podría saturar la enzima 11 β HSD2, que en diversos tejidos esta

presente para proteger al receptor de mineralocorticoides (MR) de la activación por cortisol, promoviendo la excesiva activación de MR y el consecuente aumento en la respuesta pro-inflamatoria(11, 12). Adicionalmente, un nuevo receptor podría intervenir en la respuesta de las DCs frente a un estímulo con hormonas corticosteroidales: el receptor acoplado a proteína G-30 (GPR30), que puede ser activado por estrógenos, aldosterona o cortisol.

Por lo tanto, el efecto neto sobre la respuesta inmune de aldosterona y cortisol dependerá de la concentración de cada ligando, el contexto celular y los niveles de expresión relativa de cada receptor en cada célula inmune, entre otros múltiples factores. En este contexto, el objetivo de esta tesis es profundizar en la comprensión del papel de los receptores de corticosteroides en las DCs y su efecto sobre la respuesta inmune con un enfoque particular en el posible rol pro-inflamatorio de cortisol en las DCs. Esta propuesta es relevante ya que la mayoría de los estudios sobre la interacción GR-MR se han realizado *in vitro* en macrófagos, utilizando moléculas sintéticas, las cuales fueron modificadas para tener mayor afinidad por estos receptores, alterando las condiciones fisiológicas en que éstos interactúan entre sí.

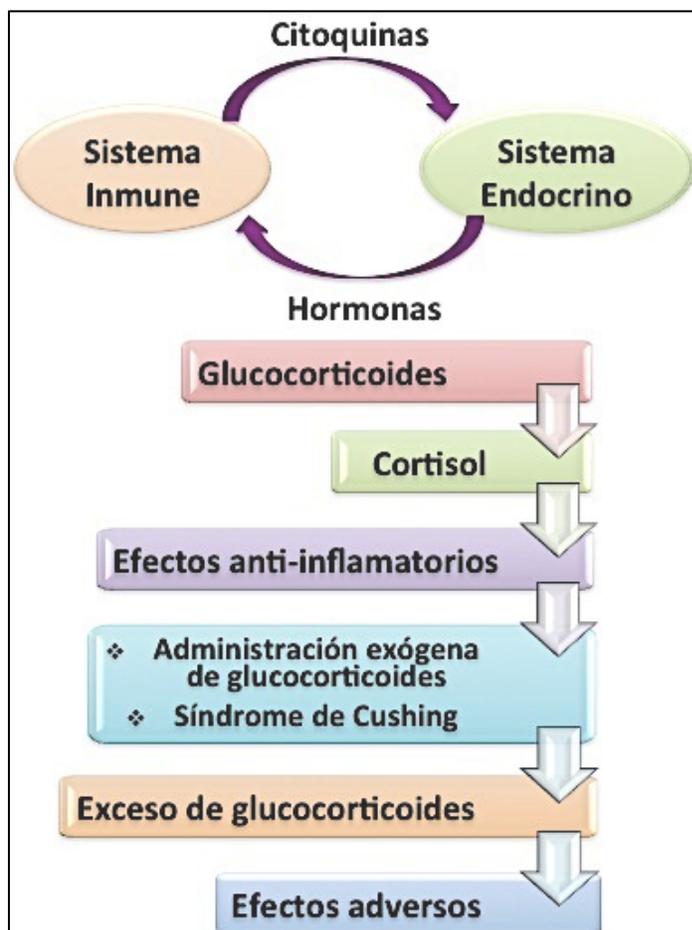


Figura 1: Relación entre el sistema endocrino y el sistema inmune.

El sistema inmune puede regular la respuesta endocrina mediante la secreción de citoquinas y viceversa a través de las hormonas. Un ejemplo son los glucocorticoides como el cortisol, cuyos altos niveles generan una potente respuesta anti-inflamatoria, siendo la administración de GCs exógenos un tratamiento efectivo para diversas patologías. Sin embargo, la exposición a un exceso de GCs por largos períodos de tiempo generan efectos adversos como miopatías, hipertensión y daño endotelial.

1.1 Células Dendríticas (DCs).

La respuesta inmune adaptativa es iniciada por APCs, como macrófagos, DCs o células B, que son las encargadas de capturar y procesar los antígenos exógenos para posteriormente, exponerlos en moléculas de MHC. Luego, estas células migran hacia los órganos linfoides secundarios para buscar células T *naïve* que respondan a los antígenos expuestos a través de la interacción específica entre el receptor de células T (TCR) presente en la superficie de células T y el MHC de la APC. Una vez que se logra esta interacción, se desencadena la activación y expansión de esta población de células T específica (3).

Las DCs son APCs especializadas con la capacidad única de activar células T *naïve* específicas e iniciar la respuesta inmune adaptativa (13-15). Las DCs presentes en tejidos periféricos exhiben un fenotipo inmaduro caracterizado por una alta capacidad fagocítica y baja expresión de moléculas co-estimuladoras como CD40, CD80 y CD86 (16). Durante este fenotipo inmaduro, las DCs exponen antígenos propios en las moléculas MHC e inducen anergia en células T antígeno específicas; de esta forma, las DCs son importantes mediadores de la tolerancia y mantención de la homeostasis inmune (17).

Una vez que las DCs inmaduras reconocen PAMPs, sufren un cambio fenotípico, conocido como la maduración, migración a los ganglios linfáticos secundarios y aumento en la eficiencia de procesamiento y presentación de antígenos en las moléculas MHC a células T *naïve* CD8+ y CD4+, que luego de activarse, se convertirán en células T citotóxicas y células T helper (Th), respectivamente. Las DCs maduras presentan antígenos y expresan altos niveles de moléculas co-estimuladoras y moléculas de MHC, además de secretar varias citoquinas y quimioquinas que desencadenan la activación de las células T (18). Las DCs también pueden polarizar las células T CD4+ hacia una respuesta Th diferencial a través de la secreción de distintos patrones de citoquinas (15, 19). Las células T CD4+ pueden ser clasificadas en distintos subtipos de acuerdo al patrón de citoquinas secretado: células Th1 secretan mayoritariamente IFN- γ , las células Th2 producen IL-4 e IL-10 (20) y las células Th17 se caracterizan por la producción de IL-17 (21, 22).

Debido a este rol clave en la respuesta y la tolerancia inmune, la modulación de la función de las DCs ha sido altamente estudiada como mecanismo para evitar daños a causa de patologías autoinmunes o inflamatorias (23). Diversas clases de agentes inmunosupresores han sido caracterizados, de ellos, los más estudiados son los GCs, que a través de GR, son capaces de suprimir la diferenciación/ maduración de DCs *in vitro* (24-26). Por otro lado,

entre los agentes inmuno-estimulantes se encuentra MR, cuya activación por aldosterona promueve un estado pro-inflamatorio (10).

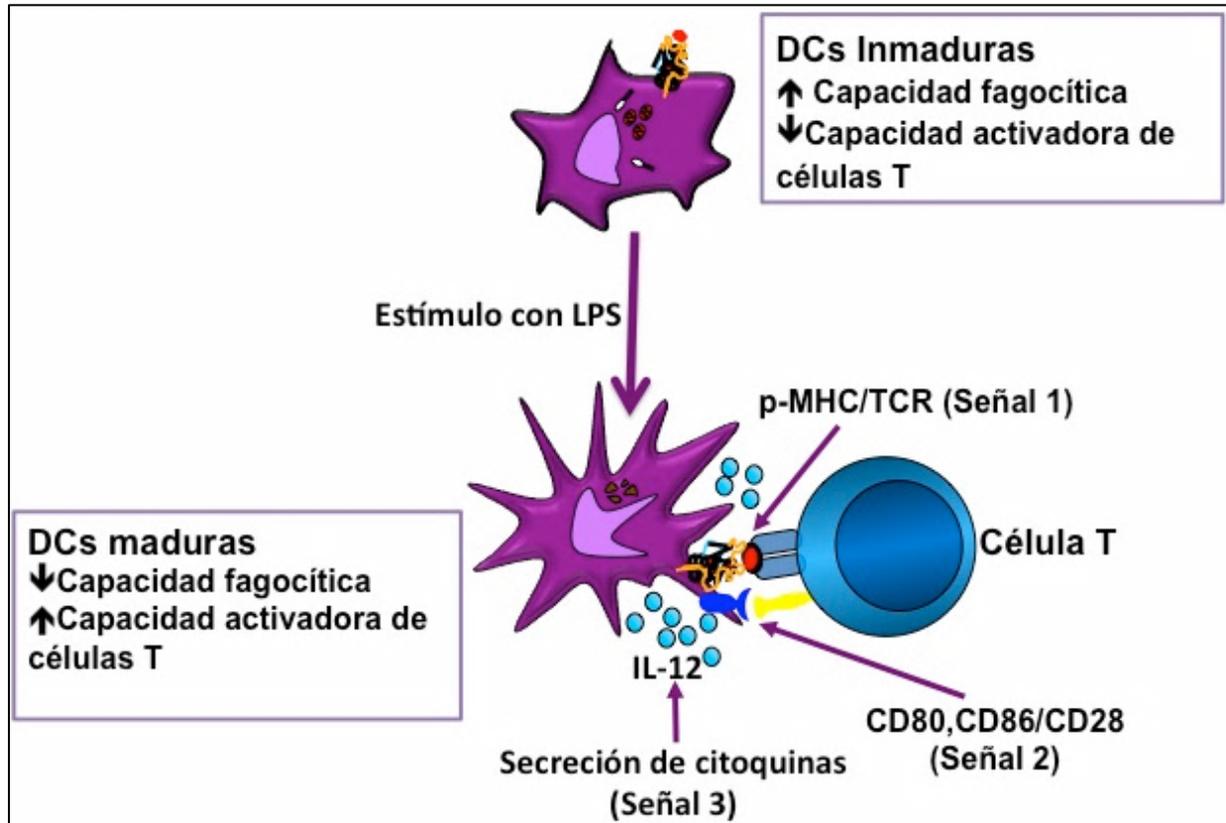


Figura 2: Estados de diferenciación de las DCs.

Las DCs inmaduras presentan los antígenos endógenos y exógenos en moléculas de MHC y secretan citoquinas como IL-10, pero no expresan moléculas co-estimuladoras. Después de un estímulo con LPS, las DCs adquieren un fenotipo maduro, expresando altos niveles de moléculas co-estimuladoras como CD80 y secretando diversas citoquinas pro-inflamatorias como IL-12, que inducen la activación de células T e inician la respuesta inmune adaptativa.

1.2 Receptores Corticosteroidales: Receptor de glucocorticoides (GR) y receptor de mineralocorticoides (MR).

Las hormonas corticosteroidales (glucocorticoides, mineralocorticoides) son sintetizadas a partir del colesterol en la corteza adrenal y ejercen sus efectos a través de la unión a receptores citoplasmáticos: GR y MR (27, 28). Estos receptores son miembros de un subgrupo de la superfamilia de receptores nucleares de factores transcripcionales activados por ligando y son expresados en células inmunes como macrófagos, neutrófilos y DCs (29, 30). Luego de su activación, estos receptores sufren un cambio conformacional, disociándose de las proteínas chaperonas y translocan hacia el núcleo, iniciando la transcripción de genes específicos mediante la interacción con co-activadores de la transcripción y la unión a los elementos de respuesta a hormonas (hormone-response elements, HRE) (31). El perfil de localización de estos dos receptores es distinto, reflejando su especificidad y frecuentes roles opuestos en la regulación de la respuesta inmune. Por ejemplo, el timo contiene una de las mayores concentraciones de GR, mientras que no expresa MR (32-36). En cambio, ambos receptores son expresados por las células del bazo, aunque los niveles de MR son muy bajos (37). El patrón de expresión diferenciado que presentan GR y MR puede determinar la respuesta/sensibilidad de las células inmunes a las hormonas corticosteroidales (38).

Recientemente, ha sido demostrado en células humanas un mecanismo de regulación post-transcripcional de GR que consiste en un *splicing* alternativo que genera 2 ARN mensajeros (ARNm) distintos. El *splicing* del exón 9A genera la isoforma GR α , relacionada principalmente los efectos genómicos de los GCs, induciendo modificaciones transcripcionales de los genes blancos. En cambio, el *splicing* del exón 9B genera la isoforma GR β a la cual no se le ha identificado actividad transcripcional a pesar de su unión al ADN (39). Por lo tanto, GR β podría actuar como dominante negativa (inhibición de la actividad) de GR α , formando heterodímeros sin actividad transcripcional (40). De acuerdo a Cao et.al, esta regulación post-transcripcional también existe en células murinas (41). Además, las distintas isoformas de GR son expresadas en DCs maduras e inmaduras para contribuir a la sensibilidad a los GCs de acuerdo al estado de maduración (41). Por ejemplo, las DCs maduras, pero no las inmaduras, son sensibles a la apoptosis inducida por GCs.

Cortisol, principal glucocorticoide en humanos (corticosterona en ratones) ejerce sus efectos a través de la activación de 2 receptores intracelulares: GR (de baja afinidad) y MR (de alta

afinidad) (42). En el núcleo, GR unido a cortisol regula la expresión génica mediante 2 mecanismos: el primero involucra la unión de los homodímeros de GR a HREs en el promotor de los genes blancos, generando el subsecuente reclutamiento de co-activadores que inician el remodelado de la cromatina y facilitan la transcripción de los genes blancos. El segundo, es un mecanismo de regulación transcripcional independiente de la dimerización y la unión al ADN; los genes blancos son regulados negativamente mediante un mecanismo de trans-represión que en la mayoría de los casos involucra la interferencia negativa de GR con la actividad de otros factores de transcripción como NF- κ B, IRF3, NFAT, STAT, T-Bet y GATA-3 (43-45). Diferentes mecanismos de GR en diferentes tipos celulares pueden ser requeridos para la completa actividad anti-inflamatoria de los GCs(42).

Por otro lado, MR ha sido ampliamente estudiado en términos de su activación por aldosterona y el aumento en la reabsorción de sodio, la retención de agua y la pérdida de potasio y magnesio (efectos sobre el riñón), y en la regulación de la presión sanguínea (46-49). El ARNm de MR humano codifica un polipéptido altamente homólogo al ARNm de GR humano, con un 57% de homología para el dominio de unión a ligando y 94% de homología para el dominio de unión a ADN (29). Así, la translocación de MR al núcleo también puede ser promovida por cortisol mientras que aldosterona se une específicamente a MR. Cortisol se une a MR con una afinidad equivalente a la que aldosterona se une a MR; sin embargo, en tejidos epiteliales (como los túbulos de los riñones) la enzima 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2 (11 β HSD2) permite la activación selectiva de MR por aldosterona, ya que es capaz de convertir cortisol en cortisona, forma inactiva capaz de unirse a MR pero incapaz de activarlo. La enzima 11 β HSD2 usa como co-factor NAD⁺, cuya reducción a NADH cambia el estado redox intracelular y las afinidades de MR. Ha sido reportado que altos niveles de NADH induce la inactivación del complejo cortisol/MR pero no inactiva el complejo aldosterona/MR (50). Por el contrario, cuando el estado redox intracelular cambia por inhibición de la enzima 11 β HSD2, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) favorece la unión de cortisol a MR (51, 52). Por lo tanto, la enzima 11 β HSD2 no solo tiene un efecto directo, sino que el estado redox celular promueve la “selectividad de aldosterona para activar MR” (53).

Se ha descrito que la ausencia de 11 β HSD2 en monocitos/macrófagos permite que cortisol active a MR (54). Se desconoce si las DCs expresan esta enzima pero se ha descrito que sí expresan la enzima 11 β HSD1, que convierte cortisona en cortisol (55). 11 β HSD1 tiene actividad bidireccional: puede catalizar la reducción o deshidrogenación de cortisol o

cortisona, además, frente a altas concentraciones de GCs esta enzima es capaz de cumplir la función de la enzima 11 β HSD2, deshidrogenando el cortisol para convertirlo en cortisona. Recapitulando, 11 β HSD1 *In vivo* predominantemente reactiva los GCs, amplificando su acción, mientras que 11 β -HSD2 inactiva a los GCs. En ausencia de 11 β -HSD2, cortisol se une preferentemente a MR, ya que las concentraciones fisiológicas de aldosterona son al menos mil veces más bajas. Estudios recientes han demostrado la presencia de la enzima 11 β HSD1 pero no la de 11 β HSD2 en macrófagos diferenciados (54), sin embargo, 11 β HSD1 no está presente en los monocitos circulantes, por lo tanto, su expresión parece ser inducida por el estado de diferenciación y activación de los monocitos (54, 56). Diversos estudios sugieren que MR es el receptor para cortisol en condiciones fisiológicas pero la activación de MR por cortisol puede depender de diversas condiciones intracelulares como el equilibrio de las actividades de las enzimas 11 β HSD1/ 11 β HSD2 y los estados redox.

En este contexto, a pesar de los efectos anti-inflamatorios ampliamente descritos para los GCs, en estados de exceso como pacientes con el Síndrome de Cushing (CS), estrés crónico o con terapias de GCs exógenos se presentan efectos cardiovasculares adversos como hipertensión o daño endotelial (57-59). Recientemente, se ha propuesto que frente a altas concentraciones de cortisol, la enzima 11 β HSD2 se puede saturar y dejar de conferir selectividad a MR por aldosterona, posibilitando la unión de cortisol a MR, cuya excesiva activación promovería la fibrosis, hipertensión y patologías vasculares inflamatorias(60). De acuerdo a la literatura, la prevalencia de la hipertensión en niños y adolescentes con CS endógeno es mayor al 60% y en adultos es de aproximadamente un 80% (58, 61). Pacientes con CS exógeno desarrollan hipertensión dependiendo de la duración y dosis de la administración de GCs. Sin embargo, el posible rol pro-inflamatorio de los GCs mediante la activación de MR en célula inmune aún es desconocido.

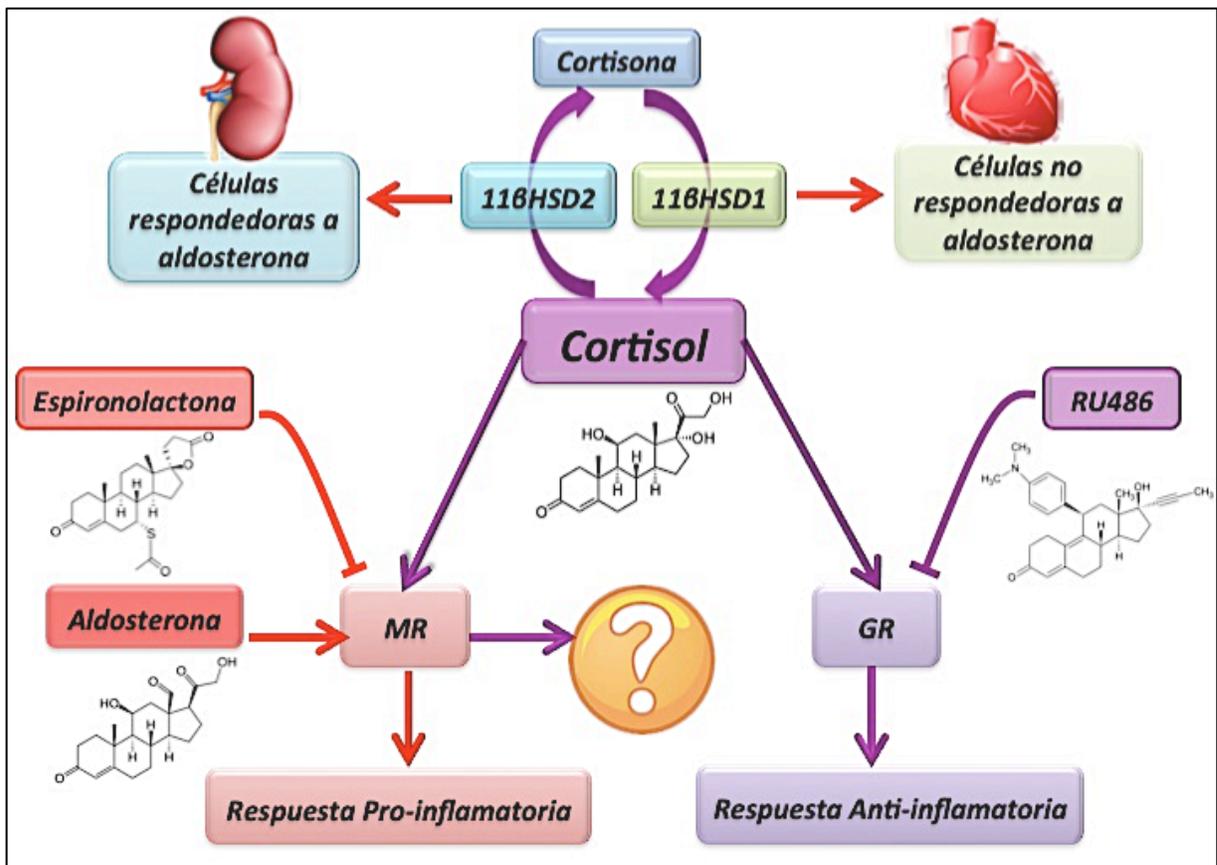


Figura 3: Interacción entre GR, MR y sus ligandos.

Cortisol se une a GR, generando una potente respuesta anti-inflamatoria. Sin embargo, también se puede unir a MR, el cual mediante la unión de aldosterona, genera una respuesta de tipo pro-inflamatoria. La selectividad por uno u otro ligando está dada (entre otros factores) por 2 isoenzimas: 11β-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2 (11β-HSD2) que convierte cortisol en cortisona (que bloquea a MR) y 11β-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 (11β-HSD1) que realiza el paso inverso. Así, células que expresan 11βHSD2 serán células que responden a aldosterona, como por ejemplo células del riñón, y células que no expresen esta enzima o expresen 11βHSD1 serán células que no responden a aldosterona, como por ejemplo las células cardíacas. En las células respondedoras a aldosterona, a altas concentraciones de GCs se observan efectos tanto a través de GR como MR. Sin embargo, en células no respondedoras a aldosterona cortisol actúa a través de MR principalmente, existiendo la posibilidad de que se formen homodímeros cortisol/MR o que GR y MR unidos a cortisol heterodimericen, cuyos efectos no han sido descritos. Además, existen inhibidores farmacológicos para cada receptor: espironolactona para MR y RU486 para GR.

1.3 Efectos de las hormonas corticoesteroidales sobre el sistema inmune.

En general, los GCs actúan sobre la APC para evitar que realice su función o en su mayoría lo hacen sobre los linfocitos, impidiendo su activación o proliferación (45, 62). Los subtipos de linfocitos T tienen distintas sensibilidades a los GCs, pero en general, conducen a una inhibición de la síntesis de IL-2 (63). Además, los GCs inhiben rápidamente la vía de señalización del TCR mediante un mecanismo no genómico y disminuyen la expresión del marcador CD4 en células T CD4+ no estimuladas y en las tratadas con anti-CD3/anti-CD28 (63). Además, Leussink et al observaron en pacientes con esclerosis múltiple una sensibilidad significativa en las células T CD4+, una sensibilidad moderada en las células T CD8+ y resistencia en linfocitos B y células asesinas naturales (NK) a los efectos pro-apoptóticos de los GCs (64).

Adicionalmente, existen interacciones funcionales entre los GCs y transductores de señal y activadores de la transcripción (STATs) (65). La unión de las distintas citoquinas a sus receptores en células T CD4+ *naïve* conduce a la activación de STATs específicos, lo que resulta en la diferenciación hacia un linaje Th determinado. Por ejemplo, STAT4, un transductor de señal de IL-12, se requiere para la generación de linfocitos Th1, mientras que STAT3 es el transductor de IL-6, IL-23 e IL-21, citoquinas implicadas en la generación de linfocitos Th17(63, 66). Con respecto a los efectos de los GCs sobre la población de linfocitos Th17, existe controversia ya que mientras algunos reportes sugieren que esta población aumenta, otros apuntan a una disminución (63).

Por otro lado, durante un tratamiento crónico con GCs, los efectos predominantes en las células B son la reducción de su número en bazo y ganglios linfáticos, la atenuación de la proliferación de los progenitores tempranos, el aumento en la producción de IgE y la disminución en la producción de IgG (67). Altas dosis de GCs disminuyen los niveles circulantes de anticuerpos, inicialmente debido a un aumento del catabolismo de las inmunoglobulinas, seguido por la reducción de su síntesis, con un efecto máximo alcanzado después de 2-4 semanas (63). Además, se ha demostrado que altas dosis de dexametasona provoca una reducción significativa del ARNm y la proteína del factor de activación de células B (BAFF), capaz de regular la supervivencia y la maduración de linfocitos B, la producción de anticuerpos y el cambio de clase de inmunoglobulina circulante (68, 69).

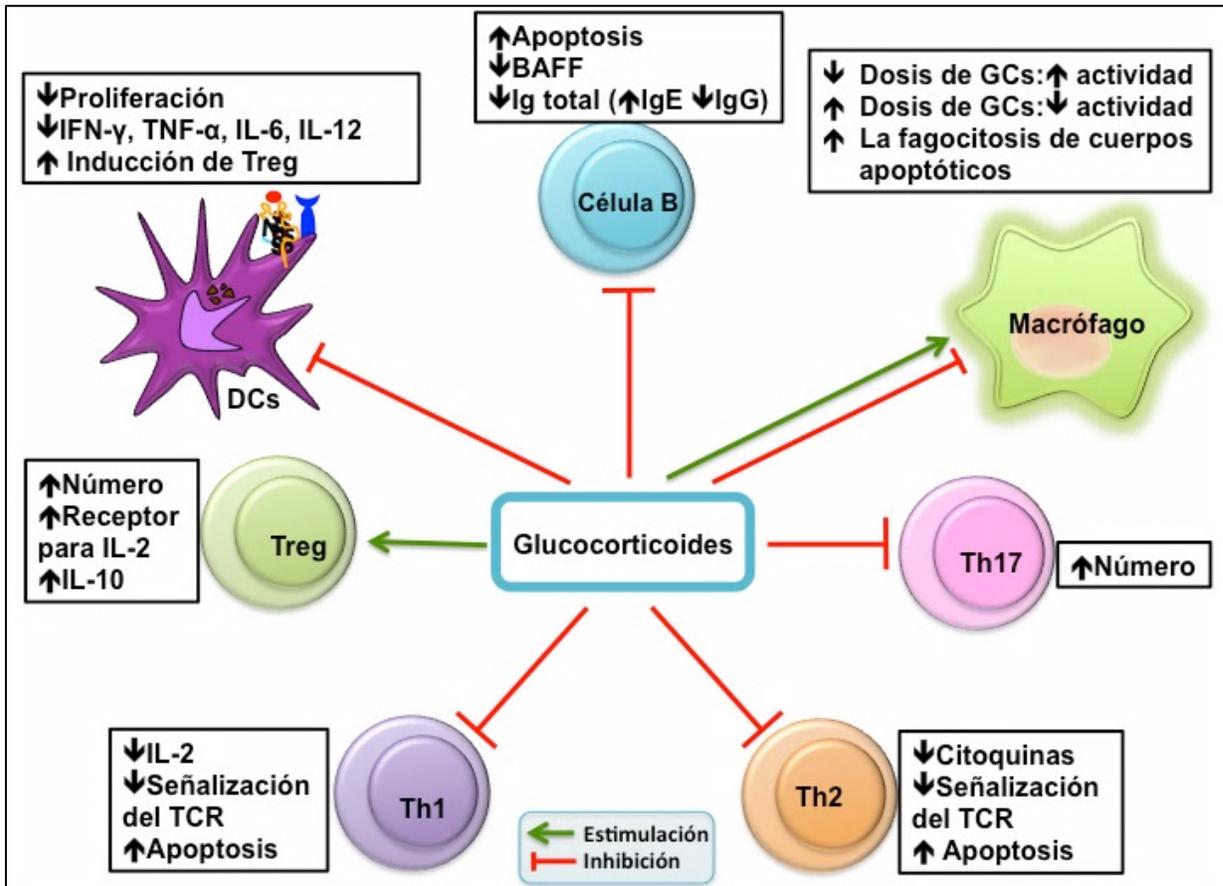


Figura 4: Efectos de los glucocorticoides sobre las células del sistema inmune. El mecanismo de acción de los GCs involucra la supresión de la activación de la células T, la proliferación y la producción de citoquinas. Además, en macrófagos y DCs altera el tráfico vesicular, clearance viral, la generación, maduración y sus propiedades inmunoestimuladoras.

La mayoría de los estudios existentes sobre los efectos de la activación de MR y GR han sido desarrollados en macrófagos. Diversos autores sugieren que la expresión de estos receptores en macrófagos depende de estímulos externos. Por ejemplo: la estimulación con LPS incrementa la expresión génica de GR 5 veces después de 4 horas de estímulo, mientras la expresión génica de MR fue totalmente suprimida en el mismo período de tiempo; en cambio, la estimulación de macrófagos con IFN-γ induce un incremento de 4 veces en la expresión génica de tanto MR como de GR (70). Por otro lado, Lim et al. ha demostrado que bajas concentraciones de corticosterona aumenta las funciones inmunes de los macrófagos peritoneales, mientras que altas concentraciones son inmunosupresoras(71). Estos datos sugieren que los efectos de bajas concentraciones de GCs son mediados por MR mientras que los efectos de altas concentraciones son mediados por GR. Sin embargo, también existen estudios en macrófagos peritoneales que muestran un efecto opuesto

inducido por diferentes concentraciones de GCs (nM versus uM) mediados solo por GR a pesar de la presencia de MR (71). Además, la exposición de macrófagos murinos y humanos a GCs por 24 horas causa un incremento en la captación de cuerpos apoptóticos (72). En este contexto, la exposición de monocitos sanguíneos periféricos a GCs induce un fenotipo altamente fagocítico a través de cambios en los componentes intracelulares: reorganización del citoesqueleto seguida por cambios en la adhesión; sugiriendo que los GCs son capaces de re-programar la diferenciación de monocitos (72).

La activación de MR en macrófagos induce estrés oxidativo a través de la activación de NF- κ B, generando un fenotipo pro-inflamatorio (M1), que es responsable de la amplificación de la inflamación de los tejidos y el subsecuente daño (73-76). En el modelo de hipertensión inducida por DOCA/sal, se sugiere que en los procesos de reparación y remodelado, el fenotipo M1 es reemplazado por un fenotipo pro-fibrótico (M2) probablemente en respuesta a señales de los tejidos o citoquinas producidas por células T (70 –72). Los macrófagos M2 liberan factores pro-fibróticos involucrados en el remodelamiento cardíaco como TGF- β , el que promueve la activación de fibroblastos y la deposición de colágeno (77). Un modulador importante de las funciones de los macrófagos es la interacción con células T incluyendo la regulación directa de DCs estimuladas por aldosterona en la diferenciación de los linfocitos Th, así, Th1 y Th2 conducen a una diferenciación M1 y M2, respectivamente (12, 77-79). La administración de antagonistas de MR, como eplerenona o espironolactona, reduce la acumulación de macrófagos en modelos de fibrosis peritoneal [79], infarto de miocardio [80] e inflamación (80, 81).

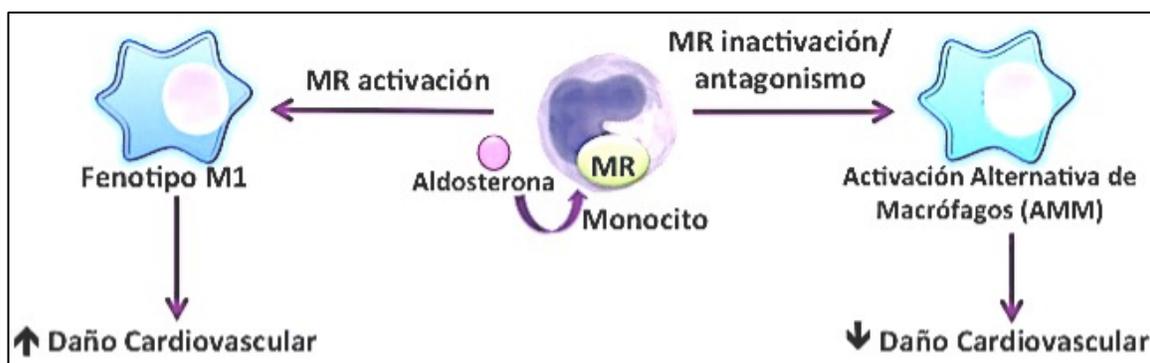


Figura 5: Efecto de la activación de MR sobre la diferenciación de macrófagos.

Para estudiar los efectos de la activación de MR en macrófagos se ha utilizado el modelo de daño cardiovascular generado por hipertensión, sugiriendo que la activación de MR en monocitos genera la diferenciación hacia un fenotipo M1 de macrófagos, los cuales aumentan el daño cardiovascular; y que la inactivación de MR, un KO condicional, o el uso de antagonistas de MR genera una diferenciación hacia un fenotipo de AAM (activación alternativa de macrófagos), que contribuye a una disminución en el daño cardiovascular.

1.4 Efectos de los corticoesteroides sobre las DCs.

Elftman et. al, demostró que corticosterona (CORT), GC murino endógeno producido en altas concentraciones durante la respuesta al estrés, actúa mediante GR en las DCs, las cuales permanecen fenotípica y funcionalmente inmaduras después de la estimulación con LPS, mientras que la expresión de TLR-4 no disminuye, indicando que los efectos de CORT no son consecuencia de la reducción de la capacidad de las DCs para detectar el LPS (82, 83). Además, el tratamiento con CORT generó una marcada reducción en la capacidad de la DCs para activar linfocitos CD8+ naïve *in vivo*. Interesantemente, a bajas dosis de CORT (10^{-9} M) aumenta la expresión de MHCII en respuesta al LPS, sin embargo, concentraciones de $CORT > 10^{-8}M$ (saturantes de GR) bloquean la *up-regulation* of MHCII, B7.1 y B7.2 inducida por LPS (83). Estas observaciones sugieren que una concentración de CORT de 10^{-9} M podría activar MR pero no GR.

Por otro lado, Moser et al. reportó que el tratamiento con GCs reduce la viabilidad de las DCs y *down-regula* la expresión de moléculas co-estimuladoras en DCs murinas viables cultivadas *in vitro* (24). Dexametasona (Dex), GC sintético, también *down-regula* la expresión de moléculas co-estimuladoras y la capacidad de bm-DCs murinas de activar células T *in vitro* (84). Además, en bm-DCs tratadas con Dex aumenta su capacidad de activación de las células T hacia células T reguladoras (Treg), caracterizadas por la producción de IFN- γ , IL-4 e IL-10. En humanos, se han observado alteraciones en la capacidad activadora de las DCs derivadas de monocitos (Mo-DCs) tratadas con GCs durante su diferenciación (62, 85) y maduración, disminuyendo la producción de IL-12p70 y IL-6 y se incrementa la producción de IL-10 luego de un estímulo con GCs (62, 86, 87). Los GCs no solo suprimen la actividad de las DCs sino también inducen un fenotipo tolerogénico en las DCs caracterizado por la *down-regulation* de los marcadores de maduración, el aumento de la capacidad fagocítica y de la producción de IL-10 (62, 88-90).

Por otro lado, nuestro grupo demostró en bm-DCs tratadas con aldosterona (agonista de MR) aumenta la secreción de IL-6 y TNF- α (12). Consistentemente con estos resultados, las bm-DCs expresan un MR funcional, posibilitando que aldosterona pueda modular la función de las DCs, incrementando su capacidad para activar linfocitos CD8+ y la polarización de linfocitos T CD4+ hacia un perfil Th17, a través de la secreción selectiva de IL-6 y TGF- β por las DCs (12). Estos efectos fueron prevenidos mediante el uso de eplerenona (antagonista selectivo para MR) y espironolactona (antagonista de MR e inhibidor de NF κ B), pero ni

espironolactona ni eplerenona fueron capaces de inhibir la función de las DCs (12). En este contexto, la combinación de bloqueadores de MR con inmunomoduladores podría ser usada como una terapia efectiva para modular la respuesta inmune adaptativa (91). Por ejemplo, en el modelo de encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), patología inflamatoria-autoinmune caracterizada por una respuesta Th17 exacerbada, nuestro grupo observó un aumento significativo en la severidad del EAE y en la producción de IL-17 por células T CD4⁺ en los ratones tratados con acetato de deoxicorticosterona (DOCA: agonista más estable de MR), exacerbando los síntomas del EAE y sugiriéndose que la activación de MR promueve la inmunidad mediada por Th17 (12).

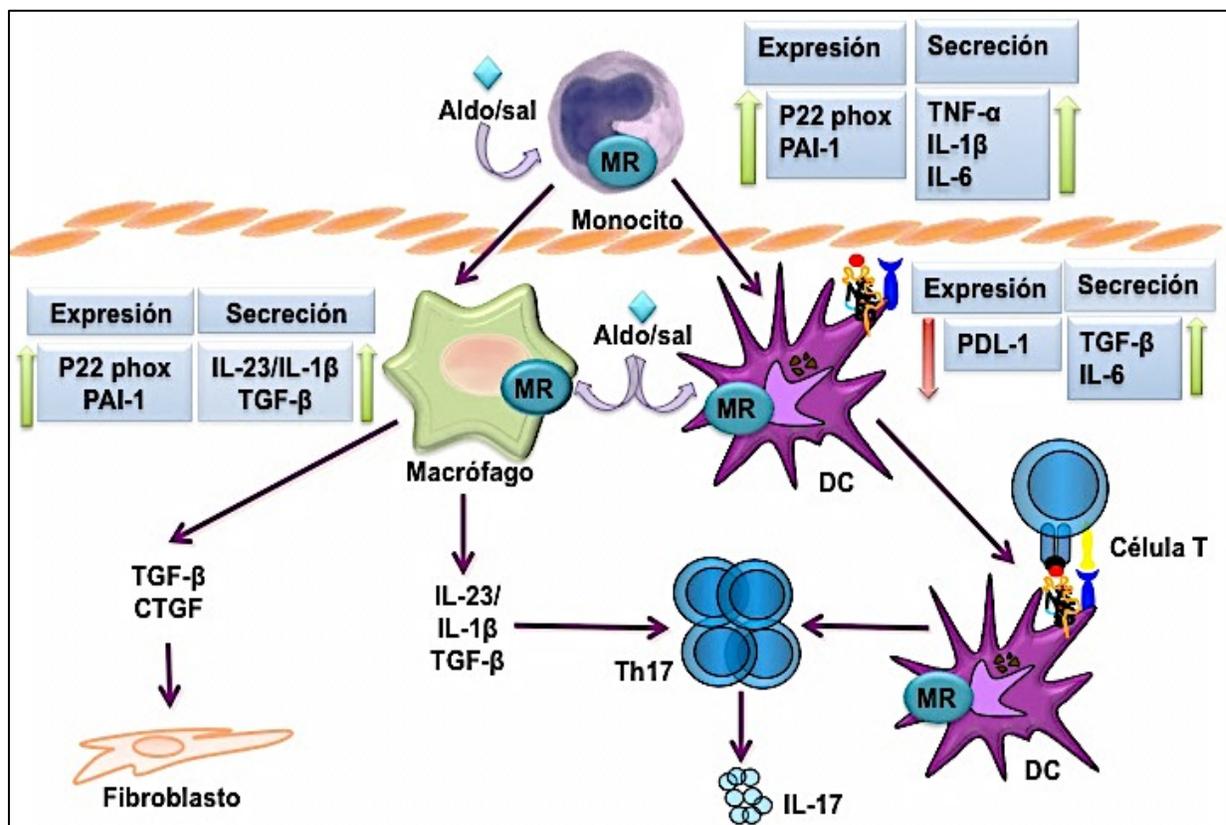


Figura 6: Efectos de la activación de MR en macrófagos y DCs.

La activación de MR promueve el reclutamiento y activación de macrófagos M1, los que secretan mayores niveles de citoquinas para amplificar y perpetuar la inflamación en una fase temprana. Una señal no identificada promueve el reclutamiento de macrófagos M2 y proliferación en respuesta a la activación continua de MR. La diferenciación hacia fibroblastos ocurre en respuesta a factores de crecimiento como TGF- β o CTGF. La presentación antigénica a células T CD4⁺ naïve en el contexto de moléculas co-estimuladoras, TGF- β e IL-6 promueve la diferenciación hacia TH17. Además, la secreción de IL-23 o IL-1 β por lo macrófagos, permite la expresión y secreción de IL-17.

1.5 Activación de MR en DCs y su rol en el desarrollo de hipertensión.

El rol de las hormonas corticosteroidales en la respuesta inmune ha sido ampliamente estudiado en modelos de hipertensión, demostrándose el rol de las células de la inmunidad innata en el desarrollo de ésta, aunque los mecanismos de respuesta en el daño cardiovascular inducido por la activación de MR en células inmunes no ha sido entendido. Inicialmente, estudios en macrófagos describieron que la activación de MR favorece la polarización clásica de los macrófagos, caracterizada por la secreción de IFN- γ y el aumento de la respuesta inflamatoria. En este contexto, estudios recientes realizados en el modelo de *knock out de MR* (MR KO) condicional sugieren que la deficiencia de MR protege de los efectos dañinos de los cambios dependiente de Ang-II en la presión sanguínea, hipertrofia cardíaca, fibrosis y daño vascular *in vivo* (92).

El primer dato que sugiere el rol de la respuesta inmune adaptativa en el desarrollo de hipertensión sugiere que ratones deficientes en el gen activador de la recombinasa (RAG^{-/-}), que carecen tanto de linfocitos B como T, son resistentes al desarrollo de la respuesta hipertensiva inducida por DOCA/sal o Ang-II, y además, el fenotipo hipertensivo y el daño vascular fue restaurado solo cuando se transfirieron linfocitos T pero no cuando fueron transferidos linfocitos B (93). En este contexto, ha sido reportado que ratones tratados con Ang-II presentan un incremento en el porcentaje de células T CD4⁺ T secretoras de IL-17 en la aorta media (94); en cambio, ratones IL-17^{-/-} KO, que presentan una función vascular normal en condiciones basales, tratados con Ang II no desarrollan una hipertensión sostenida. Estos resultados indican que aunque IL-17 no está directamente involucrada en la generación de la hipertensión mediada por Ang-II (en ratones), está fuertemente relacionada con la mantención de la hipertensión y de las alteraciones vasculares (94). Además, existen estudios en ratón que demuestran que la transferencia adoptiva de células CD4⁺CD25⁺ T purificadas antes de inyectarles Ang-II previene el desarrollo de hipertensión, de estrés oxidativo vascular, de disfunción endotelial y de la infiltración de células inmunes (monocitos/macrófagos y células T) en los tejidos vasculares (95).

Recientemente, Amador et al (2014) demostró que ratas tratadas con DOCA/sal (modelo de hipertensión) aumenta la expresión de ROR γ T (factor de transcripción que promueve la diferenciación hacia el fenotipo Th17) e IL-17 en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), bazo, corazón y riñones, y que esta inducción de IL-17 se correlaciona con la *up-regulation* de TGF- β 1, IL-1 β e IL-23p19 (citoquinas involucradas en la

polarización/mantenimiento del fenotipo IL-17) (96). Todos estos cambios fueron prevenidos mediante la administración de espironolactona,. Además, las ratas tratadas con DOCA/sal junto con el aumento en los niveles de IL-17, disminuyen los niveles del ARNm para Foxp3 (factor regulador maestro de la transcripción que participa directamente en la función de las células Treg CD4+) y se reduce el % CD4+/Foxp3+ tanto en sangre como en bazo . Los experimentos anteriores sugieren que uno de los efectos de la activación de MR es la supresión de la función de los linfocitos Treg, por lo tanto, una posibilidad terapéutica importante a investigar es la utilización de fármacos que promuevan la generación de linfocitos Treg.

1.6 Efectos de la activación de MR y la expresión de HO-1.

En la literatura se han descritos diversos mecanismos mediante los cuales es posible inducir la población de linfocitos Treg, sin embargo, nuestro grupo recientemente se ha interesado en las propiedades inductoras de Tregs de la enzima hemo-oxigenasa-1 (HO-1). HO-1 es una enzima inducible que está presente en células inmunes encargada de degradar el grupo hemo a monóxido de carbono, hierro y bilirrubina, (97, 98). Actualmente, existen compuestos que inducen la expresión de HO-1 como CoPP (protoporfirina de cobalto), que inhiben su expresión, como SnPP (protoporfirina de estaño) o que imitan su acción liberando CO, como CORM2 (moléculas liberadoras de CO) (99).

Se ha descrito que bajos niveles de expresión y/o actividad de esta enzima generan disfunción inmune (99, 100). Por otro lado, la sobre expresión de HO-1 ha sido asociada con efectos cardio y renoprotectores, antioxidantes, antiinflamatorios y anti-apoptóticos, los cuales son opuestos a los efectos descritos para la activación de MR mediada por aldosterona (97). Recientemente, nuestro grupo publicó datos que sugieren que la inducción de la expresión de HO-1 en DCs tratadas con LPS puede inhibir su capacidad para presentar antígenos solubles a células T *naïve* mediante el bloqueo de tráfico del antígeno a nivel de la fusión endosoma-lisosoma (99). Por lo tanto, se sugiere que al aumentar los niveles de HO-1 aumenta la población de linfocitos Treg debido a que las DCs serían incapaces de activar linfocitos T *naïve* hacia linfocitos T efectoros (Teff), conduciéndolos hacia un perfil Treg.

Interesantemente, la expresión de HO-1 ha sido asociada con los efectos de aldosterona a través de MR, describiéndose que la sobreexpresión de HO-1 inhibe la síntesis de aldosterona y que en células renales aumenta la expresión de HO-1 y VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) en respuesta a espironolactona (antagonista de MR) (101, 102). Adicionalmente, diversos estudios han demostrado que el uso de hemina (inductor de la expresión de HO-1) disminuye la síntesis y niveles plasmáticos de aldosterona (97). En modelos de hipertensión inducida por exceso de aldosterona también se ha observado que la sobreexpresión de HO-1 reduce los niveles de aldosterona, disminuyendo los daños cardiovasculares inducidos por la activación de MR (97). Considerando estos antecedentes, nos preguntamos: si la sobreexpresión de HO-1 disminuye los niveles de síntesis y secreción de aldosterona ¿existirá *feed back* inverso? ¿la inducción de HO-1 en DCs podría inhibir los efectos de aldosterona? ¿el aumento de la expresión de la HO-1 podría ser un mecanismo mediante el cual espironolactona induce cardioprotección?

1.7 Respuestas no genómicas en la vías de señalización de los corticoesteroides

En las últimas décadas, se han descrito diversos efectos generados por aldosterona que no pueden ser evitados mediante el uso de antagonistas o bloqueadores de MR: el rápido incremento en los niveles de AMPc y de calcio intracelular, incluso, estos efectos han sido observados en ratones MR KO constitutivo (este KO es letal, los ratones mueren a los 9 días de vida) (103). Estos datos sugieren la existencia de otro receptor para aldosterona, el cual ha sido recientemente descrito en células del músculo liso vascular (VSMCs) e identificado como el receptor acoplado a proteína G número 30 (GPR30), que es capaz de unirse a aldosterona, corticosterona y estrógenos (104).

GPR30 fue inicialmente caracterizado como un receptor activado por estrógenos (E2) (105, 106), ampliamente expresado en VSMCs recién aisladas (107-109), células endoteliales vasculares, corazón, arterias, tejido mamario, pulmones, sistema nervioso central y leucocitos (104, 107, 110). Diversos autores han propuesto un modelo en el que la activación de GPR30 por aldosterona ocurre mediante un mecanismo que involucra la trans-activación del receptor del factor de crecimiento (EGFRs) mediante una vía proteína G dependiente (111, 112). Esta transactivación incluye un corte mediado por metaloproteinasas (MPP) de el factor de crecimiento epidermal unido a pro-heparina (proHB-EGF), que inicia la activación de los EGFRs (111, 112). Este mecanismo de activación de GPR30 por aldosterona ha sido observado en células mesangiales (donde induce proliferación) y en microarterias coronarias humanas (HCMAs) (113, 114). Se ha postulado que GPR30 es el responsable de los efectos no genómicos de aldosterona, incluyendo la activación de fosfoinositol 3-quinasas (PI3K) y de la activación de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (ERK1/2) en VSMCs (104). Estudios adicionales en células mesangiales demuestran que la activación de GPR30 por aldosterona activa la vía de señalización ROS/EGFR/PI3K/Akt/ mTOR (115).

Además, Gross et al. usando un cultivo primario de VSMCs de rata observaron que aldosterona altera la fosforilación de ERK (efecto que fue inhibido tanto por un antagonista de GPR30 como por un bloqueador de MR denominado eplerenona), la apoptosis, y la fosforilación/contracción de la cadena liviana de miosina a través de la vía PI3K en presencia o ausencia de GPR30 (104). Sin embargo, en ausencia de MR (*knock down*) los efectos de aldosterona fueron completamente dependientes de GPR30. En el modelo de VSMCs, los datos de estos autores sugieren que a concentraciones equivalentes de ligando libre, aldosterona sería la señal dominante en la activación de GPR30. Por otro lado, Batenburg et

al. proponen que aldosterona puede tanto antagonizar como potenciar la respuesta a Ang-II de una manera dependiente de la concentración: la pre-incubación de HCMAs con aldosterona (10 nmol/L) aumenta los efectos contráctiles de Ang-II a través de una respuesta no genómica mediada por la activación de GPR30 (este efecto no fue bloqueado por antagonistas de MR)(114). Además, observaron que la activación de GPR30 por cortisol (en presencia del antagonista de GR llamado RU486) genera un efecto similar al observado en el caso de aldosterona.

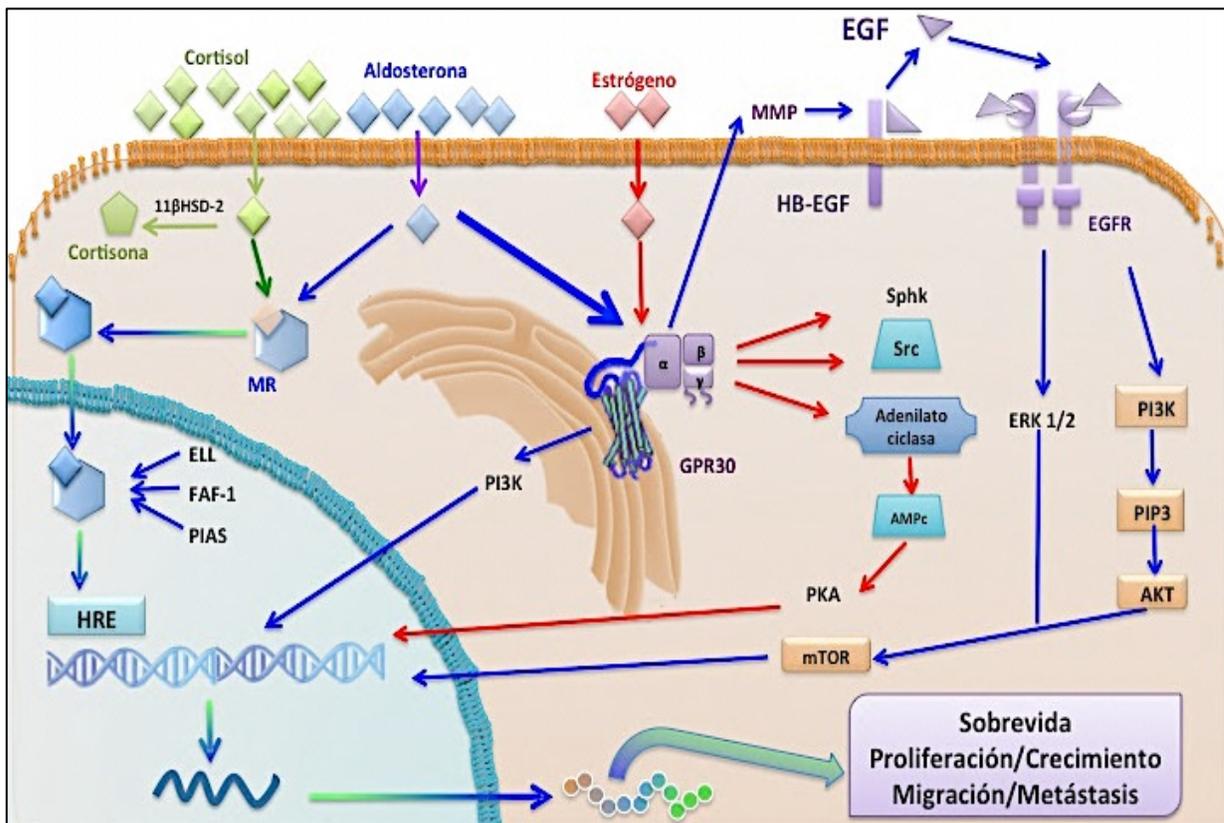


Figura 7: Modelo de la interacción entre MR y GPR30 en VSMCs.

MR es un factor de transcripción inducido por ligando (aldosterona o cortisol). El complejo ligando/MR, se transloca al núcleo y se une a HREs. Un mecanismo de especificidad es el reclutamiento selectivo de co-activadores o co-represores, como ELL, FAF-1 y PIA. En VSMCs, GPR30 es una vía común para aldosterona y estrógenos. La activación de GPR30 por aldosterona se produce a través de un mecanismo que implica la transactivación de EGFR a través de AKT y la acción de metaloproteinasas (MMP) sobre proHB -EGF.

Finalmente, la expresión de GR y MR en DCs ha abierto una nueva ventana de posibilidades para la regulación endocrina del sistema inmune. Si GR y MR promueven la inflamación, la remodelación o la resolución de la inflamación dependería de múltiples factores, incluyendo la concentración de ligando, el contexto celular y su nivel de expresión relativa dentro de las DCs. Aunque al parecer la señalización de MR y GR mediada por el cortisol tiene efectos opuestos, en DCs no han sido explorado los efectos de la activación MR por cortisol o la expresión relativa de GR versus MR. También es importante destacar que no existen estudios sobre la expresión de la enzima 11 β HSD2 o el receptor GPR30 en DCs, considerando que estas proteínas pueden ser importantes moduladores de la activación MR y por lo tanto, de la función de las DCs. Por otro lado, es clínicamente relevante describir un nuevo mecanismo de espironolactona relacionado con la inducción de HO-1 y el consecuente aumento en la población de linfocitos Treg. En consecuencia, espironolactona/ eplerenona (antagonistas de MR), RU486 (antagonista de GR) o anticuerpos anti-IL-17 pueden ser una nueva alternativa para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias.

2.-HIPÓTESIS

Basado en la información obtenida en la literatura y nuestro trabajo previo, nosotros postulamos la siguiente hipótesis:

“Corticosterona, a través de la señalización de MR, incrementa la capacidad de la células dendríticas para activar células T”.

2.1 Objetivo general

Evaluar el rol de la activación de MR dependiente de corticosterona en la función de las DCs.

2.2 Objetivos específicos

- 1) Estandarizar la generación de células dendríticas derivadas de médula ósea (bm-DCs).
- 2) Determinar los niveles de ARNm de 11 β HSD2, MR, GPR-30 y GRs en bm-DCs.
- 3) Determinar los niveles de ARNm de 11 β HSD2, MR y GPR-30 en linfocitos B.
- 4) Determinar los niveles de ARNm de HO-1 en bm-DCs estimuladas con espironolactona.
- 5) Determinar los niveles de expresión de CD86, CD40, MHC-II y PDL-1 en bm-DCs estimuladas con corticosterona o corticosterona/RU486.

3.- MATERIALES

3.1 Equipamiento

- Incubadora de células Forma Scientific modelo 3110.
- Gabinete de bioseguridad Biosafetyhood SterilGard Hood from The Baker Company.
- Microcentrífuga Eppendorf 5415R.
- Centrifuga Eppendorf 5702R.
- Microscopio invertido Olympus, modelo CKX41.
- Freezer -80°C REVCO modelo Ultima III.
- Citómetro de flujo BD modelo FACSCanto.
- Baño termostático LP/BX .
- Medidor de pH Hanna HI 9321PH con electrodo Corning 476086.
- Vortex Labnet International, modelo VX100.
- Balanza analítica Adam, modelo AFA-180LC.
- Cámara de Neubauer.
- Cámara de electroforesis modelo Mini Protean II.
- Fuente de poder modelo 200/2.0, Bio-Rad.
- Axygen Maxygene Thermocycler.
- Real-Time PCR System Applied Biosystem Step One™.
- Transiluminador UVP, 302 nm, 15 W lamp.

3.2 Reactivos de cultivo celular

- Azul de Tripán 0.4%
- Trizol Reagent, Invitrogen.
- Medio de cultivo celular RPMI 1640, Gibco
- Suero fetal bovino (FBS), Biological Industries, Israel.
- Suplementos para cultivo celular eucariótico (Hyclone): aminoácidos no esenciales, glutamina, piruvato, solución HEPES, β-mercaptoetanol, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100mg/ml, Gentamicina 50 mg/ml.
- GM- CSF (Preprotech).

3.3 Reactivos químicos

- Saponina (Sigma),

- Etanol 100% (Merck).
- Aldosterona stock (Sigma).
- Espironolactona (Sigma).
- Corticosterona (Sigma).
- RU486 (Sigma).

3.4 Anticuerpos

- Rat anti class II MHC (IA/IE), clone M5/114.15.2, BD Bioscience.
- Monoclonal anti-mouse CD40-PE (Pharmingen, clone 44986).
- Monoclonal anti-mouse CD86-PE (Pharmingen, clone GL1).
- Monoclonal anti-mouse CD11c-APC (clone HL3; BD Pharmingen).
- Monoclonal anti-mouse PD-L1-PE (clone MIH5; BD Pharmingen).

3.5 Buffers

- PBS: NaCl 0.14 M, KH_2PO_4 1.47 mM, Na_2HPO_4 7.81 mM, KCl 2.68 mM.
- Buffers para anticuerpos y proteínas: PBS, PBS-BSA 1%, PBS-FBS 1%, PBS- Tween20 0.02%, PBS-azida 0.02%, PBS-fat-free milk 1%, PBS-Formaldehído 1%.
- ACK: Cloruro de amonio 0.17 M, bicarbonato de potasio 10 mM, EDTA 0.1 mM, pH 7.2.
- Buffer de permeabilización: 0.5% saponina y 3% suero de albumina bovina BSA en PBS.

3.6 Implementos de plástico

Tubos de centrifuga de 15 ml y 50 ml (Falcon), placas de cultivo de 6, 24 y 96 pocillos (Orange Scientific), Tubos de FACS de 5 ml FACS (Falcon), Tubos eppendorf de 0,2, 0,6 y 1,5 mL (Falcon), Micropipetas de 1000uL, 200uL, 20uL and 2uL (Gilson and Rainin).

3.7 Software

Los datos de FACS fueron analizados con FlowJo versión 8.7 para Macintosh. La graficación de los datos fue desarrollada con GraphPad Prism versión 6 para Macintosh.

3.8 Animales

Los ratones C57BL/6 fueron obtenidos desde The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) y fueron mantenidos en la Pontificia Universidad Católica de Chile (Santiago, Chile). Todo el trabajo con animales fue desarrollado de acuerdo a las guías internacionales.

4.- METODOLOGÍA

4.1 Animales

Ratones C57BL/6 *wild type* (machos) de más de 8 semanas de edad, obtenidos inicialmente en The Jackson Lab (Bar Harbor, ME) y mantenidos por la veterinaria del Bioterio Central en instalaciones libres de patógenos de la Pontificia Universidad Católica de Chile (Santiago, Chile). Todo el trabajo con animales se realizó de acuerdo con las guías institucionales y supervisado por un veterinario.

4.2 Cultivo primario de células dendríticas derivadas de médula ósea (bm-DCs)

Las DCs fueron diferenciadas a partir de la médula ósea (bm-DCs) de ratones C57BL/6, como se describió previamente (116). A grandes rasgos, la tibia y el fémur fueron retirados de ratones C57BL/6 de 6 a 8 semanas de edad y la médula ósea se perfundió con abundante PBS estéril usando una jeringa. La médula ósea se homogeneizó y se centrifugó durante 10 min a 300×g a 4°C. El sedimento se resuspendió en 10 ml de tampón de lisis ACK, se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó durante 10 minutos a 300×g a 4°C. Finalmente, el sedimento se lavó dos veces con PBS estéril y se resuspendió a 1×10^6 células/ml en medio RPMI 1640 suplementado con 10 % de suero bovino fetal, glutamina 2 mM, 1 mM de aminoácidos no esenciales, piruvato 1 mM, 1 mM HEPES, 50 mM β -mercaptoetanol y 10 ng/ml de GM-CSF murino recombinante (PeproTech, NJ, EE.UU). A continuación, las células se sembraron en placas de 24 pocillos (1 ml de suspensión de células por pocillo) y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂. El medio de cultivo fue reemplazado cada dos días y los DC se usaron durante el día 6 para todos los experimentos. La maduración de las DCs fue inducida por la adición de 1 μ g/ml de LPS (Sigma Aldrich) durante el día 5. La eficiencia de la diferenciación de las bm-DCs se determinó mediante el análisis de la expresión específica de superficie del marcador CD11c, por citometría de flujo. Normalmente, se obtuvieron altos porcentajes de células CD11c positivas (>70%) mediante este protocolo de cultivo.

4.3 Extracción de ARN total, generación de ADNc y qPCR.

El ARN total fue aislado de los tejidos utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) según las instrucciones del fabricante. Cinco microgramos de este ARN total se transcribió de forma inversa en ADNc utilizando oligo-DT y el kit de sistema de transcripción inversa ImProm-II (Promega). Para la ejecución de los qPCRs se

utilizó β -actina como *house keeping* (gen de referencia) cuya longitud del amplicón es de 142 pb. El qPCR se llevó a cabo en un termociclador StepOnePlus™. El análisis de los datos de expresión génica relativa se realizaron utilizando el método de ciclo umbral comparativo. Para confirmar la especificidad de la amplificación, los productos del qPCR se sometieron a un programa de curva de fusión (durante el qPCR) y luego fueron observados en un gel de electroforesis.

4.4 Expresión de marcadores de maduración y moléculas co-estimuladoras.

Las bm-DCs fueron tratadas con vehículo, corticosterona, corticosterona/RU486 y corticosterona RU486/espironolactona durante 24 horas, y luego se tiñeron con anticuerpos específicos: anti-CD11c mAb conjugado a APC(HL3 clon; BD Pharmingen), anti-CD80 mAb (clon 16-10A1; BD Pharmingen) o anti-CD86 mAb (clon GL1; BD Pharmingen) conjugado a FITC, y anti-PD-L1 (clon MIH5; BD Pharmingen) conjugado a PE. La tinción se realizó en 200 μ L de PBS 1X al 2% de FBS con una dilución de anticuerpos 1/1000 durante 30 minutos. Luego, las células se lavaron con 1 mL PBS 1X al 2% de FBS dos veces y se fijaron con paraformaldehído al 1% en PBS. Posteriormente, se analizaron por FACS.

4.5 Análisis de datos.

Los datos de FACS fueron analizados con el programa FlowJo versión 8.2. Los datos gráficos fueron analizados y generados con el programa GraphPad Prism versión 6 para Mac. Los datos de los ensayos de qPCR fueron analizados con el software Step One 2.2.

5.- RESULTADOS

5.1 Estandarización de la generación de células dendríticas derivadas de médula ósea.

Como controles experimentales iniciales, nos propusimos estandarizar nuestros métodos para obtener células dendríticas derivadas de médula ósea (bm-DCs). Células precursoras se obtuvieron a partir de médula ósea de ratones C57BL/6 y se cultivaron con GM-CSF por 5 días (Figura 8). Se obtuvieron aproximadamente un total de 4×10^7 precursores de médula ósea por cada ratón sacrificado.

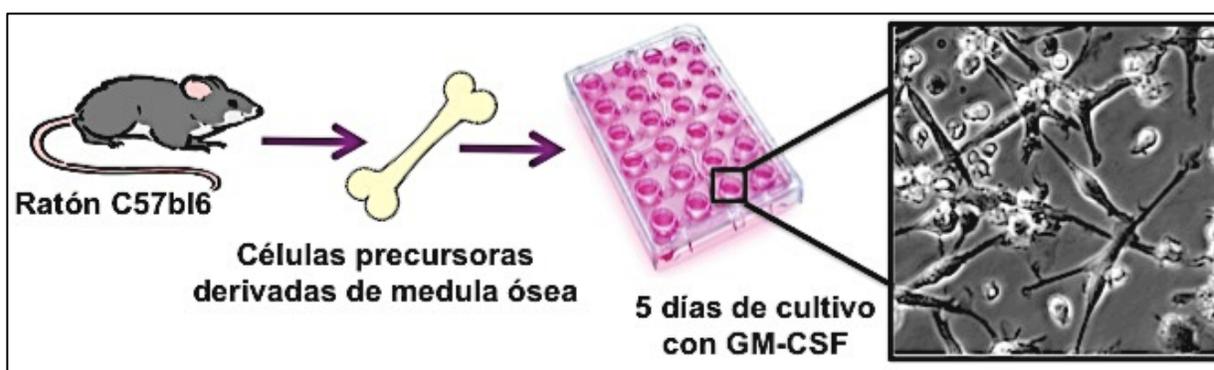


Figura 8. Obtención de bm-DCs a partir de progenitores derivados de médula ósea.

Las bm-DCs se obtuvieron a partir de médula ósea recuperada de la tibia y el fémur de ratones C57BL/6. Luego, las células se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ por 5 días en medio RPMI 1640 completo más GM-CSF a una concentración de 10 ng/mL.

La diferenciación de los progenitores hacia bm-DCs se controló mediante la forma, el tamaño y la expresión de marcadores moleculares específicos de la membrana celular externa de las bm-DCs. A medida que los progenitores comenzaron su diferenciación aumentaron su tamaño y adquirieron una forma irregular caracterizada por la aparición de dendritas que surgen a partir de la membrana extracelular (117). Un subconjunto representativo de las células cultivadas en placas de 24 pocillos se recuperó en el día 5, las cuales fueron marcadas con anticuerpos específicos contra proteínas de membrana y analizadas por citometría de flujo (FACS) (figura 10). Las células fueron seleccionadas mediante las características de tamaño (FSC) y granularidad o complejidad celular (SSC) durante la adquisición de los datos (figura 11). Se definió una región arbitraria (denominada gate) y las células dentro de este gate se separaron de los residuos celulares. Este gate fue analizado mediante un marcador característico de DCs conocido como CD11c. En cada experimento, siempre se analizó el porcentaje de células CD11c⁺, el que osciló entre 70% y 80%.

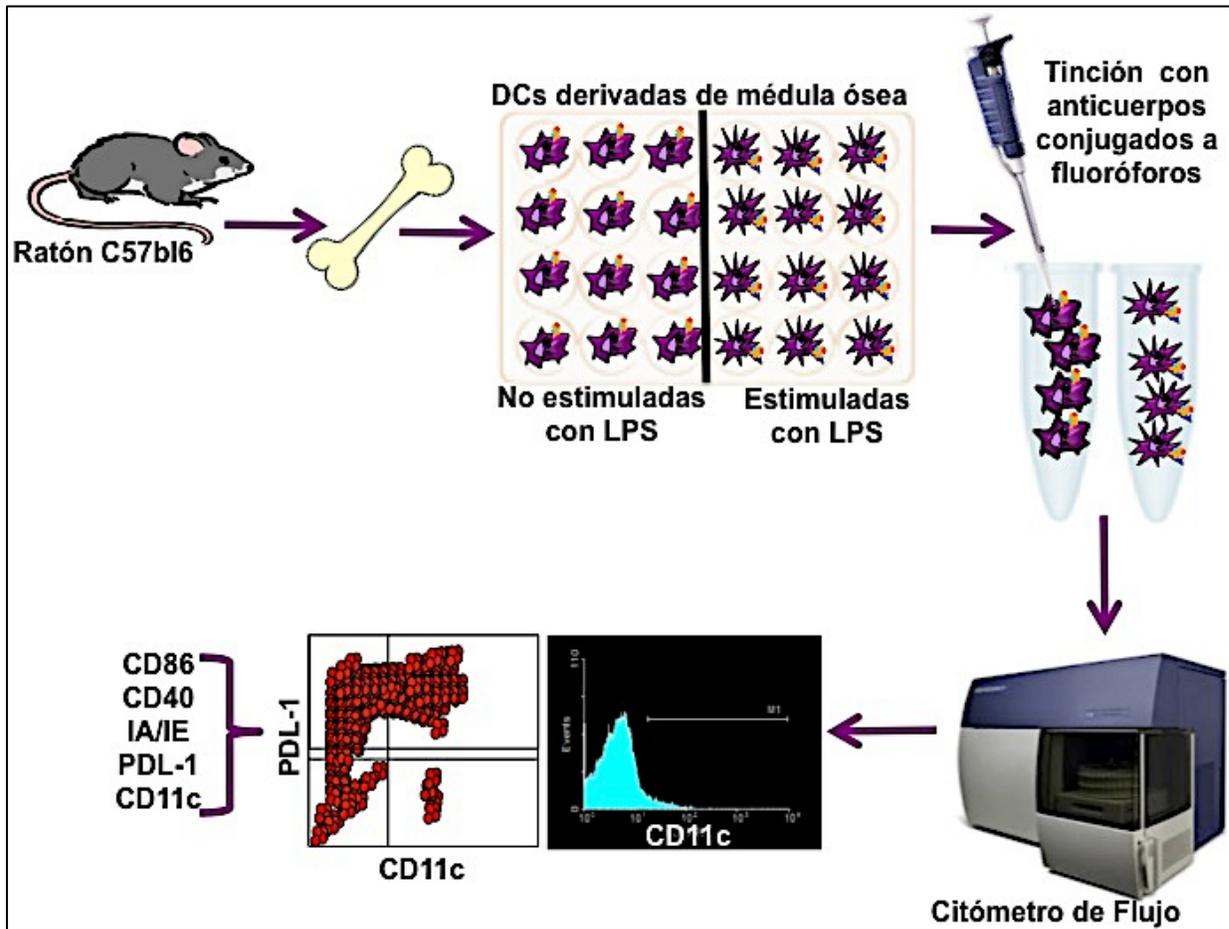


Figura 9. Caracterización de las bm-DCs por FACS.

Las bm-DCs cultivadas con GM-CSF se recuperaron durante el día 5 y se transfirieron a tubos eppendorf donde se realizaron las tinciones específicas para cada molécula. Las células recuperadas fueron teñidas con anti-CD11c-APC, anti-CD86-FITC y anti-PDL-1-PE y analizadas en un citómetro de flujo de BD modelo FACS Canto.

Además, observamos que alrededor del 75% de las células son positivas para CD11c+, el 20% de las DCs inmaduras expresa CD86 y el 54% expresa PDL-1, aumentando a casi un 60% y 75% luego de un estímulo de 24 horas con LPS. El aumento en la expresión de estas moléculas implica que nuestras bm-DCs generadas son funcionales. En conclusión, nuestros métodos para producir DCs a partir de precursores de la médula ósea de ratones C57BL/6 son eficaces. Nuestro protocolo garantiza al menos el 70% de células CD11c+.

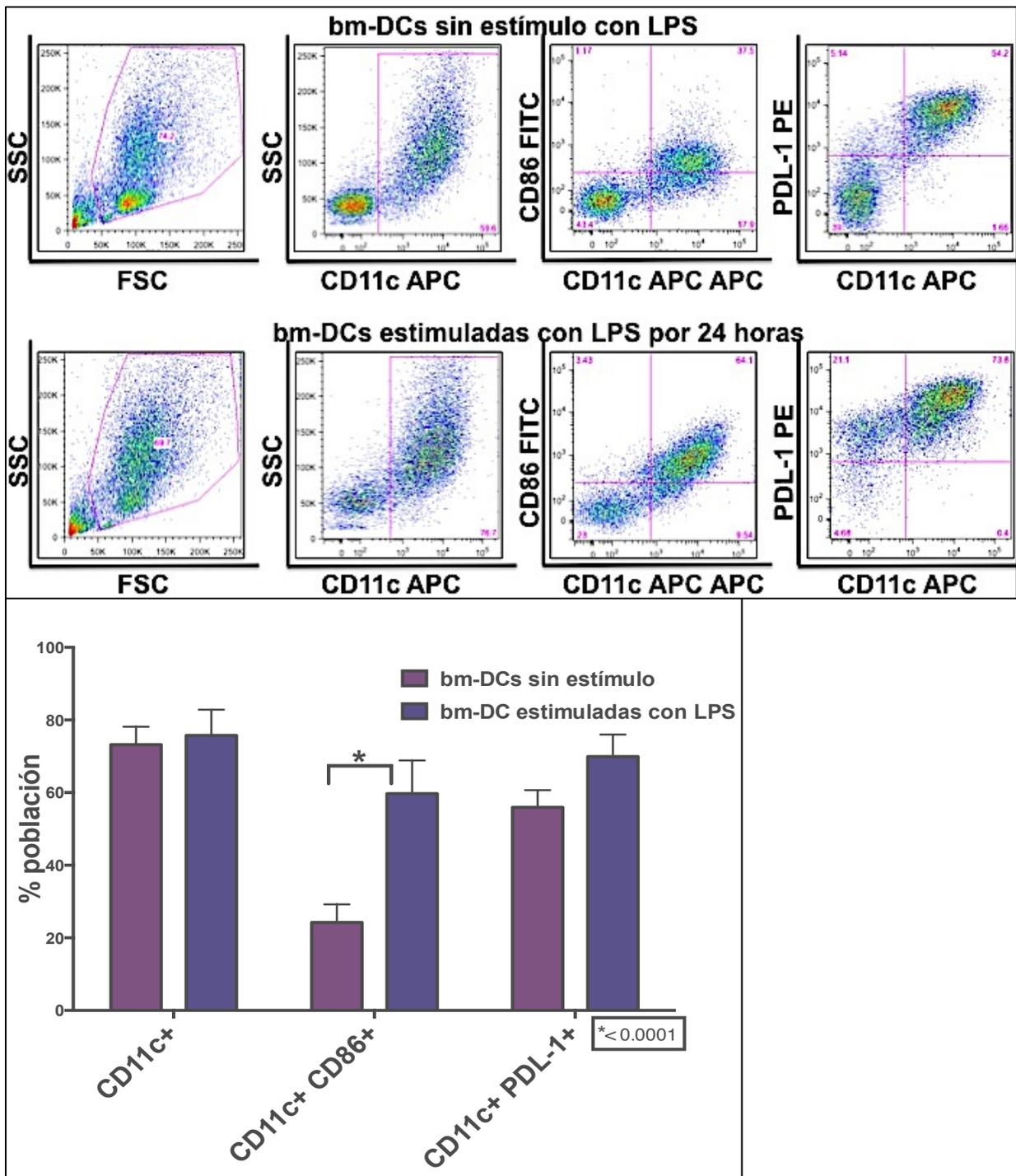


Figura 10. Caracterización molecular de las bm-DCs durante el día 5.

Las bm-DCs se identificaron mediante la inmunotinción con anti-CD11c-APC (~ 70% de las células fueron siempre positivas). La presencia de moléculas de CD86 y PDL-1 se evaluó en la población CD11c+.

5.2 La estimulación con LPS aumenta los niveles de ARNm de 11 β HSD2, MR, GPR30 y GR β en bm-DCs.

Mediante el protocolo anterior fueron cultivadas bm-DCs a partir de progenitores derivados de médula ósea. De acuerdo a la literatura, las DCs pueden tener dos estados de diferenciación: inmaduras, caracterizadas por una baja expresión de moléculas co-estimuladoras y una alta capacidad fagocítica, y DCs maduras, caracterizadas por la alta expresión de moléculas co-estimuladoras, la baja capacidad fagocítica y la secreción de citoquinas (62). La maduración de las DCs puede ser inducida por diversas moléculas, en este caso nosotros utilizamos LPS de *Salmonella typhimurium*. Durante el día 5, la maduración de las bm-DCs fue inducida mediante la adición de 1 μ g/ml de LPS; 24 horas después, (durante el día 6) tanto las bm-DCs inmaduras como maduras fueron recuperadas y se extrajo ARN total mediante el reactivo TRIZOL. Posteriormente, 5 microgramos de ARN total fueron retrotranscritos a ADNc utilizando oligo-DT y el kit de sistema de transcripción inversa ImProm-II, obteniendo un ADNc equivalente al ARNm de las bm-DCs (figura 11).

Las bm-DCs cultivadas con GM-CSF se recuperaron durante el día 5 y se transfirieron a tubos eppendorf. Usando TRIZOL se extrajo el ARN total y se retro-transcribió a ADNc. Posteriormente, se realizó un qPCR para cada gen blanco usando β -actina como *house keeping* y un equipo *Real-Time PCR*.

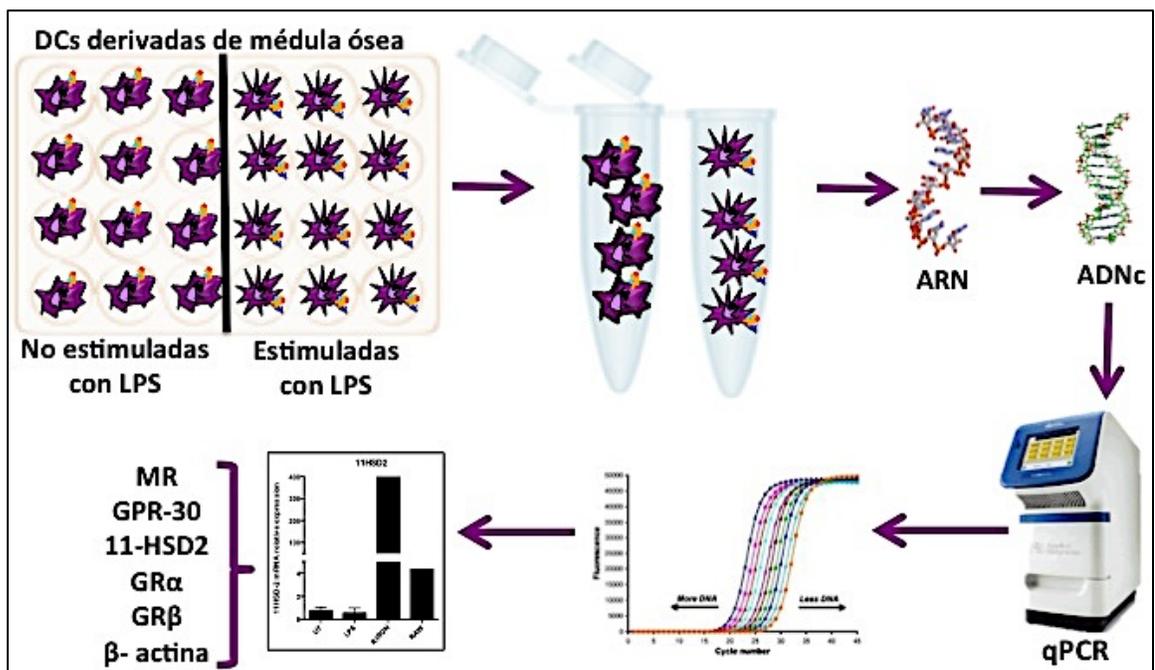


Figura 11: Determinación de los niveles de ARNm de MR, GPR30, 11 β HSD2, GR α y GR β .

Con el ADNc obtenido se realizó un PCR convencional con primers específicos para GPR30 y 11 β HSD2. Los productos de esta reacción fueron observados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%. De acuerdo a las fotografías de la figura 12, se observó que bm-DCs con o sin estímulo de LPS presentan niveles detectables para ambos transcritos. Como control, se utilizaron primers específicos para β -actina (figura 14).

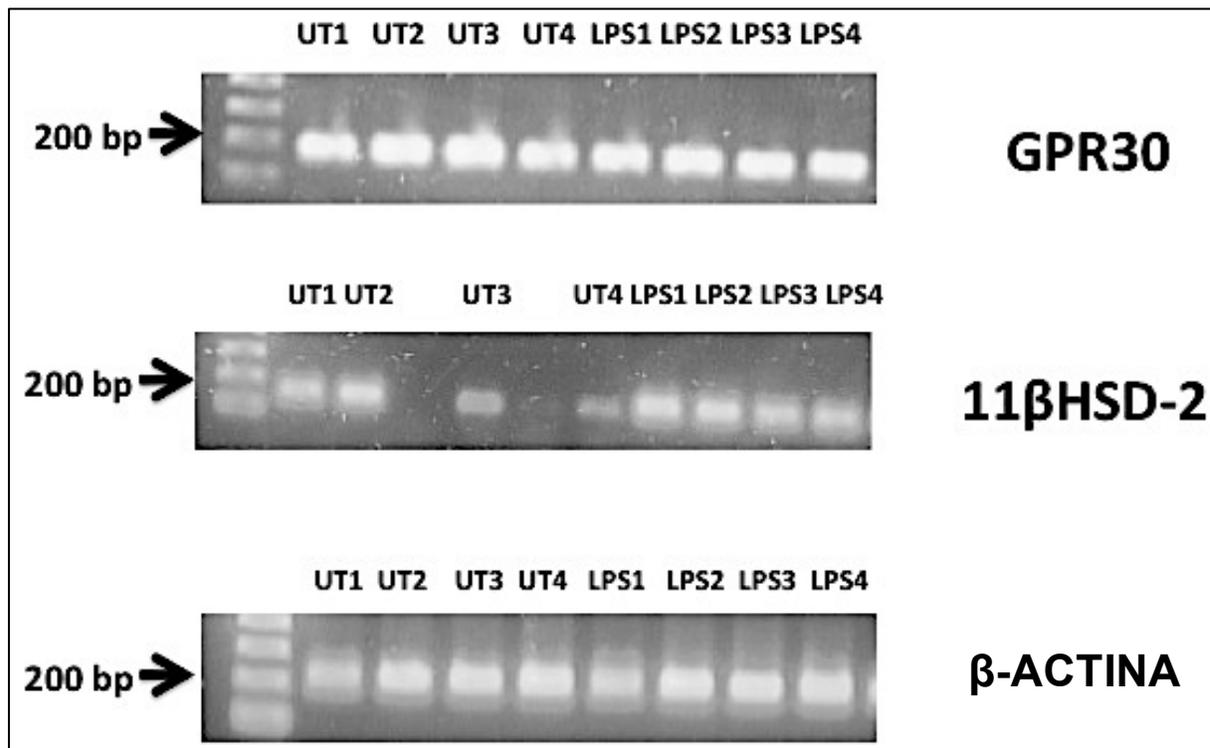


Figura 12: bm-DCs estimuladas y no estimuladas con LPS presentan niveles detectables de ARNm de GRPR30 y 11 β HSD2.

A partir del ARNm extraído de bm-DCs estimuladas (UT) y no estimuladas con LPS (LPS) se generó el ADNc respectivo. Con este ADNc se realizó un PCR convencional con primers específicos para GPR30 y 11 β HSD2. Los productos de esta reacción fueron observados mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 2%. Como control se utilizó β -actina.

Una vez corroborado que nuestras bm-DCs expresan tanto GRPR30 como 11 β HSD2, el mismo ADNc se utilizó para la cuantificación relativa mediante un PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR, StepOne Applied Biosystems) utilizando β -actina (longitud del amplicón de 142 pb) como gen de referencia, el ARN del riñón como control positivo del ARNm de 11 β HSD2, el ARN de una línea de macrófagos murinos (RAW) control positivo del ARNm de GPR30 en células inmunes y la línea celular de melanoma (B16,) como control negativo. El qPCR se llevó a cabo en un termociclador StepOnePlus TM y para el análisis de datos de expresión génica relativa se utilizó el método de ciclo umbral comparativo. Para confirmar la

especificidad de la amplificación, los productos PCR se sometieron a un programa de curva de fusión. Los datos obtenidos de 3 experimentos independientes con sus respectivos triplicados sugieren que la estimulación de bm-DCs con LPS induce un ligero aumento en los niveles de ARNm de GPR30 con respecto a las DCs inmaduras (sin estímulo con LPS) (figura 13).

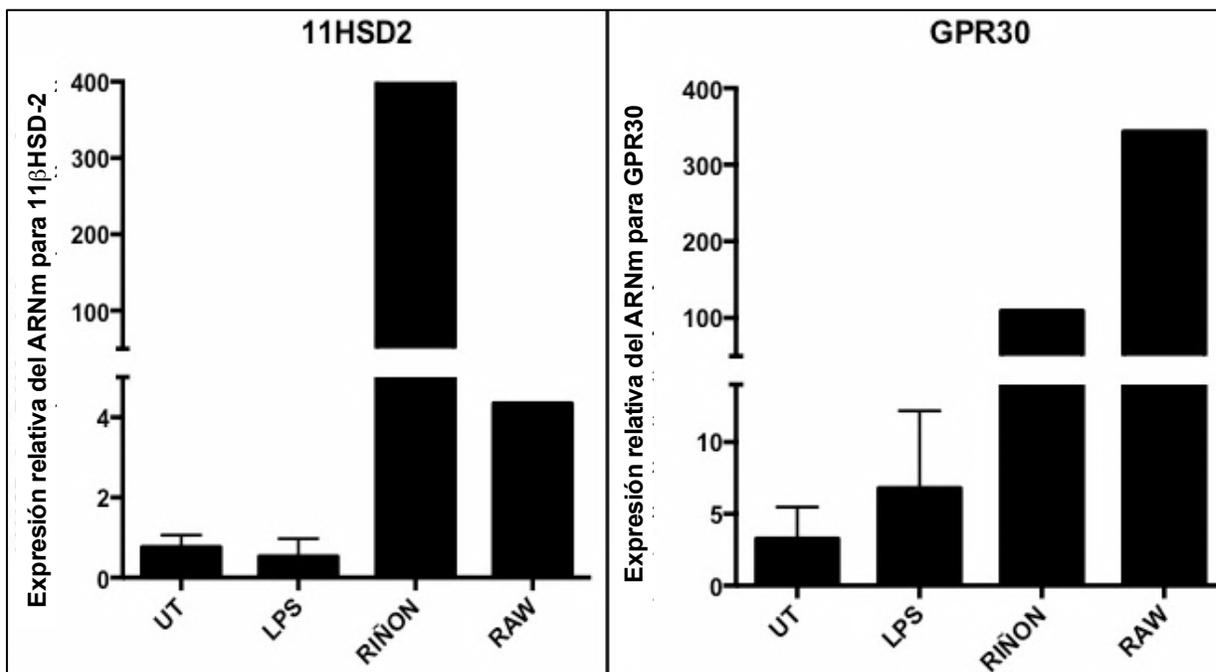


Figura 13: LPS aumenta levemente los niveles de ARNm de GPR30 pero no los de 11βHSD2 en bm-DCs.

Utilizando el ADNc de la figura anterior se realizó un qPCR para determinar los niveles relativos de GPR30 y de 11βHSD2 en bm-DCs estimuladas y no estimuladas con LPS por 24 horas. Se utilizó como *house keeping* β-actina, como control positivo de expresión de GPR30 se utilizó el ARNm de la línea de macrófagos murinos (RAW) y como control positivo de la expresión de 11βHSD2 se utilizó ARNm de riñón.

Para mejorar los resultados obtenidos anteriormente, decidimos purificar las bm-DCs obtenidas mediante el sistema de separación por citometría de flujo (FACS ARIA II cell sorting) usando el marcador CD11c. De esta manera, las bm-DCs alcanzaron $\geq 95\%$ de pureza (figura 14). Además, se analizaron los niveles de expresión de IA/IE (MHC-II en ratones) y CD86 en estas células, tanto en condiciones basales como tras la estimulación con LPS (figura 15). Los resultados obtenidos demuestran que la bm-DCs generadas, luego del *cell sorting* mantienen su fenotipo característico, tanto en el caso de las bm-DCs inmaduras (baja expresión de CD86 y población mayoritariamente IA/IE^{low}) como en el caso de las bm-DCs maduras (alta expresión de CD86 y población mayoritariamente IA/IE^{high}).

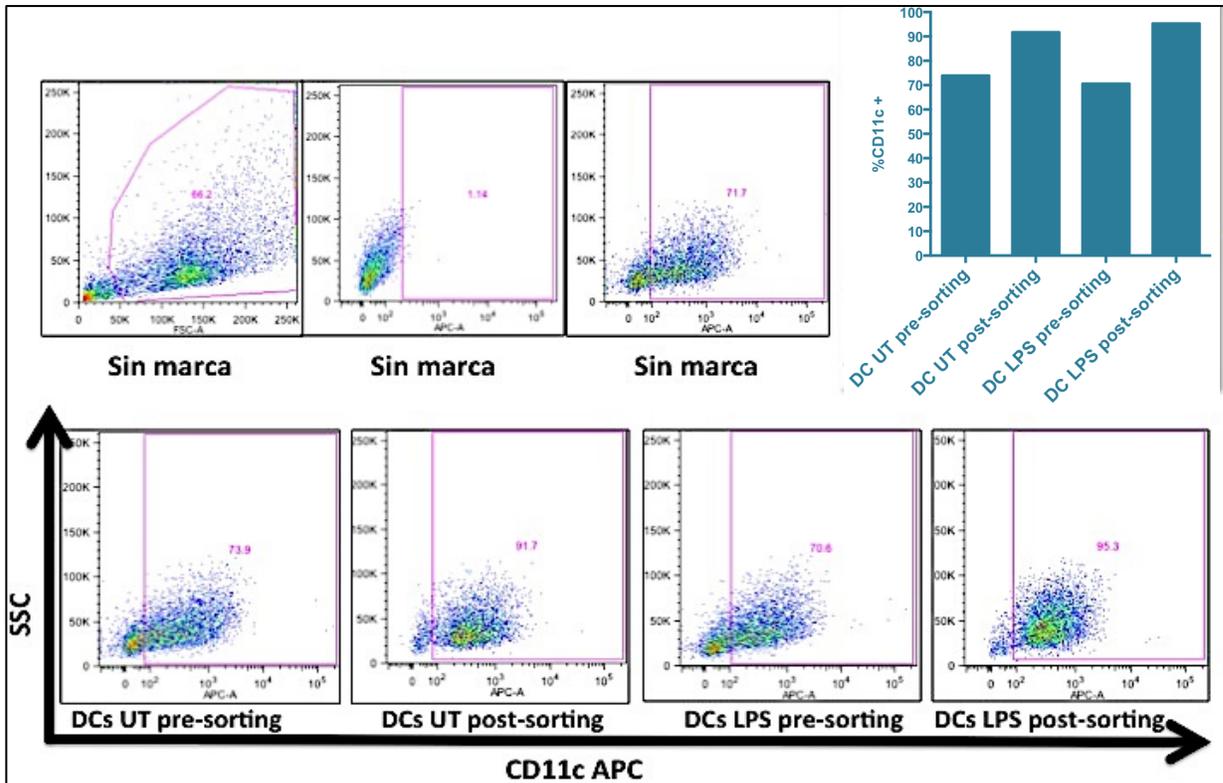


Figura 14: La selección de bm-DCs por cell sorting enriqueció la población CD11c +. Las bm-DCs al día 5 se estimularon con 1 ng/mL de LPS durante 24 horas, fueron recuperadas durante el día 6 y teñidas con anticuerpos específicos contra CD11c, CD86 y MHC-II. Posteriormente fueron separadas mediante *cell sorting* en el equipo FACS ARIA.

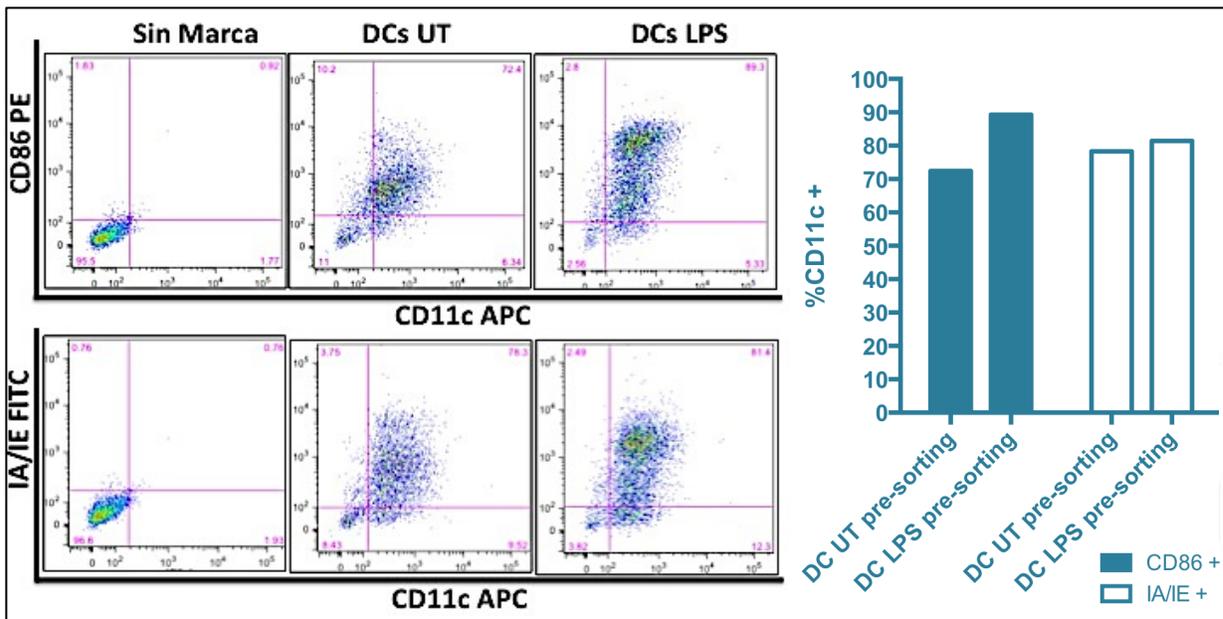


Figura 15: LPS incrementa la expresión de CD86 e IA/IE en bm-DCs purificadas mediante cell sorting. Luego de ser seleccionadas por *cell sorting*, las bm-DCs fueron analizadas mediante los marcadores de maduración IA/IE y CD86.

Luego de la purificación por cell sorting, se extrajo el ARN de estas bm-DCs y se obtuvo el ADNc correspondiente. Los datos obtenidos, que corresponden a 1 experimento (con sus triplicados), sugieren que el estímulo de bm-DCs con LPS aumenta los niveles del ARNm de 11 β HSD2, MR y GPR30 con respecto a las células no estimuladas (figura 16).

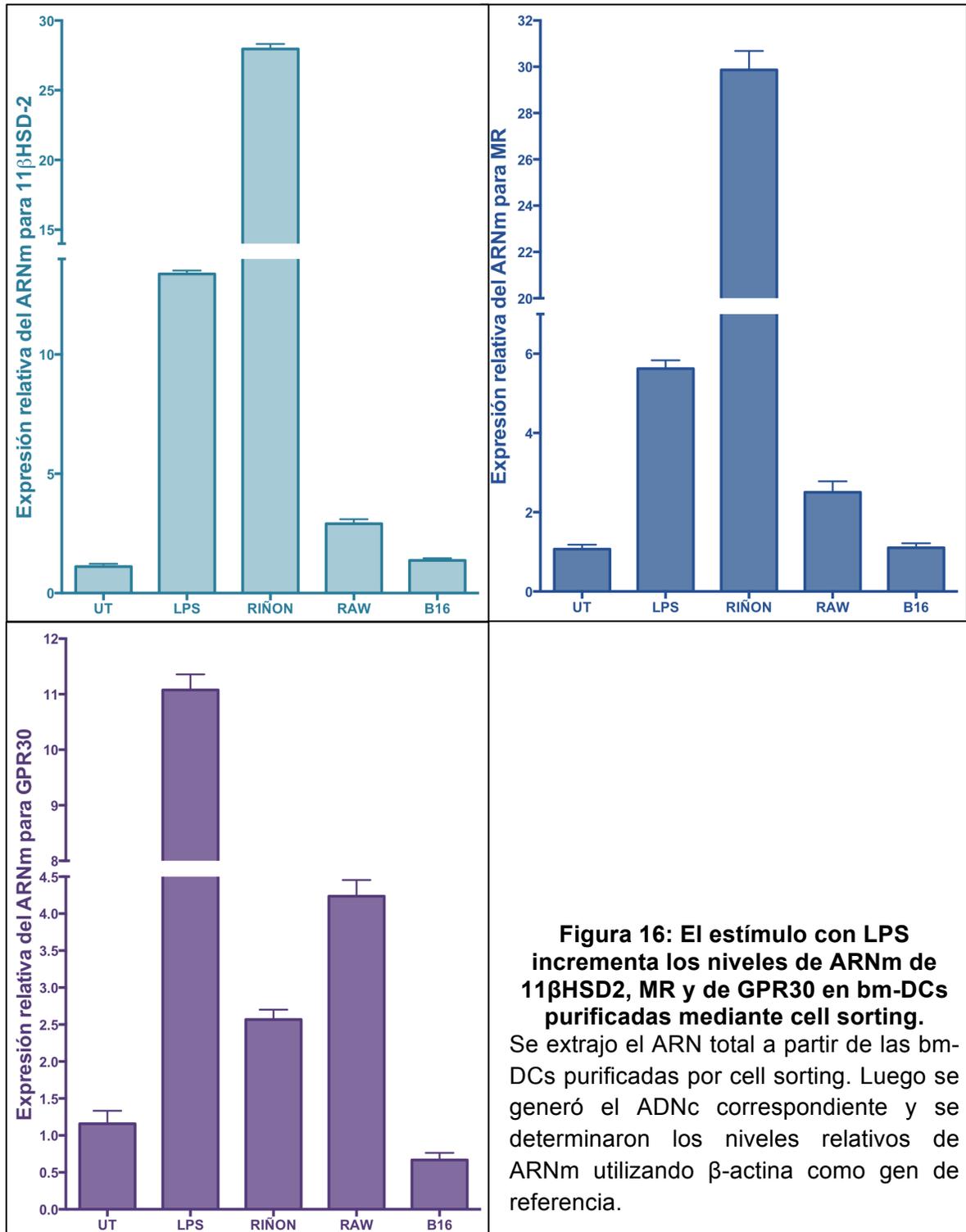


Figura 16: El estímulo con LPS incrementa los niveles de ARNm de 11 β HSD2, MR y de GPR30 en bm-DCs purificadas mediante cell sorting. Se extrajo el ARN total a partir de las bm-DCs purificadas por cell sorting. Luego se generó el ADNc correspondiente y se determinaron los niveles relativos de ARNm utilizando β -actina como gen de referencia.

De acuerdo con la literatura, cortisol puede unirse tanto al receptor de glucocorticoides (GR) como a MR y GPR30, por lo tanto, era importante determinar el nivel de expresión de cada uno de estos receptores en nuestros cultivos de bm-DCs; además, fue necesario considerar que GR puede presentarse en dos formas moleculares diferentes (isoformas α y β) (118, 119). La posibilidad de que un aumento en la presencia del GR β pueda actuar como potente inhibidor de la isoforma activa α , y con ello reducir la eficacia de los GC, ha generado un debate científico acerca del papel que la isoforma β del GR podría ejercer realmente en la respuesta a los GCs. Por lo tanto, como primer paso, se procedió a corroborar la expresión GR α en las bm-DCs mediante un PCR convencional. Observando, mediante un gel de agarosa, que las bm-DCs estimuladas y no estimuladas con LPS expresan la isoforma del receptor GR α (figura 17).

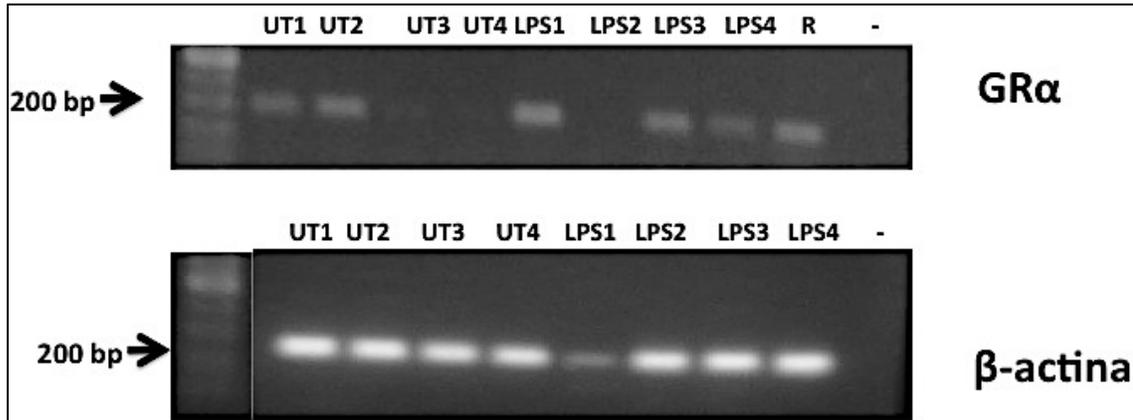


Figura 17: bm-DCs estimuladas y no estimuladas con LPS presentan niveles detectables de ARNm para GR α .

La expresión GR α en bm-DCs se corroboró mediante PCR convencional. La imagen muestra un gel de agarosa en el que las bm-DCs estimuladas y no estimuladas con LPS presentan niveles de ARNm detectables para GR α .

Posteriormente, utilizando el mismo ADNc del experimento anterior, se realizó un qPCR con primers específicos para GR α y GR β . Los datos obtenidos sugieren que la estimulación con LPS no aumenta los niveles de ARNm de la isoforma GR α (forma activa de GR), pero sí aumenta los niveles de ARN de la isoforma GR β (receptor que actúa como dominante negativa de GR α) (figura 18). Los productos de qPCR se observaron en un gel de agarosa como un control de la especificidad de los productos de qPCR (figura 19). Estos resultados sugieren que la estimulación con LPS aumenta la respuesta del cortisol a través de aumento en los niveles de ARNm de MR y/o GPR30.

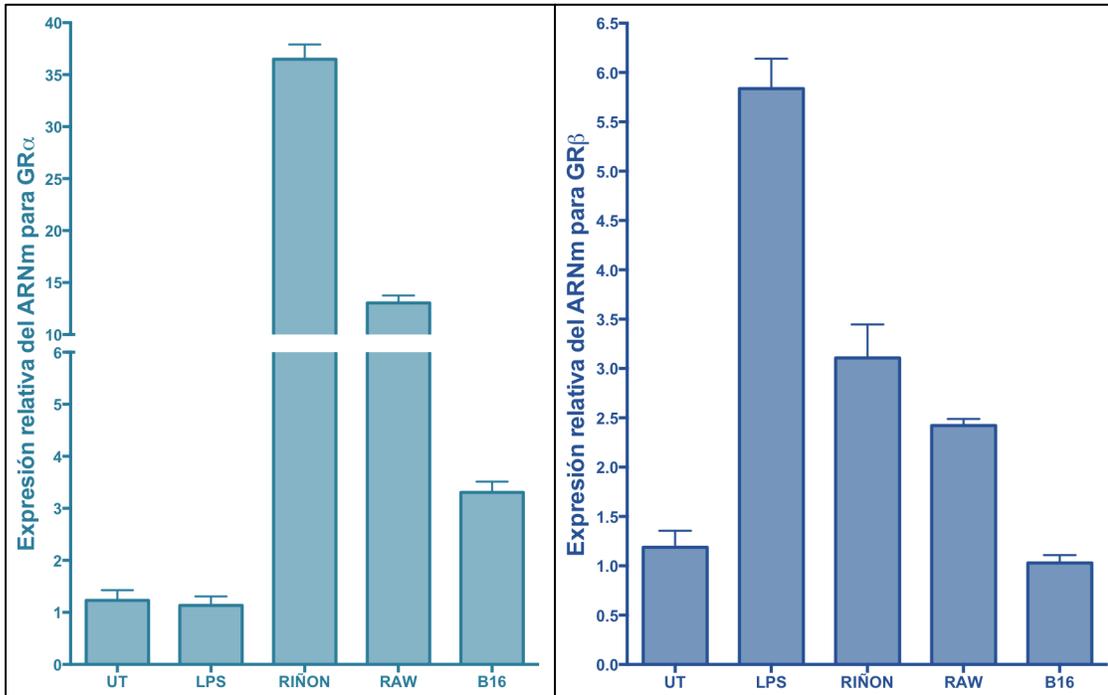


Figura 18: El estímulo con LPS aumenta los niveles de ARNm de GRβ pero no los de GRα en bm-DCs.

Utilizando el mismo ADNc de la figura 17, se determinaron los niveles relativos de ARNm de GRα y GRβ, utilizando β-actina como gen de referencia.

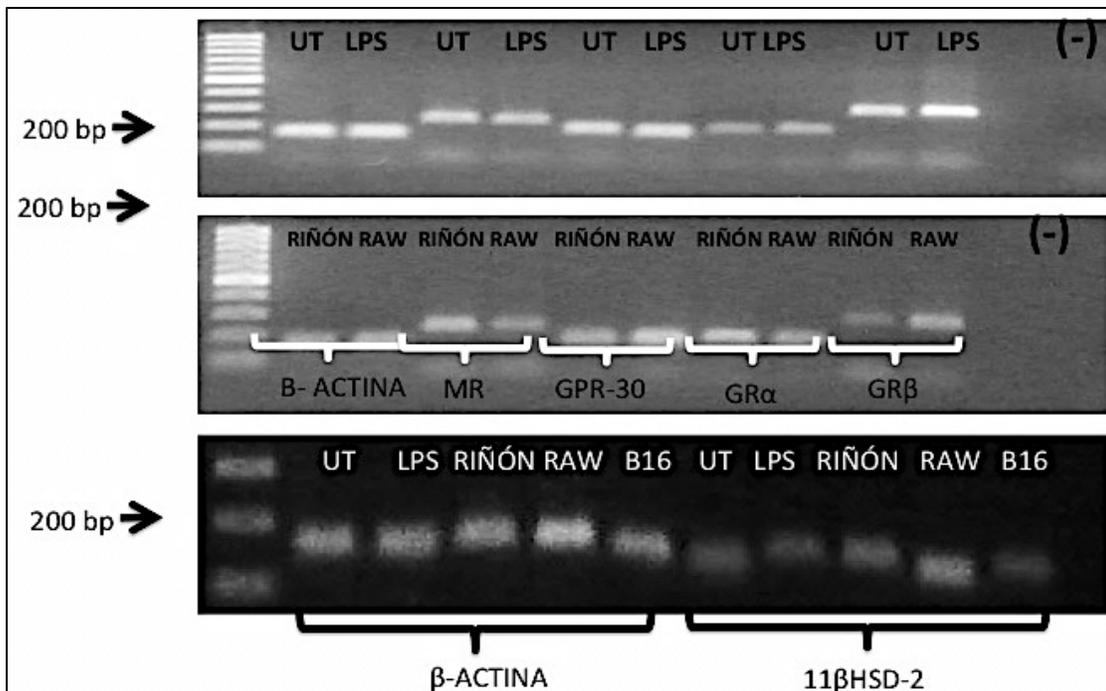


Figura 19: Los productos de qPCR de β-actina, MR, GPR-30, 11βHSD2, GRα y GRβ son específicos.

La imagen muestra un gel de agarosa como un control de la especificidad de los qPCR realizados.

5.3 Linfocitos B presentan niveles detectables de ARNm para MR y GPR30 pero no para 11 β HSD2.

A pesar de que esta tesis se centra en caracterizar posibles moléculas que modulen las funciones de las DCs, también nos interesa describir la expresión de estos receptores en otra APC: los linfocitos B. Pese a que la función principal de los linfocitos B es la producción de anticuerpos, en los últimos años se ha reconocido su importante papel como APCs. Las interacciones antígeno específicas entre células T y B requieren que la célula B internalice el antígeno unido a sus receptores BCR, lo procese, lo asocie a moléculas de MHC-II y lo presente a los linfocitos T CD4+ (120). Los estudios de depleción de linfocitos B en modelos animales han demostrado que las células B son esenciales para una óptima activación de los linfocitos T CD4+ en la respuesta inmune a antígenos extraños en dosis bajas y autoantígenos compartiendo esta función con las DCs (121).

A partir de un bazo de un ratón *wild type* se obtuvieron esplenocitos totales, que fueron teñidos con anticuerpos específicos anti-B220 y anti-CD19 y luego seleccionados mediante cell sorting utilizando el equipo FACS ARIA. Luego de la selección, se analizó la pureza de la fracción de linfocitos B mediante los mismos marcadores utilizados para el cell sorting. Luego, se extrajo el ARN total y se generó el ADNc respectivo. El qPCR fue realizado utilizando β -actina como *house keeping* y ARN de riñón como control positivo de la expresión de 11 β HSD2, MR y GPR-30 (figura 20).

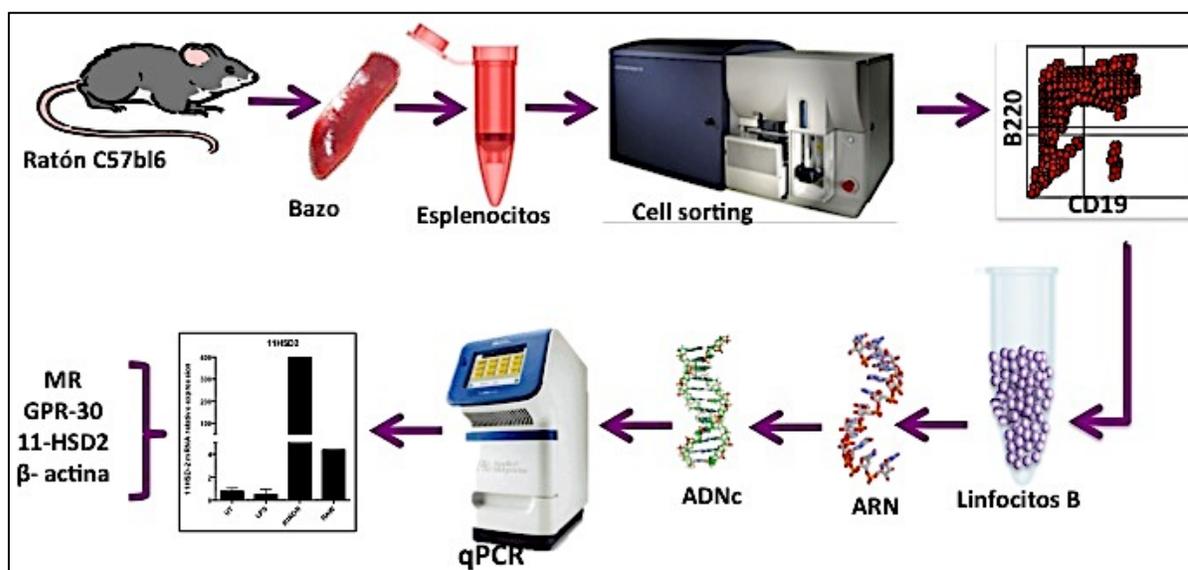


Figura 20: Determinación de los niveles de ARNm de 11 β HSD2, MR y GPR-30 en linfocitos B.

Los resultados obtenidos (figura 21), correspondientes a 2 experimentos independientes y determinaciones por triplicados, sugieren que los linfocitos B presentan niveles detectables de ARNm tanto MR como GPR30 pero no expresan la enzima 11 β HSD2.

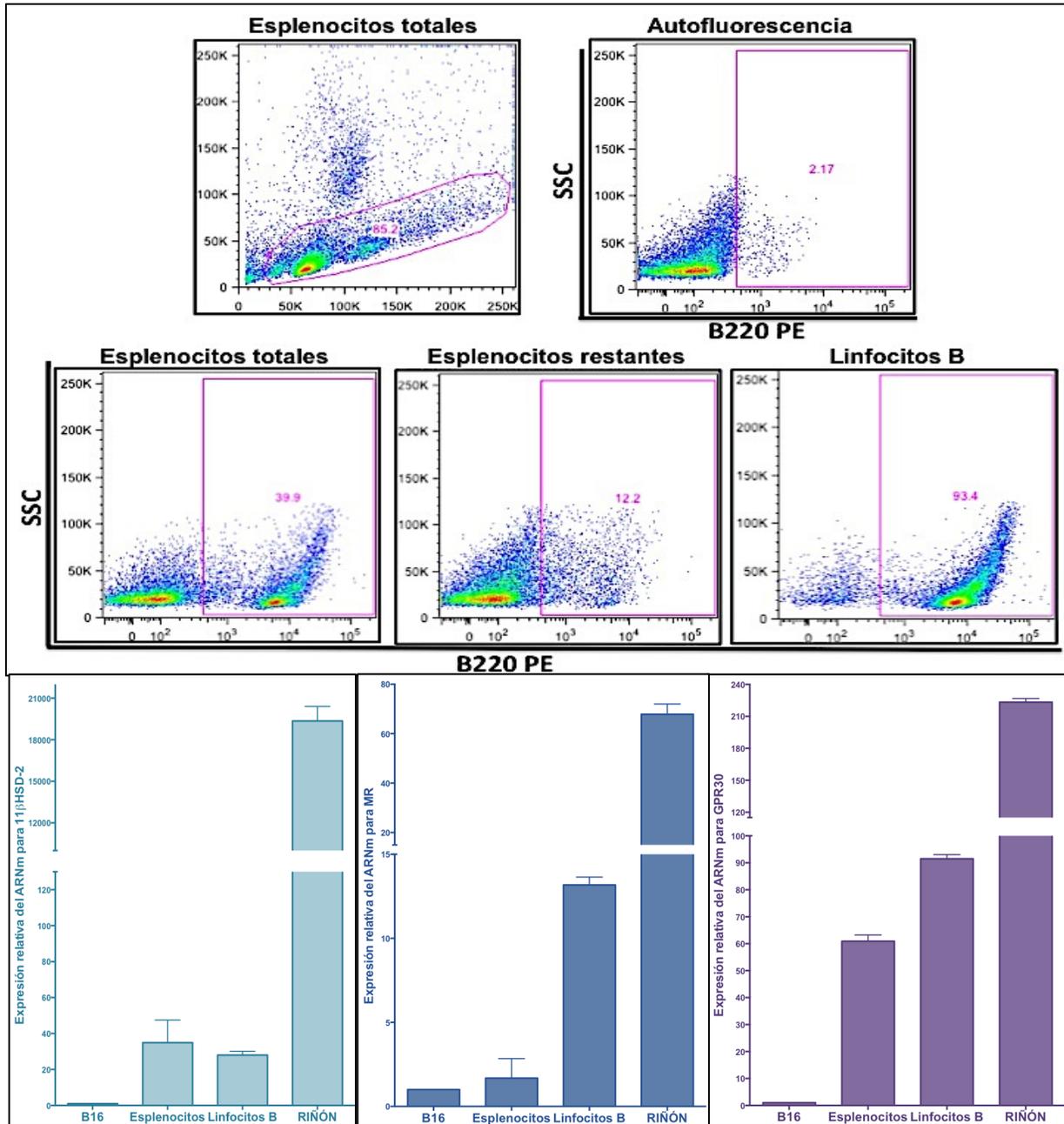


Figura 21: Linfocitos B purificados por cell sorting presentan niveles detectables de ARNm para MR y GPR30.

A partir de esplenocitos totales fueron purificados linfocitos B mediante cell sorting usando como marcadores CD19 y B220. En los dot plots se muestra la expresión de B220 luego del cell sorting. Se le extrajo el ARN total y se realizó un qRT-PCR para MR, 11 β HSD2 y GPR30. Se utilizó β -actina como *house keeping* y ARNm de riñón como control positivo de la expresión de estos genes (N=2 con sus respectivos triplicados).

5.4 Espironolactona aumenta levemente la expresión de HO-1 en bm-DCs.

Como parte de un proyecto planteado a realizar durante una estadía en Francia (que finalmente no se concretó), y con el objetivo de caracterizar mejor la regulación que ejerce MR sobre la función de la DCs decidimos profundizar en los la efectos de la activación de MR y la expresión de la enzima hemoxygenasa (HO-1). Diversos estudios sugieren que la actividad de las DCs puede ser modulada por la actividad de la HO-1 (100, 122). Su efecto protector se ha evidenciado en modelos de trasplante de órganos y autoinmunidad en los cuales la inducción de HO-1 mediante drogas, tales como la protoporfirina cobalto (CoPP) y hemina contribuye a reducir el daño inflamatorio generado por respuestas inmunes anómalas, que por lo general se desencadenan luego de la activación de DCs (123-125). Por otro lado, se ha descrito que en células renales aumenta la expresión de HO-1 en respuesta a espironolactona (antagonista de MR e inhibidor de NF-KB) (102).

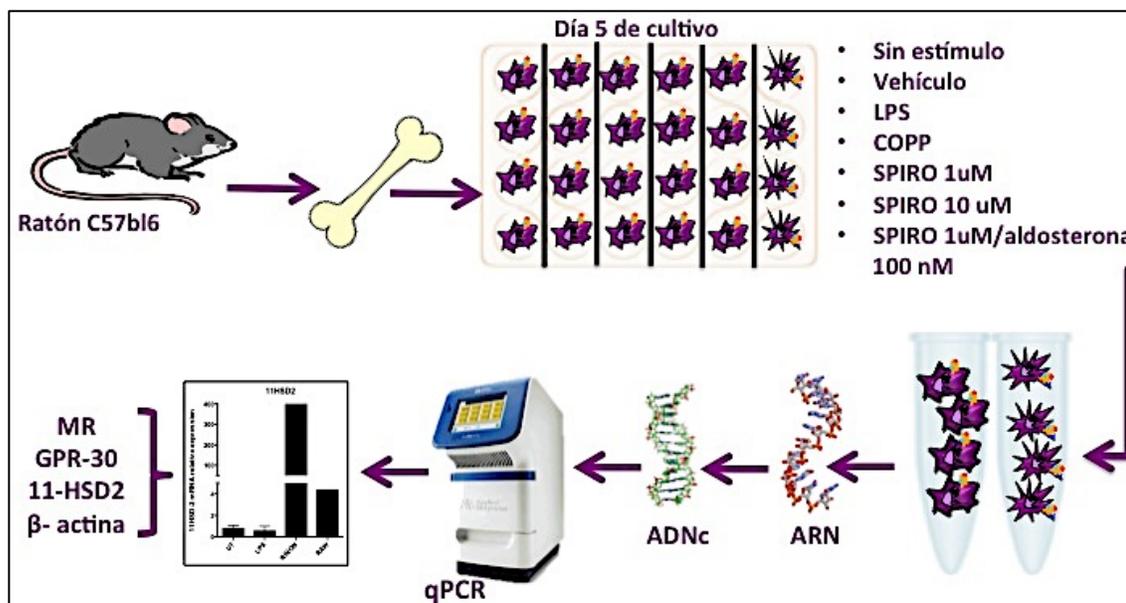


Figura 22: Determinación de la expresión de HO-1 en bm-DCs estimuladas con espironolactona.

Se realizaron 2 experimentos (EXP1 y EXP2), en los cuales bm-DCs diferenciadas a partir de médula ósea (como se describió anteriormente) fueron estimuladas por 24 horas con 2 concentraciones de espironolactona (SPIRO): 1 y 10 uM, en el caso de EXP1; y, con SPIRO 10uM y SPIRO 1uM+aldosterona 100nM, en el caso de EXP2. Además, como controles se utilizaron bm-DCs sin tratamiento, tratadas con vehículo, con LPS para verificar la funcionalidad de las bm-DCs generadas y con CoPP, un inductor de la expresión de HO-1, con el cual las bm-DCs fueron estimuladas durante 2 horas (figura 22).

Posteriormente, se recolectaron las bm-DCs y se extrajo su ARN total, se obtuvo el ADNc y se realizó el qPCR respectivo, utilizando triplicados y β -actina como *house keeping*. En la figura 21 se muestran los resultados correspondientes a 2 experimentos independientes, en los cuales podemos observar que en el caso de EXP1, no se observa una inducción de HO-1 a las 2 concentraciones de SPIRO utilizadas. Además, la inducción de la expresión de HO-1 utilizada como control (CoPP) es baja en comparación con las células sin tratamiento o tratadas con el vehículo en el cual fue disuelta SPIRO (etanol), indicando que ocurrió un error en la manipulación del cultivo o el procesamiento de las muestras (figura 23).

Por otro lado, los datos para el EXP2 sugieren que SPIRO a una concentración 10uM induce un incremento de 0,5 veces y las células tratadas con SPIRO (10uM) por 2 horas y posteriormente con aldosterona (100nM) una disminución de 0,5 veces en la expresión de HO-1 respecto a las células sin tratamiento y al vehículo. Además, en este experimento se observa claramente el efecto inductor de CoPP en la expresión de HO-1 (más de 40 veces) respecto a los controles. Sin embargo, el ligero aumento observado en la expresión de HO-1 en respuesta a un estímulo con SPIRO no es significativo.

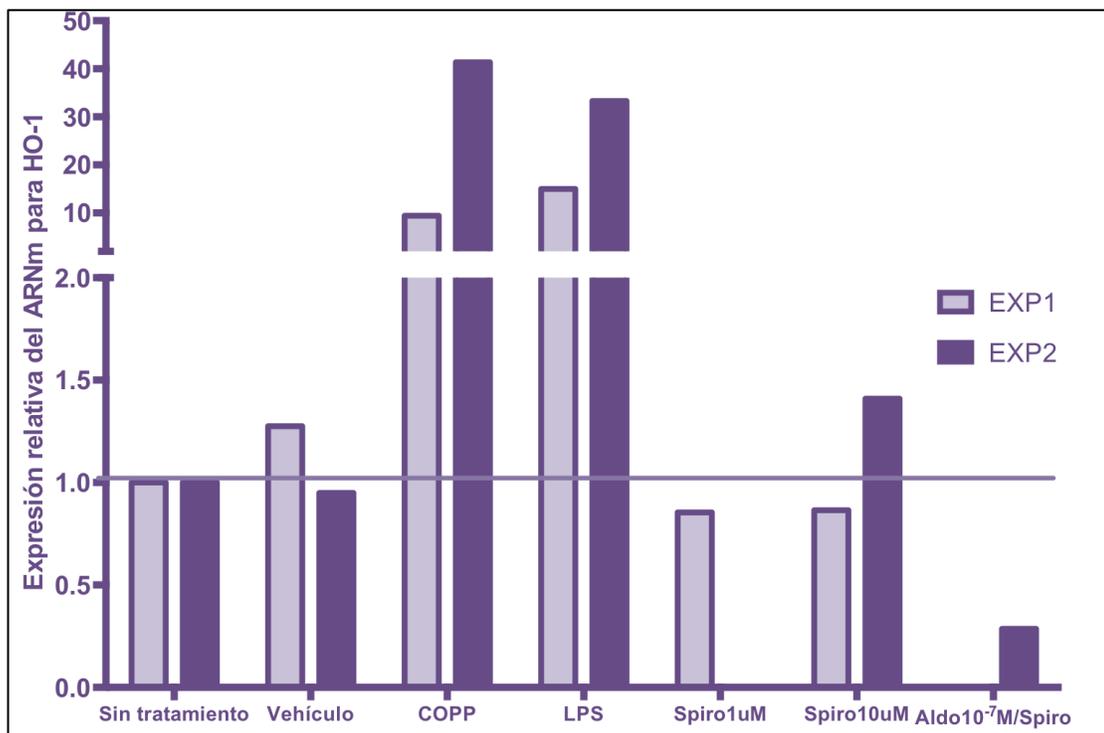


Figura 23: Espironolactona aumenta levemente la expresión de HO-1 en bm-DCs.

Las bm-DCs fueron cultivadas con GM-CSF y durante el día 5 fueron estimuladas con COPP (inductor de la expresión de HO-1) por 2 horas y con LPS, espironolactona (1 y 10 uM) y aldosterona (100 nM) por 24 horas. Luego las células fueron recuperadas y se les extrajo el ARN (N= 2 con sus respectivos triplicados).

5.5 El tratamiento con corticosterona/RU486 disminuye la expresión de PDL-1 y aumenta la expresión de CD40 en bm-DCs.

El efecto modulador de corticosterona sobre la función de las DCs se analizó a través de los niveles de expresión de marcadores de maduración y moléculas co-estimuladoras. Las bm-DCs durante el día 5 se trataron con vehículo, corticosterona, corticosterona /RU486 o corticosterona/RU486/ espironolactona durante 24 horas. Durante el día 6, se recuperaron las células, se tiñeron con anti-CD11c mAb, anti-CD IA/IE mAb, anti-PDL1 y anti-CD40, y se analizaron mediante FACS (figura 24).

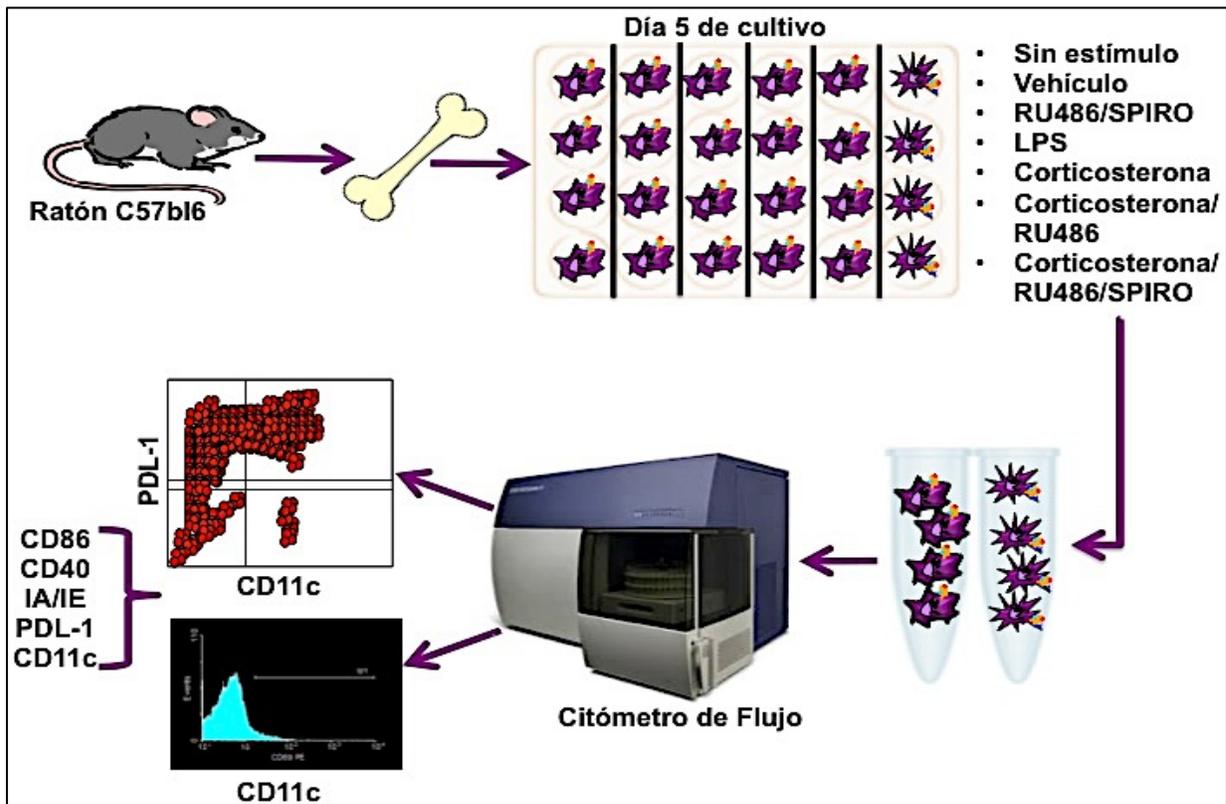


Figura 24: Determinación de CD86, CD40, IA/IE y PDL-1 en bm-DCs estimuladas con corticosterona o corticosterona/RU486.

En dos experimentos iniciales, se observó que corticosterona/RU486 disminuyen el porcentaje de células que expresan PDL-1 a las concentraciones evaluadas (10^{-7} o 10^{-8} M), similar a la disminución observada en respuesta al estímulo con aldosterona a las mismas concentraciones (figura 25). Era importante evaluar los cambios en la expresión de PDL1 ya que es una molécula, presente en la superficie de las DCs, que proporciona señales inhibitorias para la activación de las células T CD8+ .

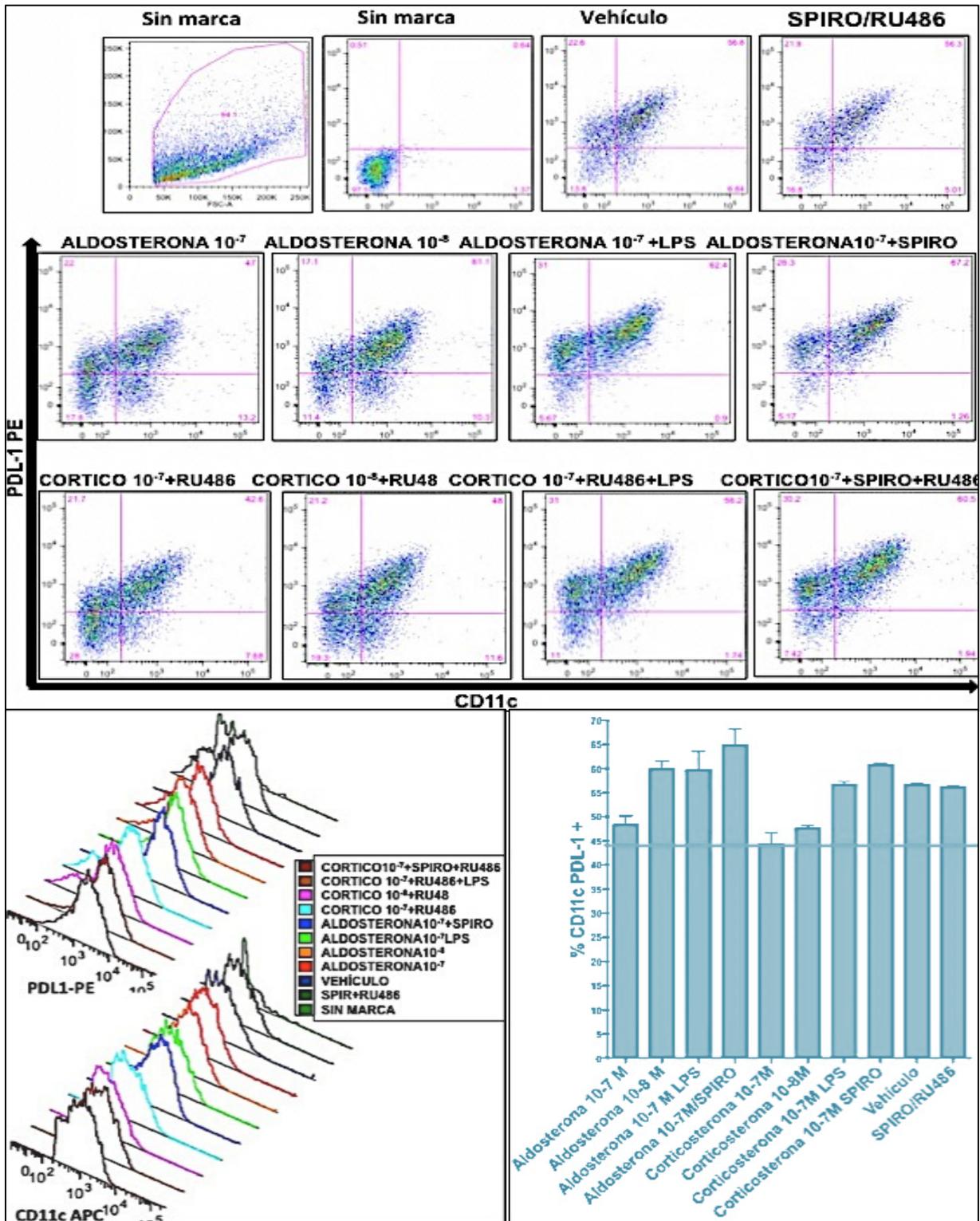


Figura 25: Corticosterona disminuye la expresión de PDL-1 en bm-DCs.

Determinación por FACS de PDL-1 y CD11c en bm-DCs estimuladas con 2 concentraciones de aldosterona: A-7 (10^{-7} M) and A-8 (10^{-8} M); SPIRO (5×10^{-6} M); CORT: C-7 (10^{-7} M) y C-8 (10^{-8} M); LPS y RU486 (10^{-6} M). La imagen muestra dot plots e histogramas (población CD11c+) representativos y un gráfico del %CD11c+PDL-1+ (N=2 con sus respectivos duplicados).

Para descartar que los tratamientos farmacológicos puedan afectar la viabilidad de las bm-DCs, se realizó un experimento para medir la apoptosis y la necrosis en respuesta a los diversos estímulos. Se utilizó Anexina V-FITC y ioduro de propidio como marcadores para apoptosis y la necrosis, respectivamente. Los datos obtenidos sugieren que corticosterona (100nM), RU486(5uM), espironolactona(5uM) por separado o corticosterona/RU486/espironolactona no inducen un cambio significativo sobre la apoptosis y la necrosis en nuestros cultivos de bm-DCs (figura 26).

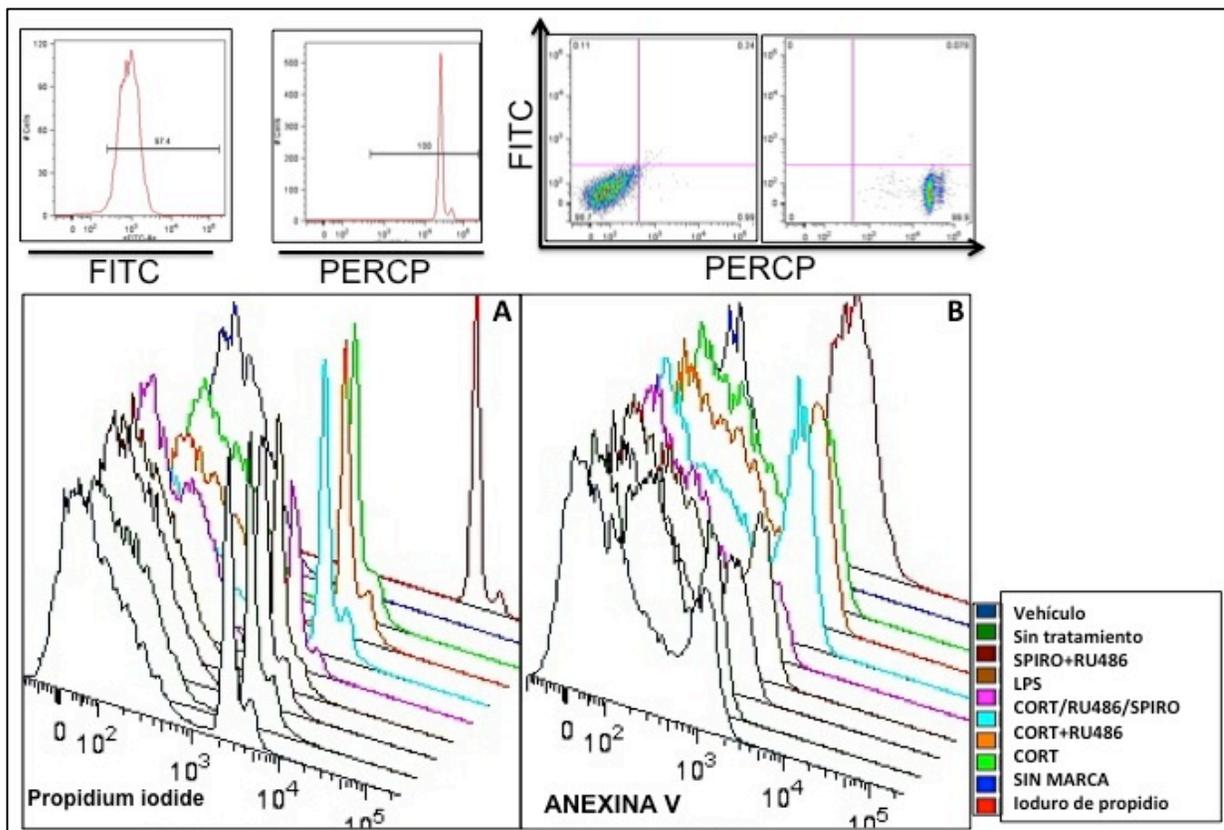


Figure 26: El tratamiento con corticosterona y/o RU486 /SPIRO no afecta la viabilidad de las bm-DCs.

Determinación por FACS de anexina V FITC y ioduro de propidio en bm-DCs estimuladas con SPIRO ($5 \times 10^{-6}M$); corticosterona ($10^{-7}M$), LPS, RU486 ($10^{-6}M$) y SPIRO/RU486. La imagen muestra los controles positivos (dot plots e histogramas) y los histogramas representativos de la población CD11c+ de las bm-DCs con los diversos tratamientos.

En el siguiente experimento, las bm-DCs recibieron el mismo tratamiento descrito anteriormente pero esta vez se determinaron los niveles de expresión de CD40, CD86, IA/IE y PDL-1 mediante FACS. Los resultados obtenidos, que corresponden a un experimento con sus respectivos duplicados, sugieren que el estímulo de corticosterona (1nM)/RU486(5uM) aumenta el porcentaje de células CD11c+CD40+ en comparación con las células tratadas con corticosterona/RU486/espironolactona o las tratadas solo con corticosterona, lo que sugiere que este efecto fue a través de la activación de MR por corticosterona. Sin embargo, al analizar los datos por MFI (nos dice cuantas moléculas de nuestro marcador son expresadas por célula) no se observaron cambios (figura 11).

En el caso de los niveles de los marcadores CD86 (figura 11), PDL-1 e IA/IE (figura 12) no se detectaron cambios en los porcentajes de la población doble positiva, pero al analizar los datos por MFI, en el caso del estímulo de corticosterona/RU486 observamos dos poblaciones en el histograma de IA/IE: una población de alta expresión (presente en todas las condiciones de estímulos) y una nueva población de baja expresión de IA/IE. A pesar de los datos para CD86, PDL-1 e IA/IE, el aumento de la expresión de CD40 podría sugerir que los estímulos con corticosterona incrementan la capacidad de pro-inflamatoria de bm-DCs a través de la activación MR. Sin embargo, es necesario realizar un mayor número de experimentos para corroborar estos datos.

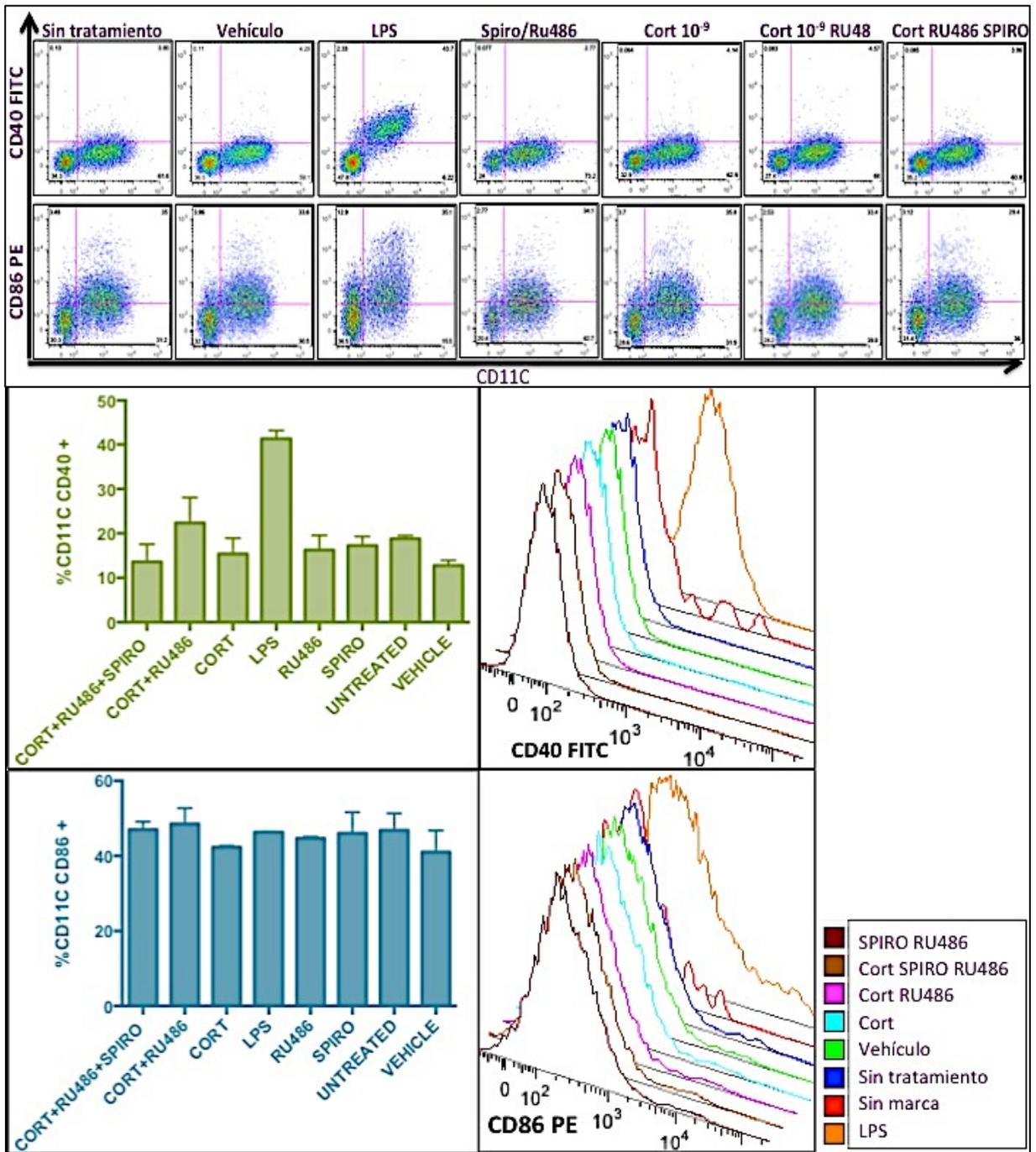


Figure 27: El tratamiento con corticosterona/RU486 aumenta los niveles de expresión de CD40 pero no los de CD86 en bm-DCs.

bm-DCs estimuladas con SPIRO ($5 \times 10^{-6}M$); CORT: ($10^{-9}M$), LPS y RU486 ($10^{-6}M$). La imagen muestra dot plots e histogramas de MFI (población CD11c+) representativos de cada condición y un gráfico del porcentaje de células CD11c+CD40+ y CD11c+CD86+ (N= 2 con sus respectivos duplicados).

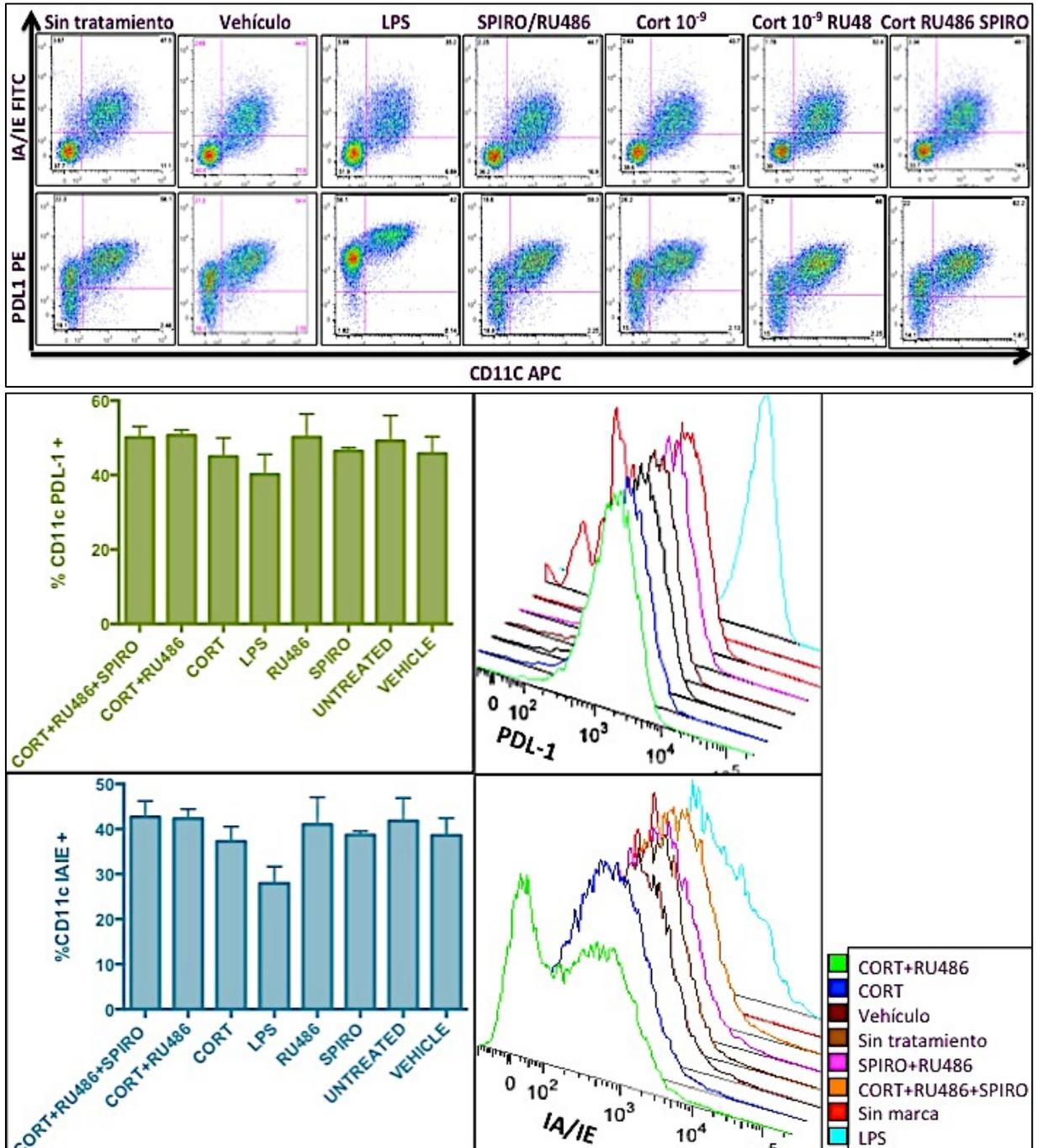


Figura 28: El tratamiento con corticosterona/RU486 no altera los niveles de expresión de los marcadores PDL-1 e IA/IE en bm-DCs.

Determinación por FACS de PDL-1, IA/IE y CD11c en bm-DCs estimuladas con SPIRO (5×10^{-6} M); corticosterona: (10^{-9} M), LPS y RU486 (10^{-6} M). La imagen muestra dot plots e histogramas de MFI (población CD11c+) representativos de cada condición y un gráfico del porcentaje de células CD11c+PDL-1+ y CD11c+IA/IE+ (N= 2 con sus respectivos duplicados).

6.- DISCUSIÓN

Las células dendríticas (DCs) son células presentadoras de antígenos profesionales (APCs) que están especializadas en la captación de antígenos y su transporte desde los tejidos periféricos hacia los órganos linfoides (126). Debido a su capacidad para estimular células T *naïve*, las DCs tienen un rol central en la iniciación de la respuesta inmune primaria y son consideradas como herramientas promisorias para la inmunoterapia (126). Por lo tanto, los esfuerzos se han dirigido hacia modular la función de las DCs para prevenir el daño autoinmune y/o inflamatorio (127-129).

6.1 Estandarización de la generación de células dendríticas derivadas de médula ósea (bm-DCs).

Nuestros métodos para producir DCs a partir de precursores de la médula ósea de ratones C57BL/6 son eficaces al garantizar al menos el 70% de células CD11c+ (molécula característica de las bm-DCs), ya que todas las células no lo expresan o lo expresan en una baja proporción. Se ha descrito que las DCs expresan diferentes niveles de este marcador dependiendo de la cepa de ratón de la cual fueron generadas, lo mismo sucede con el rendimiento obtenido (130). Los datos obtenidos se encuentran dentro de los rangos normales de cultivo generados en nuestro laboratorio.

6.2 La estimulación con LPS aumenta los niveles de ARNm de 11 β HSD2, MR, GPR30 y GR β en bm-DCs.

Durante el inicio de esta tesis, evaluamos la presencia en bm-DCs de dos moléculas relacionadas con las hormonas corticoesteroidales (aldosterona y cortisol): 11 β HSD2 y GPR30. Los resultados obtenidos en tres PCR convencionales independientes, sugieren que las bm-DCs expresan 11 β HSD2 y GPR30. Además, sugieren que un estímulo con LPS aumenta ligeramente la expresión de GPR30 en cultivos primarios de bm-DCs (3 qPCRs independientes). Este resultado no significativo podría explicarse ya que en un cultivo primario no todos los progenitores de la médula ósea se diferenciaron hacia bm-DCs, obteniéndose un porcentaje de diferenciación cercano al 75%; para mejorar estos resultados, decidimos purificar los cultivos primarios de bm-DCs mediante *cell sorting*, marcando con anticuerpos específicos anti-CD11c. Luego de esta purificación, el porcentaje de la población CD11c+ aumentó de 70% al 95% aproximadamente. Con el ARN de estas células decidimos realizar un nuevo qRT-PCR, cuyos datos (correspondientes a un qPCR con sus respectivos

triplicados) sugieren que el estímulo con LPS aumenta la expresión de 11 β HSD2 en 11 veces, y de GPR30 en 13 veces con respecto a las bm-DCs sin estímulo. De acuerdo con la literatura, el cortisol se puede unir tanto a GR como a MR y GPR30, por lo tanto, era importante determinar el nivel de expresión de cada uno de estos receptores en nuestros cultivos de bm-DCs. En el caso de MR, los datos obtenidos sugieren que se repite la tendencia de que el estímulo con LPS aumenta los niveles de su ARNm en 6 veces.

En 2011 Gros et al. informó de la participación de GPR30 en efectos rápidos de aldosterona en VSMCs (104). Ellos demostraron que la activación de GPR30 dependiente de aldosterona aumenta la fosforilación de la vía ERK1/2, la apoptosis, y la fosforilación de la cadena ligera de la miosina(131). GPR30 fue originalmente postulado como un receptor que involucrado en las respuestas rápidas de los estrógenos (105), pero existen discrepancias sobre las características GPR30 entre los diferentes grupos de trabajo. Interesantemente, se necesitan concentraciones suprafisiológicas de estrógeno para inducir efectos medibles *in vitro* sobre la fosforilación de ERK1/2 en VSMCs (104), en cambio, en el caso de aldosterona y cortisol tales efectos se pudieron detectar incluso a concentraciones fisiológicas (104). Estudios previos ya habían demostrado que aldosterona parece ser el agonista fisiológico de GPR30, generando un rápido incremento en el AMPc en VSMCs(132). En consecuencia, la posible expresión de GPR30 en bm-DCs podría explicar diversos efectos generados por aldosterona que no pueden ser bloqueados mediante el uso de antagonistas de MR.

Uno de los debates científicos generado durante los últimos años, intenta determinar algunas de las razones que justifiquen la variabilidad en la respuesta clínica a los GCs, centrándose en los mecanismos que regulan la unión, síntesis y acción de GR al que los GCs se unen para poder realizar posteriormente su acción en la regulación intranuclear de la síntesis de moléculas implicadas en la inflamación. En este contexto, recientemente se describieron dos isoformas (α y β) para GR . La isoforma β , producto de una maduración alternativa del ARNm, podría actuar en contraposición a la α , que es la biológicamente activa, y con ello ejercer un efecto represor global sobre los GCs. Por lo tanto, nuestro siguiente paso fue determinar la expresión las isoformas de GR en nuestras bm-DCs purificadas. Los datos que obtuvimos mediante qPCR (con sus respectivos triplicados) sugieren que ambas isoformas son expresadas en bm-DCs, sin embargo, solo la isoforma GR β aumenta (más de 5 veces) sus niveles de ARNm en respuesta al LPS, mientras que los niveles para la isoforma GR α no se ven alterados.

De acuerdo a la literatura, De Castro et al usando técnicas de Western blot e inmunocitoquímica encontraron que en los neutrófilos GR β es expresado en valores equiparables a los del GR α (118). Por el contrario, Webster et al encontraron valores elevados de GR β en células HeLa-S3 estimuladas con citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α o IL-1 (133). Sin embargo, la posibilidad de que un aumento en la presencia del GR β pueda actuar como potente inhibidor de GR α , y con ello reducir la eficacia de los GCs, ha generado un gran debate científico. Así, han surgido trabajos que demuestran la influencia negativa que GR β puede ejercer en la actividad antiinflamatoria del GR α , al comprobarse que un aumento de GR β es capaz de reducir la potencia GR α para disminuir la actividad del factor de transcripción NF- κ B, un potente agente pro inflamatorio (134).

Recientemente, se ha sugerido que el posible efecto represor podría ser de tipo célula específico, o incluso que una sobreexpresión del GR β sería consecuencia de la misma respuesta inflamatoria(135). Aunque los mecanismos que modificarían el proceso de *splicing* alternativo aún son desconocidos, diversos trabajos relacionan la presencia del GR β con la respuesta inflamatoria. En diferentes estudios se demuestra una relación entre la presencia de marcadores inflamatorios como la IL-2 o la IL-4, la existencia del GR β y el grado de respuesta a los GCs(136-139). Asimismo, se ha podido demostrar que la intervención mediante estímulos pro-inflamatorios, como diversas citoquinas o antígenos microbianos, es capaz de inducir una disminución de la acción de los GCs sobre las células y, paralelamente, un incremento en la detección de GR β (140, 141). Por lo tanto, nuestros datos están de acuerdo con la descripción de la expresión de estas isoformas en otros tipos celulares, ya que LPS es un potente estímulo pro-inflamatorio. De esta forma, a partir de nuestros datos podríamos sugerir que un estímulo pro-inflamatorio como LPS, que induce la maduración de las DCs, podría aumentar la expresión de GR β disminuyendo los efectos antiinflamatorios del cortisol, favoreciendo su unión a MR y sus consecuentes efectos pro-inflamatorios.

6.3 Linfocitos B presentan niveles detectables de ARNm para MR y GPR30 pero no para 11 β HSD2.

Como segundo paso, quisimos establecer si otras células que cumplen con el rol de APCs presentan niveles de ARNm para 11 β HSD2, MR y GPR30, para este propósito, purificamos linfocitos B a partir de esplenocitos. Nuestros resultados, que corresponden a 2 qPCRs independientes con sus respectivos triplicados, sugieren que los linfocitos B expresan ARNm para MR y GPR30 pero no para 11 β HSD2. Al buscar en la literatura, sólo existe un estudio

que sugiere que los linfocitos B expresan MR pero fue realizado en 1988 utilizando ligandos marcados y gráficos de scatchard, en los cuales se definía el número de moléculas de MR mediante el desplazamiento en la marca radiactiva por el ligando sin marcar (32), por lo tanto, con el desarrollo de la tecnología era importante corroborar este reporte. La expresión de MR y GPR30 en linfocitos B y la caracterización de sus efectos, puede abrir un nuevo enfoque terapéutico para las enfermedades cuyo componente patológico principal son los linfocitos B, como el caso de algunas enfermedades autoinmunes. Tradicionalmente, la importancia otorgada a los linfocitos B radica en la presentación de antígenos por células B autorreactivas (que unen selectivamente antígenos propios) que los presentan a los linfocitos T autorreactivos aportándoles señales de co-estimulación, que permitirán la activación y diferenciación en células T efectoras autorreactivas que iniciarán la inflamación en respuesta a autoantígenos (120).

6.4 Espironolactona aumenta levemente los niveles de ARNm de HO-1 en bm-DCs.

El eje central de esta tesis es MR y sus efectos sobre las funciones de las DCs, en este contexto, nos pareció interesante la posible relación entre un antagonista competitivo de MR y la expresión de una enzima inmunoreguladora como HO-1. De esta forma, realizamos 2 experimentos independientes en los cuales cultivamos bm-DCs y las estimulamos por 24 horas con 2 concentraciones de espironolactona (SPIRO): 1 y 10uM, en el caso de EXP1; y con SPIRO10uM y SPIRO1uM+aldosterona 100nM, en el caso de EXP2. Además, como controles se utilizaron bm-DCs sin tratamiento, tratadas con vehículo, con LPS para verificar la funcionalidad de las bm-DCs generadas y con COPP, un inductor de la expresión de HO-1, con el cual las bm-DCs fueron estimuladas durante las 2 últimas horas.

En el caso de EXP1, nuestros datos sugieren que existió una inducción de HO-1 a ninguna de las 2 concentraciones de SPIRO utilizadas. Además, que la inducción de la expresión de HO-1 generada por CoPP es baja (sólo 10 veces) en comparación con las células sin tratamiento o tratadas solo con el vehículo en el cual fue disuelta la SPIRO (etanol al 100%). Esto podría indicar que en algún paso del experimento hubo un error en la manipulación del cultivo celular o en el procesamiento de las muestras. Por otro lado, los datos para EXP2 sugieren que SPIRO a una concentración 10uM induce un incremento de 0,5 veces y que en el caso de las células que se trataron con SPIRO (1uM) por 2 horas y luego se agregó aldosterona (100nM), una disminución de 0,5 veces en la expresión de HO-1 respecto a los controles. Además, en este experimento se observa claramente el efecto inductor de CoPP sobre la expresión de HO-1 (más de 40 veces) respecto a los controles. Sin embargo, a

pesar de observar este ligero aumento en la expresión de HO-1 en respuesta a un estímulo con SPIRO, este no es significativo. Nosotros creemos que esto se debe a que los cultivos primarios de bm-DCs utilizados no fueron purificados, por lo tanto, es posible que al purificar las células mediante el marcador CD11c+ este cambio en la expresión del ARNm de HO-1 sea más significativo, tal como ocurrió en el caso de 11 β HSD2 y GPR30.

En el caso de que a futuro se vuelva a repetir este experimento con bm-DCs purificadas y que se logre apreciar una inducción significativa de los niveles de ARNm de HO-1 mediante un estímulo con espirolactona, posibilitaría un nuevo enfoque terapéutico en el tratamiento de las patologías del sistema inmune. HO-1 es expresada en todas las células en niveles bajos pero es altamente inducible principalmente como respuesta a su sustrato, el grupo hemo, y también por agentes involucrados en el estrés oxidativo, como radicales libres derivados de oxígeno, citoquinas pro-inflamatorias y estímulos inflamatorios, demostrándose su efecto protector en diversos modelos inflamatorios experimentales (100, 122, 124, 142). Además, ha sido descrito que la expresión de HO-1 en DCs disminuye drásticamente como resultado del proceso de maduración (125, 143, 144) y que la sobreexpresión de HO-1 en DCs, de humanos y ratas, inhibe la maduración y la función pro-inflamatoria inducida por LPS (122). Además, este posible nuevo efecto de espirolactona sobre la expresión de HO-1 se relaciona con una solicitud de sobre el *“uso de una composición en base a espirolactona, que presenta una acción inhibitoria de la activación de linfocitos T útil para prevenir y/o tratar esclerosis múltiple”* (145). De esta forma, se podrían explicar algunos efectos de espirolactona y se le podrían asignar otros usos clínicos.

6.5 El tratamiento con corticosterona/RU486 disminuye la expresión de PDL-1 y aumenta la expresión de CD40 en bm-DCs.

Retomando el eje central de esta tesis, nos propusimos determinar los efectos que tiene la activación de MR por corticosterona. La mayoría de los estudios que examinan los efectos de los GCs sobre la función de las DCs han utilizado un glucocorticoides sintético farmacológico: dexametasona (63). En cambio, en nuestros experimentos se utilizó el glucocorticoide producido naturalmente en modelos murinos: corticosterona (CORT), que en nuestra opinión es más apropiado para examinar los efectos de las interacciones neuroendocrinos sobre la función inmunológica.

El efecto modulador de corticosterona sobre la función de las DCs se analizó a través de los niveles de expresión de marcadores de maduración y moléculas co-estimuladoras. Las bm-DCs durante el día 5 se trataron con vehículo, corticosterona, corticosterona/RU486 o

corticosterona/RU486/espironolactona durante 24 horas. En dos experimentos iniciales, se observó que en bm-DCs tratadas previamente con RU486 y luego con corticosterona disminuye el porcentaje de células que expresan PDL-1 a las concentraciones evaluadas (10^{-7} o 10^{-8} M), similar a la disminución observada en respuesta al estímulo con aldosterona a las mismas concentraciones. Con el objetivo de descartar el efecto diferencial de los tratamientos farmacológicos sobre la viabilidad de las bm-DCs, se realizó un experimento para medir la apoptosis y la necrosis en respuesta a los diversos estímulos. Los datos obtenidos sugieren que corticosterona (100nM), RU486 (5uM), espironolactona (5uM) por separado o en conjunto no inducen un cambio significativo sobre la apoptosis y la necrosis (figura 26).

En el siguiente experimento, las bm-DCs recibieron el mismo tratamiento descrito anteriormente y se determinó la expresión de moléculas co-estimuladoras. Los resultados obtenidos, que corresponden a un experimento con sus respectivos duplicados, sugieren que el estímulo de CORT(1nM)/ RU486(5uM) aumenta el la población doble positiva para los marcadores CD11c y CD40 en comparación a las células tratadas con CORT/RU486/SPIRO o las tratadas solo con CORT, sugiriendo que este efecto fue a través de la activación de MR por corticosterona, ya que al usar un antagonista de GR más un antagonista de MR no se observa el mismo efecto. Sin embargo, al analizar los datos por MFI no se observaron cambios (figura 11). En el caso de los niveles de los marcadores CD86 (figura 11), PDL-1 e IA/IE (figura 12) no se detectaron cambios en los porcentajes de la población doble positiva. Una posible explicación para el efecto no detectable de corticosterona además de RU486 en PDL-1 de expresión es las concentraciones de corticosterona por lo que, el primer experimento se utilizó 10^{-7} o 10^{-8} M y en el segundo, se utilizó 10^{-9} M, por lo tanto, es posible que la concentración de corticosterona no fue suficiente para estimular bm-DCs. Sin embargo, al analizar los datos por MFI, en el caso del estímulo de corticosterona más RU486, observamos dos poblaciones en el histograma de IA/IE: una población de alta expresión (presente en todas las condiciones de estímulos) y una nueva población de baja expresión de IA/IE.

De acuerdo a la literatura, la maduración de DCs y la activación de células T naïve es crucial en la iniciación de una respuesta inmunitaria adaptativa contra agentes patógenos (83). Estudios realizados en bm-DCs tratadas con CORT demostraron que estas células eran deficientes en la regulación de las moléculas co-estimuladoras: CD86 y PDL-1 (molécula que proporciona señales inhibitorias para la activación de las células T CD8+)(83). Las DCs

inmaduras expresan bajos niveles de moléculas co-estimuladoras, haciéndolos ineficaces para la activación de células T (146). Después de la maduración, DC normalmente aumentan la expresión de moléculas co-estimuladoras para proporcionar la señal co-estimuladora necesaria para las células T a través de CD28. La falta de co-estimulación puede conducir a anergia de células T y podría causar la deficiencia en la activación de células T específicas CD8+ antígeno específicas (147). Los datos de este estudio sugieren que elevadas concentraciones de CORT, encontradas *in vivo* durante una respuesta de estrés, probablemente contribuyen a la generación ineficiente de la inmunidad mediada por CTL. Sin embargo, la up-regulación de moléculas co-estimuladoras no es insuficiente para la activación de células T, así, las DCs maduras también secretan muchas citoquinas pro-inflamatorias como IL-6, IL-12 y TNF- α (148). A pesar de los datos para CD86, PDL-1 e IA/IE, el aumento de la expresión de CD40 podría sugerir que los estímulos de corticosterona incrementan la capacidad de pro-inflamatoria de bm-DCs a través de la activación MR. Sin embargo, es necesario para llevar a cabo el mayor número de experimentos para corroborar estos datos.

Por último, es importante destacar que a futuro, esta tesis puede promover una mejor caracterización de los efectos de 11 β HSD2, GPR30, MR, GR α , GR β y la activación de MR por una molécula anti-inflamatoria como cortisol sobre la función de las DCs. De esta forma, sería interesante que próximamente se determinara la expresión de 11 β HSD2 y 11HSD1 en bm-DCs tratadas con corticosterona+RU486, y que además, se correlacionaran los efectos de LPS sobre los niveles del ARNm de 11 β HSD2, GPR30, MR, GR α y GR β con los niveles de expresión de sus proteínas.

7.- CONCLUSIONES

Los datos obtenidos en esta tesis sugieren que:

- bm-DCs con o sin estímulo de LPS presentan niveles detectables de ARNm de GPR30 y 11 β HSD2.
- La estimulación con LPS aumenta los niveles de ARNm de 11 β HSD2, MR, GPR30 y GR β en bm-DCs.
- La estimulación con LPS no cambia los niveles de ARNm GR α en DCs.
- Los linfocitos B presentan niveles detectables de ARNm de MR y GPR30, pero no de 11 β HSD2.
- Espironolactona induce un ligero aumento en la expresión de HO-1 en bm-DCs.
- Los estímulos farmacológicos con corticosterona, espironolactona y/o RU486 no cambia significativamente la viabilidad de las bm-DCs DCs.
- El tratamiento con corticosterona/RU486 disminuye la expresión de PDL-1 y aumenta la expresión de CD40 en bm-DCs.

La base terapéutica de un gran número de enfermedades, desde un punto patogénico, son los agentes antiinflamatorios, especialmente los GCs. Ha sido ampliamente descrito que la respuesta a los GCs es variable de unos individuos a otros y existen algunos pacientes con una respuesta pobre o nula a estos agentes. Por lo tanto, es necesario profundizar en las múltiples y diferenciales formas de regulación de la función de las DCs, las cuales podrían contribuir a explicar los efectos pleiotrópicos de los GCs e ilustran el efecto sustancial que los productos de los sistemas nervioso y endocrino tienen sobre la función inmune, y subrayan la importancia de considerar los procesos neuroendocrinos que pueden influir en el resultado de una respuesta inmune.

Sin embargo, con respecto a nuestra hipótesis inicial en la que proponíamos que "corticosterona, a través de la señalización de MR, aumenta la capacidad de las células dendríticas para activar las células T" creemos que nuestros datos sugieren que la hipótesis es correcta, sin embargo, son necesarios algunos experimentos indispensables que nos permitan evaluar la capacidad presentadora de antígenos de nuestras bm-DCs tratadas con corticosterona, por ejemplo: realizar co-cultivos entre bm-DCs cargadas con antígenos (péptidos de ovoalbúmina) estimuladas con corticosterona o corticosterona/RU486 y células

T de ratones transgénicos OT-I y OT-II, con el objetivo de determinar marcadores de activación (IL-2, CD69 y CD71) y el patrón de citoquinas secretadas (IFN- γ IL17, IL-4, IL-10).

Finalmente, podemos decir que los datos obtenidos en el desarrollo de esta tesis no nos permiten concluir categóricamente que corticosterona es capaz de activar MR e inducir un fenotipo pro-inflamatorio en las DCs, pero la disminución en la expresión de PDL-1 y el aumento de CD40 sugieren que las DCs tienden a adquirir dicho fenotipo. Por otro lado, es importante destacar hasta el momento, no existen estudios sobre la expresión de la enzima 11 β HSD2 o el receptor GPR30 en DCs, pero nuestros resultados sugieren que las DCs expresan 2 nuevas moléculas involucradas en la respuesta a hormonas corticoesteroidales, las cuales abren una nueva posibilidad de regulación de la función de las DCs.

BIBLIOGRAFÍA

1. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immune induction of the adaptive immune response. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 1999;64:429-35.
2. Jiang H, Chess L. How the immune system achieves self-nonself discrimination during adaptive immunity. *Advances in immunology*. 2009;102:95-133.
3. Kalergis AM. Modulation of T cell immunity by TCR/pMHC dwell time and activating/inhibitory receptor pairs on the antigen-presenting cell. *Current pharmaceutical design*. 2003;9(3):233-44.
4. Carroll MC. The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:545-68.
5. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*. 2000;406(6797):782-7.
6. Ahmed R. Tickling memory T cells. *Science*. 1996;272(5270):1904.
7. Gray D. Immunological memory. *Annu Rev Immunol*. 1993;11:49-77.
8. Mackay CR. T-cell memory: the connection between function, phenotype and migration pathways. *Immunol Today*. 1991;12(6):189-92.
9. Lanzavecchia A, Sallusto F. Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Curr Opin Immunol*. 2005;17(3):326-32.
10. Rickard AJ, Young MJ. Corticosteroid receptors, macrophages and cardiovascular disease. *J Mol Endocrinol*. 2009;42(6):449-59.
11. Feraco A, Armani A, Mammi C, Fabbri A, Rosano GM, Caprio M. Role of mineralocorticoid receptor and renin-angiotensin-aldosterone system in adipocyte dysfunction and obesity. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2013;137:99-106.
12. Herrada AA, Contreras FJ, Marini NP, Amador CA, Gonzalez PA, Cortes CM, et al. Aldosterone promotes autoimmune damage by enhancing Th17-mediated immunity. *J Immunol*. 2010;184(1):191-202.
13. Steinman RM, Adams JC, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. IV. Identification and distribution in mouse spleen. *J Exp Med*. 1975;141(4):804-20.
14. Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature*. 2007;449(7161):419-26.
15. Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*. 2001;106(3):255-8.

16. Mahnke K, Schmitt E, Bonifaz L, Enk AH, Jonuleit H. Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. *Immunology and cell biology*. 2002;80(5):477-83.
17. Gad M, Claesson MH, Pedersen AE. Dendritic cells in peripheral tolerance and immunity. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 2003;111(7-8):766-75.
18. Alaniz RC, Sandall S, Thomas EK, Wilson CB. Increased dendritic cell numbers impair protective immunity to intracellular bacteria despite augmenting antigen-specific CD8+ T lymphocyte responses. *J Immunol*. 2004;172(6):3725-35.
19. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 1996;383(6603):787-93.
20. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*. 1989;7:145-73.
21. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006;441(7090):235-8.
22. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 2006;24(2):179-89.
23. Ardavin C, Amigorena S, Reis e Sousa C. Dendritic cells: immunobiology and cancer immunotherapy. *Immunity*. 2004;20(1):17-23.
24. Moser M, De Smedt T, Sornasse T, Tielemans F, Chentoufi AA, Muraille E, et al. Glucocorticoids down-regulate dendritic cell function in vitro and in vivo. *European journal of immunology*. 1995;25(10):2818-24.
25. Rea D, van Kooten C, van Meijgaarden KE, Ottenhoff TH, Melief CJ, Offringa R. Glucocorticoids transform CD40-triggering of dendritic cells into an alternative activation pathway resulting in antigen-presenting cells that secrete IL-10. *Blood*. 2000;95(10):3162-7.
26. Xing N, ML LM, Bachman LA, McKean DJ, Kumar R, Griffin MD. Distinctive dendritic cell modulation by vitamin D(3) and glucocorticoid pathways. *Biochemical and biophysical research communications*. 2002;297(3):645-52.
27. Sheppard KE, Funder JW. Equivalent affinity of aldosterone and corticosterone for type I receptors in kidney and hippocampus: direct binding studies. *Journal of steroid biochemistry*. 1987;28(6):737-42.
28. Rousseau G, Baxter JD, Funder JW, Edelman IS, Tomkins GM. Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors for aldosterone. *Journal of steroid biochemistry*. 1972;3(2):219-27.
29. Arriza JL, Weinberger C, Cerelli G, Glaser TM, Handelin BL, Housman DE, et al. Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science*. 1987;237(4812):268-75.

30. Shen JZ, Young MJ. Corticosteroids, heart failure, and hypertension: a role for immune cells? *Endocrinology*. 2012;153(12):5692-700.
31. McKenna NJ, O'Malley BW. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell*. 2002;108(4):465-74.
32. Armanini D, Endres S, Kuhnle U, Weber PC. Parallel determination of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in T- and B-lymphocytes of human spleen. *Acta endocrinologica*. 1988;118(4):479-82.
33. Armanini D, Kuhnle U, Witzgall H, Tietze U, Saule H, Schroeter C, et al. The determination of mineralocorticoid receptors in human mononuclear leukocytes from patients with mineralocorticoid excess: physiological and pathological implications. *Clinical and experimental hypertension Part A, Theory and practice*. 1986;8(4-5):781-5.
34. Armanini D, Strasser T, Weber PC. Binding of agonists and antagonists to mineralocorticoid receptors in human peripheral mononuclear leucocytes. *Journal of hypertension Supplement : official journal of the International Society of Hypertension*. 1985;3(3):S157-9.
35. Armanini D, Strasser T, Weber PC. Parallel determination of glucocorticoid receptors in human mononuclear and polymorphonuclear leukocytes after Percoll separation. *Journal of endocrinological investigation*. 1985;8(1):45-7.
36. Armanini D, Witzgall H, Strasser T, Weber PC. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in circulating mononuclear leukocytes of patients with primary hyperaldosteronism. *Cardiology*. 1985;72 Suppl 1:99-101.
37. Miller AH, Spencer RL, Husain A, Rhee R, McEwen BS, Stein M. Differential expression of type I adrenal steroid receptors in immune tissues is associated with tissue-specific regulation of type II receptors by aldosterone. *Endocrinology*. 1993;133(5):2133-40.
38. Miller AH, Spencer RL, hassett J, Kim C, Rhee R, Ciurea D, et al. Effects of selective type I and II adrenal steroid agonists on immune cell distribution. *Endocrinology*. 1994;135(5):1934-44.
39. Lu NZ, Cidlowski JA. The origin and functions of multiple human glucocorticoid receptor isoforms. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2004;1024:102-23.
40. Pujols L, Mullol J, Perez M, Roca-Ferrer J, Juan M, Xaubet A, et al. Expression of the human glucocorticoid receptor alpha and beta isoforms in human respiratory epithelial cells and their regulation by dexamethasone. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2001;24(1):49-57.
41. Cao Y, Bender IK, Konstantinidis AK, Shin SC, Jewell CM, Cidlowski JA, et al. Glucocorticoid receptor translational isoforms underlie maturational stage-specific glucocorticoid sensitivities of dendritic cells in mice and humans. *Blood*. 2013;121(9):1553-62.
42. Karin M. New twists in gene regulation by glucocorticoid receptor: is DNA binding dispensable? *Cell*. 1998;93(4):487-90.

43. De Bosscher K, Haegeman G. Minireview: latest perspectives on antiinflammatory actions of glucocorticoids. *Mol Endocrinol.* 2009;23(3):281-91.
44. Newton R, Holden NS. Separating transrepression and transactivation: a distressing divorce for the glucocorticoid receptor? *Molecular pharmacology.* 2007;72(4):799-809.
45. Baschant U, Tuckermann J. The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology.* 2010;120(2-3):69-75.
46. Spat A, Hunyady L. Control of aldosterone secretion: a model for convergence in cellular signaling pathways. *Physiological reviews.* 2004;84(2):489-539.
47. Foster RH, MacFarlane CH, Bustamante MO. Recent progress in understanding aldosterone secretion. *General pharmacology.* 1997;28(5):647-51.
48. Tait SA, Tait JF. The correspondence of S.A.S. Simpson and J.F. Tait with T. Reichstein during their collaborative work on the isolation and elucidation of the structure of electrocortin (later aldosterone). *Steroids.* 1998;63(9):440-53.
49. Mosso L, Carvajal C, Gonzalez A, Barraza A, Avila F, Montero J, et al. Primary aldosteronism and hypertensive disease. *Hypertension.* 2003;42(2):161-5.
50. Fiebeler A, Muller DN, Shagdarsuren E, Luft FC. Aldosterone, mineralocorticoid receptors, and vascular inflammation. *Current opinion in nephrology and hypertension.* 2007;16(2):134-42.
51. Funder JW. Mineralocorticoid receptors: distribution and activation. *Heart failure reviews.* 2005;10(1):15-22.
52. Mihailidou AS, Funder JW. Nongenomic effects of mineralocorticoid receptor activation in the cardiovascular system. *Steroids.* 2005;70(5-7):347-51.
53. Freel EM, Connell JM. Mechanisms of hypertension: the expanding role of aldosterone. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* 2004;15(8):1993-2001.
54. Chapman KE, Coutinho A, Gray M, Gilmour JS, Savill JS, Seckl JR. Local amplification of glucocorticoids by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and its role in the inflammatory response. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2006;1088:265-73.
55. Freeman L, Hewison M, Hughes SV, Evans KN, Hardie D, Means TK, et al. Expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 permits regulation of glucocorticoid bioavailability by human dendritic cells. *Blood.* 2005;106(6):2042-9.
56. Thieringer R, Le Grand CB, Carbin L, Cai T-Q, Wong B, Wright SD, et al. 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Is Induced in Human Monocytes upon Differentiation to Macrophages. *The Journal of Immunology.* 2001;167(1):30-5.
57. Baid S, Nieman LK. Glucocorticoid excess and hypertension. *Current hypertension reports.* 2004;6(6):493-9.

58. Magiakou MA, Smyrnaki P, Chrousos GP. Hypertension in Cushing's syndrome. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2006;20(3):467-82.
59. Mantero F, Boscaro M. Glucocorticoid-dependent hypertension. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 1992;43(5):409-13.
60. Melcescu E, Koch C. Syndromes of Mineralocorticoid Excess. In: Koch CA, Chrousos GP, editors. *Endocrine Hypertension. Contemporary Endocrinology: Humana Press*; 2013. p. 33-50.
61. Sharma ST, Nieman LK. Cushing's Syndrome: All Variants, Detection, and Treatment. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2011;40(2):379-91.
62. Piemonti L, Monti P, Allavena P, Sironi M, Soldini L, Leone BE, et al. Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. *J Immunol*. 1999;162(11):6473-81.
63. Zen M, Canova M, Campana C, Bettio S, Nalotto L, Rampudda M, et al. The kaleidoscope of glucocorticoid effects on immune system. *Autoimmunity reviews*. 2011;10(6):305-10.
64. Leussink VI, Jung S, Merschdorf U, Toyka KV, Gold R. High-dose methylprednisolone therapy in multiple sclerosis induces apoptosis in peripheral blood leukocytes. *Archives of neurology*. 2001;58(1):91-7.
65. Rogatsky I, Ivashkiv LB. Glucocorticoid modulation of cytokine signaling. *Tissue antigens*. 2006;68(1):1-12.
66. Good SR, Thieu VT, Mathur AN, Yu Q, Stritesky GL, Yeh N, et al. Temporal Induction Pattern of STAT4 Target Genes Defines Potential for Th1 Lineage-Specific Programming. *The Journal of Immunology*. 2009;183(6):3839-47.
67. Cupps TR, Gerrard TL, Falkoff RJ, Whalen G, Fauci AS. Effects of in vitro corticosteroids on B cell activation, proliferation, and differentiation. *The Journal of clinical investigation*. 1985;75(2):754-61.
68. Youinou P, Pers J-O. The late news on baf in autoimmune diseases. *Autoimmunity reviews*. 2010;9(12):804-6.
69. Huard B, Schneider P, Mauri D, Tschopp J, French LE. T Cell Costimulation by the TNF Ligand BAFF. *The Journal of Immunology*. 2001;167(11):6225-31.
70. Barish GD, Downes M, Alaynick WA, Yu RT, Ocampo CB, Bookout AL, et al. A Nuclear Receptor Atlas: macrophage activation. *Mol Endocrinol*. 2005;19(10):2466-77.
71. Lim HY, Muller N, Herold MJ, van den Brandt J, Reichardt HM. Glucocorticoids exert opposing effects on macrophage function dependent on their concentration. *Immunology*. 2007;122(1):47-53.
72. Kim KD, Choe YK, Choe IS, Lim JS. Inhibition of glucocorticoid-mediated, caspase-independent dendritic cell death by CD40 activation. *Journal of leukocyte biology*. 2001;69(3):426-34.

73. Keidar S, Kaplan M, Pavlotzky E, Coleman R, Hayek T, Hamoud S, et al. Aldosterone administration to mice stimulates macrophage NADPH oxidase and increases atherosclerosis development: a possible role for angiotensin-converting enzyme and the receptors for angiotensin II and aldosterone. *Circulation*. 2004;109(18):2213-20.
74. Sun Y, Zhang J, Lu L, Chen SS, Quinn MT, Weber KT. Aldosterone-induced inflammation in the rat heart : role of oxidative stress. *Am J Pathol*. 2002;161(5):1773-81.
75. Oestreicher EM, Martinez-Vasquez D, Stone JR, Jonasson L, Roubanthisuk W, Mukasa K, et al. Aldosterone and not plasminogen activator inhibitor-1 is a critical mediator of early angiotensin II/NG-nitro-L-arginine methyl ester-induced myocardial injury. *Circulation*. 2003;108(20):2517-23.
76. Ahokas RA, Warrington KJ, Gerling IC, Sun Y, Wodi LA, Herring PA, et al. Aldosteronism and peripheral blood mononuclear cell activation: a neuroendocrine-immune interface. *Circulation research*. 2003;93(10):e124-35.
77. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature immunology*. 2010;11(10):889-96.
78. Troidl C, Mollmann H, Nef H, Masseli F, Voss S, Szardien S, et al. Classically and alternatively activated macrophages contribute to tissue remodelling after myocardial infarction. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2009;13(9B):3485-96.
79. Hofmann U, Beyersdorf N, Weirather J, Podolskaya A, Bauersachs J, Ertl G, et al. Activation of CD4+ T lymphocytes improves wound healing and survival after experimental myocardial infarction in mice. *Circulation*. 2012;125(13):1652-63.
80. Rocha R, Rudolph AE, Frierdich GE, Nachowiak DA, Kekec BK, Blomme EA, et al. Aldosterone induces a vascular inflammatory phenotype in the rat heart. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2002;283(5):H1802-10.
81. Young MJ, Moussa L, Dilley R, Funder JW. Early inflammatory responses in experimental cardiac hypertrophy and fibrosis: effects of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase inactivation. *Endocrinology*. 2003;144(3):1121-5.
82. Truckenmiller ME, Princiotta MF, Norbury CC, Bonneau RH. Corticosterone impairs MHC class I antigen presentation by dendritic cells via reduction of peptide generation. *Journal of neuroimmunology*. 2005;160(1-2):48-60.
83. Elftman MD, Norbury CC, Bonneau RH, Truckenmiller ME. Corticosterone impairs dendritic cell maturation and function. *Immunology*. 2007;122(2):279-90.
84. Kitajima T, Ariizumi K, Bergstresser PR, Takashima A. A novel mechanism of glucocorticoid-induced immune suppression: the inhibition of T cell-mediated terminal maturation of a murine dendritic cell line. *The Journal of clinical investigation*. 1996;98(1):142-7.
85. Piemonti L, Monti P, Allavena P, Leone BE, Caputo A, Di Carlo V. Glucocorticoids increase the endocytic activity of human dendritic cells. *International immunology*. 1999;11(9):1519-26.

86. Matasic R, Dietz AB, Vuk-Pavlovic S. Dexamethasone inhibits dendritic cell maturation by redirecting differentiation of a subset of cells. *Journal of leukocyte biology*. 1999;66(6):909-14.
87. Bellinghausen I, Brand U, Steinbrink K, Enk AH, Knop J, Saloga J. Inhibition of human allergic T-cell responses by IL-10-treated dendritic cells: differences from hydrocortisone-treated dendritic cells. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2001;108(2):242-9.
88. Carreno LJ, Riedel CA, Kalergis AM. Induction of tolerogenic dendritic cells by NF-kappaB blockade and Fcgamma receptor modulation. *Methods in molecular biology*. 2011;677:339-53.
89. Llanos C, Carreno LJ, Gutierrez MA, Riedel CA, Jacobelli SH, Kalergis AM. Genetic and pharmacological modulation of dendritic cell-T cell interactions as a therapeutic strategy for systemic lupus erythematosus. *Current gene therapy*. 2011;11(6):544-53.
90. Llanos C, Mackern-Oberti JP, Vega F, Jacobelli SH, Kalergis AM. Tolerogenic dendritic cells as a therapy for treating lupus. *Clinical immunology*. 2013;148(2):237-45.
91. Iruretagoyena MI, Tobar JA, Gonzalez PA, Sepulveda SE, Figueroa CA, Burgos RA, et al. Andrographolide interferes with T cell activation and reduces experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2005;312(1):366-72.
92. Usher MG, Duan SZ, Ivaschenko CY, Frieler RA, Berger S, Schutz G, et al. Myeloid mineralocorticoid receptor controls macrophage polarization and cardiovascular hypertrophy and remodeling in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(9):3350-64.
93. Guzik TJ, Hoch NE, Brown KA, McCann LA, Rahman A, Dikalov S, et al. Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction. *J Exp Med*. 2007;204(10):2449-60.
94. Madhur MS, Lob HE, McCann LA, Iwakura Y, Blinder Y, Guzik TJ, et al. Interleukin 17 promotes angiotensin II-induced hypertension and vascular dysfunction. *Hypertension*. 2010;55(2):500-7.
95. Barhoumi T, Kasal DA, Li MW, Shbat L, Laurant P, Neves MF, et al. T regulatory lymphocytes prevent angiotensin II-induced hypertension and vascular injury. *Hypertension*. 2011;57(3):469-76.
96. Amador CA, Barrientos V, Pena J, Herrada AA, Gonzalez M, Valdes S, et al. Spironolactone Decreases DOCA-Salt-Induced Organ Damage by Blocking the Activation of T Helper 17 and the Downregulation of Regulatory T Lymphocytes. *Hypertension*. 2014.
97. Ndisang JF, Jadhav A, Lane N. Interaction between the heme oxygenase system and aldosterone in hypertension. *The International journal of angiology : official publication of the International College of Angiology, Inc*. 2007;16(3):92-7.
98. Abraham NG, Drummond GS, Lutton JD, Kappas A. The Biological Significance and Physiological Role of Heme Oxygenase. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 1996;6(3):129-68.

99. Tardif V, Riquelme SA, Remy S, Carreno LJ, Cortes CM, Simon T, et al. Carbon monoxide decreases endosome-lysosome fusion and inhibits soluble antigen presentation by dendritic cells to T cells. *European journal of immunology*. 2013;43(11):2832-44.
100. Blancou P, Tardif V, Simon T, Remy S, Carreno L, Kalergis A, et al. Immunoregulatory properties of heme oxygenase-1. *Methods in molecular biology*. 2011;677:247-68.
101. Botros FT, Schwartzman ML, Stier CT, Jr., Goodman AI, Abraham NG. Increase in heme oxygenase-1 levels ameliorates renovascular hypertension. *Kidney international*. 2005;68(6):2745-55.
102. Yim HE, Kim JH, Yoo KH, Bae IS, Hong YS, Lee JW. Spironolactone and enalapril differentially up-regulate the expression of VEGF and heme oxygenase-1 in the neonatal rat kidney. *Pediatric research*. 2011;69(5 Pt 1):378-83.
103. Haseroth K, Gerdes D, Berger S, Feuring M, Gunther A, Herbst C, et al. Rapid nongenomic effects of aldosterone in mineralocorticoid-receptor-knockout mice. *Biochemical and biophysical research communications*. 1999;266(1):257-61.
104. Gros R, Ding Q, Sklar LA, Prossnitz EE, Arterburn JB, Chorazyczewski J, et al. GPR30 expression is required for the mineralocorticoid receptor-independent rapid vascular effects of aldosterone. *Hypertension*. 2011;57(3):442-51.
105. Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*. 2005;307(5715):1625-30.
106. Prossnitz ER, Arterburn JB, Smith HO, Oprea TI, Sklar LA, Hathaway HJ. Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. *Annual review of physiology*. 2008;70:165-90.
107. Hasbi A, O'Dowd BF, George SR. A G protein-coupled receptor for estrogen: the end of the search? *Molecular interventions*. 2005;5(3):158-61.
108. O'Dowd BF, Nguyen T, Marchese A, Cheng R, Lynch KR, Heng HH, et al. Discovery of three novel G-protein-coupled receptor genes. *Genomics*. 1998;47(2):310-3.
109. Ding Q, Gros R, Limbird LE, Chorazyczewski J, Feldman RD. Estradiol-mediated ERK phosphorylation and apoptosis in vascular smooth muscle cells requires GPR 30. *American journal of physiology Cell physiology*. 2009;297(5):C1178-87.
110. Ding J, Song D, Ye X, Liu SF. A pivotal role of endothelial-specific NF-kappaB signaling in the pathogenesis of septic shock and septic vascular dysfunction. *J Immunol*. 2009;183(6):4031-8.
111. Prenzel N, Zwick E, Daub H, Leserer M, Abraham R, Wallasch C, et al. EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature*. 1999;402(6764):884-8.
112. Daub H, Weiss FU, Wallasch C, Ullrich A. Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature*. 1996;379(6565):557-60.

113. Huang S, Zhang A, Ding G, Chen R. Aldosterone-induced mesangial cell proliferation is mediated by EGF receptor transactivation. *American journal of physiology Renal physiology*. 2009;296(6):F1323-33.
114. Batenburg WW, Jansen PM, van den Bogaardt AJ, AH JD. Angiotensin II-aldosterone interaction in human coronary microarteries involves GPR30, EGFR, and endothelial NO synthase. *Cardiovascular research*. 2012;94(1):136-43.
115. Yuan Y, Zhang A, Huang S, Ding G, Chen R. A PPARgamma agonist inhibits aldosterone-induced mesangial cell proliferation by blocking ROS-dependent EGFR intracellular signaling. *American journal of physiology Renal physiology*. 2011;300(2):F393-402.
116. Bueno SM, Gonzalez PA, Carreno LJ, Tobar JA, Mora GC, Pereda CJ, et al. The capacity of Salmonella to survive inside dendritic cells and prevent antigen presentation to T cells is host specific. *Immunology*. 2008;124(4):522-33.
117. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*. 1973;137(5):1142-62.
118. de Castro M, Elliot S, Kino T, Bamberger C, Karl M, Webster E, et al. The non-ligand binding beta-isoform of the human glucocorticoid receptor (hGR beta): tissue levels, mechanism of action, and potential physiologic role. *Molecular medicine*. 1996;2(5):597-607.
119. Oakley RH, Sar M, Cidlowski JA. The human glucocorticoid receptor beta isoform. Expression, biochemical properties, and putative function. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(16):9550-9.
120. Lanzavecchia A. Antigen-specific interaction between T and B cells. *Nature*. 1985;314(6011):537-9.
121. Bouaziz JD, Yanaba K, Venturi GM, Wang Y, Tisch RM, Poe JC, et al. Therapeutic B cell depletion impairs adaptive and autoreactive CD4+ T cell activation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(52):20878-83.
122. Chauveau C, Remy S, Royer PJ, Hill M, Tanguy-Royer S, Hubert FX, et al. Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression. *Blood*. 2005;106(5):1694-702.
123. Braudeau C, Bouchet D, Tesson L, Iyer S, Remy S, Buelow R, et al. Induction of long-term cardiac allograft survival by heme oxygenase-1 gene transfer. *Gene therapy*. 2004;11(8):701-10.
124. Bouche D, Chauveau C, Roussel JC, Mathieu P, Braudeau C, Tesson L, et al. Inhibition of graft arteriosclerosis development in rat aortas following heme oxygenase-1 gene transfer. *Transplant immunology*. 2002;9(2-4):235-8.
125. Herrada AA, Llanos C, Mackern-Oberti JP, Carreno LJ, Henriquez C, Gomez RS, et al. Haem oxygenase 1 expression is altered in monocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Immunology*. 2012;136(4):414-24.

126. Bayry J, Thirion M, Delignat S, Misra N, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, et al. Dendritic cells and autoimmunity. *Autoimmunity reviews*. 2004;3(3):183-7.
127. Comabella M, Montalban X, Munz C, Lunemann JD. Targeting dendritic cells to treat multiple sclerosis. *Nature reviews Neurology*. 2010;6(9):499-507.
128. Khan S, Greenberg JD, Bhardwaj N. Dendritic cells as targets for therapy in rheumatoid arthritis. *Nature reviews Rheumatology*. 2009;5(10):566-71.
129. Hardin JA. Dendritic cells: potential triggers of autoimmunity and targets for therapy. *Annals of the rheumatic diseases*. 2005;64 Suppl 4:iv86-90.
130. Petersen, Toldbod, Holtz, Hokland, Bolund, Agger. Strain-Specific Variations in the Development of Dendritic Cells in Murine Bone-Marrow Cultures. *Scandinavian journal of immunology*. 2000;51(6):586-94.
131. Ji TH, Grossmann M, Ji I. G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(28):17299-302.
132. Christ M, Gunther A, Heck M, Schmidt BM, Falkenstein E, Wehling M. Aldosterone, not estradiol, is the physiological agonist for rapid increases in cAMP in vascular smooth muscle cells. *Circulation*. 1999;99(11):1485-91.
133. Demoly P, Jaffuel D, Mathieu M, Sahla H, Godard P, Michel FB, et al. Glucocorticoid insensitive asthma: a one year clinical follow up pilot study. *Thorax*. 1998;53(12):1063-5.
134. Hecht K, Carlstedt-Duke J, Stierna P, Gustafsson J, Bronnegard M, Wikstrom AC. Evidence that the beta-isoform of the human glucocorticoid receptor does not act as a physiologically significant repressor. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(42):26659-64.
135. Leung DY, Hamid Q, Vottero A, Szefer SJ, Surs W, Minshall E, et al. Association of glucocorticoid insensitivity with increased expression of glucocorticoid receptor beta. *J Exp Med*. 1997;186(9):1567-74.
136. Honda M, Oritani F, Ayabe T, Imai S, Ashida T, Obara T, et al. Expression of glucocorticoid receptor beta in lymphocytes of patients with glucocorticoid-resistant ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 2000;118(5):859-66.
137. Sousa AR, Lane SJ, Cidrowski JA, Staynov DZ, Lee TH. Glucocorticoid resistance in asthma is associated with elevated in vivo expression of the glucocorticoid receptor beta-isoform. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2000;105(5):943-50.
138. Webster JC, Oakley RH, Jewell CM, Cidrowski JA. Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative beta isoform: a mechanism for the generation of glucocorticoid resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(12):6865-70.
139. Hauk PJ, Hamid QA, Chrousos GP, Leung DY. Induction of corticosteroid insensitivity in human PBMCs by microbial superantigens. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2000;105(4):782-7.

140. Sher ER, Leung DY, Surs W, Kam JC, Zieg G, Kamada AK, et al. Steroid-resistant asthma. Cellular mechanisms contributing to inadequate response to glucocorticoid therapy. *The Journal of clinical investigation*. 1994;93(1):33-9.
141. Leung DY, Martin RJ, Szefer SJ, Sher ER, Ying S, Kay AB, et al. Dysregulation of interleukin 4, interleukin 5, and interferon gamma gene expression in steroid-resistant asthma. *J Exp Med*. 1995;181(1):33-40.
142. Hill-Kapturczak N, Chang SH, Agarwal A. Heme oxygenase and the kidney. *DNA and cell biology*. 2002;21(4):307-21.
143. Chauveau C, Bouchet D, Roussel JC, Mathieu P, Braudeau C, Renaudin K, et al. Gene transfer of heme oxygenase-1 and carbon monoxide delivery inhibit chronic rejection. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2002;2(7):581-92.
144. Remy S, Blancou P, Tesson L, Tardif V, Brion R, Royer PJ, et al. Carbon monoxide inhibits TLR-induced dendritic cell immunogenicity. *J Immunol*. 2009;182(4):1877-84.
145. HERRADA AA, Kalergis AM. Uso de una composición en base a espirolactona, que presenta una acción inhibitoria de la activación de linfocitos t útil para prevenir y/o tratar esclerosis múltiple. *Google Patents*; 2012.
146. Schuurhuis DH, Laban S, Toes RE, Ricciardi-Castagnoli P, Kleijmeer MJ, van der Voort EI, et al. Immature dendritic cells acquire CD8(+) cytotoxic T lymphocyte priming capacity upon activation by T helper cell-independent or -dependent stimuli. *J Exp Med*. 2000;192(1):145-50.
147. Gimmi CD, Freeman GJ, Gribben JG, Gray G, Nadler LM. Human T-cell clonal anergy is induced by antigen presentation in the absence of B7 costimulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(14):6586-90.
148. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol*. 1997;9(1):4-9.