



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**“Hormonas esteroideas, dimorfismo sexual y polarización de
la respuesta inmune”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

MARCO ANTONIO DE LEÓN NAVA

TUTOR

DR. JORGE MORALES MONTOR

MEXICO, D.F.

AGOSTO DE 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Índice

Resumen	2
Abstract	4
Introducción	5
<i>Reproducción, selección y origen del dimorfismo sexual</i>	5
<i>Dimorfismo sexual de la respuesta inmune</i>	6
<i>Interacción entre el sistema endocrino y el sistema inmune</i>	9
<i>Dicotomía Th1/Th2</i>	11
<i>Acción de los esteroides sexuales en el sistema inmunológico</i>	12
<i>Estrógenos</i>	12
<i>Progestágenos</i>	14
<i>Andrógenos</i>	15
<i>Mecanismos de acción de los esteroides sexuales en inmunocitos</i>	17
Justificación	21
Hipótesis	22
Objetivos	23
Material y metodología	24
<i>Ratones y procesos quirúrgicos</i>	24
<i>Extracción de ARN</i>	24
<i>Retrotranscripción–Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)</i>	25
<i>Análisis densitométrico</i>	26
<i>Cultivo y activación de células</i>	27
<i>Citometría de flujo de células de bazo y de receptores de esteroides</i>	28
<i>Diseño experimental y análisis estadístico</i>	28
Resultados	30
<i>Dimorfismo sexual de la expresión de citocinas en bazo</i>	30
<i>Efecto de los esteroides sexuales en la expresión de citocinas en células de bazo</i>	32
<i>Efecto de los esteroides sexuales en la proliferación de linfocitos</i>	34
<i>Dimorfismo sexual de las poblaciones celulares de bazo</i>	36
<i>Expresión de receptores de esteroides sexuales en bazo</i>	38
<i>Análisis de receptores de esteroides en distintas células de bazo</i>	40
Discusión	42
Conclusiones	50
Bibliografía	52
Apéndice	59

Resumen

El dimorfismo sexual en los mamíferos se refleja en las características anatómicas, fisiológicas y conductuales de cada sexo. Esta diferencia es resultado de un proceso evolutivo que se derivó de la reproducción sexual. En algunas especies se hizo más complejo y pronunciado gracias a la selección sexual. La divergencia en hembras y machos requiere a su vez de estructuras y células reproductoras especiales, además de mecanismos de control hormonales junto con la comunicación e interacción entre el sistema neuroendocrino y el sistema inmunológico. De toda la gama de hormonas que integran esta red de interacciones inmuno-endocrinas, se sabe que las hormonas esteroideas tienen una gran diversidad de efectos sobre la función de las células del sistema inmune. Dentro de estas funciones se encuentran dos que son relevantes para una respuesta inmune efectiva contra diversos agentes patógenos: la proliferación de linfocitos y la secreción de citocinas. El patrón de producción de estas moléculas determina el tipo de respuesta inmune que confrontará un antígeno mientras que la proliferación de linfocitos indica la magnitud de la misma. Existen muchos factores inmunológicos que afectan dichas funciones pero se sabe poco sobre el efecto de otros protagonistas fisiológicos. Aunque el género es un factor que determina el patrón de producción de citocinas, aún no se conoce con detalle el papel de los esteroides sexuales en la proliferación de linfocitos y en la producción de citocinas. Los objetivos de este trabajo fueron: [1] explorar las diferencias en la expresión de citocinas Th1/Th2 y de receptores de esteroides sexuales en el bazo de ratones de ambos sexos intactos y gonadectomizados; [2] evaluar el efecto de los esteroides sexuales estradiol (E2), progesterona (P4) y testosterona (Te) en la proliferación de linfocitos; y [3] determinar en ambos sexos el porcentaje de algunas células inmunes en el bazo. La metodología utilizada combinó citometría de flujo, RT-PCR, cultivo y proliferación celular. Los resultados indican que existe una expresión dimórfica de Interferón- γ e Interleucina-4 que es afectada por la gonadectomía. Las células más abundantes en el bazo fueron los linfocitos T CD4+ y los linfocitos B, sin embargo, no hubo un patrón asociado al sexo y la gonadectomía no tuvo efecto. Con respecto a la proliferación de linfocitos, el E2 la inhibe tanto en células de macho (19.51 %) como de hembra (24.62%); la P4 es capaz de disminuirla más del 22 % en células de hembra y no tiene efecto en células de macho. En la búsqueda del ARNm de los diferentes receptores de esteroides encontramos que todas las células de bazo analizadas expresan dichos receptores. Sin embargo, el análisis mediante citometría de flujo confirmó que sólo la expresión del receptor de progesterona está asociada al sexo. Estas evidencias indican que los esteroides sexuales son capaces de afectar la magnitud de la respuesta inmune de manera dimórfica y

que, junto con las citocinas, pueden formar un lenguaje químico común efectivo para mantener el balance entre la red inmunoendocrina. Alteraciones en esta delicada red pueden explicar diferentes patologías donde existen diferencias asociadas al sexo y donde los esteroides sexuales son factores clave.

Abstract

Cytokine secretion and lymphocyte proliferation are crucial aspects in immune system modulation. The secretion pattern of these molecules determines the immune response type that will confront a particular antigen, and this pattern can be at least Th1 or Th2 types. There are many immunological factors that affect expression of these proteins and autoregulate the Th1/Th2 balance, but there are few evidences about effect of other protagonists of mammals physiology. This work focuses on the regulation of the Th1/Th2 cytokine secretion pattern of immune cells by sexual steroids and on the effect of these hormones on lymphocyte proliferation. The aims of this study were [1] to explore the differences in the expression of Th1/Th2 cytokines and of steroid receptors in spleen of intact and gonadectomized mice of both sexes; [2] to evaluate the effect of estradiol (E2), progesterone (P4) and testosterone (T) on cytokine production and lymphocyte proliferation, and [3] to determine the percentage of splenic subpopulations in both sexes. Results indicated dimorphic expression of Interferon- γ and Interleukin-4, wich was affected by gonadectomy (GX). CD4⁺ T lymphocytes were the most frequent type of cell in the spleen, followed by CD19⁺ cells. There was no dimorphic pattern of cell subtypes, and GX had no effect. Regarding lymphocyte proliferation, E2 inhibited both male (19.51%) and female (24.62 %) cells; P4 diminished lymphocyte proliferation by 22 % in female cells and had no effect on male cells. Sex steroid receptor mRNA was highly expressed in all splenocytes, and that this expression was dimorphic. This dimorphic pattern was, however, only seen in lymphocytes. Present evidence indicates that sex steroids are capable of affecting crucial immune system functions dimorphically and that cytokines and steroids form a common chemical language effective to keep the balance between immune and endocrine systems.

Introducción

Reproducción, selección y origen del dimorfismo sexual

Los cambios que surgieron entre cada generación de los primeros organismos sobre la Tierra fueron fundamentales para generar la diversidad de especies que, con el paso del tiempo, conquistarían la mayor parte de los climas y habitarían buena parte de la superficie del planeta. Un suceso clave en el éxito de esa nueva forma de organización de la materia fue la aparición de la reproducción sexual. Este tipo de reproducción se originó hace aproximadamente dos mil millones de años [Zimmer, 2009] y representó un hito para la evolución de los seres vivos ya que la vasta mayoría se reproduce sexualmente en algún grado y durante alguna fase de su historia vital. Un aspecto importante de la reproducción sexual es que cada nuevo individuo se forma a partir de dos gametos de dos individuos, en vez de ser una copia de un solo individuo; sus ventajas radican principalmente en que permite un grado considerable de variación que se manifiesta en las características de la descendencia [Burt, 2000]. Esta variación proviene principalmente de la meiosis y la fertilización. La reproducción sexual también trajo consigo la formación, dentro de la misma especie, de dos sexos con diferentes funciones y atributos: hembra y macho. Esta separación requiere a su vez de estructuras y células reproductoras especiales, mecanismos de control hormonales y neurales, y formas de comportamiento.

Hace alrededor de 150 años, dos teorías, ambas propuestas por Charles Darwin, explicaban la diversidad y complejidad de la vida en la Tierra y las diferencias observadas entre los sexos de una sola especie. La primera teoría explica la manera en que se produce la diversidad y la especiación. Afirma que en la diversidad de las especies aquellas variaciones que favorecen la supervivencia son preservadas en las generaciones sucesivas. Esta teoría se denomina Selección Natural. La segunda teoría es, de alguna manera, un refinamiento de la primera y explica las diferencias entre los sexos de una especie que no pueden ser explicadas por la selección natural. Esta teoría se denomina Selección Sexual. Darwin lo expresó así:

“Este proceso hace posible que los dos sexos se modifiquen, mediante selección natural, en relación con sus diferentes hábitos de vida o que un sexo se modifique con relación al otro. La selección sexual depende, no de una lucha por la existencia entre los diferentes organismos, sino de una lucha entre los individuos de un sexo, generalmente los machos, por la posesión del otro sexo. El resultado no es la muerte del competidor desafortunado, sino del que deja poca o ninguna descendencia” [Darwin, 1859].

Así, una de las consecuencias más importantes de la selección sexual es que produce un dimorfismo sexual en la especie, es decir, genera la diferenciación anatómica, fisiológica, conductual y morfológica entre los individuos de cada sexo porque en uno de los sexos evolucionan rasgos que no son necesarios para los miembros del otro. Esta distinción además se refleja en la forma corporal, el tamaño y la estructura de las características sexuales secundarias, en los patrones de desarrollo, en las estrategias reproductivas y en el fondo genético [Behringer *et al.* 2006].

El dimorfismo sexual se encuentra ampliamente distribuido en el reino animal, alcanzando mayor complejidad en los mamíferos. Las diferencias entre hembras y machos son muy aparentes una vez que aparece la maduración sexual pero suelen ser sutiles en el momento del nacimiento, esta divergencia tiene su origen en la diferenciación sexual. Este proceso secuencial inicia en la fertilización con el establecimiento del sexo cromosómico, continúa con la determinación del sexo gonadal y culmina en el desarrollo de las características sexuales secundarias que incluye los fenotipos de hembra y macho [Jost *et al.* 1973].

Dimorfismo sexual de la respuesta inmune

La determinación del genotipo sexual en la concepción, seguida por el desarrollo fisiológico y endocrinológico, provocan múltiples diferencias entre machos y hembras en las especies sexualmente dimórficas. Empezando desde la infancia y a lo largo de la edad reproductiva, se

presentan diferencias basadas en la producción, secreción y concentraciones circulantes de estrógenos, progesterona y testosterona. La base de estas diferencias se encuentra principalmente en la función y desarrollo del eje hipotálamo-pituitaria-gónadas (HPG) [Morales-Montor *et al.* 2004; Grossman *et al.* 1991]. Las interacciones entre las hormonas producidas por el eje HPG y otras hormonas, además de productos de genes independientes del sexo, producen un fenotipo de macho o de hembra. Aunque existe una gran variación entre individuos, el fenotipo de hembra se caracteriza típicamente por elevaciones cíclicas de estrógenos y progesterona y bajos niveles de andrógenos. En contraste, el fenotipo hormonal de macho se caracteriza por bajos niveles tanto de estrógenos como de progesterona y altos niveles de andrógenos [Wilson & Foster, 1998].

Una diferencia en los niveles de esteroides sexuales entre un sexo y otro podría afectar diferencialmente la respuesta inmune de uno u otro sexo al mismo estímulo antigénico o determinar funciones inmunológicas diferentes entre hembras y machos. Aunque fue en 1979 [Grossman *et al.*] cuando se publicaron los primeros reportes describiendo la presencia de receptores de esteroides sexuales en timo, la primera observación que evidenció una conexión entre el sistema inmune y el endocrino fue hecha por el científico italiano Calzolari en 1898, cuando publicó que el timo de conejos castrados antes de la madurez sexual era más grande que el de los animales controles. Sin embargo, esta observación despertó poco interés y pasó casi inadvertida. En 1940, Chiodi hizo una observación similar con respecto a los efectos de la castración sobre el peso del timo. La observación adicional de que el reemplazo de los andrógenos revirtió la hipertrofia tímica inducida por la castración, sugirió fuertemente que estos esteroides sexuales fueron los mediadores de este efecto.

Posteriormente, el dimorfismo inmunológico se demostró con la observación de que las hembras de diferentes especies producen niveles más altos de inmunoglobulinas circulantes, y típicamente presentan una respuesta inmune de tipo humoral más pronunciada en contra de la infección. La producción de una variedad de anticuerpos autorreactivos

también es más frecuente en las hembras. Se ha comprobado que los estrógenos incrementan la respuesta de células B tanto *in vivo* como *in vitro*, mientras los andrógenos y la progesterona disminuyen la producción de anticuerpos. Las hormonas sexuales, además, modulan una gran cantidad de fenómenos implicados en la respuesta inmune, incluyendo la maduración y selección de timocitos, el tránsito celular, la proliferación de linfocitos, la expresión de moléculas y receptores del complejo mayor de histocompatibilidad clase II y la producción de citocinas. De acuerdo con estas observaciones, se sugiere que los estrógenos potencian la inmunidad mediada por células B y suprimen algunos aspectos dependientes de células T. La testosterona parece suprimir tanto la respuesta mediada por células T como la mediada por células B [Grossman, 1989; Bebo *et al.* 1999; Da Silva, 1999; Olsen & Kovacs, 2001].

Evidencias que apoyan este efecto de los esteroides sexuales sobre fenómenos específicos, son varias. Por ejemplo, las observaciones clínicas y epidemiológicas de que las enfermedades autoinmunes son más comunes en mujeres que en hombres y que son más frecuentes durante la edad reproductiva de las mujeres sugieren que estas hormonas son factores claves en determinar estas diferencias. De acuerdo con datos proporcionados por los sistemas de salud de varios países, se sabe que más del 75% de las personas que padecen una enfermedad autoinmune son mujeres y que existen casos extremos, específicamente el lupus eritematoso sistémico, en que de cada 10 pacientes, 9 son mujeres [Cooper, 2003] (Tabla 1).

Tabla 1. Incidencia de algunas enfermedades autoinmunes en pacientes del sexo femenino.

Enfermedad Autoinmune	Incidencia en mujeres (%)
Esclerosis múltiple	64
Anemia perniciosa	66
Artritis reumatoide	74
Tiroiditis de Hashimoto	85
Lupus eritematoso sistémico	90
Enfermedad de Addison	92
Síndrome de Sjogren	93

Otro aspecto en que se han observado diferencias asociadas al sexo es durante diversas enfermedades infecciosas. Estas incluyen dimorfismo sexual inmunitario o dimorfismo sexual asociado a parámetros de la infección [Morales-Montor *et al.* 2004; Zuk & McKean, 1996]. También abarca distintos parásitos y hospederos (Tabla 2). Estas diferencias asociadas al sexo sugieren un papel importante de los esteroides sexuales como moduladores del sistema inmune. De los diversos aspectos moleculares que regulan a este sistema, aún no ha sido explorado con detalle el efecto que tienen los esteroides sexuales en la producción de citocinas.

Tabla 2. Dimorfismo sexual de la infección o dimorfismo sexual inmune en diferentes relaciones hospedero-parásito.

Parásito	Hospedero	Dimorfismo	Prevalencia	Intensidad
<i>Brugia Malawi</i>	Humano	Si	♀ < ♂	♀ < ♂
<i>Leishmania donovani</i>	Ratón	Si	♀ < ♂	♀ < ♂
<i>Leishmania major</i>	Ratón	Si	♀ < ♂	♀ < ♂
<i>Leishmania mexicana</i>	Ratón	Si	♀ < ♂	♀ < ♂
<i>Plasmodium chabaudi</i>	Ratón	Si	♀ < ♂	♀ < ♂
<i>Schistosoma mansoni</i>	Humano	Si	♀ < ♂	♀ < ♂
<i>Taenia crassiceps</i>	Ratón	Si	♀ > ♂	♀ > ♂
<i>Toxoplasma gondii</i>	Ratón	Si	♀ > ♂	♀ > ♂
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Ratón	Si	♀ < ♂	♀ < ♂

Interacción entre el sistema endocrino y el sistema inmune

El sistema inmune de los mamíferos tiene la extraordinaria capacidad de distinguir entre lo propio y lo ajeno del organismo, ha evolucionado para proveer mecanismos flexibles y dinámicos capaces de enfrentar y eliminar específicamente una gran variedad de agentes patógenos. Para llevar a cabo estas acciones, posee un repertorio de células altamente especializadas que llevan a cabo distintas funciones con precisión y eficacia. Estas células son finamente reguladas por moléculas secretadas por los componentes propios del sistema inmune, pero también son susceptibles a la regulación por parte de moléculas aparentemente

lejanas de lo inmunológico. Originalmente se creía que este sistema era autorregulado en un grado considerable, sin embargo, cada vez es más claro que, junto con el sistema neuroendocrino, ambos sistemas forman una interconexión directa y bidireccional [Besedovsky & Del Rey, 1996; Bilbo & Klein, 2012]. Así pues, los sistemas fisiológicos que integran a los organismos complejos interactúan entre sí formando redes de mutuo control, que favorecen el cumplimiento correcto de sus funciones específicas y las más generales del organismo entero.

La respuesta inmunológica, como una respuesta homeostática bajo control fisiológico, contribuye al mantenimiento de la integridad de las células corporales y de los tejidos [Papadimitriou & Priftis, 2009]. Estas funciones las lleva a cabo no sólo mediante las moléculas específicas del sistema, sino también mediante las hormonas que están presentes en el micro-ambiente de las células inmunológicas que pueden restringir su autonomía, probablemente por su acción sobre sus receptores específicos. La comunicación inmunoendocrina eficiente, implica entonces, la existencia de vías aferentes y eferentes que constituyen un sistema de retroalimentación. Cuando se producen alteraciones en esta red, se desencadenan patologías que involucran a los diferentes componentes de la misma.

Al igual que otras células corporales, las células del sistema inmunológico son afectadas por el sistema endocrino, particularmente porque la respuesta inmunológica es, tal vez, el único fenómeno fisiológico en el cual la amplificación de su respuesta está basada en la proliferación celular y la transformación específica de sus componentes. Este proceso requiere, a su vez, de cambios metabólicos y factores de crecimiento que hacen a esta respuesta particularmente dependiente del control endocrino [Chikanza & Grossman, 2000].

Las interacciones inmunoendocrinas involucran un alto grado de evolución y comunicación bioquímica. Los esteroides sexuales figuran de manera prominente en estas interacciones. Además de los diferentes factores inmunes implicados en la regulación de la red inmunoendocrina, el género podría ser un factor importante en determinar el patrón de

secreción de moléculas claves de la respuesta inmunológica, como las citocinas [Girón-González *et al.* 2000]. Lo anterior sugiere que los esteroides sexuales pueden ser los responsables de estas diferencias entre género.

Dicotomía Th1/Th2

Una población particular de células T, los linfocitos T colaboradores (Th) CD4+, es la encargada de orquestar una respuesta inmune apropiada contra un reto antigénico particular mediante la polarización de la respuesta inmune. Las dos principales subclases de células T colaboradoras, designadas como Th1 y Th2, poseen diferentes patrones de producción de citocinas y, como consecuencia, juegan diferentes papeles durante la respuesta inmune. Estas subclases se describieron originalmente con base en el patrón de producción de citocinas por parte de células T de ratón [Mosmann *et al.* 1986] pero el concepto también ha encontrado aplicación en células humanas [Abbas *et al.* 1996; Lucey *et al.* 1996; Mossmann & Sad, 1996]. Las células Th1 secretan principalmente interleucina (IL)-2 e interferón (IFN)- γ , mientras que las células Th2 se caracterizan por la secreción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13. Cada subclase coordina una serie de funciones inmunes coordinadas para controlar a algunos patógenos y padecimientos en particular, pero puede ser inefectiva, o hasta patológica, en respuesta a otros tipos de retos inmunológicos [Mosmann & Coffman, 1989].

Esta diversidad funcional en el sistema inmune ha sido propuesta para explicar una gama de fenómenos patológicos [Romagnani, 2004; D'Ambrosio *et al.* 2000] que incluyen la infección, la alergia y la autoinmunidad [Jancovich *et al.* 2001; Kidd, 2003]. Además, el paradigma se ha extendido a las distintas poblaciones de células del sistema inmune: linfocitos T citotóxicos [Sad *et al.* 1995], linfocitos B [Amel_Kashipaz *et al.* 2003], células dendríticas [Moser & Murphy, 2000], macrófagos [Mantovani *et al.* 2002], células NK [Cooper *et al.* 2001] y células T reguladoras. Estas últimas células tienen distintas funciones efectoras durante la respuesta inmune, es cada vez más grande el número de trabajos que les

atribuyen acciones clave para suprimir una respuesta inmune contra antígenos propios, previniendo enfermedades autoinmunes; también existen evidencias de que controlan respuestas inmunes contra bacterias, virus, parásitos y hongos. La remoción o reducción de esta población celular puede provocar el desarrollo espontáneo de varias enfermedades autoinmunes y puede potenciar la respuesta inmune contra diversos agentes patógenos. A pesar de la importancia biológica de estas células, no escapan a la regulación por parte de los esteroides sexuales. Se ha descubierto ya que el estradiol contribuye al incremento del número de estas células [Polanczy *et al.* 2004; Prieto & Rosenstein, 2006], sugiriendo que podría jugar un papel clave en la supresión de una respuesta inmune exacerbada.

Acción de los esteroides sexuales en el sistema inmunológico

Estrógenos

Los estrógenos son producidos principalmente en el ovario y, de las distintas formas que existen, el 17- β -estradiol (E2) es la forma circulante más común. Dentro de la gran cantidad de acciones que pueden ejercer, una que podría ser importante en la modulación de la inmunidad y la autoinmunidad [Lahita *et al.* 1979]. Uno de los mecanismos por medio de los cuales podría hacerlo es por la regulación de la secreción de citocinas. En un estudio en ratones hembras gonadectomizadas, la administración de estradiol promovió una fuerte respuesta de células Th1, medida por la cantidad de células productoras de IFN- γ [Maret *et al.* 2003]. En estudios que implican procesos inflamatorios dependientes de células T, se encontró que los estrógenos regulan, y no sólo reducen, el número de células en el sitio de inflamación además de que disminuyen la expresión de marcadores de activación como CD40, CD44, CD69 y el receptor de IL-2 [Salem *et al.* 2000a]. Además, los niveles de expresión de IL-2 e IFN- γ disminuyeron y los de IL-4 e IL-10 aumentaron [Salem *et al.* 2000b]. En otros trabajos también se ha mostrado que los estrógenos inducen un incremento en la producción de citocinas Th2 como la IL-5, y la disminución de citocinas Th1 como la

IL-2 [Ahmed *et al.* 1996]. Estudios adicionales han sugerido que, bajo ciertas circunstancias, los estrógenos podrían favorecer una respuesta tipo Th1. A nivel molecular se ha descubierto que la región promotora del gen del IFN- γ tiene un elemento de respuesta a estrógenos y se ha encontrado un incremento en los transcritos de este gen en linfocitos estimuladas con estrógenos [Fox *et al.* 1991]. En general, los estrógenos parecen tener una acción dual sobre la polarización de la respuesta inmune que depende de la concentración del esteroide. Algunos estudios sugieren que el estradiol puede potenciar tanto la producción de citocinas Th1 (IFN- γ) como de citocinas Th2 (IL-10). En estos estudios, altas concentraciones de estradiol (>5000 pg ml⁻¹) estimulan la secreción de IL-10 por parte de clonas de células T, mientras bajas concentraciones estimulan la secreción de IFN- γ . Estas observaciones también demostraron que el estradiol tiene un efecto bifásico en la secreción de TNF- α , potenciando su producción a bajas concentraciones y disminuyéndola a altas dosis [Gilmore *et al.* 1997; Correale *et al.* 1998] (Figura 1). Este efecto dual del estradiol también se ha observado durante enfermedades inflamatorias crónicas. Los efectos de esta hormona pueden ser pro o anti-inflamatorios si la concentración es baja o alta, respectivamente [Cutolo, 2004] (Tabla 3).

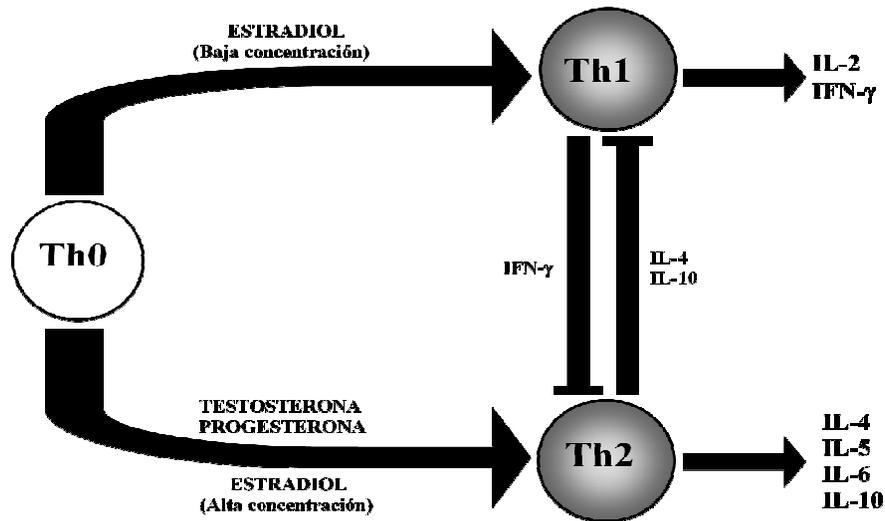


Figura 1. Las citocinas producidas por las poblaciones de linfocitos Th1 y Th2 determinan sus funciones efectoras o inhibitoras. En la diferenciación hacia las vías Th1 y Th2 cada una controla un tipo único de respuesta inmune e incrementa el desarrollo de células de la misma subclase. Los esteroides sexuales inducen el desarrollo de una subclase e inhiben el desarrollo de la otra. El estradiol parece tener un efecto dual dependiente de la concentración. La progesterona y la testosterona en general favorecen la expresión de las células Th2, lo que podría explicar su acción inmunosupresora durante diversas patologías.

Progestágenos

Uno de los progestágenos más importantes es la progesterona (P4), que es una hormona clave en el establecimiento y mantenimiento del embarazo. Se sabe que este esteroide contribuye, mediante diversas acciones, en la supresión de la inmunidad materna contra el feto. Una de estas acciones se da mediante la modulación de la secreción de citocinas Th1/Th2 [Piccini, 2002] y la inhibición directa de la expansión de células Th1 mientras que potencian el desarrollo de las células Th2 [Miyaura & Iwata, 2002]. Este efecto lo determinaron mediante la detección de células productoras de IL-10. También se ha comprobado que la progesterona induce la secreción de IL-4 e IL-5 [Piccini *et al.* 2000a]. El consenso general es que la progesterona tiene efectos anti-inflamatorios, inhibiendo el desarrollo de células tipo Th1 mientras promueve la respuesta tipo Th2 [Piccini *et al.* 2000b]. Así, un cambio hacia el patrón Th2 (IL-4, IL-5, IL-6) podría beneficiar al feto, mientras el desarrollo de células Th1 (IL-2, IFN- γ y TNF- α) podría ser dañino [Ragusa *et al.* 2004]. Otra evidencia que indica que la progesterona tiene influencia en la polarización de la respuesta inmune, es por las alteraciones

en la secreción de citocinas durante la fase lútea del ciclo menstrual. Durante esta fase del ciclo menstrual de mujeres regulares la respuesta inmune se inclina hacia una respuesta tipo Th2, reflejada como un incremento en la producción de IL-4 [Faas *et al.* 2000]; estos resultados sugieren que el incremento en las concentraciones de progesterona y estradiol durante la fase lútea del ciclo menstrual juega un papel en la desviación de la respuesta inmune hacia una respuesta tipo Th2. Existe también una relación entre la producción de citocinas y la de hormonas sexuales en mujeres que padecen alguna enfermedad autoinmune. Tal es el caso del lupus eritematoso sistémico; se ha descubierto que estas pacientes presentan altos niveles séricos de estradiol y progesterona, mientras que el número de células que secretan IFN- γ está reducido significativamente [Verthelyi *et al.* 2001] (Tabla 3).

Andrógenos

La testosterona (Te) y la dihidrotestosterona (DHT) son los dos andrógenos sexuales biológicamente más importantes. La testosterona a concentraciones fisiológicas actúa sobre los macrófagos, inhibiendo la producción de IL-1, IL-6 y TNF- α . En líneas celulares de macrófagos de ratón, la testosterona induce la síntesis de IL-10 y tiene efectos anti-inflamatorios mediante la inhibición de TNF- α , mientras que el estradiol incrementa la producción de TNF- α y disminuye la síntesis de IL-10 en cultivos estimulados con lipopolisacarido (LPS) [D'Agostino *et al.* 1999]. En otro trabajo con monocitos, se observó que la testosterona, a concentraciones fisiológicas, es capaz de incrementar el porcentaje de células productoras de IL-1 β e IL-12 [Posma *et al.* 2004]. El efecto de la testosterona sobre la producción de IL-10 también se ha observado en linfocitos T CD4+ de ratón, mediado por el receptor de andrógenos [Liva & Voskuhl, 2001]. Aunque se ha observado que la testosterona no tiene efecto en la producción de IFN- γ en leucocitos humanos [Le *et al.* 1988], recientemente se descubrió que, en el bazo de ratones, este esteroide incrementa la expresión

del gen del IFN- γ y de genes regulados por esta citocina [Wunderlich *et al.* 2005]. En contraste, en otro trabajo con ratones se encontró que este andrógeno disminuye la secreción de IFN- γ y de TNF- α [Matejuk *et al.* 2005]. Este aparente efecto dual de la testosterona en la producción de IFN- γ se observó en células mononucleares de sangre periférica de conejos machos; de acuerdo con este estudio, la acción del esteroide en la producción de IFN- γ depende de factores inherentes al animal, como el comportamiento y el estatus hormonal, como a factores estacionales; es decir, después del tratamiento con testosterona la producción de IFN- γ disminuye si es primavera pero se incrementa si es otoño. Estos efectos se asocian también al rango social y a otros aspectos endocrinos del animal [Mussettola *et al.* 2003]. Otras evidencias indican que, en pacientes con deficiencias en la producción de andrógenos, la falta de acción de la testosterona puede afectar el balance de citocinas; esto provoca que tanto la inmunidad celular como la inmunidad humoral sean activadas y, en ciertos casos, provoquen el desarrollo de enfermedades autoinmunes [Yesilova *et al.* 2000].

Por otra parte, es común que se confundan los efectos de la testosterona y la DHT y pocas veces se discriminan las acciones de ambas hormonas. Sin embargo, existen trabajos en que se demuestra la acción directa de la DHT en células T de ratón. En uno de estos trabajos se encontró que la exposición directa de linfocitos T de ratón a DHT *in vitro* redujo la producción de IL-4, IL-5 e IFN- γ después de la activación con anti-CD3, sin que esto tuviera efecto en la producción de IL-2 [Araneo *et al.* 1991]. Una reducción de IL-4 e IL-5 provocada por la DHT también se detectó en otro trabajo con células de ratón [Moynihan *et al.* 1998]. Además de reducir la producción de IFN- γ , también se ha encontrado que en células de bazo de ratones castrados la DHT disminuye la producción de IL-2 y promueve la liberación de IL-10, lo que sugiere que este andrógeno es capaz de regular negativamente, directa e indirectamente, a través de la liberación de IL-10, la respuesta tipo Th1 [Angele *et al.* 2001].

A pesar de que los andrógenos tienen efecto en la secreción de citocinas es difícil afirmar que son capaces de polarizar la respuesta inmune hacia una respuesta tipo Th1 o tipo Th2. Como se ha comprobado mediante las observaciones al respecto, los andrógenos pueden afectar al mismo tiempo la secreción de citocinas tanto del tipo 1 como del tipo 2 y este efecto puede ser dependiente de la concentración de los andrógenos así como del estatus hormonal del individuo (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto de los esteroides sexuales sobre células del sistema inmune.

Hormona	Fuente	Blanco	Efecto principal
Estradiol	Ovario	Células B	Activador policlonal de células B, promueve la diferenciación a células plasmáticas, ↓ la masa del timo y médula ósea, ↑ las células secretoras de IL-10 e IL-6, ↓ la producción de IFN- γ e IL-2, regula negativamente la actividad de células NK, ↑ la fagocitosis por macrófagos, ↑ la liberación de serotonina e histamina.
	Testículos	Mastocitos	
	Glándulas Adrenales	Células Th1 y Th2	
	Neuronas	Macrófagos	
		Células NK	
	Eosinófilos		
Testosterona	Testículos	Células B	↓ la respuesta de B a mitógenos, ↓ la secreción de serotonina e histamina por mastocitos, ↓ la producción de IL-1, IL-6 y TNF- α .
	Ovario	Células T	
	Neuronas	Macrófagos	
DHT	Testículos	Células T	↓ la producción de IL-1, IL-5 e IFN- γ
	Ovario		
	Neuronas		
Progesterona	Testículos	Células T	↓ la actividad citotóxica de NKs, ↑ la secreción de TNF- α , ↓ la secreción de citocinas y la producción de NO por macrófagos
	Ovario	Células B	
	Neuronas	Células NK	

↑: incrementa. ↓: suprime.

Mecanismos de acción de los esteroides sexuales en células del sistema inmune

La secreción de citocinas provocada por el efecto directo de los esteroides sexuales en células del sistema inmune puede darse mediante distintas vías. Los posibles mecanismos de acción de los esteroides en el sistema inmune incluyen, como en cualquier tejido endocrino clásico, la acción por vía genómica o por vía no genómica [Falkenstein *et al.* 2000; Losel & Welhling, 2003]. De acuerdo a la teoría de acción genómica, los esteroides se unen a receptores

específicos presentes en el citoplasma o el núcleo y funcionan como factores de transcripción. Además de la acción genómica, existen evidencias de que los esteroides pueden actuar mediante efectos rápidos no genómicos y que la transmisión de estos efectos se debe a la presencia de receptores específicos de membrana [Wendler *et al.* 2010]. Así, los efectos no genómicos sobre la función celular implican las convencionales cascadas de segundos mensajeros (Figura 2). Si bien estos mecanismos de acción han sido descritos en órganos del sistema endocrino, se han acumulado evidencias de que estas acciones también pueden operar en el sistema inmune. Para que estas hormonas puedan ejercer un efecto sobre las células del sistema inmune, se requiere la presencia de receptores de hormonas en dichas células. Aunque existen evidencias de que las hormonas esteroides ejercen sus efectos en parte también mediante mecanismos no genómicos, actuando sobre receptores de superficie celular y desencadenando cascadas de señalización, actualmente se acepta que la ruta principal de actividad biológica se lleva a cabo mediante receptores nucleares (NR) específicos, los cuales funcionan como factores de transcripción y coordinan, después de la unión con su ligando, la expresión de genes blanco. Los siguientes NR son mediadores de estos efectos: receptores de estrógenos (ER), ER α y ER β , cada uno codificado por un gen individual, su ligando predominante es el 17 β -estradiol (E2); receptor de progesterona (PR), con las variantes A y B que son generadas del mismo gen mediante splicing alternativo, su ligando principal es la progesterona (P4) y receptor de andrógenos (AR), codificado por un solo gen, sus ligandos son la testosterona (Te) y la dihidrotestosterona (DHT). Uno de los efectos de los esteroides que resulta clave en la regulación y funciones efectoras del sistema inmune que no ha sido completamente explorado es su acción en la producción de citocinas y la proliferación de linfocitos. Se ha descubierto que receptores clásicos de esteroides están presentes en células de timo [Bridges *et al.* 1993] y bazo [Sakasaki *et al.* 2002]. Algunos trabajos indican que las acciones de la testosterona sobre células T son mediadas no sólo a través del receptor intracelular de andrógenos sino también mediante un receptor de andrógenos de membrana

sobre la superficie celular [Benten *et al.* 2002]. De acuerdo con este descubrimiento, existe un patrón de expresión diferencial, entre el receptor de andrógenos intracelular (RAi) y un receptor de andrógenos membranal (RAm), asociado a la maduración de células T. Mientras que en células T de timo se encuentra un RAi funcional y no se expresa el RAm en cantidades significativas para un efecto biológico, en células T de bazo se expresa un RAm funcionalmente activo pero el RAi presente no muestra funcionalidad en la vía genómica. Esto indica que el patrón de expresión del RAi y del RAm puede variar en una célula determinada durante su desarrollo y que la actividad inmunosupresora atribuida a la testosterona puede implicar células T de timo en enfermedades autoinmunes y células T de bazo en enfermedades infecciosas. No se sabe aún si ocurre algún tipo de regulación similar asociado a los estrógenos, la progesterona y sus receptores.

Mecanismo de acción de los esteroides

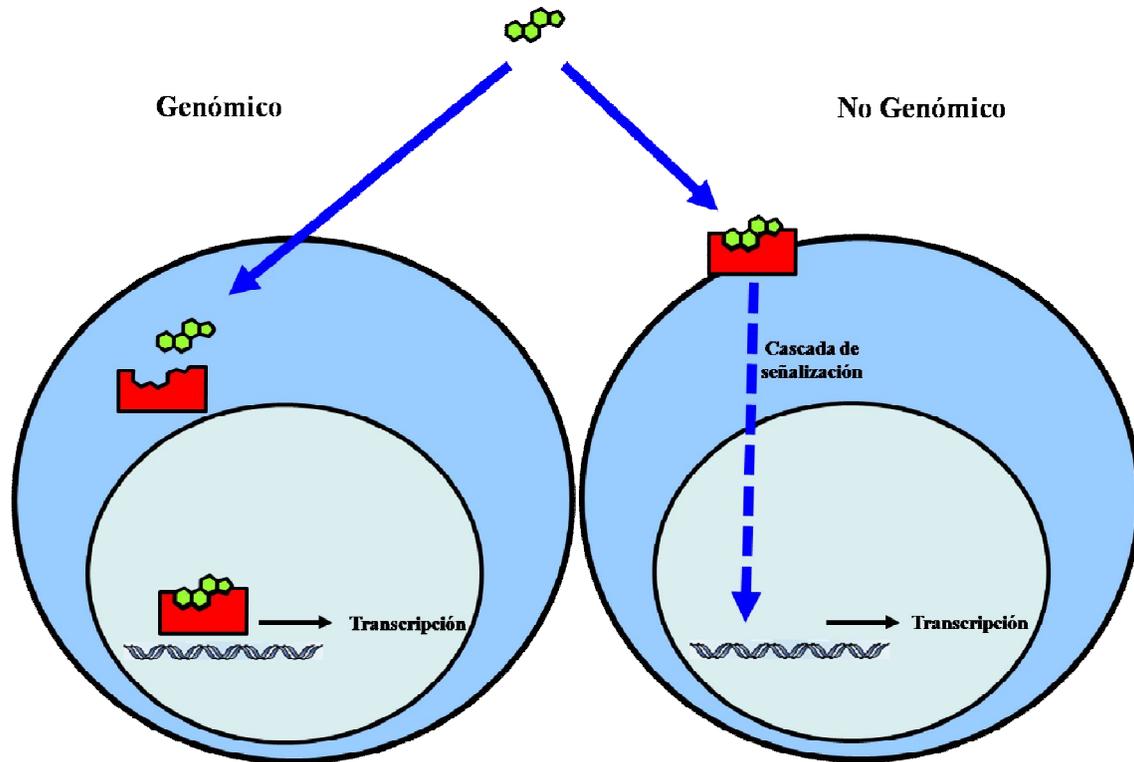


Figura 2. Mecanismos de acción de las hormonas esteroideas. Los receptores de estas hormonas se pueden encontrar en el citoplasma o el núcleo y actúan como factores de transcripción dependientes de ligando (efecto genómico); o pueden actuar mediante efectos rápidos no genómicos, la transmisión de estos efectos se debe a la presencia de receptores específicos de membrana e implican las convencionales cascadas de segundos mensajeros.

Justificación

La interacción entre el sistema inmune y el sistema endocrino es un hecho. Sin embargo, existen muchas discrepancias y resultados contrastantes con respecto al efecto de las hormonas en las células del sistema inmune y si éstas células poseen o no los receptores de los esteroides sexuales, considerando ambos sexos. Se han realizado infinidad de trabajos en los que se considera el sexo del hospedero, pero generalmente dichos experimentos incluyen otras variables alejadas de una condición fisiológica normal; en otros el sexo de los hospederos a menudo no es considerado o simplemente es omitido, a pesar de las evidencias de la interacción inmunoendocrina. En muchos proyectos de investigación biomédica se ha utilizado durante mucho tiempo un sexo u otro con base en la comodidad o situaciones extras al rigor científico, lo que ha provocado disparidad y sesgo del conocimiento en biomedicina y, por lo tanto, de los fenómenos biológicos que hay detrás. En este trabajo se evalúan los efectos directos de los esteroides sexuales sobre las células del sistema inmune, considerando ambos sexos y con la menor cantidad de variables posible. Además se pone énfasis al estudio de los mamíferos dada su relevancia médica y veterinaria.

Hipótesis

Un ambiente hormonal dimórfico influye en la presencia y modulación de receptores de esteroides sexuales y en ciertos parámetros de la respuesta inmunológica como la secreción de citocinas y la proliferación de linfocitos.

Objetivo

Definir el papel, en ambos sexos, de los esteroides sexuales sobre la polarización de la respuesta inmune y esclarecer si el efecto de estas hormonas se produce por la presencia o modulación diferencial de sus receptores.

Objetivos específicos

1. Explorar las diferencias en la expresión de citocinas Th1/Th2 y de receptores de esteroides en células inmunológicas de animales de ambos sexos, intactos y gonadectomizados.
2. Evaluar los efectos de los esteroides estradiol, progesterona y testosterona sobre la producción de citocinas y la proliferación de linfocitos.
3. Determinar el porcentaje y tipo de células inmunológicas en el bazo de ratones de ambos sexos.

Material y metodología

Ratones y procesos quirúrgicos

Para este estudio se utilizaron ratones (*Mus musculus*) de ambos sexos de la cepa BALB/c AnN de 6 semanas de edad. Fueron alimentados con Purina Diet 5015 y agua *ad libitum*, se mantuvieron bajo condiciones constantes de temperatura y ciclos de luz/obscuridad (14 h luz: 10 h obscuridad). A la edad de 4 semanas, los animales se castraron bajo anestesia con pentobarbital sódico (Pfizer), se suturaron con una aguja circular y con hilo reabsorbible. Un grupo de ratones recibió cirugías simuladas y otro grupo de animales intactos se utilizó como control; después de dos semanas de recuperación, los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical precedida de una anestesia profunda con pentobarbital. De cada animal se extrajeron el bazo, los nódulos linfáticos y las gónadas.

Las prácticas de experimentación y de cuidado animal en el Instituto de Investigaciones Biomédicas son evaluadas continuamente por el comité de utilización y cuidado animal de la Universidad y del mismo instituto, para asegurar el cumplimiento con las reglas y recomendaciones internacionales.

Extracción de ARN

De cada animal se aisló el ARN total de los testículos, útero, ovario (tejidos controles para la expresión positiva de los receptores de esteroides), bazo y células del mismo bazo mediante el método de extracción con el reactivo TRIzol (Gibco-BRL, EUA). Cada tejido fue extirpado e inmediatamente degradado en el reactivo TRIzol (1 mL/0.1 g de tejido), después de la degradación y homogenización del tejido, a cada muestra se agregaron 0.2 mL de cloroformo por cada mL de TRIzol (Invitrogen, EUA). Después de 15 minutos de centrifugación a 15,000 rpm, se recuperó la fase acuosa, el ARN se precipitó con isopropanol (Sigma, EUA), se lavó con etanol al 75, 85 y 100 %. Finalmente, la pastilla de ARN se resuspendió en agua libre de

ARNasas. La concentración de ARN se determinó mediante su absorbancia a 260 nm y se verificó su pureza con una electroforesis en un gel desnaturalizante de agarosa al 1 % en la presencia de formaldehído al 2.2 M. El ARN total de todos los tejidos se retrotranscribió y después se amplificaron, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), secuencias específicas de genes de citocinas (IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-6), receptores de esteroides sexuales (ER- α , ER- β , PR-A, PR-B y AR) y, además, en todos los casos se utilizó β -actina como gen constitutivo.

Retrotranscripción–Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

Las secuencias de nucleótidos de los cebadores utilizados para ampliar genes específicos se muestran en la Tabla 3. Del ARN total de cada tejido se tomaron 4 μ g y se incubaron a 37 °C durante 1 h con 400 unidades de retrotranscriptasa M-MLV (Applied Biosystems, EUA) en un volumen de reacción de 15 μ L conteniendo 10 μ M de cada dNTP y 0.01 μ g de oligo dT (Gibco-BRL, EUA). Después de ese tiempo, se tomaron 5 μ L de ADN complementario (ADNc) y se sometieron a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar fragmentos específicos de los genes particulares. Cada reacción de 50 μ L incluyó 5 μ L con ADNc previamente sintetizado, 5 μ L de buffer 10 x para PCR, 30 mM de MgCl₂, 10 mM de cada uno de los 4 desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTP), 15 μ M de cada cebador, y 0.5 unidades de *Taq* ADN polimerasa (Biotecnologías Universitarias, UNAM, México). Del producto de la PCR se tomaron 25 μ L de cada muestra, se sometieron a una electroforesis en un gel de agarosa al 2 % en presencia de un marcador de peso molecular. Los productos se revelaron mediante una tinción del gel con bromuro de etidio y exposición a radiación ultravioleta. En todos los casos, las condiciones de la PCR fueron ajustadas hasta obtener una sola banda correspondiente al peso molecular esperado. Con el fin de determinar que cada gen estuviera en su fase exponencial de amplificación se llevaron a cabo curvas de temperatura, ciclos y de cantidad de ARN utilizado para cada tratamiento y tejido estudiado. La expresión

de β -actina se utilizó como control interno en todos los experimentos. Así, se obtuvo la expresión de cada muestra y, como se esperaba, un solo producto correspondiente al fragmento amplificado de PR-A, con 197 nucleótidos (nt), PR-B (198 nt), ER- α (251 nt), ER- β (239 nt), AR (365 nt), IFN- γ (247 nt), IL-2 (168 nt), IL-4 (181 nt), IL-6 (638 nt) y β -actina (238 nt). Después de una fase inicial de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, los ciclos de temperatura se realizaron como se indica a continuación: 25 ciclos de 95 °C durante 1min, 58°C durante 1 min y 72°C durante 1 min para PR-A, PR-B y β -actina; 30 ciclos de 95°C durante 1min, 60°C durante 1min y 72°C durante 1min para ER- α y ER- β ; 25 ciclos de 95°C durante 1min, 55°C durante 1min y 72°C durante 1min para AR; 30 ciclos de 95°C durante 1min, 50°C durante 1min y 72°C durante 1min para IFN- γ ; 25 ciclos de 95°C durante 1min, 60°C durante 1min y 72°C durante 1min para IL-2; y finalmente 30 ciclos de 95°C durante 1min, 50°C durante 1min y 72°C durante 1min para IL-4 e IL-6. Se llevó a cabo además una fase final a 72°C durante 10 minutos para cada gen.

Tabla 4. Secuencias de los cebadores utilizados para la amplificación mediante PCR de ARN total.

Gen	Sentido	Antisentido
IL-2	5 -tgatggacctacaggagctcctgag	5 -gagtcaaatccagaacatgccgcag
IL-4	5 -cgaagaacaccacagagagtgagct	5 -gactcattcatggcgacttatcg
IL-6	5 -atgaagttcctctctgcaagag	5 -cactaggtttgccgagtagat
IFN- γ	5 -agcggctgactgaactcagattgtag	5 -gtcacagtttcagctgtataggg
PR-A	5 -cagtgggtgatttcatccatg	5 -ctccagagggtaggtgcga
PR-B	5 -ggaggcagaaattccagacc	5 -gacaacaacccttggtgac
ER- α	5 -agactgtccagcagtaacgag	5 -tcgtaaaccttgcgcagccg
ER- β	5 -catctgggtatcattacggtg	5 -ggcacttctctgtcttcg
AR	5 -gaatgtcagcctatcttctta	5 -tgcctcatctcacactggc
β -Actina	5 -gggtcagaaggattcctatg	5 -ggttctaaacatgatctggg

Los cebadores se diseñaron con base en las secuencias de los genes de ratón (*Mus musculus*) [Gene databank, NCBI, NIH].

Análisis densitométrico

Los niveles relativos de expresión de cada gen, tomando como base la expresión constitutiva de β -actina como control positivo, se determinaron mediante el análisis densitométrico de las fotografías correspondientes a los geles de agarosa. La expresión se representa

numéricamente como la proporción de la densidad óptica (OD) de cada gen estudiado relativa a la expresión en el mismo experimento del gen de β -actina, un gen que se expresa constitutivamente usado como control interno para detectar, en el proceso de amplificación, las diferencias entre experimentos y en la tinción de diferentes geles.

Cultivo y activación de células

Las células de bazo y de nódulos linfáticos se cultivaron en medio de cultivo libre se suero AIM-V (Gibco-BRL, EUA). Las células de bazo recibieron, además, un tratamiento hormonal a concentraciones farmacológicas de los esteroides E2, P4 y Te (Sigma, EUA), en placas de 96 pozos. Dichas placas se incubaron a 37°C, en una atmósfera con CO₂ al 5%, durante 76 horas. Después de este tiempo, se determinó, mediante RT-PCR, la expresión relativa de IFN- γ e IL-4. Las hormonas se prepararon a la concentración requerida y se esterilizaron con un filtro *Millipore* de 0.2 mm. Las concentraciones se calcularon para simular aquellas observadas *in vivo*, incluyendo un rango que incluye concentraciones farmacológicas.

Para los ensayos de proliferación, se obtuvieron los nódulos linfáticos de cada animal y posteriormente se aislaron las células, se cultivaron en placas de 96 pozos a 37°C, en una atmósfera con CO₂ al 5%, durante 76 horas. Las células se activaron con anticuerpos (PharMingen, EUA) anti-CD3 y anti-CD28 y tratadas con E2, P4 y Te. Para evaluar la proliferación celular se utilizó el tinte AlamarBlue (Biosource International, EUA) (Ahmed et al, 1994), dicho proceso consistió en lo siguiente: después de 48 horas de cultivo, se agregaron 20 μ L de tinte a cada pozo de las células cultivadas, 24 horas después se midió, con un lector de microplacas, la absorbancia a 570 y 600 nm. Con esos datos se calculó el índice de proliferación.

Citometría de flujo de células de bazo y de los receptores de esteroides

Mediante citometría de flujo se detectó el porcentaje de subpoblaciones celulares de bazo y la expresión de receptores de esteroides. Los tipos celulares detectados fueron linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, linfocitos B, células *natural killer* y macrófagos. Para tal efecto se utilizó el protocolo *Phosphoflow* (BD Biosciences) para proteínas intracelulares, con ligeras modificaciones. Las células de bazo se purificaron y se marcaron con los siguientes anticuerpos: anti-mCD4-APC, anti-mCD8-PECy5, anti-mCD19-PE, anti-mCD56-PE, anti-mCD11b-bn más estreptavidina PE (BD Biosciences); se fijaron con 500 μ L de solución de lisis/fijación. Después se permeabilizaron con 200 μ L de solución de permeabilización II. Después de lavar las células, se incubaron con reactivo de bloqueo Fc (Receptor CD16/CD32-Fc gama III/II) y después se incubaron con anticuerpos purificados anti-ER (receptor de estrógenos), anti-AR (receptor de andrógenos) o anti-PR (receptor de progesterona). Los anticuerpos primarios se detectaron con anticuerpos secundarios acoplados a FITC (Zymed). Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo utilizando el citómetro FACSCalibur (BD Biosciences). Los datos se analizaron con el software FlowJo.

Diseño experimental y análisis estadístico.

Para los experimentos *in vivo*, el diseño incluyó un experimento de tres factoriales. Las variables independientes son: (1) sexo del animal del que se tomaron las muestras (dos niveles: hembra y macho); (2) castración (dos niveles: si y no); y (3) población celular (cinco niveles: CD4, CD8, CD19, NK y Mac). La variable dependiente es, en cada caso, la expresión o presencia de ER- α , ER- β , PR-A, PR-B, AR, IFN- γ , IL-2, IL-4 o IL-6 en cada muestra de tejido o células. Los resultados se expresan en densidad óptica (OD) del fragmento del gel correspondiente dividido por la densidad óptica del gen de β -actina en la misma muestra; porcentaje de células e intensidad de fluorescencia. El gen de β -actina se utilizó como control en el proceso de amplificación. Cuando se llevaron a cabo, el contraste de grupos mediante

una prueba de Fisher, se utilizó la suma de residuales y la interacción de varianza de tres factores para probar las diferencias significativas. Se consideraron diferencias significativas cuando $P < 0.05$.

Los datos de los experimentos *in vitro* se evaluaron con el análisis de varianza (ANOVA) tomando como variables independientes: el sexo del animal (dos niveles), la gonadectomía (dos niveles) y la hormona utilizada en el cultivo (cuatro niveles); la variable dependiente fue el índice de proliferación de las células. Si la ANOVA revelaba diferencias significativas entre tratamientos, se aplicó una prueba *t-student* para evaluar las diferencias entre las medias de los grupos de cada experimento, utilizando la varianza residual estimada, mediante ANOVA para probar la significancia. Los datos se muestran como la media + la desviación estándar (S. D.). Se consideró diferencia significativa cuando $P < 0.05$.

Resultados

Dimorfismo sexual de la expresión de citocinas en bazo

La expresión de citocinas se determinó mediante RT-PCR en el bazo de ratones de ambos sexos intactos y gonadectomizados. De las citocinas tipo Th1, el IFN- γ mostró una expresión dimórfica tanto en animales silvestres como gonadectomizados. En el caso de los ratones controles, las hembras expresan más INF- γ que los machos mientras que en los ratones gonadectomizados el patrón de expresión se invirtió y los machos expresan más que las hembras. La expresión de la IL-2 no muestra diferencias en los ratones silvestres pero en los ratones gonadectomizados la expresión fue inhibida en los ratones machos y en las hembras no tuvo efecto (Figura 3A). Para el caso de las citocinas tipo Th2, la IL-4 es expresada más en machos que en hembras en los ratones silvestres, en los ratones gonadectomizados no hay diferencia pero en ambos sexos la expresión es inhibida. La expresión de la IL-6 no difiere entre sexos en ninguno de los dos grupos pero en ambos es inhibida (Figura 3B).

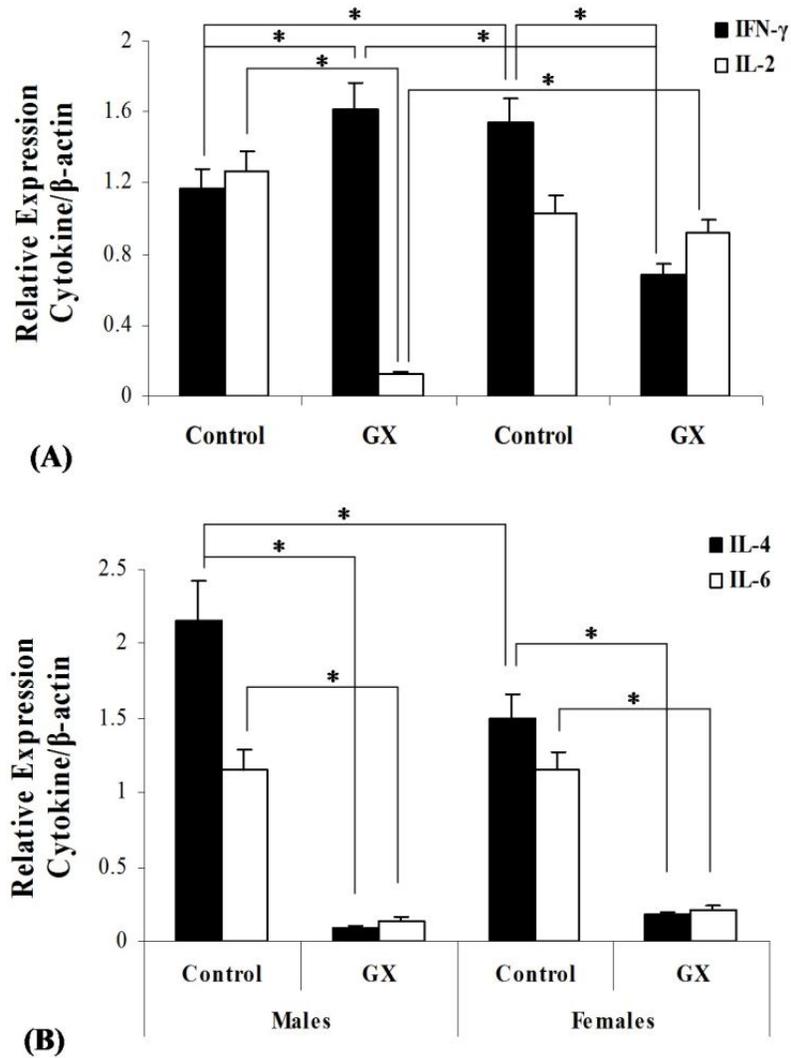


Figura 3. Dimorfismo sexual en la expresión de citocinas Th1 y Th2 en bazo de ratones de ambos sexos, controles y gonadectomizados (GX). La expresión relativa se determinó mediante el análisis densitométrico de las fotografías de los geles correspondientes, considerando la expresión de β -actina como parámetro. (A) Citocinas Th1, y (B) citocinas Th2. Los datos representan el resultado de cinco animales, cada experimento se hizo por triplicado. Los valores representan la media + la desviación estándar. * $P < 0.05$ comparado entre sexos.

Efecto de los esteroides sexuales en la expresión de citocinas en células de bazo

Con el objetivo de evaluar la expresión de las citocinas Th1/Th2 *in vitro*, obtuvimos y cultivamos leucocitos de bazo de ratones de ambos sexos en medio de cultivo libre de suero y evaluamos el efecto de los esteroides sexuales E2, P4 y Te en la expresión de IFN- γ e IL-4. En el primer caso encontramos que, en el grupo control, el IFN- γ se expresa más en células de hembra que en células de macho y que el E2 es capaz de inhibir dicha expresión en células de ambos sexos. Los tratamientos con P4 y Te no tuvieron efecto en la expresión de esta citocina. (Figura 4A) Por otro lado, la expresión de IL-4 también se asocia al sexo ya que las hembras la expresan más que los machos y, en este caso, tanto el E2 como la P4 son capaces de incrementar la expresión en células de ratones de ambos sexos. La Te tampoco tuvo efecto en la expresión de la IL-4 (Figura 4B).

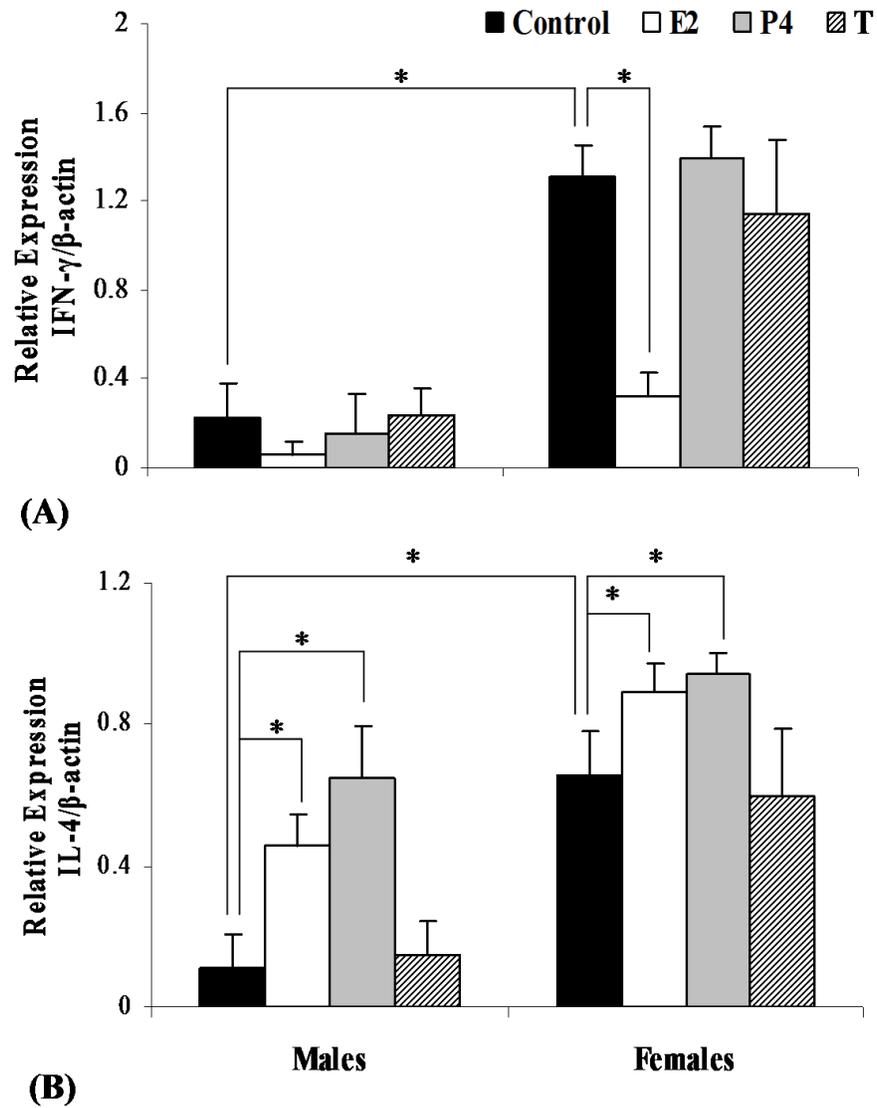


Figura 4. Efecto del tratamiento con esteroides sexuales sobre la expresión de IFN- γ (A) e IL-4 (B) en células de bazo de ratones de ambos sexos. Los datos representan la media + la desviación estándar de dos experimentos diferentes ($n=5$). Cada cultivo de células de bazo se realizó por triplicado. $*P < 0.05$ comparado con células sin tratamiento (Control). Estradiol (E2), progesterona (P4) y testosterona (T).

Efecto de los esteroides sexuales en la proliferación de linfocitos

Después de obtener células de nódulos linfáticos, fueron cultivadas y activadas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. Se evaluó el efecto de los esteroides sexuales E2, P4 y Te, en concentraciones suprafisiológicas y farmacológicas, en la proliferación de los linfocitos. Se encontró que las células de hembra siempre proliferan más que las células de macho. El tratamiento con E2 inhibió, a una concentración de 50 nM, la proliferación tanto en células de macho (19.51 %) como de hembra (24.62 %); la P4, a una concentración de 62.5 nM, fue capaz de disminuirla más del 22 % en células de hembra y no tuvo efecto en células de macho y, finalmente, la Te no tuvo efecto ni en células de macho ni de hembra (Figura 5).

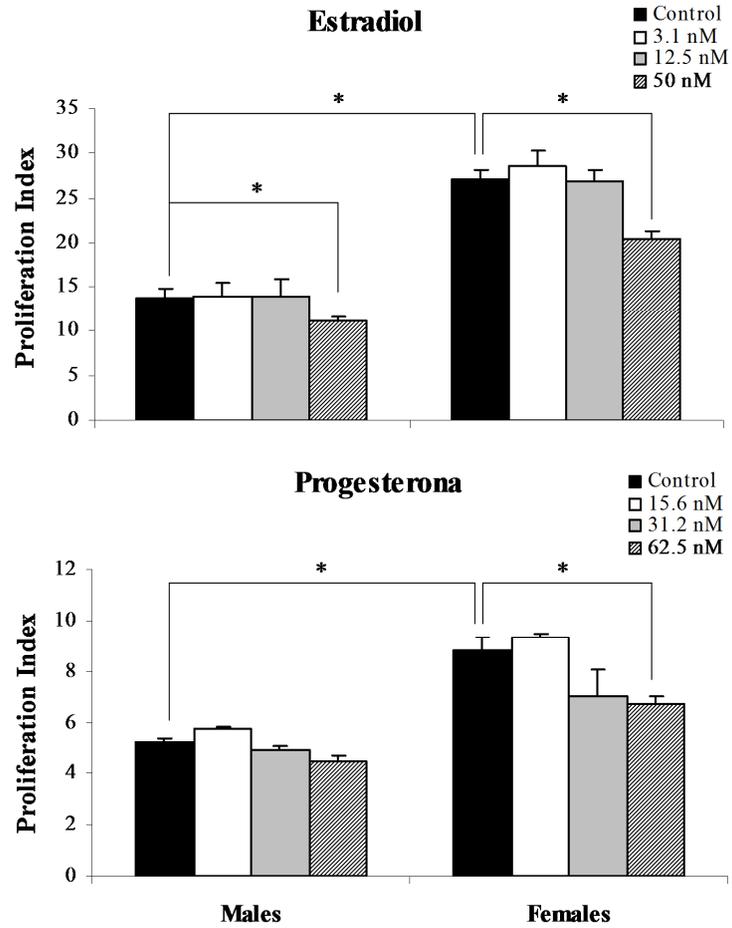


Figura 5. Efecto del estradiol (A) y la progesterona (B) sobre la proliferación de linfocitos. Los resultados muestran el índice de proliferación. Los datos representan la media + la desviación estándar de dos experimentos diferentes ($n=5$). Cada cultivo de células se realizó por triplicado. $*P < 0.05$ comparado con células sin tratamiento (Control).

Dimorfismo sexual de las poblaciones celulares de bazo

Con la intención de explorar qué tipo de poblaciones celulares están presentes en el bazo, decidimos determinar el porcentaje de cada tipo celular presente en este órgano y analizar si su respectiva proporción está relacionada con el sexo. En la Figura 6, las células con más alto porcentaje presentes en el bazo son los linfocitos T (CD4+ y CD8+) y los linfocitos B (CD19+). De las células analizadas, sólo se presentó dimorfismo sexual en el porcentaje de macrófagos. Dichas células predominaron en el bazo de los machos casi tres veces más que en las hembras. La gonadectomía influyó solamente en los machos al disminuir el número de macrófagos, comparado con los animales intactos. El análisis mediante citometría de flujo mostró que, con excepción de los macrófagos, ambos sexos tienen proporciones de células de bazo muy similares. En animales intactos los machos presentan mayor proporción de macrófagos que las hembras y la castración sólo alteró el porcentaje de estas células en los mismos machos.

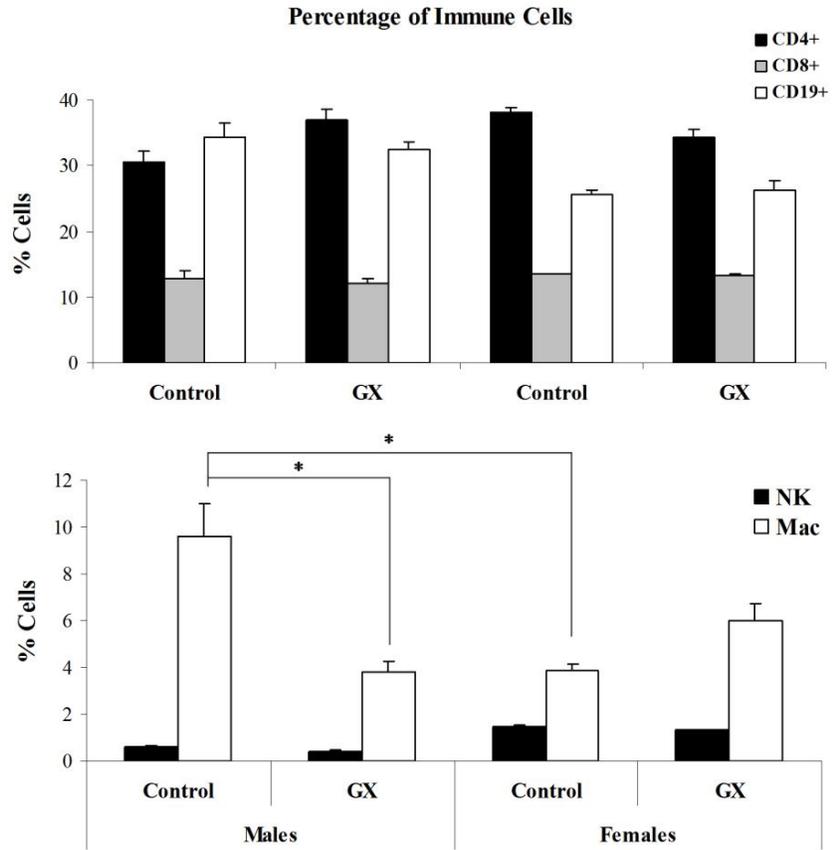


Figura 6. Porcentaje de células inmunológicas en el bazo de animales de ambos sexos, intactos y gonadectomizados (GX), detectadas mediante citometría de flujo. Linfocitos T (CD4+ y CD8+), linfocitos B (CD19+), células *natural killer* (NK) y macrófagos (Mac). Los datos representan la media + la desviación estándar ($n=5$). * $P < 0.05$ comparado entre sexos.

Expresión de receptores de esteroides sexuales en bazo

Para saber si en el bazo se expresan los mediadores clásicos de los efectos de los esteroides sexuales, buscamos la expresión de los receptores de esteroides sexuales en dicho tejido linfoide en ratones de ambos sexos. Determinamos la expresión del ER- α y del ER- β (Figura 7A), del PR A y B (Figura 7B) y del AR (Figura 7C). Encontramos que el bazo expresa tanto las dos isoformas del ER, como los dos tipos de PR y el AR. También descubrimos que todos los receptores son expresados de manera dimórfica ya que, con excepción del PR-A, los machos expresan más receptor que las hembras. Cuando se detectó la expresión de estos receptores en animales castrados, se encontró que ambas isoformas del ER disminuyeron su expresión en ambos sexos pero sólo el ER- α mantiene su carácter dimórfico. La expresión del RP-A, por su parte, es inhibida un 50% sólo en el bazo de las hembras, mientras que en los machos no cambia; y la expresión del RP-B es inhibida en ambos sexos. Finalmente, la expresión del AR es inhibida más del 50% sólo en el bazo de los machos; en el bazo de las hembras la gonadectomía no tuvo efecto.

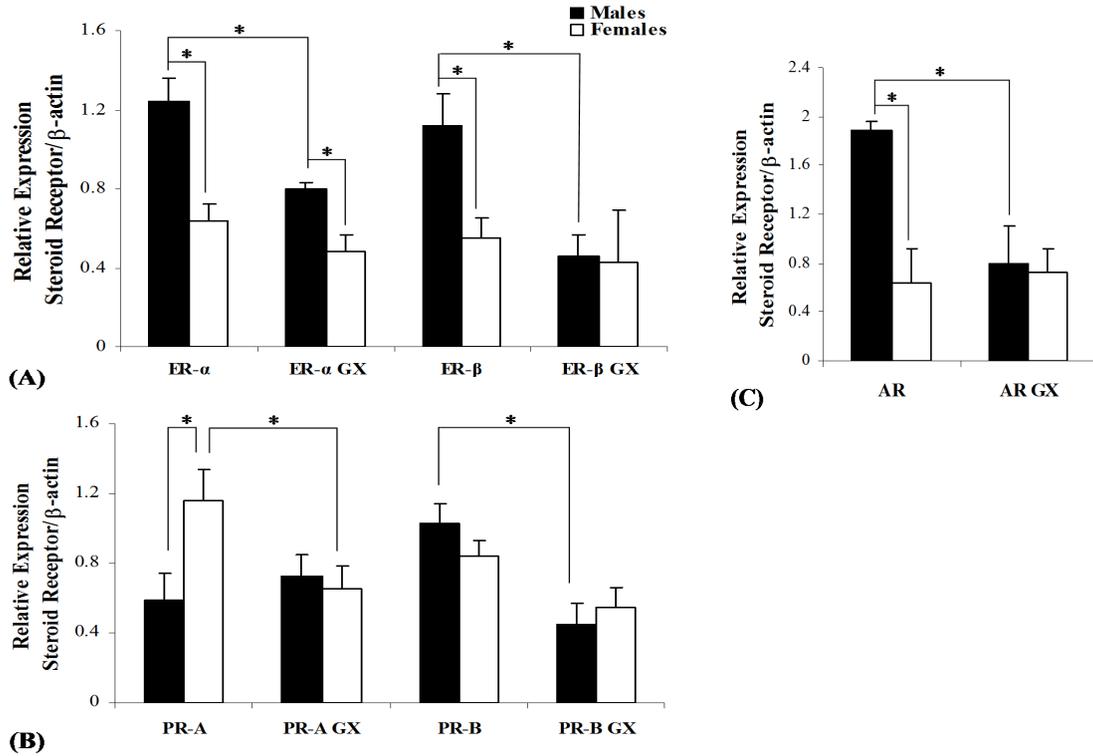


Figura 7. Expresión de receptores de esteroides en células de bazo totales de animales de ambos sexos, intactos y gonadectomizados (GX). La expresión relativa se determinó mediante el análisis densitométrico de las fotografías de los geles correspondientes, considerando la expresión de β-actina como parámetro. (A) Receptor de estrógenos, (B) receptor de progesterona y (C) receptor de andrógenos. Los datos representan la media + la desviación estándar de cinco ratones, cada experimento se hizo por triplicado. * $P < 0.05$ comparado entre sexos. Receptor de estrógenos (ER), receptor de progesterona (PR) y receptor de andrógenos (AR).

Análisis de receptores de esteroides en distintas células de bazo

Mediante citometría de flujo se analizaron las proteínas ER- α , ER- β , PR y AR presentes en las células del sistema inmune. Los resultados indican que no existen diferencias asociadas al sexo en la expresión del ER- α , mientras que la expresión de PR es dimórfica en los tres tipos de linfocitos (CD4+, CD8+ y CD19+) ya que los machos intactos presentan niveles dos veces más altos que las hembras, coincidiendo con los resultados obtenidos mediante RT-PCR. En los machos castrados la expresión de PR en los mismos linfocitos disminuyó aproximadamente 50%, comparado con los machos intactos. La expresión de ER- β y del receptor de andrógenos no mostró ninguna relación con el sexo (datos no mostrados) (Figura 8).

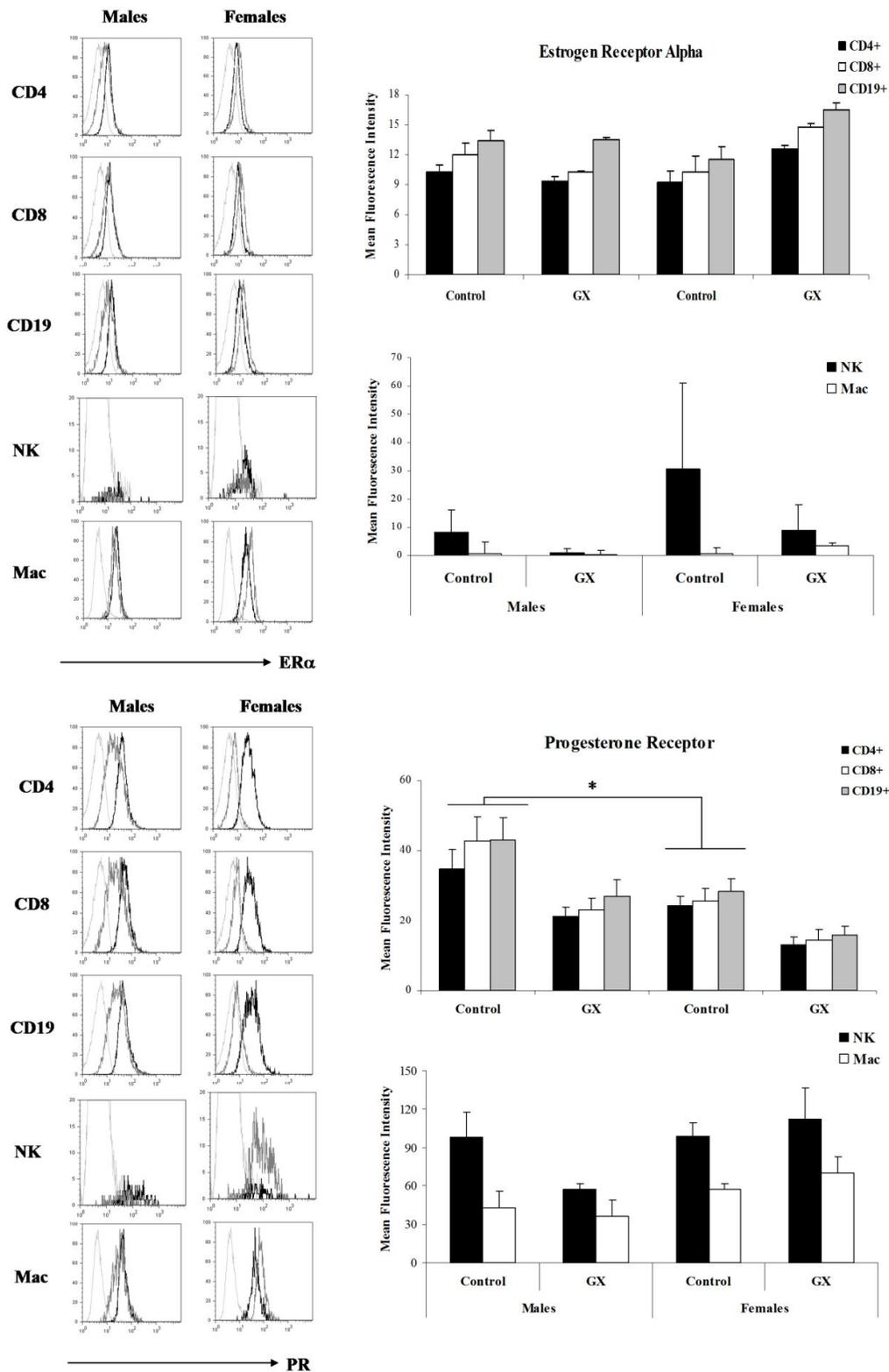


Figura 8. Receptores de esteroides sexuales en células de bazo de ratones de ambos sexos, intactos y gonadectomizados (GX), detectados mediante citometría de flujo. El receptor de estrógenos α y el receptor de progesterona fueron detectados en linfocitos T (CD4+ y CD8+), linfocitos B (CD19+), células *natural killer* (NK) y macrófagos (Mac). Los datos representan la media + la desviación estándar ($n=5$). * $P < 0.05$ comparado entre sexos.

Discusión

Los hallazgos de este trabajo indican que los esteroides sexuales son capaces de afectar de manera dimórfica funciones fundamentales del sistema inmunológico. Dado que existen pocos trabajos sobre el dimorfismo sexual de la expresión de las citocinas Th1/Th2, exploramos estas diferencias en ratones intactos y gonadectomizados. En primer lugar, citocinas importantes en la regulación de la respuesta inmune como el IFN- γ y la IL-4 muestran diferencias asociadas al sexo en ratones intactos. Para determinar si los esteroides sexuales tienen un papel en la expresión de estas citocinas retiramos quirúrgicamente la fuente principal de estas hormonas. Después de remover las gónadas encontramos que, con excepción de la IL-2 en las hembras, el IFN- γ , la IL-4 y la IL-6 presentan cambios significativos indicando que las hormonas producidas por las gónadas tienen un efecto en la regulación de estas citocinas (Figura 3). Esto resulta relevante si consideramos que estas proteínas son las que determinan que una respuesta inmune se polarice para una efectiva eliminación de posibles patógenos, lo que indica que hembras y machos pueden responder de manera diferente hacia algún antígeno particular y, por lo tanto, la eliminación de dicho antígeno puede variar por el sexo del hospedero. Esto indica que los esteroides sexuales, como moduladores de la expresión de citocinas, podrían afectar indirectamente al combate y eliminación de organismos invasores o, en su defecto, al establecimiento y transmisión de los mismos (Figura 10).

El efecto de los esteroides sexuales en la expresión de citocinas fue confirmado *in vitro* mediante el aislamiento y cultivo de células de bazo y la adición de dichas hormonas. Cabe señalar que en este caso el cultivo de células se hizo en un medio de cultivo libre de suero. En este caso se detectó la expresión de INF- γ e IL-4 como marcadores de la respuesta inmune Th1 y Th2, respectivamente. En primera instancia descubrimos una vez más que el sexo es importante en la expresión de dichas citocinas ya que las células de bazo que no fueron tratadas presentan diferencias de expresión asociadas al sexo. En ambos casos las

hembras expresan mayor cantidad que los machos. Cuando las células fueron tratadas con los esteroides sexuales, encontramos que el E2 inhibe la expresión de IFN- γ tanto en células de hembra como de macho. Esto coincide con trabajos previos que indican que el E2 regula el promotor del gen de esta citocina [Fox et al, 1991]. Contrario al efecto que tuvo en la expresión de IFN- γ , el E2 indujo un incremento en la expresión de IL-4 tanto en células de macho como de hembra. La diferencia asociada al sexo permanece tanto en las células sin tratamiento como en las células tratadas (Figura 4A). En general, los estrógenos parecen tener una acción dual sobre la polarización de la respuesta inmune que depende de la concentración del esteroide. Algunos estudios sugieren que el estradiol puede potenciar tanto la producción de citocinas Th1 (IFN- γ) como de citocinas Th2 (IL-10). En esos trabajos, altas concentraciones de estradiol ($>5000 \text{ pg ml}^{-1}$) estimulan la secreción de IL-10 por parte de clonas de células T, mientras bajas concentraciones estimulan la secreción de IFN- γ [Correale et al, 1998; Gilmore et al, 1997] (Figura 1). La progesterona también tuvo efecto en la expresión de IL-4 incrementando su expresión. Esto coincide con trabajos previos en que se evalúa la acción de la P4 como inmunoregulador durante el embarazo [Piccinni et al. 2000; Piccinni, 2002]. Otro estudio indica que la P4 tiene una influencia en la polarización de la respuesta inmune durante la fase lútea del ciclo menstrual. Durante esta fase del ciclo de mujeres regulares, la respuesta inmune se inclina hacia una respuesta tipo Th2, reflejada como un incremento en la producción de IL-4 [Faas et al. 2000], sugiriendo que el incremento en las concentraciones de P4 y E2 durante la fase lútea del ciclo menstrual juega un papel en la desviación de la respuesta inmune hacia una respuesta tipo Th2. La testosterona, por su parte, no tuvo efecto en la expresión de ninguna de las citocinas.

Este patrón de acción de los esteroides sexuales también se observó con los experimentos de proliferación de linfocitos. Las células fueron obtenidas de nodos linfáticos de ratones de ambos sexos, fueron cultivadas, activadas con anti-CD3 y anti-CD28 y tratadas con E2, P4 y Te. Una vez más, como en los experimentos de expresión de citocinas, la Te no

tuvo efecto en la proliferación de linfocitos mientras que el E2 y la P4 fueron capaces de inhibirla. Es relevante que las células de hembra proliferan más que las células de macho pero resulta contradictorio que, a pesar de esta diferencia, sean precisamente los esteroides asociados a la fisiología de las hembras los que inhiben la proliferación de linfocitos. Una posible explicación a esta aparente contradicción es la edad de los ratones. En todos los experimentos se utilizaron ratones de seis semanas de edad. Durante este periodo, los animales todavía no son sexualmente maduros y, por lo tanto, los cambios hormonales característicos de la fase reproductiva todavía no se presentan. Resulta así interesante explorar el efecto de estas hormonas en la proliferación de linfocitos durante la fase reproductiva. Es de resaltar también el que el estradiol y la progesterona tengan una acción diferencial en los linfocitos dependiendo del sexo del animal. El E2 es capaz de inhibir la proliferación de estas células tanto de machos (19.51%) como de hembras (24.62%) mientras que la P4 sólo la disminuye en células de hembra (22%). Si consideramos que la proliferación de linfocitos puede tener efecto en la magnitud de una respuesta inmune que, subsecuentemente, puede eliminar o no a un patógeno, entonces podemos deducir que los esteroides sexuales podrían afectar indirectamente diversas funciones y alteraciones del sistema inmune, como la erradicación de agentes patógenos y la autoinmunidad, respectivamente (Figura 10). El estradiol, por su parte, parece ser una molécula de gran importancia no sólo en el sistema endocrino sino también en el sistema inmune.

Considerando el efecto que tienen los esteroides en diversos componentes del sistema inmune y tomando en cuenta que no existen trabajos en que se reporten los diferentes receptores en un órgano periférico como el bazo, detectamos la expresión de estos receptores tanto en el bazo de ratones intactos como gonadectomizados. Previamente se ha encontrado una amplia distribución del ER- α y el ER- β en timo, médula ósea y bazo [Grossman *et al.* 1979; Tornwall *et al.* 1999; Kuiper *et al.* 1997; Smithson *et al.* 1998] pero el número de trabajos que reportan la presencia de receptores de estrógenos en tejido linfoide contrasta con

el escaso número de los que hacen lo propio con los receptores de progesterona y andrógenos. En este trabajo encontramos la expresión de ambos tipos del ER y del PR así como el AR en el bazo de ratones de ambos sexos. La gonadectomía, a su vez, tuvo un efecto significativo en la expresión de estos receptores que se asocia al sexo. Aunque la expresión en bazo es mucho menor que en tejido endocrino (datos no mostrados), resulta relevante la presencia de estos factores de transcripción, dependientes de ligando, en un órgano linfoide secundario ya que esto señala que los esteroides sexuales pueden tener acción no sólo durante la maduración y desarrollo de células inmunes (en timo) sino también durante los mecanismos efectores de estas células. Queda también la pregunta de la población de células inmunes que expresa los receptores y la manera en que se regulan.

Los posibles mecanismos de acción de los esteroides en células del sistema inmune incluyen, como en cualquier tejido endocrino clásico, la acción por vía genómica o por vía no genómica [Falkenstein *et al.*, 2000]. De acuerdo con la teoría de acción genómica, los esteroides se unen a receptores específicos presentes en el citoplasma y funcionan como factores de transcripción. Además de la acción genómica, existen evidencias de que los esteroides pueden actuar mediante efectos rápidos no genómicos y que la transmisión de estos efectos se debe a la presencia de receptores específicos de membrana. Así, los efectos no genómicos sobre la función celular implican las convencionales cascadas de segundos mensajeros. Si bien estos mecanismos de acción han sido descritos en órganos del sistema endocrino, se han acumulado evidencias de que estas acciones también pueden operar en el sistema inmune. De acuerdo al trabajo de Benten *et al.* [2002], las acciones de la testosterona sobre células T son mediadas no sólo a través del receptor intracelular de andrógenos sino también mediante un receptor de andrógenos de membrana sobre la superficie celular. Una posible acción de las hormonas esteroides, a través de sus receptores intracelulares y membranales sobre distintas células inmunitarias, puede implicar una regulación de una respuesta inmune contra algún patógeno particular que requiera la acción de estas hormonas

de manera rápida e inmediata, mediante la vía no genómica, o requiera una respuesta con un retraso específico en el tiempo, mediante la vía genómica. Cabe entonces especular sobre la posibilidad de que la vía no genómica regule, predominantemente, la respuesta inmune innata mientras que la vía genómica haga lo propio con la respuesta inmune adaptativa (Figura 9).

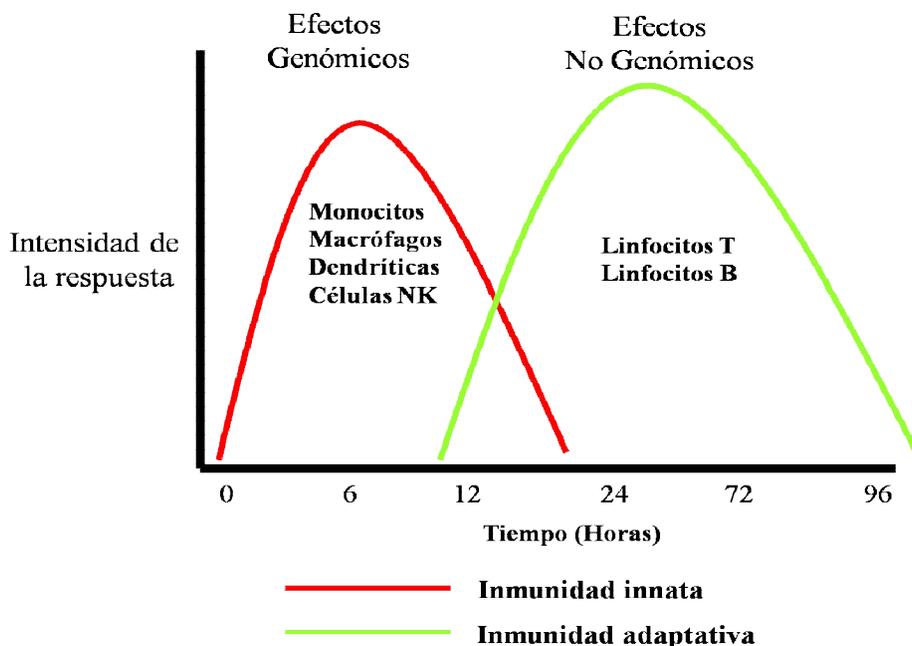


Figura 9. Posible asociación de la vía genómica de los esteroides sexuales y la inmunidad innata, así como de la vía no genómica y la inmunidad adaptativa.

Aunque actualmente existen varios trabajos en los que se estudian los efectos directos de los esteroides sexuales en células del sistema inmune, todavía existen varios aspectos por esclarecer. Uno de ellos es el que tratamos en este trabajo, es decir, el dimorfismo sexual de las funciones de cada una de las subpoblaciones de células inmunes. Puesto que en este trabajo utilizamos células totales tanto de bazo como de nodos linfáticos no podemos saber qué población de células está respondiendo a la acción de los esteroides sexuales. Es posible que los esteroides tengan un efecto en una población particular de células que provoque, mediante la secreción de citocinas o por el contacto célula-célula, una respuesta en otra

población celular. En ese aspecto, a menudo surgen evidencias de que los esteroides sexuales pueden tener efectos contradictorios. Se conocen varios factores que afectan la interacción entre las hormonas sexuales y la respuesta inmune, éstos incluyen: edad, sexo, estatus inmunológico, fase del ciclo hormonal, fondo genético, concentración o dosis hormonales, embarazo, tipo celular y estado de activación de las células. Aún en una misma especie, las hormonas esteroideas podrían tener efectos diferenciales dependiendo del tejido blanco. Las vías de señalización de la célula, en respuesta a los esteroides sexuales, podrían variar con el tipo de enfermedad o el estatus inmunológico. Otra variable importante se presenta cuando se evalúan los efectos de los esteroides sexuales sobre un tipo de células purificadas en comparación con los efectos sobre una población de varios tipos celulares. El resultado de una respuesta inmune depende de la regulación cruzada de varios tipos de células de la inmunidad innata y adaptativa y de sus interacciones adyacentes (la regulación mediante moléculas coestimuladoras y citocinas durante la interacción entre la célula presentadora de antígeno y el linfocito). El estudio de los efectos de los esteroides sexuales sobre células purificadas y aisladas podría arrojar resultados que difieran de aquellos obtenidos sobre poblaciones de células mezcladas. La complejidad de los efectos de estas hormonas sobre distintos tejidos también necesita ser clarificada.

Además de saber qué tipo de célula inmune es la que responde a los esteroides sexuales, permanece la pregunta del momento en que el sistema inmune adquiere su carácter dimórfico. Es decir, en qué momento del desarrollo de machos y hembras el sistema inmune experimenta una diferenciación específica del sexo que provoca que la respuesta inmune de machos y hembras sea diferente, con sus consecuencias inherentes como la erradicación o permanencia de organismos patógenos o el padecimiento dimórfico de enfermedades autoinmunes.

De trabajos como este también se desprende la necesidad de establecer normas, mientras la medicina personalizada se convierte en una realidad, para que la investigación

biomédica considere, sin aumentar los costos y la complejidad, la utilización de ambos sexos en las disciplinas que así lo exigen. Hasta ahora existe cierto sesgo en la investigación que tiene que ver con el estudio de ciertos fenómenos biológicos en los que se desprecia una característica tan importante como el sexo.

Finalmente, el significado biológico del dimorfismo sexual inmunológico puede explicarse, en parte, porque existe una diferencia sustancial entre machos y hembras: las hembras tienen que llevar a buen término un largo periodo de gestación. Del delicado balance involucrado en este proceso fisiológico puede depender la sobrevivencia de la misma especie.

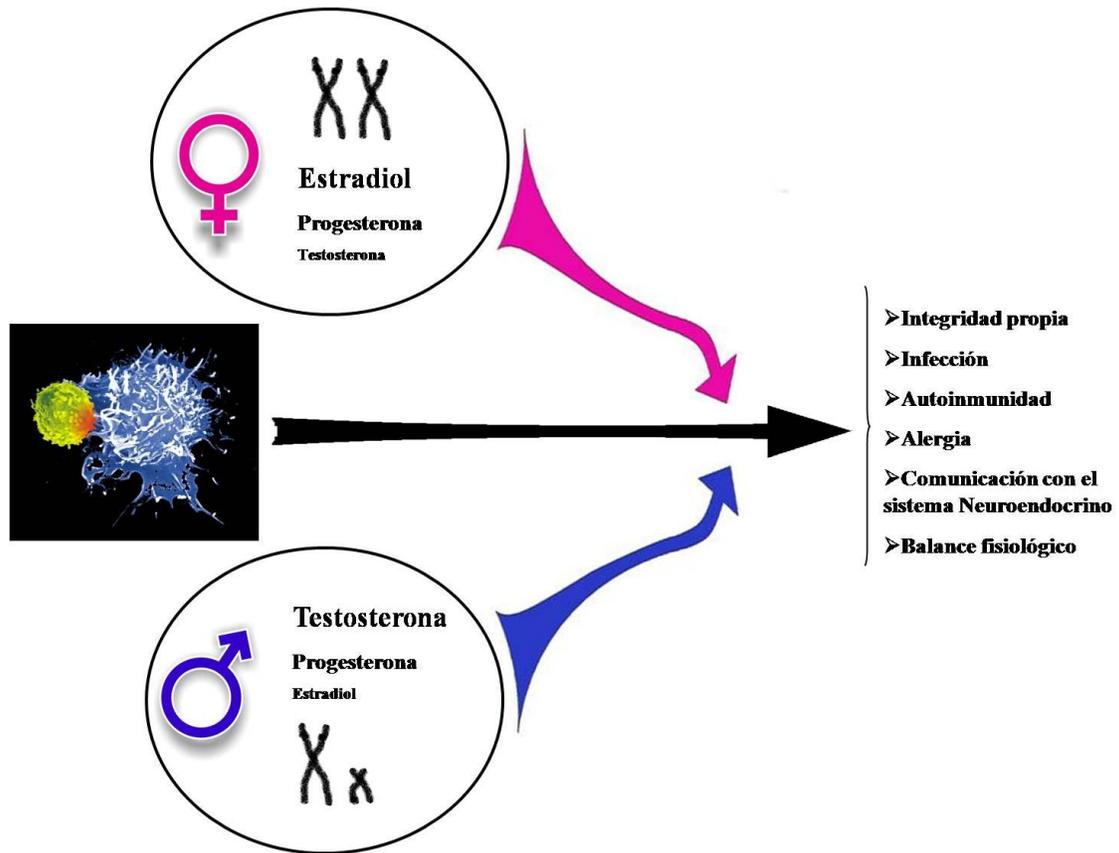


Figura 10. El sistema inmune, representado por un linfocito T acoplado a una célula presentadora de antígeno, se encarga de regular varios procesos biológicos que permiten mantener una integridad propia y cierto balance fisiológico. El genotipo y el fenotipo de hembra o macho produce diferencias que pueden afectar, indirectamente, las funciones efectoras de este sistema.

Conclusiones particulares

- Existe una expresión dimórfica de las citocinas IFN- γ e IL-4, importantes en la polarización de la respuesta inmune. Dicha expresión es afectada por la gonadectomía.
- No existen diferencias, asociadas al sexo, en el tipo y porcentaje de células inmunológicas. La gonadectomía no alteró esas características.
- El estradiol inhibió significativamente la proliferación de linfocitos en células de ambos sexos, la progesterona también la inhibió sólo en células de hembra y la testosterona no tuvo ningún efecto.
- Todos los tipos celulares analizados en el bazo (linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, linfocitos B, células *natural killer* y macrófagos) expresan receptores de esteroides sexuales.

Conclusión general

Las citocinas y las hormonas constituyen un lenguaje químico común para la comunicación entre los sistemas inmunológico y endocrino. Tal comunicación sugiere un papel inmunorregulador de los esteroides que hasta el momento no se ha valorado en su verdadera dimensión. Los esteroides sexuales podrían operar suprimiendo o activando la función celular con base en un estímulo diferente y en el tejido blanco, proporcionando, en parte, una explicación a las diferentes susceptibilidades, entre mujeres y hombres, hacia algunas infecciones y enfermedades autoinmunes. En conjunto, estas evidencias sugieren que el efecto de los esteroides sexuales no puede generalizarse ni se puede afirmar que un esteroide en particular tiene un efecto específico potenciando o inhibiendo el desarrollo de células Th1 o Th2. La acción de estas hormonas en las células del sistema inmune debe más bien determinarse mediante la detección de cada citocina en particular. Un entendimiento más claro de esta red de interacciones inmunoendocrinas está cambiando considerablemente nuestra concepción de la fisiología y podría afectar el tratamiento de diversas enfermedades. Finalmente, este trabajo pretende enfatizar en la importancia de considerar la edad y el sexo de los pacientes o de los modelos animales, en el momento en que se desarrollan y prueban nuevos fármacos, vacunas y tratamientos.

Bibliografía

Abbas AK, Murphy KM, Sher A. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383: 787-793.

Ahmed SA, Goyal RM, Walsh JE, Saunders G. 1996. Estrogen induces defects in T cell functions of mice. *FASEB Journal* 10: 961-965.

Amel Kashipaz MR, Huggins ML, Lanyon P, Robins A, Powell RJ, Todd I. 2003. Assessment of Be1 and Be2 cells in systemic lupus erythematosus indicates elevated interleukin-10 producing CD5+ B cells. *Lupus* 12: 356-363.

Angele MK, Knoferl MW, Ayala A, Bland KI, Chaudry IH. 2001. Testosterone and estrogen differently effect Th1 and Th2 cytokine release following trauma-haemorrhage. *Cytokine* 16: 22-30.

Araneo BA, Dowell T, Diegel M, Daynes RA. 1991. Dihydrotestosterone exerts a depressive influence on the production of interleukin-4 (IL-4), IL-5, and gamma-interferon, but not IL-2 by activated murine T cells. *Blood* 78: 688-699.

Bebo BF, Schuster JC, Vandenbark AA, Offner H. 1999. Androgens alter the cytokine profile and reduce encephalitogenicity of myelin-reactive T cells. *Journal of Immunology* 162: 35-40.

Behringer RR, Eakin SE, Renfree MB. 2006. Mammalian diversity: gametes, embryos and reproduction. *Reproduction Fertility and Development* 18: 99-107.

Benten WP, Becker A, Schmitt-Wrede HP, Wunderlich F. 2002. Developmental regulation of intracellular and surface androgen receptors in T cells. *Steroids* 67: 925-931.

Besedovsky HO, Del Rey A. 1996. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocrine Reviews* 17: 64-102.

Bilbo S, Klein S. 2012. The neuroendocrine-immune axis in health and disease. *Hormones and Behavior*. Doi: 10.1016/j.yhbeh.2012.06.005

Bridges ED, Greenstein BD, Khamashta MA, Hughes GR. 1993. Specificity of estrogen receptors in rat thymus. *International Journal of Immunopharmacology* 15: 927-932.

Burt A. 2000. Perspective: sex, recombination and the efficacy of selection – was Weismann right? *Evolution* 54: 337-351.

Calzolari A. 1898. Recherches expérimentales sur un rapport probable entre la fonction du thymus et celle des testicules. *Archives Italiennes de Biologie* 30: 71-77.

Chikanza IC, Grossman AB. 2000. Reciprocal interactions between the neuroendocrine and immune systems during inflammation. *Rheumatic Diseases Clinics of North America* 26: 693-711.

Chiodi H. 1940. The relationship between the thymus and the sexual organs. *Endocrinology* 26: 107.

Cooper GS, Stroehla BC. 2003. The epidemiology of autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews* 2: 119-125.

Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. 2001. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology* 22: 633-40.

Correale J, Arias M, Gilmore W. 1998. Steroid hormone regulation of cytokine secretion by proteolipid protein-specific CD4+ T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects. *Journal of Immunology* 161: 3365-3374.

Cutolo M. 2004. Estrogen metabolites: increasing evidence for their role in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *The Journal of Rheumatology* 31: 419-421.

D'Agostino P, Milano S, Barbera C, Di Bella G, La Rosa M, Ferlazzo V, Farruggio R, Miceli DM, Miele M, Castagnetta L, Cillari E. 1999. Sex hormones modulate inflammatory mediators produced by macrophages. *Annals of the New York Academy of Sciences* 876: 426-429.

D'Ambrosio D, Iellem A, Colantonio L, Clissi B, Pardi R, Sinigaglia F. 2000. Localization of Th-cell subsets in inflammation: differential thresholds for extravasation of Th1 and Th2 cells. *Immunology Today* 19: 568-574.

Darwin C. 1859. On the origin of species.

Da Silva JA. 1999. Sex hormones and glucocorticoids: interactions with the immune system. *Annals of the New York Academy of Sciences* 876: 102-118.

- Faas M, Bouman A, Moesa H, Heineman MJ, de Leij L, Schuiling G. 2000. The immune response during the luteal phase of the ovarian cycle: a Th2-type response? *Fertility and Sterility* 74(5): 1008-1013.
- Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M. 2000. Multiple actions of steroid hormones – a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacological Reviews* 52: 513-555.
- Fox HS, Bond BL, Parslow TG. 1991. Estrogen regulates the IFN- γ promoter. *Journal of Immunology* 146: 4362-4367.
- Gilmore W, Weiner LP, Correale J. 1997. Effect of estradiol on cytokine secretion by proteolip protein-specific T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects. *Journal of Immunology* 158: 446-451.
- Giron-Gonzalez JA, Moral FJ, Elvira J, Garcia-Gil D, Guerrero F, Gavilan I, Escobar L. 2000. Consistent production of a higher TH1:TH2 cytokine ratio by stimulated T cells in men compared with women. *European Journal of Endocrinology* 43: 31-36.
- Grossman CJ, Roselle GA, Mendenhall CL. 1991. Sex steroid regulation of autoimmunity. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 40: 649-659.
- Grossman CJ, Sholiton LJ, Nathan P. 1979. Rat thymic estrogen receptor. I. Preparation, location, and physiochemical properties. *Journal of Steroid Biochemistry* 11: 1233-1240.
- Grossman CJ. 1989. Possible underlying mechanism of sexual dimorphism in the immune response, fact and hypothesis. *Journal of Steroid Biochemistry* 34: 241-251.
- Jankovic D, Sher A, Yap G. 2001. Th1/Th2 effector choice in parasitic infection: decision making by committee. *Current Opinion in Immunology* 13: 403-409.
- Jost A, Vigier B, Prepin J, Perchellet J. 1973. Studies on sex differentiation in mammals. *Recent Progress in Hormone Research* 29: 1-41.
- Kidd P. 2003. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Alternative Medicine Review : a Journal of Clinical Therapeutic* 8: 223-246.

Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S. 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138: 363-370.

Lahita RG, Bradlow HL, Kunkel HG, Fishman J. 1979. Alterations of estrogen metabolism in SLE. *Arthritis and Rheumatism* 22: 1198-1200.

Le N, Yousefi S, Vaziri N, Carandang G, Ocariz J, Cesario T. 1988. The effect of beta-estradiol, progesterone and testosterone on the production of human leukocyte derived interferons. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents* 2(4): 199-204.

Liva SM, Voskuhl RR. 2001. Testosterone acts directly on CD4+ T lymphocytes to increase IL-10 production. *Journal of Immunology* 167: 2060-2067.

Losel R, Wehling M. 2003. Nongenomic actions of steroid hormones. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 4(1): 46-56.

Lucey DR, Clerici M, Shearer GM. 1996. Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. *Clinical Microbiology Reviews* 9(4): 532-562.

Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. 2002. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology* 23: 549-555.

Maret A, Coudert JD, Garidou L, Foucras G, Gourdy P, Krust A, Dupont S, Chambon P, Druet P, Bayard F, Guery JC. 2003. Estradiol enhances primary antigen-specific CD4 T cell responses and Th1 development in vivo. Essential role of estrogen receptor alpha expression in hematopoietic cells. *European Journal of Immunology* 33: 512-521.

Martin JT. 2000. Sexual dimorphism in immune function: the role of prenatal exposure to androgens and estrogens. *European Journal of Pharmacology* 405: 251-261.

Matejuk A, Hopke C, Vandenbark AA, Hurn PD, Offner H. 2005. Middle-age male mice have increased severity of experimental autoimmune encephalomyelitis and are unresponsive to testosterone therapy. *Journal of Immunology* 174(4): 2387-2395.

- Miyaura H, Iwata M. 2002. Direct and indirect inhibition of Th1 development by progesterone and glucocorticoids. *Journal of Immunology* 168: 1087-1094.
- Morales-Montor J, Baig S, Hallal-Calleros C, Damian RT. 2002. *Taenia crassiceps*: androgen reconstitution of the host leads to protection during cysticercosis. *Experimental Parasitology* 100(4): 209-16.
- Morales-Montor J, Chavarria A, De León MA, Del Castillo LI, Escobedo EG, Sánchez EN, Vargas JA, Hernández-Flores M, Romo-González T, Larralde C. 2004. Host gender in parasitic infections of mammals: an evaluation of the female host supremacy paradigm. *The Journal of Parasitology* 90: 531-546.
- Moser M, Murphy M. 2000. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nature Immunology* 1: 199-205.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of Immunology* 136: 2348-2357.
- Mosmann TR, Coffman RL. 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Review of Immunology* 7: 145-173.
- Mosmann TR, Sad S. 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology Today* 17: 138-146.
- Moynihan JA, Callahan TA, Kelley SP, Campbell LM. 1998. Adrenal hormone modulation of type 1 and type 2 cytokine production by spleen cells: dexamethasone and dehydroepiandrosterone suppress interleukin-2, interleukin-4, and interferon- γ production in vitro. *Cellular Immunology* 184: 58-64.
- Muscettola M, Massai L, Lodi L, Briganti F, Fontani G, Lupo C. 2003. IFN-gamma production in rabbits: behavioral and endocrine correlates. *Life Sciences* 72(12): 1331-1343.
- Olsen NJ, Kovacs WJ. 2001. Effects of androgens on T and B lymphocyte development. *Immunologic Research* 23 (2-3): 281-288.
- Papadimitriou A, Priftis KN. 2009. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuroimmunomodulation* 16(5): 265-71.

Piccinni MP, Maggi E, Romagnani S. 2000a. Role of hormone-controlled T-cell cytokines in the maintenance of pregnancy. *Biochemical Society Transactions* 28(2): 212-215.

Piccinni MP, Scaletti C, Maggi E, Romagnani S. 2000b. Role of hormone-controlled Th1-and Th2-type cytokines in successful pregnancy. *Journal of Neuroimmunology* 109: 30-33.

Piccinni MP. 2002. T cell cytokines in pregnancy. *American Journal of Reproductive Immunology* 47(5): 289-294.

Polanczy MJ, Carson BD, Subramanian S, Afentoulis M, Vandenbark AA, Ziegler SF, Offner H. 2004. Cutting edge: Estrogen drives expansion of the CD4+CD25+ regulatory T cell compartment. *Journal of Immunology* 173: 2227-2230.

Posma E, Moes H, Heineman MJ, Faas MM. 2004. The effect of testosterone on cytokine production in the specific and non-specific immune response. *American Journal of Reproductive Immunology* 52(4): 237-243.

Prieto GA, Rosenstein Y. 2006. Oestradiol potentiates the suppressive function of human CD4 CD25 regulatory T cells by promoting their proliferation. *Immunology* 118(1): 58-65.

Ragusa A, de Carolis C, dal Lago A, Miriello D, Ruggiero G, Brucato A, Pisoni MP, Muscara M, Merati R, Maccario L, Nobili M. 2004. Progesterone supplement in pregnancy: an immunologic therapy? *Lupus* 13(9): 639-642.

Romagnani S. 2004. Lymphokine production by human T cells in diseases states. *Annual Review of Immunology* 12: 227-257.

Sad S, Marcotte R, Mosmann TR. 1995. Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells into cytotoxic CD8+ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. *Immunity* 2: 271-279.

Sakazaki H, Ueno H, Nakamuro K. 2002. Estrogen receptor alpha in mouse splenic lymphocytes: possible involvement in immunity. *Toxicology Letters* 133(2-3): 221-229.

Salem ML, Hossain MS, Nomoto K. 2000a. Mediation of the immunomodulatory effect of beta-estradiol on inflammatory responses by inhibition of recruitment and activation of inflammatory cells and their gene expression of TNF- α and IFN- γ . *International Archives of Allergy and Immunology* 121: 235-245.

Salem ML, Matsuzaki G, Kishihara K, Madkour GA, Nomoto K. 2000b. β -estradiol suppresses T cell-mediated delayed-type hypersensitivity through suppression of antigen-presenting cell function and Th1 induction. *International Archives of Allergy and Immunology* 121: 161-169.

Smithson G, Couse JF, Lubahn DB, Korach KS, Kincade PW. 1998. The role of estrogen receptors and androgen receptors in sex steroid regulation of B lymphopoiesis. *Journal of Immunology* 161: 27-34.

Tornwall J, Carey AB, Fox RI, Fox HS. 1999. Estrogen in autoimmunity: expression of estrogen receptors in thymic and autoimmune T cells. *The Journal of Gender-Specific Medicine* 2: 33-40.

Verthelyi D, Petri M, Ylamus M, Klinman DM. 2001. Disassociation of sex hormone levels and cytokine production in SLE patients. *Lupus* 10(5): 352-358.

Wilson JD, Foster DW. 1997. Williams textbook of endocrinology. 8^a ed. Saunders. EUA.

Wendler A, Baldi E, Harvey BJ, Nadal A, Norman A, Wehling M. 2010. Position Paper: Rapid responses to steroids: current status and future prospects. *European Journal of Endocrinology* 162(5): 825-830.

Wunderlich F, Dkhil MA, Mehnert LI, Braun JV, El-Khadragy M, Borsch E, Hermsen D, Benten WP, Pfeffer K, Mossmann H, Krucken J. 2005. Testosterone responsiveness of spleen and liver in female lymphotoxin beta receptor-deficient mice resistant to blood-stage malaria. *Microbes and Infection* 7(3): 399-409.

Yesilova Z, Ozata M, Kocar IH, Turan M, Pekel A, Sengul A, Ozdemir IC. 2000. The effects of gonadotropin treatment on the immunological features of male patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 85(1): 66-70.

Zimmer C. 2009. Origins. On the origin of sexual reproduction. *Science* 324: 1254-1256.

Zuk M, McKean A. 1996. Sex differences in parasite infections: Patterns and processes. *International Journal for Parasitology* 26(10): 1009-1023.

Apéndice

Publicación más relevante para la obtención de grado

- **De León-Nava MA**, Nava K, Soldevila G, López-Griego L, Chávez-Ríos JR, Vargas-Villavicencio JA, Morales-Montor J. 2009. Immune sexual dimorphism: Effect of gonadal steroids on the expression of cytokines, sex steroid receptors, and lymphocyte proliferation. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 113 (1-2): 57-64.

Otras publicaciones

- Escobedo G, **De León-Nava MA**, Morales-Montor J. 2010. Sex differences in parasitic infections: beyond the dogma of female-biased resistance. En: *Sex hormones and immunity to infection*. Eds: Klein SL y Roberts CW. Ed. Springer: 187-204.
- Vargas-Villavicencio JA, **De León-Nava MA**, Morales-Montor J. 2009. Immunoendocrine mechanisms associated with resistance or susceptibility to parasitic diseases during pregnancy. *Neuroimmunomodulation* 16(2): 114-21.
- Guzmán C, Camacho-Arroyo I, **De León-Nava MA**, Morales-Montor J. 2009. Neonatal exposure to estradiol induces resistance to helminth infection and changes in the expression of sex steroid hormone receptors in the brain in adult mice of both sexes. *Brain, Behavior and Immunity* 23(5): 709-715.
- Vargas-Villavicencio JA, Larralde C, **De León-Nava MA**, Escobedo G, Morales-Montor J. 2007. Tamoxifen treatment induces protection in murine cisticercosis. *Journal of Parasitology* 93(6): 965-70.
- **De León-Nava MA**, Morales-Montor J. 2006. Dimorfismo sexual inmunitario: ¿Pueden los esteroides sexuales polarizar el perfil de citocinas Th1/Th2? *Revista de Investigación Clínica* 58(2):161-9.
- Vargas-Villavicencio JA, **De León-Nava MA**, Larralde C, Morales-Montor J. 2005. Regulation of the immune response to cestode infection by progesterone is due to its metabolism to estradiol. *Microbes and Infection* 7:485-93.
- Morales-Montor J, Chavarría A, **De León MA**, Del Castillo LI, Escobedo EG, Sánchez EN, Vargas JA, Hernández-Flores M, Romo-González T, Larralde C. 2004. Host Gender in parasitic infections of mammals: an evaluation of the female host supremacy paradigm. *Journal of Parasitology* 90 (3): 531-46.