



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

DIMORFISMO SEXUAL EN EL RECLUTAMIENTO DE MACRÓFAGOS Y EXPRESIÓN  
DE MOLÉCULAS ACCESORIAS DURANTE LA CISTICERCOSIS EXPERIMENTAL  
MURINA POR TAENIA CRASSICEPS

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:  
CRISTIÁN TOGNO PEIRCE

DIRECTOR DE TESIS  
DR. JORGE MORALES MONTOR  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS,  
UNAM  
COMITÉ TUTOR  
DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM  
DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉZ  
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN BIOMEDICINA, FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES IZTACALA, UNAM

MÉXICO, D. F. MAYO DE 2014



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.



Este proyecto fue realizado en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, con el soporte del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), mediante el donativo número IN214011. Cristián Togno Peirce recibió apoyo del Programa de Becas de la de la Coordinación de Estudios de Postgrado de la UNAM, así como del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

# Agradecimientos

Quiero agradecer de manera especial al Dr. Jorge Morales Montor, mi tutor durante el doctorado por su confianza, apoyo y amistad extraordinarios.

A los miembros de mi comité tutor, el Dr. Abraham Landa y el Dr. Luis I. Terrazas por su orientación y apoyo en el desarrollo de mi doctorado.

A los miembros de mi jurado, el Dr. Marco A. Cerbón, el Dr. Pedro Ostoa, la Dra. Miriam Rodrigues, el Dr. Fernando Alba y el Dr. Javier Ambrosio, por el tiempo y la atención que dedicaron a este trabajo y por sus valiosos comentarios.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y el Instituto de Investigaciones Biomédicas, constituidos por el trabajo de personas extraordinarias, que me han formado durante el doctorado.

A Cinthi, mi compañera, por las alegrías, el apoyo y la paciencia incansables.

A mis padres, Mónica y Francisco, mi hermano Francisco y mi tía Virginia por su importante apoyo.

A la Dra. Karen Nava, el Dr. German Aleman, el Dr. Guillermo Gómez, la Dra. Evelyn Rivera, la Biol. Lorena López, el M.C. Carlos Castellanos, la M.V.Z. Georgina Díaz, el M.V.Z. Jorge, el Lic. Carlos Martínez y a Azucena Ayala, por su ayuda y orientación durante el desarrollo de mi proyecto.

Al Biol. Javier Montoya, Héctor Jiménez, Claudia Fulgencio, mi hermana Brenda y mi primo Jorge por las cosas extraordinarias que han hecho. También a mis amigos en el centro de Tlalpan y el café de la selva, por el espacio y la motivación durante la escritura de esta tesis.

# Índice

Abreviaturas .....	4
Resumen .....	6
I. Introducción.....	10
i.i. El sistema inmune .....	11
i.ii. Inmunidad innata .....	11
i.iii. Los macrófagos .....	12
i.iv. Inmunidad adaptativa .....	16
i.v. Activación de los linfocitos T vírgenes por células presentadoras de antígeno .....	19
i.vi. La familia B7 de moléculas coestimuladoras y supresoras.....	20
i.vii. La cisticercosis murina por <i>Taenia crassiceps</i> .....	25
i.viii. La respuesta inmune en la cisticercosis .....	25
i.ix. Los macrófagos en la cisticercosis por <i>T. crassiceps</i> .....	31
i.x. Factores biológicos del hospedero que afectan la resistencia a la cisticercosis .....	35
i.xi. Dimorfismo sexual inmune .....	36
i.xii. Interacciones inmuno-endocrinas en la cisticercosis .....	37
II. Justificación .....	40
III. Hipótesis .....	42
IV. Objetivos .....	44
V. Diseño experimental .....	46
VI. Materiales y métodos .....	49
vi. i. Declaración de principios éticos. ....	50
vi. ii. Animales .....	50
vi. iii. Preparación de antígenos de <i>T. crassiceps</i> e infección experimental.....	50
vi. iv. Obtención de células de exudado peritoneal (CEP) .....	51
vi. v. Evaluación de la carga parasitaria .....	51
vi. vi. Obtención y cultivo de macrófagos .....	52

vi. vii. Tratamientos hormonales y con antígenos de <i>T. crassiceps in vitro</i> .....	52
vi. viii. Análisis de la expresión de marcadores en la superficie de los macrófagos .....	53
vi. ix. Análisis estadístico .....	54
VII. Resultados .....	55
vii. i. Las cargas parasitarias no variaron entre los sexos durante la primera semana de cisticercosis por <i>T. crassiceps</i> . .....	56
vii. ii. El reclutamiento de células al peritoneo durante la primera semana de la cisticercosis por <i>T. crassiceps</i> fue mayor en las hembras .....	58
vii. iii. Durante la primera semana de infección, el porcentaje de macrófagos no varió entre los sexos, pero el número total fue mayor en las hembras .....	58
vii. iv. El sexo no afectó la expresión del MHC-II en los macrófagos reclutados durante la primera semana de cisticercosis por <i>T. crassiceps</i> .....	59
vii. v. La infección por <i>T. crassiceps</i> alteró la expresión de las moléculas coestimuladoras en los macrófagos, pero no hubo diferencias asociadas al sexo en la expresión de CD80 o CD86. ....	60
vii. vi. La infección por <i>T. crassiceps</i> indujo la expresión de moléculas supresoras PD-L1 y PD-L2 en los macrófagos de ambos sexos. ....	62
vii. vii. La expresión de las moléculas del MHC-II en los macrófagos no fue alterada por el sexo, los esteroides sexuales E2 y DHT o por el ExTc <i>in vitro</i> . ....	64
vii. viii. La expresión de CD80 en los macrófagos cultivados, no fue afectada por el sexo, el E2 o la DHT, ni por el ExTc. ....	65
vii. ix. La expresión de CD86 no fue alterada por el sexo, el E2 o la DHT, pero si por el ExTc en los macrófagos cultivados .....	66
vii. x. La expresión de PD-L1 no varió entre los sexo o los tratamientos con E2 y DHT, ni fue inducida en los macrófagos por el ExTc <i>in vitro</i> .....	67
vii. xi. La expresión de PD-L2 no fue afectada por el sexo o los esteroides sexuales E2 y DHT, tampoco fue inducida por el ExTc en los macrófagos <i>in vitro</i> .....	68
VIII. Discusión .....	69
IX. Conclusiones .....	76

X. Referencias .....	79
XI. Apéndices .....	92

## Índice de figuras y tablas

Tabla 1. Marcadores del tipo de activación de los macrófagos.....	15
Figura 1. Las primeras 8 semanas de la cisticercosis murina por <i>T. crassiceps</i> .....	39
Figura 2. Diseño de los experimentos <i>in vivo</i> .....	47
Figura 3. Diseño de los experimentos <i>in vitro</i> .....	48
Figura 4. Cargas parasitarias obtenidas de hembras y machos.....	56
Figura 5. Cinética de las células de exudado peritoneal (CEP) recuperadas del peritoneo tras 6 días de infección con <i>T. crassiceps</i> .....	57
Figura 6. Caracterización de la expresión de moléculas del MHC-II en los macrófagos recuperados del peritoneo después de 6 días de infección con <i>T. crassiceps</i> .....	59
Figura 7. Caracterización de CD80 y CD86 en macrófagos recuperados del peritoneo de ratones infectados con <i>T. crassiceps</i> .....	61
Figura 8. Caracterización de PD-L1 y PD-L2 en macrófagos recuperados del peritoneo durante la cisticercosis aguda por <i>T. crassiceps</i> .....	63
Figura 9: Análisis de la expresión del MCH-II en macrófagos cultivados con antígenos y distintos tratamientos hormonales.....	64
Figura 10: Efecto del sexo y el ambiente hormonal sobre la expresión de CD80 en macrófagos cultivados en presencia de ExTc.....	65
Figura 11: Análisis de la expresión de CD86 en macrófagos cultivados con estrógenos o andrógenos y estimulados con ExTc.....	66
Figura 12: Expresión de PD-L1 en macrófagos cultivados con E2 o DHT y ExTc.....	67
Figura 13: Caracterización de PD-L2 en macrófagos cultivados con E2 o DHT y expuestos a los antígenos de <i>T. crassiceps</i> .....	68



# Abreviaturas

- ADN: Ácido desoxirribonucleico.  
Arg: Arginina.  
Arg1: Enzima arginasa 1.  
ARN: Ácido ribonucleico.  
CCl<sub>4</sub>: Tetracloruro de carbono.  
CD40L: Ligando del receptor CD40.  
CD<sub>x</sub>: Molécula *x* (en donde *x* es un número) del conjunto de diferenciación, por las siglas de *Cluster of Differentiation*.  
células NK: Células asesinas naturales, por las siglas de *Natural Killer*.  
CEP: Células de exudado peritoneal.  
CpG: Oligodeoxinucleótidos que contienen trifosfato de citosina y trifosfato de guanina unidos por enlaces de fosfodiéster.  
CTLA4: Antígeno 4 de los linfocitos T citotóxicos, por las siglas de *Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4*.  
DHEA: Dehidroepiandrosterona.  
DHT: Dihidrotestosterona.  
DMEM: Medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco, por las siglas de Dulbecco's Modified Eagle's Medium.  
E2: 17-beta-Estradiol.  
EDTA: Ácido etilendiaminetetraacético, por la abreviación de *Ethylenediaminetetraacetic acid*.  
ERK<sub>x</sub>: Cinasa reguladas por señal extracelular *x* (en donde *x* es un número). Por las siglas de *Extracellular signal Regulated Kinase x*.  
ExTc: Extracto total soluble de *Taenia crassiceps*.  
FIZZ1: Proteína encontrada en la zona inflamatoria 1, por las siglas en inglés de *Found in Inflammatory Zone*.  
I.P. Intra peritoneal.  
ICOS: Coestimulador inducible de linfocitos T, del inglés *Inducible t cell COStimulator*.  
ICOSL: Ligando de ICOS.  
IDO: Enzima Indoleamina 2,3-dioxigenasa.  
IFN- $\gamma$ : Interferón gamma.  
IgC: Dominio Constante de inmunoglobulina.  
IgE: Inmunoglobulina E.  
IgG: Inmunoglobulina G.  
IgV: Dominio Variable de inmunoglobulina.  
IL-4R $\alpha$ : Receptor alfa de la interleucina 4.  
IL-*x*: Interleucina *x* (en donde *x* es un número).  
iNOS: Enzima óxido nítrico sintasa inducible (también llamada, óxido nítrico sintetasa 2), por las siglas de *Inducible Nitric Oxide Synthase*.  
ITIM: Motivo inhibidor basado en tirosina de receptor inmune, por las siglas de *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif*.  
ITSM: Motivo interruptor basado en tirosina de receptor inmune, por las siglas de *Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif*.  
L-NAME: Éster metílico de NG-nitro-L-arginina  
LPS: Lipopolisacáridos.  
MHC: Moléculas del complejo principal de histocompatibilidad, por las siglas en inglés de *Major Histocompatibility Complex*.  
MHC-I: Moléculas de la clase i del MHC.  
MHC-II: Moléculas de la clase ii del MHC.  
MIF: Factor inhibidor de la migración de macrófagos, por las siglas de *macrophage Migration Inhibitory Factor*.

- MR: Receptor de manosa, por las siglas de *Mannose Receptor*.
- MyD88: Proteína adaptadora llamada Gen de respuesta primaria de diferenciación mieloides 88, por las siglas de *Myeloid differentiation primary response gene 88*.
- M $\phi$ aa: Macrófagos activados alternativamente.
- M $\phi$ ac: Macrófagos activados clásicamente.
- NF- $\kappa$ B: Factor nuclear de transcripción potenciador de las cadenas ligeras kappa de los linfocitos B activados, por las siglas en inglés de *Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*.
- NO: Óxido Nítrico, por su fórmula química y por las siglas en inglés de *Nitric Oxide*.
- OX40L: Ligando del receptor OX40.
- P4: Progesterona.
- PBS: Solución amortiguadora de fosfatos.
- PD-1: Receptor 1 de muerte celular programada, por las siglas en inglés de *Programmed cell Death-1*.
- PD-L1: Ligando 1 del receptor PD-1, por las siglas en inglés de *Programmed Cell Death Ligand-1*.
- PD-L2: Ligando 2 del receptor PD-1, por las siglas en inglés de *Programmed Cell Death Ligand-2*.
- RELM $\alpha$ : Molécula alfa semejante a la resistina, por las siglas de *REsistin-Like Molecule-Alpha*.
- RRP: Receptor de reconocimiento de patrones, por las siglas en inglés de *Pattern Recognition Receptor*.
- SFB: Suero Fetal Bovino.
- SHP-2 Proteína 2 con dominio NH2 terminal homólogo de Src y dominio fosfatasa de tirosina C terminal, por las siglas de *Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2*.
- STAT $\underline{x}$ : Factor de transcripción transductor de señales y activador de la transcripción  $\underline{x}$  (en donde  $\underline{x}$  es un número), por las siglas en inglés de *Signal Transducer and Activator of Transcription*.
- T. crassiceps*: *Taenia crassiceps*.
- T. solium*: *Taenia solium*.
- T4: Testosterona.
- TcES: Productos de excreción y secreción de *Taenia crassiceps*.
- TCR: Receptor de los linfocitos T, por las siglas en inglés de *T cell Receptor*.
- TGF- $\beta$ : Factor de crecimiento transformante beta, por las siglas en inglés de *Transforming Growth Factor beta*.
- T<sub>H</sub>: Linfocito T coadyuvador, por las siglas en inglés de *T Helper*.
- T<sub>H</sub>1: Linfocitos T coadyuvadores en el perfil 1 de activación.
- T<sub>H</sub>2: Linfocitos T coadyuvadores en el perfil 2 de activación.
- TLR- $\underline{x}$ : Receptor semejante a Toll número  $\underline{x}$  (en donde  $\underline{x}$  es un número), por las siglas en inglés de *Toll Like Receptor*.
- TNF: Factor de necrosis tumoral alfa, por las siglas en inglés de *Tumor Necrosis Factor*.
- TREM $\underline{x}$ : Receptor activador expresado en células mieloides  $\underline{x}$  (en donde  $\underline{x}$  es un número), por las siglas en inglés de *Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells  $\underline{x}$* .
- $\underline{y}^-$ : El signo – superíndice tras  $\underline{y}$  (donde  $\underline{y}$  es una molécula) indica que la célula no expresa  $\underline{y}$ .
- $\underline{y}^{-/-}$ : -/- superíndice después de  $\underline{y}$  (en donde  $\underline{y}$  es un gen o una molécula) indica que la célula o el animal es incapaz de expresar  $\underline{y}$ , pues el gen ha sido inactivado.
- $\underline{y}^+$ : El signo + superíndice tras  $\underline{y}$  (donde  $\underline{y}$  es una molécula) indica que la célula expresa  $\underline{y}$ .
- $\underline{y}^{\text{brillante}}$ : “brillante” superíndice tras  $\underline{y}$  (donde  $\underline{y}$  es una molécula) indica que la expresión de  $\underline{y}$  en la célula es densa.
- $\underline{y}^{\text{tenue}}$ : “tenue” superíndice tras  $\underline{y}$  (donde  $\underline{y}$  es una molécula) indica que la expresión de  $\underline{y}$  en la célula es escasa.
- $\alpha$ - $\underline{y}$ : Anticuerpo específico contra  $\underline{y}$  (en donde  $\underline{y}$  es una molécula). Por ejemplo,  $\alpha$ -CD80, anticuerpo específico contra CD80.

# Resumen

Los macrófagos son células pertenecientes al sistema inmune, distribuidos en todos los tejidos que poseen proliferación activa. Cumplen varias funciones en el mantenimiento de la homeostasis, como la remoción de células senescentes y detritos del espacio intersticial. Durante las infecciones los macrófagos tienen una amplia participación, detectan la presencia de agentes infecciosos, a los que pueden fagocitar, promueven la inflamación y además pueden servir como células presentadoras de antígenos. Las células presentadoras de antígenos se caracterizan por activar linfocitos T mediante la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) y de moléculas coestimuladoras como, CD80 y CD86. Por otro lado, los macrófagos pueden presentar distintos perfiles de activación. Por ejemplo, los macrófagos activados clásicamente promueven el desarrollo de inflamación, producen óxido nítrico contra los agentes infecciosos y activan a la respuesta inmune celular. Los macrófagos también pueden presentar un perfil asociado a la cicatrización, llamado activación alternativa. Estos macrófagos limitan el desarrollo de inflamación, participan en la remodelación de la matriz extracelular y suprimen la respuesta inmune celular.

Durante la cisticercosis murina por *Taenia crassiceps* (*T. crassiceps*), los macrófagos tienen una participación central en el establecimiento o eliminación del parásito. Los macrófagos activados clásicamente limitan el desarrollo del parásito mediante la producción de óxido nítrico y la producción de interleucina-12, una citocina que promueve la activación de la respuesta inmune celular y el perfil  $T_H1$  de los linfocitos. Sin embargo, al progresar la infección, los macrófagos activados clásicamente son sustituidos por macrófagos activados alternativamente que favorecen el crecimiento de las cargas parasitarias. Durante la cisticercosis, los macrófagos activados alternativamente suprimen la activación de los linfocitos T mediante la ruta de señalización de muerte celular programada-1 (PD-1, por la nomenclatura en inglés) expresando los ligandos de PD-1, PD-L1 y PD-L2. Las células presentadoras de antígenos de las cepas de ratón resistentes a la cisticercosis presentan mayor expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 en comparación a las cepas susceptibles, mientras que en la cepa susceptible, la expresión de PD-L1 y PD-L2 es mayor.

En la cisticercosis por *T. crassiceps*, también se ha reportado una fuerte relación entre el sexo del hospedero y la resistencia a la infección: las hembras desarrollan cargas

parasitarias mayores en comparación a los machos. Las diferencias en el desarrollo de las cargas parasitarias alcanzan significancia estadística entre la segunda y cuarta semana de infección. Durante este periodo, la respuesta inmune protectora  $T_H1$  es sustituida por una respuesta  $T_H2$  que resulta inocua al parásito. Las diferencias en resistencia entre los sexos dependen de los esteroides sexuales producidos por las gónadas del hospedero, el estradiol y la progesterona favorecen el crecimiento de las cargas parasitarias, mientras que los andrógenos testosterona y dihidrotestosterona confieren resistencia al hospedero. Los esteroides sexuales tienen efectos directos sobre el parásito, sin embargo, las diferencias en la resistencia asociadas al sexo del hospedero dependen del sistema inmune. En la cisticercosis, el tratamiento con andrógenos promueve la respuesta inmune  $T_H1$ , mientras que el tratamiento con estradiol acentúa la supresión de la respuesta inmune protectora. A pesar de que la cisticercosis ha sido ampliamente estudiada, no se conocen los mecanismos que generan las diferencias en la respuesta inmune  $T_H1$  entre los sexos.

En este trabajo, se estudió la relación entre el sexo del hospedero y la expresión de las moléculas del MHC-II, CD80, CD86, PD-L1 y PD-L2 en macrófagos peritoneales  $F4/80^+$  de ratones BALB/cAnN infectados con *T. crassiceps* o reclutados por los antígenos del parásito durante la primera semana de infección. Así mismo, se analizó el efecto *in vitro* de los esteroides sexuales 17-beta-estradiol, testosterona y dihidrotestosterona sobre la expresión de las moléculas del MHC-II, coestimuladoras (CD80 y CD86) y accesorias supresoras (PD-L1 y PD-L2) en los macrófagos cultivados en presencia del extracto total soluble del cisticerco de *T. crassiceps*. El fenotipo de los macrófagos se analizó mediante citometría de flujo. Encontramos que el reclutamiento de células al peritoneo de las hembras durante el sexto día de infección fue mayor en comparación a los machos. El número total de macrófagos también fue mayor en las hembras en comparación a los machos, sin embargo no observamos diferencias entre los sexos de la composición de las poblaciones celulares. No encontramos diferencias asociadas al sexo en el porcentaje o la densidad de expresión del MHC-II, CD80, CD86, PD-L1 o PD-L2. Si embargo, las hembras presentaron un mayor número de macrófagos expresando estas moléculas. La infección aumentó el porcentaje de macrófagos  $CD80^+$  y  $PD-L2^+$  en ambos sexos. La infección también disminuyó el porcentaje de macrófagos  $CD86^+$  y aumentó el de  $PD-L1^+$ , pero estas diferencias solo alcanzaron significancia en los machos.

A pesar de que las diferencias en significancia apuntan a posibles diferencias en la expresión de moléculas coestimuladoras y supresoras entre los sexos en tiempos más avanzados de la infección, nuestros resultados sugieren que durante la primera semana de infección no hay diferencias en la expresión de moléculas del MHC-II, coestimuladoras o accesorias supresoras en los macrófagos y que la expresión de estas moléculas no es regulada por los esteroides sexuales. Sin embargo, estos hallazgos sugieren que las diferencias en el reclutamiento de macrófagos durante la etapa aguda de la cisticercosis por *T. crassiceps*, podría ser uno de los mecanismos involucrados en las diferencias en la resistencia a la infección observadas entre los sexos.

# **I. Introducción**

### **i.i. El sistema inmune**

El sistema inmune está conformado por tejidos, células y moléculas especializadas en la defensa del organismo, al que protege contra la invasión o el daño causado por microorganismos, parásitos y células del cuerpo que han perdido su homeostasis (1).

Muchas de las funciones del sistema inmune dependen de los leucocitos, que son células producidas en la médula ósea y liberadas a la circulación. Los leucocitos son un grupo heterogéneo constituido por linfocitos, monocitos y células polimorfonucleares. Cada tipo de leucocito posee funciones especializadas y dependiendo del tipo se pueden encontrar en distintos tejidos o en la circulación (1).

La inmunidad se puede dividir en dos categorías: la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. Ambas categorías distinguen al organismo propio de lo ajeno, pero poseen mecanismos distintos para ello. El reconocimiento de elementos extraños, como agentes infecciosos o sus moléculas, desencadena una respuesta inmune. La inmunidad innata es la primera en responder, si la infección no es resuelta en el transcurso de minutos u horas, el sistema inmune innato y los antígenos del patógeno activarán a la inmunidad adaptativa, que idealmente eliminará a la infección y generará memoria inmune, la cual conferirá protección contra infecciones por el mismo patógeno (1).

### **i.ii. Inmunidad innata**

La inmunidad innata está conformada por las barreras físicas y químicas, como la piel y el moco, por células como los macrófagos, neutrófilos y eosinófilos y por moléculas como el sistema de complemento. Cuando un agente infeccioso atraviesa las barreras del organismo, es confrontado por las moléculas y células de la inmunidad innata. Las moléculas como el sistema de complemento tienen la capacidad de matar microorganismos, además de activar señales de peligro que causan el reclutamiento de células como los neutrófilos y los macrófagos, que a su vez poseen mecanismos para eliminar agentes invasores y sus productos (1).

Las moléculas que reconocen agentes extraños en la inmunidad innata son llamados receptores de reconocimiento de patrones (RRP), como su nombre indica, reconocen patrones moleculares que corresponden a organismos de Phyla o reinos distintos al propio, como las bacterias, hongos, parásitos protistas y helmintos. Estas moléculas están



presentes desde el nacimiento y son heredadas a la descendencia. Algunos de los monocitos como las células dendríticas y los macrófagos sirven de interfase entre la inmunidad innata y la adaptativa, reconociendo la presencia de agentes infecciosos y confiriendo señales de activación a los linfocitos de la inmunidad adaptativa (1).

### **i.iii. Los macrófagos**

Los macrófagos son células fagocíticas que se diferencian en los tejidos a partir de monocitos derivados de la médula ósea (2). Están presentes en todos los tejidos que poseen proliferación celular, en donde participan activamente en el mantenimiento de la homeostasis. Algunos autores definen a los macrófagos como “células de limpieza”, cuya función principal es la remoción de materiales extraños del espacio intersticial (3).

Los macrófagos cuentan con RRP como los receptores semejantes a TOLL (TLR, por sus siglas en inglés) que son receptores especializados en el reconocimiento de patrones moleculares que no se corresponden al propio organismo, y que se asocian a patógenos, como el ARN de doble cadena que distingue a algunos virus, o los lipopolisacáridos (LPS) presentes en las bacterias Gram positivo. El reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos por los TLR inicia cascadas de señalización, que conducen a la activación de las células de la inmunidad innata (4).

Además de los TLR, los macrófagos cuentan con otros RRP como los receptores Scavenger (en inglés, carroñero) y el receptor de manosa mediante los cuales reconocen señales de alteración en los tejidos, como células muertas, patógenos y sus productos o complejos inmunes, a los que fagocitan manteniendo las condiciones homeostáticas (2 y 3).

Algunas poblaciones de macrófagos proliferan *in situ*, y se considera que de esta manera renuevan a las poblaciones residentes en los tejidos, particularmente en ausencia de inflamación (5).

### **Funciones biológicas de los macrófagos**

**Fagocitosis:** captura de células muertas o moribundas, microorganismos como bacterias y hongos, virus, complejos inmunes, toxinas y alérgenos (2).

**Mantenimiento de la tolerancia inmune:** Los macrófagos en estado basal tienden a ser supresores. Por ejemplo, los macrófagos del intestino mantienen la tolerancia a la flora

intestinal. Otro ejemplo son los macrófagos de la zona marginal del bazo que mantienen la tolerancia a las células apoptóticas (2).

**Resolución de la inflamación:** Cuando se ha desarrollado una respuesta inmune contra un patógeno y la infección ha sido controlada, los macrófagos producen citocinas anti-inflamatorias o reguladoras como la interleucina-10 (IL-10) y el factor transformante de crecimiento beta (TGF- $\beta$ , por sus siglas en inglés) que promueven la resolución de la inflamación y el regreso a la homeostasis del tejido afectado (2).

**Cicatrización de heridas:** Algunos macrófagos secretan factores de crecimiento como el TGF- $\beta$  y otros productos como la ornitina, que promueve la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos y la síntesis de colágenos fibrilares intersticiales e inhibidores de las metaloproteasas (2).

### **Activación clásica de macrófagos**

Los estímulos en el ambiente del macrófago, como algunas citocinas y ligandos de los TLR pueden alterar el comportamiento de los macrófagos, induciendo la expresión de moléculas que caracterizan distintos perfiles funcionales o estados de activación.

La activación clásica fue descrita originalmente estimulando macrófagos con las citocinas factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interferón gama (IFN- $\gamma$ ). Sin embargo, la activación de la ruta de señalización intracelular mediada por la molécula “Gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88” (MyD88, por sus siglas en inglés), puede estimular la producción de TNF- $\alpha$  y satisfacer de manera autocrina el requerimiento de esta citocina para la activación de los macrófagos. Las señales de activación por los TLR y del receptor de IL-1 convergen sobre MyD88, por esta razón, algunos agonistas de los TLR pueden sustituir a TNF- $\alpha$  en la activación clásica de los macrófagos (3, 6 y 7).

Los macrófagos activados clásicamente se caracterizan por la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (también llamada Oxido Nítrico Sintasa 2 o iNOS) que produce grandes cantidades de óxido nítrico (NO) (8). Otra característica importante de la activación clásica de los macrófagos es la secreción de IL-12 (Tabla 1), esta citocina promueve la polarización hacia T<sub>H</sub>1 de los linfocitos T (que explicaremos más adelante) y la producción de IFN- $\gamma$  por las células NK, que a su vez promueve la activación clásica de

los macrófagos. Vale la pena mencionar, que el IFN- $\gamma$  promueve la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MCH, por sus siglas en inglés).

Los macrófagos activados clásicamente, pueden producir otros mediadores inflamatorios como IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$  y participan en la eliminación de bacterias y citotoxicidad a tumores, pero también en la patología de enfermedades autoinmunes e inflamatorias, como la artritis reumatoide (2, 3 y 6).

### **Activación alternativa de macrófagos**

Aunque el término “activación alternativa” no es satisfactorio para todos los autores, pues sugiere que solo hay dos formas de activación (clásica y alternativa), cuando en realidad se han descrito varios tipos funcionales de macrófagos que responden a estímulos distintos (3 y 6), en este trabajo nos referiremos a la activación alternativa de los macrófagos, como aquella que es inducida por IL-4, IL-13 y azúcares de los helmintos, ya que esta nomenclatura ha sido empleada en los estudios realizados en la cisticercosis y otras infecciones por helmintos (9 a 11).

Los macrófagos activados alternativamente se caracterizan por la expresión del receptor de manosa, de quitinasas y de moléculas semejantes, como Fizz1 y YM1. El receptor de manosa participa en la fagocitosis, mientras que las quitinasas Fizz1 y YM1 participan en la remodelación de la matriz extracelular. IL-4 también promueve la expresión de la enzima arginasa 1 (Arg1), que metaboliza L-arginina en urea y ornitina, un precursor de las poli-aminas y del colágeno (Tabla 1), contribuyendo a la cicatrización de heridas a la vez que compite con iNOS por la arginina (3 y 6).

Los macrófagos activados alternativamente promueven la diferenciación de linfocitos T<sub>H</sub>2 (que explicaremos más adelante), que secretan IL-4 e IL-13. Los macrófagos activados alternativamente también pueden secretar IL-10 que suprime la actividad de los linfocitos T<sub>H</sub>1, promoviendo la resolución de la inflamación y el regreso a la homeostasis (2).

<b>Características</b>	<b>Activación clásica</b>	<b>Activación alternativa</b>
<b>Citocinas secretadas</b>	IL-12	L-10
<b>Genes característicos</b>	<i>Nos2</i>	<i>Arg1, Ym1, FcγR1</i>
<b>Productos metabólicos de Arg</b>	NO	Urea y ornitina
<b>Moléculas de membrana</b>		MMR y PD-L2

**Tabla 1. Marcadores del tipo de activación de los macrófagos.** En la tabla se muestran algunos de los marcadores utilizados con mayor frecuencia para identificar el tipo de activación de los macrófagos. Cabe mencionar que dependiendo del contexto, los macrófagos pueden expresar distintas combinaciones de marcadores. Por ejemplo, macrófagos activados alternativamente que expresan el gen de la arginasa 1 *Arg1* y producen urea, pero no secretan IL-10.

### **Caracterización de los macrófagos**

El micro ambiente tiene un profundo efecto sobre el fenotipo de los macrófagos (5), dependiendo del tejido en el que se encuentren, se pueden reconocer distintos tipos de macrófagos con funciones especializadas. Por ejemplo, los osteoclastos en los huesos que participan en la remodelación ósea, o los macrófagos de la lámina propia que son muy eficientes en la eliminación de bacterias, pero secretan pocas citocinas pro-inflamatorias (2 y 5).

Los macrófagos al igual que las células dendríticas son células presentadoras de antígenos y comparten la capacidad de expresar moléculas del MHC y moléculas coestimuladoras (12). Aunado a esto, el empleo de algunas moléculas de membrana para caracterizar a los macrófagos, como CD11b que se expresa en todas las células del linaje mieloide, o el empleo de MAC2 que se expresa en a otros monocitos (2), ha generado confusión. Los macrófagos son células sumamente plásticas y expresan una amplia gama de receptores, varios de los cuales también son expresados por las células dendríticas, como CD11b y CD11c (2, 5 y 13).

A pesar de las similitudes entre macrófagos y células dendríticas, se ha propuesto que en el adulto, las células dendríticas provienen de un precursor distinto al que genera a los monocitos y a los macrófagos (13 y 14). La mayoría de los macrófagos se pueden reconocer por la expresión de la molécula F4/80, que ha pesar de expresarse en algunos

monocitos y células dendríticas, presenta una expresión distinguiblemente más densa en los macrófagos.

Los macrófagos peritoneales se caracterizan por una alta expresión de F4/80 y baja o nula expresión del marcador Gr1 (Ly6C/Ly6G) (13). Además de F4/80, la expresión del factor de transcripción PU.1 también puede ayudar a distinguir a los macrófagos (7).

#### **i.iv. Inmunidad adaptativa**

Los receptores que caracterizan a la inmunidad adaptativa son llamados receptores de antígeno, y son producidos por la recombinación de genes durante el desarrollo de los linfocitos. Cada linfocito posee un receptor con la capacidad de reconocer específicamente a un antígeno. A diferencia de los RRP, los receptores de antígeno no son heredados a la descendencia. Otra diferencia entre la inmunidad innata y la adaptativa consiste en la generación de memoria por la inmunidad adaptativa. La memoria inmune confiere protección a un individuo que ha resuelto una infección contra infecciones posteriores por el mismo patógeno (1).

La respuesta inmune adaptativa depende de dos tipos celulares, los linfocitos B y los linfocitos T. El receptor de antígenos de los linfocitos B es una inmunoglobulina y puede ser secretada en forma de anticuerpo. Los anticuerpos pueden reconocer varios tipos de moléculas, como proteínas, ADN o azúcares. Además, las inmunoglobulinas reconocen antígenos en solución. En contraste con el receptor de los linfocitos B, el receptor de los linfocitos T (TCR, por sus siglas en inglés) no es secretado ni reconoce antígenos en solución. El TCR reconoce la superficie formada por un péptido montado en una “surco” en las moléculas del MHC. Los péptidos presentados por las moléculas del MHC son derivados de la degradación de una proteína (1).

#### **Inmunidad celular e inmunidad humoral**

Históricamente, la inmunidad fue dividida en dos clases, la inmunidad celular y la inmunidad humoral. La parte adaptativa de la inmunidad celular depende de los linfocitos T específicos contra el antígeno al que se dirige la respuesta inmune, comprende las formas de inmunidad específica que no pueden ser transferidas por el suero. En contraste, la inmunidad humoral no requiere la transferencia de células para dar protección, es

transferida por el suero. La parte adaptativa de la inmunidad humoral depende de los anticuerpos producidos por los linfocitos B (1).

### **Los linfocitos T**

Los linfocitos T pasan la mayor parte de su desarrollo en el timo, en donde son seleccionados los linfocitos que pueden interactuar con moléculas del MHC, pero que no reaccionan contra péptidos derivados de proteínas propias del organismo. Durante este proceso de selección los linfocitos T se diferencian en dos tipos, los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Los linfocitos CD8<sup>+</sup> también llamados citotóxicos, participan en la lisis de células infectadas por virus o por parásitos intracelulares y reconocen péptidos presentados por moléculas de la clase I del MHC (MHC-I). En contraste, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> también llamados linfocitos T coadyuvadores (T<sub>H</sub>, por las siglas en inglés T helper) reconocen péptidos presentados en el MHC-II y participan en la gran mayoría de las respuestas inmunes regulando las funciones de otras células. Por ejemplo, cooperan con los linfocitos B para que produzcan anticuerpos, también incrementan la actividad citotóxica de los linfocitos CD8<sup>+</sup> y activan a las células de la inmunidad innata, como los macrófagos a los que pueden activar clásicamente o alternativamente (1).

### **Perfiles de linfocitos coadyuvadores (T<sub>H</sub>)**

Los linfocitos T<sub>H</sub> activan o inactivan a otras células mediante la secreción de moléculas llamadas citocinas. Las citocinas son mensajeros químicos del sistema inmune que al unirse a sus receptores, inducen la proliferación, diferenciación o muerte de la célula diana, es decir la célula que posee receptores para la citocina en cuestión. Los linfocitos T<sub>H</sub> se pueden diferenciar en varios perfiles funcionales, cada perfil confiere protección contra distintas infecciones. Los primeros perfiles en ser descritos fueron los linfocitos T<sub>H1</sub> y los linfocitos T<sub>H2</sub>, estos perfiles se pueden reconocer por las citocinas que secretan (1).

### **Linfocitos T<sub>H1</sub>**

La activación de los linfocitos T<sub>H1</sub> es inducida por las citocinas IFN- $\gamma$  e IL-12, que requieren de los factores de transcripción STAT1 y STAT4 para transducir las señales de los receptores al núcleo. Los linfocitos T<sub>H1</sub> se caracterizan por secretar las citocinas IL-2 e

IFN- $\gamma$ , IL-2 es un factor de crecimiento que actúa de manera autocrina en el linfocito y permite su proliferación. El IFN- $\gamma$  es una citocina que tiene varios efectos sobre el organismo, estimula la expresión de moléculas del MHC, induce actividades anti-virales en las células del cuerpo y participa en la activación clásica de los macrófagos, en los que promueve la expresión de iNOS y la producción de NO (1).

El perfil T<sub>H</sub>1 se ha relacionado a la protección contra infecciones por bacterias que se establecen en vesículas intracelulares, como *Mycobacterium leprae* que puede persistir en los macrófagos hasta que los macrófagos son activados por los linfocitos T<sub>H</sub>1, lo que resulta en la eliminación de las bacterias. Además de participar en el control de microorganismos que persisten en vesículas intracelulares, los linfocitos T<sub>H</sub>1 pueden participar de manera importante en el control de parásitos extracelulares grandes, como los helmintos, ya que la producción de mediadores tóxicos como las especies reactivas de oxígeno y NO por los macrófagos pueden dañar a los parásitos (1).

### **Linfocitos T<sub>H</sub>2**

La citocina IL-4, a través del factor de transcripción STAT6, promueve la diferenciación de los linfocitos T<sub>H</sub>2, que a su vez se distinguen por la producción de las citocinas IL-4, IL-5 e IL-13. Los linfocitos T<sub>H</sub>2 participan en la inmunidad contra patógenos extracelulares y en la defensa de las mucosas, las citocinas que producen son necesarias para la producción de inmunoglobulina E (IgE) por los linfocitos B. IL-4 e IL-13 estimulan la producción de moco por las células caliciformes. Mediante la secreción de IL-5 e IL-9 reclutan eosinófilos y basófilos a los sitios de inflamación, estas células responden a los complejos inmunes formados por IgE liberando sus gránulos que causan el reclutamiento de otras células, aumento de la permeabilidad vascular y el aumento de la contractibilidad del músculo liso (15). Estos mecanismos son importantes en la expulsión de parásitos intestinales y en las alergias. Vale la pena mencionar que los linfocitos T<sub>H</sub>2 antagonizan la diferenciación de los linfocitos T<sub>H</sub>1 y viceversa (1).

#### **i.v. Activación de los linfocitos T<sub>H</sub> vírgenes por las células presentadoras de antígenos.**

Los linfocitos T que han terminado su diferenciación en el timo, salen a la circulación sin estar activados, estos linfocitos son “vírgenes” y requieren condiciones especiales para su activación. Durante una respuesta inmune, la activación de los linfocitos T<sub>H</sub> depende las células presentadoras de antígenos. Las células presentadoras de antígenos capturan moléculas a las que procesan, es decir, degradan a las proteínas capturadas generando péptidos, los cuales presentan a los linfocitos T montados en las moléculas del MHC. Las células presentadoras de antígenos, como las células dendríticas y los macrófagos, pueden activar, modular y desactivar a los linfocitos T (16 y 17).

La activación de los linfocitos T vírgenes requiere al menos dos señales, la primera consiste en el reconocimiento del antígeno mediante el TCR, la segunda señal es conferida por moléculas coestimuladoras expresadas en la membrana de la célula presentadora de antígenos (16 y 17). Como mencionamos antes, el antígeno reconocido por el TCR es un complejo formado por un péptido que se encuentra montado en una molécula del MHC. Los linfocitos citotóxicos reconocen péptidos presentados en el MHC-I, la mayoría de estos péptidos son derivados de la degradación de proteínas presentes en el citosol celular y corresponden a las proteínas sintetizadas por la propia célula o proteínas derivadas de parásitos intracelulares. Todas las células del organismo que sintetizan proteínas expresan moléculas del MHC-I. En contraste, los linfocitos T<sub>H</sub> están restringidos a reconocer péptidos en moléculas del MHC-II. Los péptidos presentados en el MHC-II provienen del espacio extracelular y pueden derivar de células del organismo, bacterias o parásitos extracelulares como los helmintos. La expresión de moléculas del MHC-II, junto con la de moléculas coestimuladoras se limita a las células presentadoras de antígenos, entre las que se incluye a las células dendríticas, los linfocitos B y los macrófagos (16 y 17).

Las coestimulación necesaria para la activación de los linfocitos T<sub>H</sub> vírgenes es conferida por la expresión de moléculas pertenecientes a la familia B7.



### **i.vi. La familia B7 de moléculas coestimuladoras y supresoras.**

La familia B7 está constituida por moléculas de membrana que participan en la comunicación entre las células presentadoras de antígenos y los linfocitos T. De manera general, las moléculas de la familia B7 se expresan en las células presentadoras de antígenos y sus receptores en los linfocitos, los receptores de las moléculas de la familia B7 pertenecen a la familia de CD28. Ambas familias pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas, cuyas moléculas se caracterizan por estar conformadas por láminas beta (18 y 19).

La interacción de las moléculas accesorias de la familia B7 con sus receptores puede activar, modular, atenuar o terminar las respuestas inmunes. Las moléculas que promueven la activación de los linfocitos son llamadas coestimuladoras y las que suprimen la activación son llamadas supresoras. De manera general, las moléculas coestimuladoras de la familia B7 son CD80 (también llamada B7.1), CD86 (conocido como B7.2) e ICOSL, mientras que las moléculas supresoras de esta familia son PD-L1, PD-L2 y B7-H4. Sin embargo, dependiendo del receptor al que se unan, algunas de estas moléculas pueden tener papeles activadores o supresores, como es el caso de CD80, CD86 y B7-H3.

Además de la familia B7 de moléculas accesorias y la familia de CD28 de receptores, hay otras moléculas coestimuladoras y receptores que pertenecen a la familia del factor de necrosis tumoral (TNF, por la nomenclatura en inglés), como CD40 y su ligando (CD40L). En conjunto, las moléculas de las familias B7, CD28 y TNF forman una red de comunicación entre las células del sistema inmune y las células somáticas que coordina varias funciones del sistema inmune, las cuales van de la activación de los linfocitos T, de los linfocitos B y de los macrófagos, a la modulación, terminación de la respuesta inmune y el mantenimiento de la tolerancia (16 a 20).

#### **Las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86**

Los linfocitos T vírgenes requieren al menos dos señales para ser activados, la primera señal consiste en el reconocimiento del antígeno por el TCR, la segunda señal es conferida mediante la expresión de moléculas coestimuladoras en la membrana de la célula presentadora de antígenos. Las moléculas coestimuladoras son reconocidas por receptores

en los linfocitos T, principalmente CD28. Los ligandos de CD28 expresados por las células presentadoras de antígenos son CD80 y CD86.

Según la teoría de las dos señales, el reconocimiento del antígeno por el linfocito T virgen en ausencia de una segunda señal, llamada coestimuladora, causa la anergia o la muerte del linfocito y es un mecanismo para mantener la tolerancia (16).

A pesar de que existen otras moléculas coestimuladoras como ICOSL, CD80 y CD86 son las principales moléculas coestimuladoras en la activación de los linfocitos T vírgenes, pues los linfocitos T vírgenes expresan constitutivamente CD28 y la expresión de otros receptores para moléculas coestimuladoras como ICOS, es estimulada tras las interacciones de CD80 y CD86 con CD28 (16).

En las células presentadoras de antígenos la expresión de CD80 y CD86 es inducida o incrementada por el reconocimiento de señales de peligro, como la activación de los TLR (18).

CD80 y CD86 son moléculas homologas y sus genes comparten aproximadamente el 25% de similitud (21). La porción extracelular de ambas moléculas está conformada por un dominio IgV, un dominio IgC y ambas moléculas se anclan a la membrana mediante un dominio de anclaje transmembranal. CD80 y CD86 se unen a los receptores CD28 y CTLA4 (de las siglas en inglés de, antígeno 4 de los linfocitos T citotóxicos) expresados en los linfocitos T. La afinidad de CD80 y CD86 por CTLA4 es mayor en comparación a CD28. A pesar de las similitudes, existen algunas diferencias entre CD80 y CD86. Primero, la afinidad de CD80 por ambos receptores es mayor en comparación a CD86, sin embargo durante la interacción entre linfocitos T y células presentadoras de antígenos, CD86 parece tener preferencia por CD28, mientras que CD80 por CTLA4 (21). Por otro lado, la mayoría de las moléculas CD80 en la membrana celular se encuentra en forma de homodímeros, mientras que CD86 se mantiene en forma de monómero. Sin embargo, el entrecruzamiento de CD86 puede transducir señales a la célula en la que se expresa aumentando la traslocación al núcleo del factor de transcripción NF $\kappa$ -B (20).

CD86 se expresa de manera constitutiva en las células presentadoras de antígenos, mientras que la expresión CD80 es inducida gradualmente y es más estable. Las diferencias en la expresión de ambas moléculas se asocian a diferencias funcionales. *In vitro* CD80 favorece la diferenciación de linfocitos T<sub>H</sub>1, mientras que CD86 promueve el perfil T<sub>H</sub>2. En

línea con lo anterior, CD86 promueve la producción de IgE por los linfocitos B, un anticuerpo asociado al perfil T<sub>H</sub>2 (21).

Las diferencias funcionales entre CD80 y CD86 también se observan *in vivo*. En el modelo murino de diabetes autoinmune. En este caso, el bloqueo de CD86 disminuye el desarrollo de diabetes, mientras que el bloqueo de CD80 lo incrementa (21).

Además de su participación en la activación de los linfocitos, CD80 y CD86 también están involucradas en la regulación de la respuesta inmune, participan en el desarrollo de linfocitos T reguladores y en su función. Asimismo, CD86 transduce señales al interior de la célula presentadora de antígenos que inducen la expresión de la enzima idoleamina 2,3 dioxigenasa (IDO), una enzima que suprime la activación de los linfocitos T (16 y 20). De manera importante, CD80 y CD86 son ligandos del receptor inhibitorio CTLA4 que antagoniza las señales de activación conferidas por el TCR y CD28. CTLA4 se expresa en los linfocitos T después de haber sido activados y es requerido para regular la respuesta inmune, ya que la pérdida de funcionalidad de CTLA4 causa una condición letal caracterizada por la proliferación descontrolada e infiltración de linfocitos T en varios órganos (16).

Se ha propuesto que CTLA4 es más proclive a interactuar con CD80 y CD28 con CD86. De manera interesante, hay diferencias temporales en la expresión de CD80 y CD86, en las células dendríticas CD86 se expresa constitutivamente y la expresión de CD80 ocurre después, en los linfocitos T, CD28 se expresa constitutivamente y CTLA4 es inducido durante la activación, de manera que la interacción temprana y mayor afinidad de CD28 por CD86 promueven la activación de los linfocitos T, mientras que la expresión tardía de CTLA4 y CD80 favorecen la supresión del linfocito T (18).

### **Las moléculas supresoras PD-L1 y PD-L2**

Los macrófagos y las células dendríticas cuentan con varios mecanismos para modular la activación de los linfocitos T, como la secreción de citocinas reguladoras como IL-10 y TGF- $\beta$  y la expresión de moléculas de membrana, entre las que se incluye la ruta de comunicación de PD-1 (de las siglas de *programmed cell death-1*, también llamado CD279).

PD-1 es un receptor perteneciente a la familia de CD28 y se expresa en los linfocitos T, los ligandos de PD-1 son PD-L1 (CD274) y PD-L2 (CD273). A pesar de su nombre, las interacciones entre PD-1 y sus ligandos no necesariamente conducen a la muerte celular, sino al arresto del ciclo celular en G<sub>1</sub> (16).

PD-L1 y PD-L2 regulan la intensidad y duración de la respuesta inmune, también participan en la generación de tolerancia. Las alteraciones en esta ruta de regulación causan esplenomegalia y agravan el desarrollo de enfermedades inflamatorias y autoinmunes como la esclerosis múltiple y la encefalitis experimental autoinmune (19). Así mismo, se puede observar el desarrollo espontáneo de distintas formas de autoinmunidad dependiendo del fondo genético. Por ejemplo, los ratones PD-1<sup>-/-</sup> de la cepa C57BL/6 desarrollan artritis y glomerulonefritis, mientras que los ratones de la cepa BALB/cAnN desarrollan cardiomiopatía (16).

PD-1 está conformada por un dominio extracelular IgV, un dominio transmembranal y un dominio intracelular que señala mediante dos motivos basados en tirosina, un motivo inmuno inhibidor (ITIM, por sus siglas en inglés) y un motivo inmuno “interruptor” (ITSM, por sus siglas en inglés) (19 y 16).

En ausencia de activación del TCR, el entrecruzamiento de PD-1 no parece causar la transducción de señales en los linfocitos T. Sin embargo, cuando PD-1 es activado junto con el TCR, el entrecruzamiento de PD-1 por la interacción con sus ligandos, causa la fosforilación de las tirosinas en el dominio intracelular de PD-1 y el reclutamiento de la fosfatasa de tirosina SHP-2 (de la abreviación en inglés de, proteína 2 con dominio NH2 terminal homólogo de Src y dominio fosfatasa de tirosina C terminal), que resulta en la inhibición de las enzimas fosfolipasa C $\gamma$ 2, ERK1 y ERK2 (del inglés, cinasa reguladas por señal extracelular) y de la fosfatidilinositol-3-cinasa, que participan en la transducción de señales del TCR y CD28 (16 y 19).

PD-L1 tiene un peso de 40 kDa y posee una porción extracelular conformada por un dominio IgV y un dominio IgC además de un dominio de anclaje transmembranal, pero no posee dominio de señalización intracelular. En comparación, PD-L2 es más pequeña, pero también está conformada por un dominio IgV y un dominio IgC extracelulares y un dominio transmembranal de anclaje. PD-L1 se expresa de manera constitutiva en macrófagos y células dendríticas, también en la placenta y en células del epitelio

microvascular, su expresión puede ser inducida en otras células somáticas. En contraste, la expresión de PD-L2 se limita a monocitos y células dendríticas. A diferencia de PD-L1, PD-L2 no se expresa de manera constitutiva en los macrófagos y se ha propuesto que su expresión se relaciona a la activación alternativa de los macrófagos. En los monocitos, la expresión de PD-L1 y PD-L2 es inducida por la activación y el IFN- $\gamma$  (19 y 16).

Además de interactuar con PD-1, PD-L1 también puede interactuar con CD80 estimulando la expresión de receptores y la producción de citocinas en la célula presentadora de antígenos (19).

La interacción de PD-1 con PD-L1 o PD-L2 inhibe la respuesta proliferativa y producción de citocinas por los linfocitos T previamente activados, aún en presencia de señales coestimuladoras por CD80 o CD86. Los efectos de la interacción de PD-1 con sus ligandos dependen de la concentración del antígeno, en concentraciones de antígenos bajas, los efectos son más marcados, mientras que en concentraciones de antígeno elevadas PD-1 inhibe la producción de citocinas, pero no proliferación de los linfocitos (16).

*In vitro*, la proliferación inhibida por la ruta de señalización PD-1/PD-Ls se puede recuperar añadiendo IL-2 a los cultivos de linfocitos citotóxicos, pero no mediante la estimulación de CD28. En contraste, los linfocitos T colaboradores pueden proliferar a pesar de la señalización a través de PD-1 si CD28 es fuertemente estimulado (16).

### **i.vii. La cisticercosis murina por *Taenia crassiceps***

*T. crassiceps* es un parásito perteneciente a la clase *Cestoidea* del Phylum Plathelminthos. El ciclo de vida de este parásito transcurre en dos hospederos, el primero es un roedor, en el que se desarrolla la fase larvaria del parásito, llamada cisticerco. El segundo hospedero es un canino, que adquiere al parásito por consumir a un roedor infectado. La fase adulta del parásito, llamada tenia se desarrolla en el intestino del canino. La tenia es hermafrodita y se autofecunda, produciendo huevos que son liberados con las heces. Cuando los roedores ingieren los huevos de *T. crassiceps*, estos liberan una oncosfera, que atraviesa el intestino y a través de la circulación se aloja en los tejidos del roedor dando lugar a un cisticerco, de esta manera se completa el ciclo de vida del parásito (22).

Los cisticercos de *T. crassiceps*, particularmente de la cepa mutada ORF, pueden reproducirse por gemación en el hospedero intermediario. Esta característica tiene varias ventajas, por un lado, permite realizar la infección experimental, inyectando cisticercos en el peritoneo del hospedero, sin necesidad del desarrollo de la tenia en el hospedero definitivo. Por otro lado, el número de los parásitos que se desarrollan en el peritoneo (carga parasitaria), permite evaluar los factores de la resistencia del hospedero (23 y 22). La infección experimental por *T. crassiceps* ha sido útil en el estudio de la biología de los *Taeniidos* (22). *T. crassiceps* posee semejanzas con otros cestodos de interés clínico y veterinario como *Taenia solium*, causante de la cisticercosis porcina y de la neurocisticercosis humana, un problema de salud que persiste en México (24 a 30). Ambos parásitos comparten antígenos, que han sido empleados en el desarrollo de vacunas contra la cisticercosis porcina y de métodos de diagnóstico para la neurocisticercosis (31 a 39). Además de la similitud antigénica, entre *T. crassiceps* y *T. solium*, hay semejanza en los mecanismos de resistencia de sus respectivos hospederos (26, 40 y 41).

### **i.viii. La respuesta inmune en la cisticercosis**

#### **T<sub>H</sub>1 y T<sub>H</sub>2 en la cisticercosis**

La defensa del hospedero requiere mecanismos dependientes del timo, es decir, linfocitos T para ser eficiente en el control de la cisticercosis causada por *T. crassiceps* (42 y 43). Aunque la inmunidad humoral podría participar en la defensa del hospedero

bloqueando funciones biológicas del parásito (44), la inmunidad celular tiene un papel central en la resistencia contra la cisticercosis (42). En línea con lo anterior, la resistencia del hospedero depende de una respuesta inmune tipo  $T_H1$  (41 y 45). El desarrollo de la respuesta inmune  $T_H1$  contra el cisticerco depende de la producción de IL-12 y el factor de transcripción STAT4, que transduce las señales de IL-12 al núcleo de los linfocitos T activando su diferenciación hacia el perfil  $T_H1$  (45 a 48). Los linfocitos  $T_H1$  se caracterizan por secretar IL-2 que es un factor de crecimiento necesario para su proliferación, y por secretar IFN- $\gamma$ , una citocina que causa la activación clásica de los macrófagos, promueve la producción de NO y la expresión de moléculas del MHC. La producción de IL-2 e IFN- $\gamma$  por las células del bazo están relacionadas al control de la cisticercosis (45 y 46). De hecho, la protección conferida por las vacunas se asocia al desarrollo de una respuesta  $T_H1$  en el ratón (40) y en el cerdo (41).

A diferencia de otras infecciones por helmintos, en la cisticercosis la respuesta inmune  $T_H2$  aumenta la susceptibilidad del hospedero (49), pues bloquea la respuesta inmune  $T_H1$  (50). Los linfocitos  $T_H2$  se caracterizan por producir IL-4 e IL-13. En el ratón, estas citocinas inducen el cambio de isotipo a IgG1 e IgE, y participan en la activación alternativa de los macrófagos (10). STAT6 es un factor de transcripción necesario para la transducción de las señales de IL-4 al núcleo de las células y para la diferenciación de linfocitos  $T_H2$  (51). Los ratones deficientes de este factor de transcripción (STAT6<sup>-/-</sup>) son sumamente resistentes a la cisticercosis (48 y 50). El aumento de la secreción de citocinas TH2 (IL-4 e IL-13) se asocia al aumento de la carga parasitaria (52).

### **Supresión de la respuesta proliferativa de linfocitos T**

La cisticercosis por *T. crassiceps* causa anergia en los linfocitos T (53 y 54). Las células del bazo de los animales infectados pierden la respuesta proliferativa ante estímulos policlonales, como la concanavalina A y el entrecruzamiento del TCR por anticuerpos  $\alpha$ -CD3 (53). La supresión de las células del bazo, se puede observar desde la primera semana de infección (54) y difiere entre las cepas susceptibles y resistentes. Las cepas resistentes recuperan la respuesta proliferativa durante la segunda semana de infección, mientras que en la cepa susceptible, la supresión se acentúa (54). Se ha propuesto que en la cisticercosis, la supresión de los linfocitos  $T_H1$  promueve la polarización de la respuesta inmune hacia el

perfil T<sub>H</sub>2 (53). De hecho, en distintos contextos se puede observar que durante el transcurso de la infección, el patrón de producción de IL-4 por las células del bazo corresponde al patrón de pérdida de la respuesta proliferativa de estas células (45, 50 y 52).

### **Cambio de T<sub>H</sub>1 a T<sub>H</sub>2**

La respuesta inmune inicial contra el cisticerco de *T. crassiceps* es T<sub>H</sub>1 (49), o una mezcla de T<sub>H</sub>1 y T<sub>H</sub>2 (55), durante la infección crónica los niveles de IL-4 producidos por las células del bazo aumentan y los de IFN- $\gamma$  disminuyen (49 y 55). Vale la pena mencionar que el perfil de citocinas que se define durante la cisticercosis crónica (entre la cuarta y octava semana de infección), varía entre las cepas resistentes y las susceptibles. Las cepas resistentes, como la BALB/cJ y C57BL/6, mantienen la producción de IFN- $\gamma$  por las células del bazo a pesar de que los niveles de IL-4 aumentan (56 y 57), mientras que las células del bazo de los ratones BALB/cAnN producen más IL-4 e IL-13 y menos IFN- $\gamma$  en comparación a las cepas resistentes (58). El cambio del perfil de la respuesta inmune observado en el bazo se relaciona a cambios en el reclutamiento de células al sitio de infección. El incremento de las citocinas T<sub>H</sub>2 está acompañado por un aumento en el porcentaje de macrófagos alternativamente activados y eosinófilos en el peritoneo (Figura 1) (45).



### **Factores que promueven el cambio de T<sub>H</sub>1 a T<sub>H</sub>2**

A pesar de que aún no se definen los mecanismos que causan el cambio del perfil de T<sub>H</sub>1 a T<sub>H</sub>2 durante la cisticercosis murina, se han identificado varios factores que afectan este balance. Por ejemplo, el tamaño de las cargas parasitarias se relaciona a la producción de IL-4 e IFN- $\gamma$  por los linfocitos T (59). Por otra parte, algunos oligosacáridos presentes en los helmintos tienen la facultad de polarizar las respuestas inmunes hacia T<sub>H</sub>2, como es el caso de la Lacto-N-neotetraosa producida por *Schistosoma*. Este oligosacárido recluta una población de células supresoras derivadas de células mieloides (CD11b<sup>+</sup>/F4/80<sup>+</sup>/Gr-1<sup>+</sup>) con actividad supresora e inductores de la producción de IL-13 por los linfocitos T (9). *T. crassiceps* también posee carbohidratos con la capacidad de promover la producción de IL-4 e IgE (60).

### **Mecanismos efectores relacionados a la eliminación del parásito**

Muchos de los mecanismos de resistencia mediados por la inmunidad adaptativa dependen de la inmunidad innata para ejercer su efecto sobre el parásito. Por ejemplo, la secreción de IFN- $\gamma$  por los linfocitos T<sub>H</sub>1 estimula la activación clásica de los macrófagos y la expresión de la enzima iNOS. iNOS produce NO empleando L-arginina como sustrato. La producción de NO es el mecanismo efector de resistencia mejor descrito en la cisticercosis (47). La inhibición de la enzima iNOS empleando éster metílico de NG-nitro-L-arginina (L-NAME), resulta en un notorio aumento de las cargas parasitarias en los ratones BALB/cAnN y causa la pérdida de la resistencia en los ratones STAT6<sup>-/-</sup> (58). De manera interesante, la inhibición de la síntesis de NO anula completamente la protección asociada a la producción de IFN- $\gamma$  por las células del bazo (58).

Además del NO, se ha demostrado que los péptidos antimicrobianos pueden dañar al cisticerco, aunque no se sabe si estos participan en la respuesta inmune montada por el ratón contra *T. crassiceps* (61). También, se ha propuesto que la encapsulación del cisticerco por células del hospedero participa la eliminación del parásito (62).

### **La activación del TLR2 participa en la resistencia contra la cisticercosis murina**

La activación de los TLR promueve la resistencia contra la cisticercosis (63 y 64), en particular, el TLR2 participa en la respuesta inmune del hospedero contra el cisticerco

de *T. crassiceps* (64). Los ratones C57BL/6 a los que se les suprime la expresión de este receptor (TLR2<sup>-/-</sup>) pierden la resistencia a la infección, mientras que sus contrapartes silvestres eliminan la infección al cabo de unas semanas (64).

La pérdida de la resistencia en los ratones TLR2<sup>-/-</sup> se relaciona a el desarrollo de una respuesta inmune T<sub>H</sub>2, en donde se observa un incremento de los niveles IL-4 en el suero, también en la producción de esta citocina por las células del bazo estimuladas con antígenos del parásito (64). Así mismo, la deficiencia del TLR2 acentúa la supresión de la respuesta proliferativa, y disminuye la producción de IL-12, una citocina que promueve la activación de los linfocitos T<sub>H</sub>1 mediante STAT4 (64). De manera semejante, el tratamiento con oligodeoxinucleótidos CpG no metilados (que emulan el DNA de bacterias y activa al TLR9), aumenta la resistencia del hospedero a la cisticercosis. De manera interesante, el tratamiento con CpG le confiere más resistencia a los machos que a las hembras. En los machos aumenta el reclutamiento de macrófagos al peritoneo y de la expresión de iNOS, mientras que en las hembras, se reclutan más neutrófilos (63).

### **Células supresoras reclutadas por el cisticerco**

Los helmintos pueden reclutar distintas poblaciones de células supresoras, como las células supresoras derivadas de mieloides y los macrófagos alternativamente activados (9). *T. crassiceps* posee moléculas inmuno-moduladoras que reclutan una población de células supresoras Gr1<sup>+</sup>/F4/80<sup>+</sup>, esta población llega a su pico 24 horas después de la inyección de los extractos del cisticerco al peritoneo (65). Las células Gr1<sup>+</sup>/F4/80<sup>+</sup> suprimen la respuesta proliferativa de las células del bazo y se ha propuesto que participan en el establecimiento del parásito (65). Otros estudios presentan una relación entre la resistencia a la infección y la disminución del reclutamiento de células Gr1<sup>+</sup> (Ly6c) (63). Además de las células supresoras Gr1<sup>+</sup>/F4/80<sup>+</sup>, en periodos más avanzados de la infección se reclutan macrófagos activados alternativamente que también son supresores y promueven el establecimiento del perfil T<sub>H</sub>2 (56).

Las células supresoras Gr1<sup>+</sup>/F4/80<sup>+</sup> se pueden distinguir de los macrófagos por que los macrófagos peritoneales presentan una expresión baja o nula de Gr1, y una expresión claramente mayor de F4/80 en comparación a cualquier otra población (66). A diferencia

de los macrófagos alternativamente activados, el reclutamiento de las células Gr1<sup>+</sup>/F4/80<sup>+</sup> y su actividad supresora son independientes de la señalización por STAT6 (65).

### **Infección aguda**

En el desarrollo de la cisticercosis murina, se observa una sucesión de poblaciones celulares que se asocian a cambios en los perfiles T<sub>H</sub>1 y T<sub>H</sub>2 y a cambios en el desarrollo de las cargas parasitarias (9, 10 y 63). Durante las primeras horas de infección, hay un aumento en el número de eosinófilos y de células Gr1<sup>+</sup>/F4/80<sup>tenue</sup> en el peritoneo, estas células son gradualmente sustituidas por macrófagos (F4/80<sup>brillante</sup>/Gr1<sup>tenue</sup>) entre el tercer y séptimo día de infección (65 y 67). Los macrófagos reclutados durante la primera semana de infección son activados clásicamente y secretan NO e IL-12 (10). Los macrófagos activados clásicamente promueven proliferación de linfocitos y la diferenciación del perfil T<sub>H</sub>1 (10). En línea con lo anterior, durante las primeras 2 semanas de infección, las células del bazo presentan un perfil T<sub>H</sub>1 o una combinación T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2 (quizás un perfil T<sub>H</sub>0, caracterizados por producir una combinación de citocinas de distintos perfiles) y proliferan en respuesta a los antígenos de *T. crassiceps*. En este periodo la carga parasitaria tiene un crecimiento lento (49, 55 y 67). De manera interesante, durante la infección aguda el porcentaje de macrófagos que expresan las moléculas PD-L1 y PD-L2, dos moléculas que están involucradas en la actividad supresora de los macrófagos, alcanza sus valores máximos (67).

### **Infección crónica**

Durante la cuarta semana de infección, el patrón de respuesta cambia de T<sub>H</sub>1 a T<sub>H</sub>2, caracterizado por una marcada disminución de la secreción de IFN- $\gamma$  y un aumento de la producción de IL-4 por las células del bazo, que también dejan de proliferar en respuesta a antígenos del parásito o estímulos policlonales (49 y 68). Hay muchos ejemplos en la literatura en los que se muestra que si la infección no fue controlada antes de este periodo, el crecimiento de la carga parasitaria se dispara, llegando a ser el equivalente a la masa corporal del hospedero (10, 23, 49 y 64).

En el peritoneo se observan cambios en las funciones de los macrófagos. Dejan de secretar IL-12 y de producir NO, pero aumentan la secreción de IL-6 y de prostaglandinas

(10). A partir de este periodo, en los macrófagos aumenta la expresión de los marcadores de activación alternativa Arg1, Ym1, TREM2 y RELM $\alpha$ , además de la expresión de las moléculas supresoras PD-L1 y PD-L2 (10, 50, 59 y 67). Durante la infección crónica, los macrófagos peritoneales son inductores del perfil T<sub>H</sub>2 y supresores de la respuesta proliferativa de los linfocitos T (10).

### **i.ix. Los macrófagos en la cisticercosis por *Taenia crassiceps*.**

Los macrófagos afectan de manera relevante la resistencia del hospedero a la cisticercosis, dependiendo de su estado de activación promueven o limitan el crecimiento de la carga parasitaria. Por un lado, los macrófagos activados clásicamente limitan el desarrollo del parásito mediante la producción de NO y la secreción de IL-12. En contraste, los macrófagos activados alternativamente se relacionan al cambio del perfil T<sub>H</sub>1 a T<sub>H</sub>2 y al establecimiento del parásito (10, 58 y 67).

#### **Macrófagos activados clásicamente**

De manera interesante, los ratones cuyos linfocitos producen IFN- $\gamma$ , pero sus células peritoneales no producen NO son susceptibles a la cisticercosis, mientras que los ratones cuyos linfocitos no parecen producir IFN- $\gamma$ , pero cuyas células peritoneales producen NO son resistentes a la infección (47), esto sugiere que los mecanismos de resistencia estimulados por el IFN- $\gamma$  dependen, o al menos involucran, la producción de NO (58).

Las células del bazo de los ratones STAT6<sup>-/-</sup> no pierden la respuesta proliferativa y mantienen un perfil T<sub>H</sub>1, es decir, proliferan en respuesta a los antígenos del parásito y secretan IFN- $\gamma$ , a diferencia de sus contrapartes silvestres, cuyas células del bazo no proliferan, pero secretan IL-4 e IL-13. Los macrófagos de los ratones STAT6<sup>-/-</sup> producen más NO e IL-12, y menos IL-6 (50). Los macrófagos peritoneales de los ratones STAT4<sup>-/-</sup> infectados producen menos IL-1 $\beta$ , IL-12, TNF- $\alpha$  y NO en comparación a los ratones silvestres (45). En comparación, los macrófagos de los ratones STAT6<sup>-/-</sup> recuperados del peritoneo de ratones con 8 semanas de infección, producen NO y secretan IL-12, mientras que en los macrófagos de ratones silvestres se observa una marcada disminución de la secreción de IL-12 y NO y mayor secreción de IL-6 (50). Los macrófagos de los ratones a los que se les suprimió la expresión del factor inhibidor de la migración de macrófagos

(MIF<sup>-/-</sup>) infectados presentan un patrón de respuesta distinto al de los ratones silvestres al ser estimulados con IFN- $\gamma$  y LPS, los macrófagos MIF<sup>-/-</sup> secretan menos IL-12, NO y TNF- $\alpha$ , pero producen más IL-6 en comparación a los macrófagos de animales silvestres infectados (69). Durante la infección, la secreción de IL-12 y producción de NO es mayor en los macrófagos de los ratones C57BL/6 en comparación al los BALB/cAnN (56). En línea con lo anterior, tras 8 semanas de infección, los macrófagos de los ratones BALB/cAnN son más supresores de la respuesta proliferativa de linfocitos T en comparación a los macrófagos de los ratones C57BL/6 (56).

### **Macrófagos alternativamente activados**

Los carbohidratos de *T. crassiceps* podrían estar involucrados en la activación alternativa de los macrófagos y el cambio de T<sub>H</sub>1 a T<sub>H</sub>2 (60). Sin embargo, la activación alternativa de los macrófagos en la cisticercosis murina requiere la señalización a través de STAT6, lo que sugiere que en la cisticercosis, los macrófagos son activados alternativamente por IL-4 (10). La eliminación de los macrófagos peritoneales antes de la tercera semana de infección previene el cambio de T<sub>H</sub>1 a T<sub>H</sub>2 y reduce notablemente las cargas parasitarias (67). La cisticercosis murina causa la activación alternativa de los macrófagos peritoneales, caracterizada por un aumento de la transcripción de los genes mencionados previamente y del receptor de manosa, así como de la disminución de la síntesis de IL-12 e IL-23 (P40, P35 y P19) en respuesta al estímulo con LPS (70). La infección también aumenta la expresión de los marcadores de activación alternativa en las células de Kupffer de los ratones infectados y luego tratados con tetracloruro de carbono (CCl<sub>4</sub>) en comparación a los ratones no infectados y tratados con CCl<sub>4</sub>, en este caso la activación alternativa de las células de Kupffer se asocia al agravamiento de la fibrosis hepática (71).

A partir de la segunda semana de infección, se observa una mayor transcripción de marcadores de activación alternativa (Arg-1, Ym-1, TREM-2 y RELM $\alpha$ ) en los macrófagos de la cepa BALB/cAnN en comparación a los macrófagos de la cepa C57BL/6 (56).

### **Actividad supresora de los macrófagos**

Los macrófagos cuentan con un amplio repertorio de mecanismos que inhiben o suprimen la respuesta inmune, como las prostaglandinas, la producción de NO y la secreción de citocinas reguladoras. En la cisticercosis murina, la eliminación de los macrófagos en la infección temprana al igual que en la tardía previene la pérdida de respuesta proliferativa de los linfocitos T (67).

Entre la cepa susceptible BALB/cAnN y la cepa resistente C57BL/6 hay varias diferencias en la respuesta de los macrófagos a la infección, primero, la expresión de las moléculas accesorias supresoras PD-L1 y PD-L2 es menor en los macrófagos de los ratones resistentes (C57BL/6) durante todos los tiempos de la infección (56). Tras cuatro semanas de infección, los macrófagos (F4/80<sup>brillantes</sup>/Gr1<sup>tenue</sup>) presentes en el peritoneo de los ratones susceptibles a la infección suprimen la respuesta proliferativa de los linfocitos T por un mecanismo que requiere la interacción de moléculas en la membrana celular de ambas células (11). Este mecanismo involucra la expresión de PD-1 en los linfocitos T y la expresión de sus ligandos PD-L1 y PD-L2 en los macrófagos (11). La supresión causada por los macrófagos a partir de la cuarta semana de cisticercosis es independiente de IL-10, NO e IFN- $\gamma$  (11). La respuesta proliferativa de las células del bazo de los ratones infectados con *T. crassiceps* se recupera al bloquear PD-1 o sus ligandos (11).

La producción de IL-10 por los macrófagos durante las primeras cuatro semanas de infección es baja, pero es notoria en la octava semana de infección (11). A partir de la sexta semana de infección, se observa un incremento de macrófagos que expresan MR, PD-L1, PD-L2 y OX40L en los animales TLR2<sup>-/-</sup>, el incremento de esta población no se presenta en los ratones silvestres C57BL/6 (64).

### **Activación de linfocitos**

Los macrófagos al igual que las células dendríticas tienen la capacidad para migrar a los nódulos linfáticos y activar linfocitos T vírgenes (12). Se sabe que los macrófagos peritoneales obtenidos al inicio de la infección poseen la capacidad para activar linfocitos T<sub>H1</sub>, pero al avanzar la infección se vuelven supresores e inducen el perfil T<sub>H2</sub> (10).

### **Expresión de moléculas coestimuladoras en la cisticercosis**

Los productos de excreción/secreción de *T. crassiceps* (TcES) poseen actividad inmuno-reguladoras, la exposición de células dendríticas a TcES disminuye la capacidad de las células para activar linfocitos T y aumenta la producción de citocinas T<sub>H</sub>2 (72). Se ha propuesto que al menos parte de la inmuno-modulación causada por las moléculas de *T. crassiceps* consiste en la disminución de la expresión de CD80 y CD86, al menos en las células dendríticas (56 y 73). Los TcES pueden disminuir la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 en células dendríticas derivadas de médula ósea de ratones BALB/cAnN, que a su vez se vuelven menos eficientes en la activación de linfocitos T (56). De forma interesante, esto no ocurre con las células de ratones C57BL/6 que mantienen los mismos niveles de expresión de las moléculas coestimuladoras y la misma habilidad para inducir la activación de linfocitos T (56). Los TcES estimulan la expresión de las moléculas del MHC-II, pero no inducen la expresión de las moléculas PD-L1 o PD-L2 en las células dendríticas *in vitro* (73).

Los TcES no inducen la expresión de los marcadores de maduración CD80, CD83, CD86 o de moléculas del MHC-II en DC derivadas de monocitos de sangre periférica (72), ni estimula la secreción de citocinas pro-inflamatorias. En estas células, los TcES estimulan modestamente la secreción de IL-10. Sin embargo, los TcES también disminuyen la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 en las células dendríticas derivadas de sangre periférica humana estimuladas con LPS (72).

## **i.x. Factores biológicos del hospedero que afectan la resistencia a la cisticercosis.**

Se han descrito varias clases de factores biológicos que determinan la resistencia del hospedero en la cisticercosis murina, entre estos factores se encuentran los factores inmunes, algunos de los cuales ya hemos mencionado, factores genéticos y factores sexuales que son determinados por el sistema endocrino del hospedero. Los factores genéticos se pueden observar como diferencias en el desarrollo de las cargas parasitarias entre distintas cepas de ratón, siendo la cepa BALB/cAnN sumamente susceptible, BALB/cJ relativamente resistente y C57BL/6 sumamente resistente en comparación a BALB/c estas diferencias se han asociado al haplotipo del ratón (74).

El sexo del hospedero es un factor determinante en la resistencia del ratón durante la cisticercosis experimental murina. A pesar de que la forma de inoculación es igual en ambos sexos y que el parásito se reproduce en la cavidad peritoneal de machos y hembras, las hembras desarrollan cargas parasitarias mayores en comparación a los machos (74).

### **Dimorfismo sexual en la cisticercosis**

El dimorfismo sexual en la resistencia del hospedero a la cisticercosis por *T. crassiceps* es un fenómeno constante, se ha descrito en al menos 16 de 17 cepas de ratón en las que se ha estudiado la cisticercosis (75), y entre distintas cepas de *T. crassiceps* (76), en todos los casos los machos desarrollan cargas parasitarias menores que las hembras. Estas diferencias también se han observado en ratones infectados de forma natural en el campo. La susceptibilidad de la hembra a desarrollar cargas parasitarias mayores que los machos, las ha convertido en el hospedero de preferencia para la reproducción del cisticerco de *T. crassiceps* (77). En los primeros días de infección es difícil encontrar diferencias significativas en las cargas parasitarias entre los sexos, ya que los cisticercos se disgregan al ser inyectados en el peritoneo y no se observan cisticercos completos. Sin embargo, durante la primera semana se observan cisticercos completos, pero el número no varía entre los sexos. Dependiendo la cepa de ratón y del estudio, las diferencias en las cargas parasitarias entre los sexos alcanzan significancia entre la segunda y la cuarta semana de infección (49, 74, 78 y 79). De manera interesante, el dimorfismo sexual en la resistencia



de los ratones prevalece en los ratones inmunizados (33) y en los animales tratados con progesterona, en los que hay disminución de la resistencia (80).

Además del dimorfismo sexual en la resistencia del hospedero durante la cisticercosis murina por *T. crassiceps*, hay evidencia que sugiere que la cisticercosis por *T. solium* también es sexualmente dimórfica en el humano y en el cerdo (77). La frecuencia de la cisticercosis porcina aumenta en las hembras preñadas, y es mayor en los machos castrados en comparación a los machos intactos (25, 52 y 77). En el humano, a pesar de que no es claro si la neurocisticercosis es más frecuente en las mujeres que en los hombres (81), se han descrito diferencias en la respuesta inflamatoria entre mujeres y hombres (77, 82 y 83).

### **i.xi. Dimorfismo sexual inmune**

La cisticercosis no es un caso aislado de dimorfismo sexual en la resistencia/susceptibilidad a las enfermedades. De hecho, en la literatura se pueden encontrar varios ejemplos de dimorfismo sexual inmune. De manera general, en la etapa reproductiva las hembras son más resistentes que los machos a las infecciones por bacterias, presentan mayor sobrevivencia al choque anafiláctico y al choque hemorrágico, y tras estos traumas, el funcionamiento del sistema inmune es mejor en las hembras que en los machos (84 a 86). Sin embargo, la frecuencia de la mayoría de las enfermedades autoinmunes es mayor en las mujeres en comparación a los hombres (87). Considerando a las enfermedades autoinmunes en conjunto, aproximadamente el 80% de las personas afectadas son mujeres. En algunos casos, las diferencias llegan a ser tan contrastantes como en el lupus eritematoso sistémico, en donde el 90% de los casos ocurren en mujeres (87). Otros ejemplos son la esclerosis múltiple y la artritis reumatoide entre otras varias (78, 88 a 92). Las diferencias asociadas al sexo en las enfermedades autoinmunes se pueden observar en los modelos animales en condiciones de laboratorio, como en la encefalitis experimental autoinmune, un modelo de esclerosis múltiple, en donde la enfermedad no solo se presenta con mayor frecuencia en las hembras, también se desarrolla con mayor severidad (93 y 94).

Respecto a las infecciones por parásitos, además de la cisticercosis, hay otros ejemplos en los que uno de los sexos es notoriamente más resistente a la infección. Dos ejemplos de infecciones por protistas son la toxoplasmosis, en donde los machos son más

resistentes que las hembras (95), y las leishmaniasis que presentan manifestaciones más severas en los machos (96). En las esquistosomiasis causadas por los trematodos del género *Schistosoma*, también se observan diferencias entre los sexos en la resistencia a la infección (97). En todos estos ejemplos, las diferencias de susceptibilidad entre los sexos se asocian a diferencias en la respuesta inmune entre machos y hembras (86, 95 a 100).

Hay diferencias en el sistema inmune inherentes al sexo que se presentan durante la pubertad (101). Estas diferencias pueden ser observadas incluso en ausencia de infección. Por ejemplo, en los ratones BALB/cAnN se puede observar un mayor porcentaje de macrófagos en el bazo de los machos en comparación a las hembras, mientras que la producción basal de IFN- $\gamma$  es mayor en las hembras en comparación a los machos (102 y 103).

El dimorfismo sexual en la resistencia a la cisticercosis murina depende del sistema inmune (98), la eliminación quirúrgica del timo (timectomía) neonatal tiende a igualar las cargas parasitarias entre machos y hembras, sugiriendo que las diferencias en resistencia dependen de los linfocitos T (42). De manera semejante, las diferencias en susceptibilidad entre los sexos desaparecen en los animales cuyo sistema inmune ha sido comprometido por la irradiación de los ratones (43).

### **i.xii. Interacciones inmuno-endocrinas en la cisticercosis**

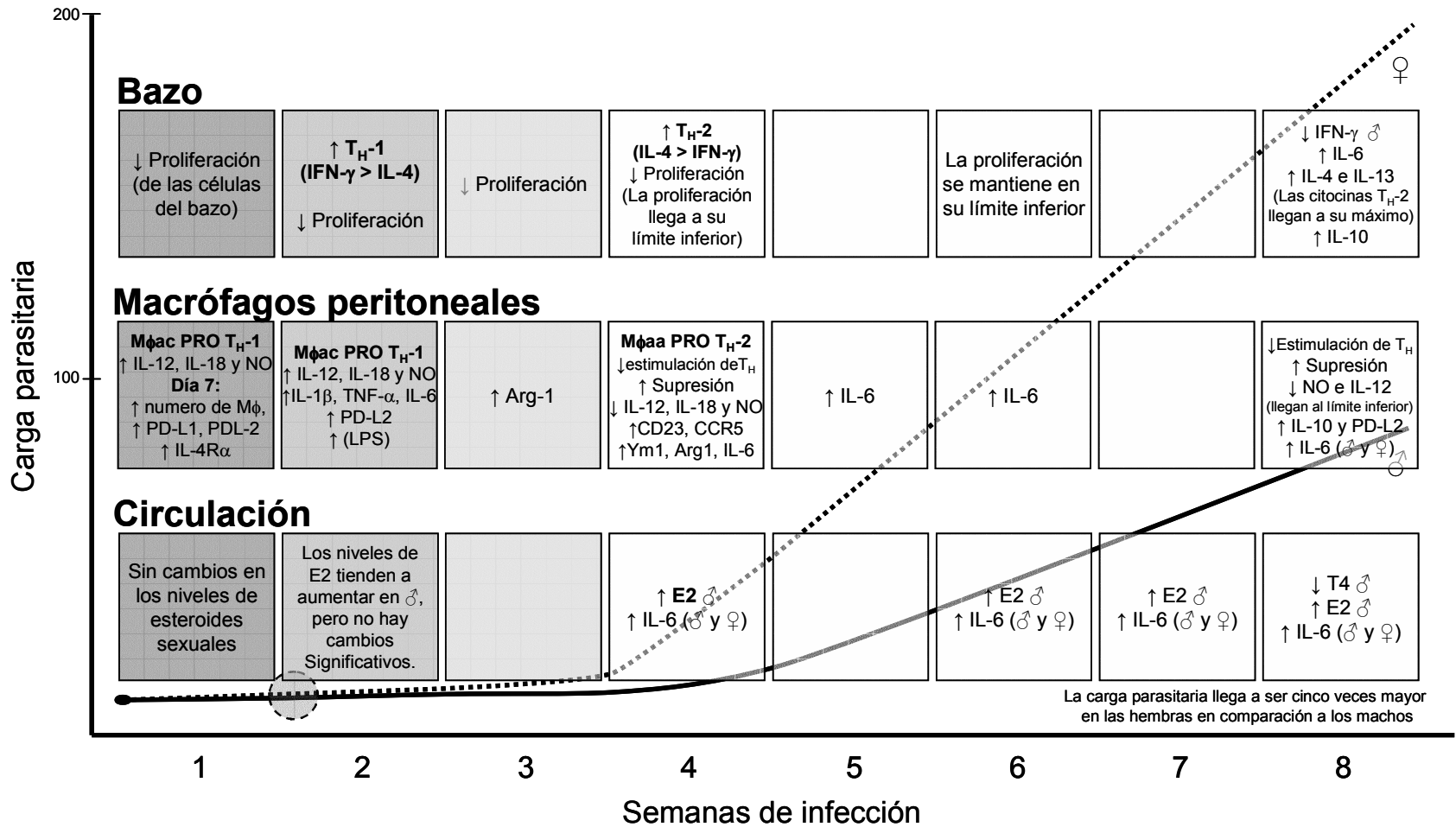
El dimorfismo sexual en la resistencia se debe a las interacciones entre el sistema inmune y el sistema endocrino del hospedero (104 a 110). Al igual que la timectomía y la irradiación, la eliminación quirúrgica de las gónadas (gonadectomía) iguala las cargas parasitarias entre machos y hembras. De manera interesante, la gonadectomía disminuye las cargas parasitarias en las hembras y las aumenta en los machos (79 y 98). Los esteroides sexuales tienen un profundo efecto sobre el sistema inmune (103). El 17 $\beta$ -estradiol (E2) producido en los ovarios favorecen el establecimiento del parásito, los andrógenos testosterona (T4) y dihidrotestosterona (DHT) producidos en los testículos limitan el crecimiento de las cargas parasitarias (79 y 104). En línea con lo anterior, la inhibición farmacológica de la síntesis o señalamiento del E2 aumenta la resistencia del hospedero a la infección (76 y 111). La inhibición de la síntesis de E2 causa un notable aumento de la respuesta proliferativa de los linfocitos T contra los antígenos de *T. crassiceps* (111) al

igual que la gonadectomía y el tratamiento con los andrógenos T4 o DHT, en ambos casos la resistencia del hospedero aumenta (79). El tratamiento con E2 en los animales gonadectomizados causa los efectos contrarios: acentúa la pérdida de la respuesta proliferativa y aumenta considerablemente las cargas parasitarias (79).

Los cambios en la resistencia causados por los tratamientos con E2 o los andrógenos T4 y DHT se relacionan a cambios en el perfil de citocinas producidos en el bazo en respuesta a los antígenos de *T. crassiceps*, el tratamiento con andrógenos promueve la producción de las citocinas T<sub>H</sub>1 IL-2 e IFN- $\gamma$ , mientras que el tratamiento con E2 disminuye la producción de ambas citocinas (79).

Las interacciones inmuno-endocrinas en la cisticercosis son bidireccionales (97), así como el sistema endocrino regula a la respuesta inmune, la infección causa la feminización del macho, en el que los niveles en suero de T4 y DHT se reducen notoriamente y los de E2 aumentan, pues la T4 es metabolizada a E2, generando un ambiente hormonal en el macho equiparable al de la hembra. La feminización del macho requiere del sistema inmune y la producción de las citocinas IL-6 y MIF (43, 111 a 113). Se ha propuesto que este proceso es una adaptación del parásito que le facilita establecerse en un hospedero que de otra manera es hostil (79, 108 y 114). El proceso de feminización del macho coincide con la aceleración en el crecimiento de la carga parasitaria y el cambio de respuesta de T<sub>H</sub>1 a T<sub>H</sub>2 en el macho (Figura 1) (108).

El ambiente endocrino del hospedero puede afectar la carga parasitaria, sin presentar necesariamente una relación con la respuesta T<sub>H</sub>1. Por ejemplo, el tratamiento con progesterona aumenta las cargas parasitarias en los animales intactos de ambos sexos, a pesar de promover un perfil tipo T<sub>H</sub>1 en las células del bazo, caracterizado por el incremento de la expresión del gene de IFN- $\gamma$  y disminución de la transcripción de los genes de IL-4, IL-6 e IL-10 (80). En contraste, el tratamiento con progesterona en los animales gonadectomizados causa resistencia contra la cisticercosis generando también una respuesta T<sub>H</sub>1 y el metabolismo de la progesterona a dehidroepiandrosterona (DHEA) (115). Por otro lado, el tratamiento neonatal con E2, que resulta en la alteración del sistema endocrino del ratón, causa una fuerte resistencia a la infección a pesar de aumentar la producción de IL-4 por las células del bazo en respuesta a los antígenos del parásito (116).



**Figura 1.** Las primeras 8 semanas de la cisticercosis murina por *T. crassiceps*. En la figura se resumen los eventos más relevantes durante la cisticercosis por *T. crassiceps* descritos en el bazo, los macrófagos peritoneales y los cambios hormonales en la circulación, sobrepuestos al crecimiento de las cargas parasitarias en hembras (línea punteada) y machos (línea sólida). Las diferencias en las cargas parasitarias entre los sexos son significativas a partir de la segunda semana. ↑, Aumenta; ↓, disminuye; ♀, en las hembras; ♂, en los machos; Mφac, macrófago activado clásicamente; Mφaa, macrófago activado alternativamente. Los cuadros grises representan el periodo agudo de la infección. Durante la cuarta semana de infección ocurre la feminización del macho, el cambio de TH1 a TH2 y la activación alternativa de los macrófagos, a partir de este punto el crecimiento de las cargas parasitarias se acelera en ambos sexos.

## **II. Justificación**

Los esteroides sexuales pueden afectar directamente al cisticerco, el E2 promueve la reproducción e infectividad del parásito, mientras que los andrógenos T4 y DHT, así como la DHEA limitan su gemación *in vitro* (117 a 119). No se ha podido establecer la diferencia inmunológica asociada al sexo que determina las diferencias en la carga parasitaria (77).

A pesar de la extensa investigación realizada en la cisticercosis experimental murina sobre el dimorfismo sexual, el efecto de los esteroides sexuales y la respuesta inmune, aún no se conocen los mecanismos que causan las diferencias entre los sexos en la respuesta inmune adaptativa contra el parásito. El papel de la presentación antigénica en las diferencias observadas entre los sexos en la susceptibilidad a la infección no ha sido estudiado. Tampoco hay información en la literatura en la se compare la expresión de las moléculas accesorias supresoras PD-L1 y PD-L2 entre los sexos.

# **III. Hipótesis**

Durante la primera semana de la cisticercosis experimental murina por *T. crassiceps*, la expresión de moléculas del MHC-II, moléculas coestimuladoras y accesorias supresoras en los macrófagos es diferencial entre los sexos y es regulada por los esteroides sexuales estradiol y dihidrotestosterona.



# **IV. Objetivos**

## **Objetivo general**

Determinar la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86, de las moléculas accesorias supresoras PD-L1 y PD-L2, así como de las moléculas del MHC-II en los macrófagos de machos y hembras durante la cisticercosis murina por *Taenia crassiceps*.

## **Objetivos particulares**

- i. Comparar la carga parasitaria entre machos y hembras durante la primera semana de cisticercosis por *T. crassiceps*.
- ii. Analizar mediante citometría de flujo diferencias entre los sexos, en la expresión del MHC-II, CD80, CD86, PD-L1 y PD-L2 en macrófagos reclutados al peritoneo durante la cisticercosis aguda por *T. crassiceps*.
- iii. Determinar el papel del sexo sobre la expresión de las moléculas del MHC-II, coestimuladoras y accesorias supresoras en los macrófagos de animales sanos, cultivados con extracto total soluble de *T. crassiceps*.
- iv. Evaluar el efecto *in vitro* de los esteroides sexuales estradiol y dihidrotestosterona sobre la expresión de las moléculas del MHC-II, CD80, CD86, PD-L1 y PD-L2 en macrófagos de animales sanos, cultivados en presencia del extracto total soluble de *T. crassiceps*.

# **V. Diseño Experimental**

# In vivo

## Grupos experimentales

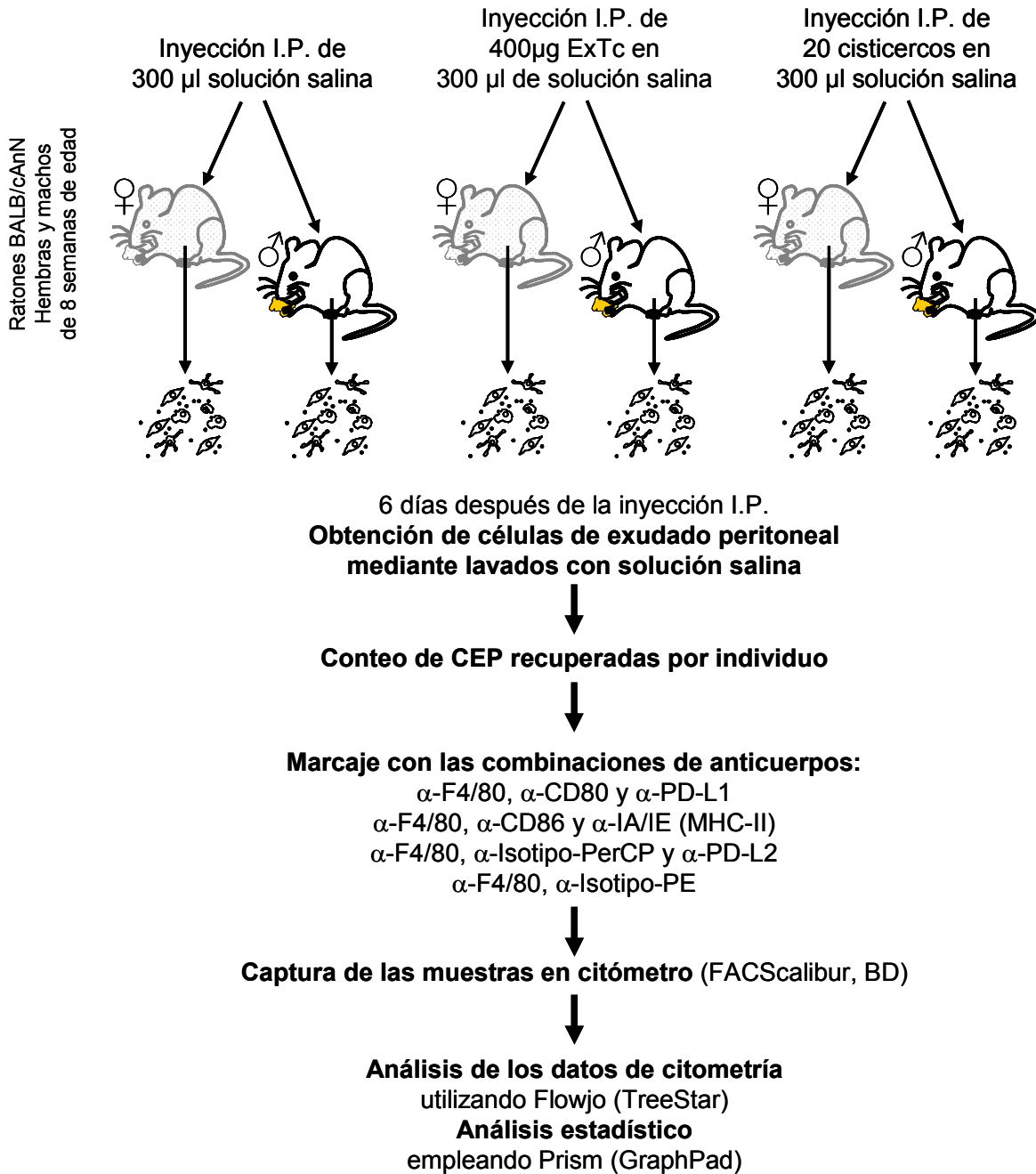
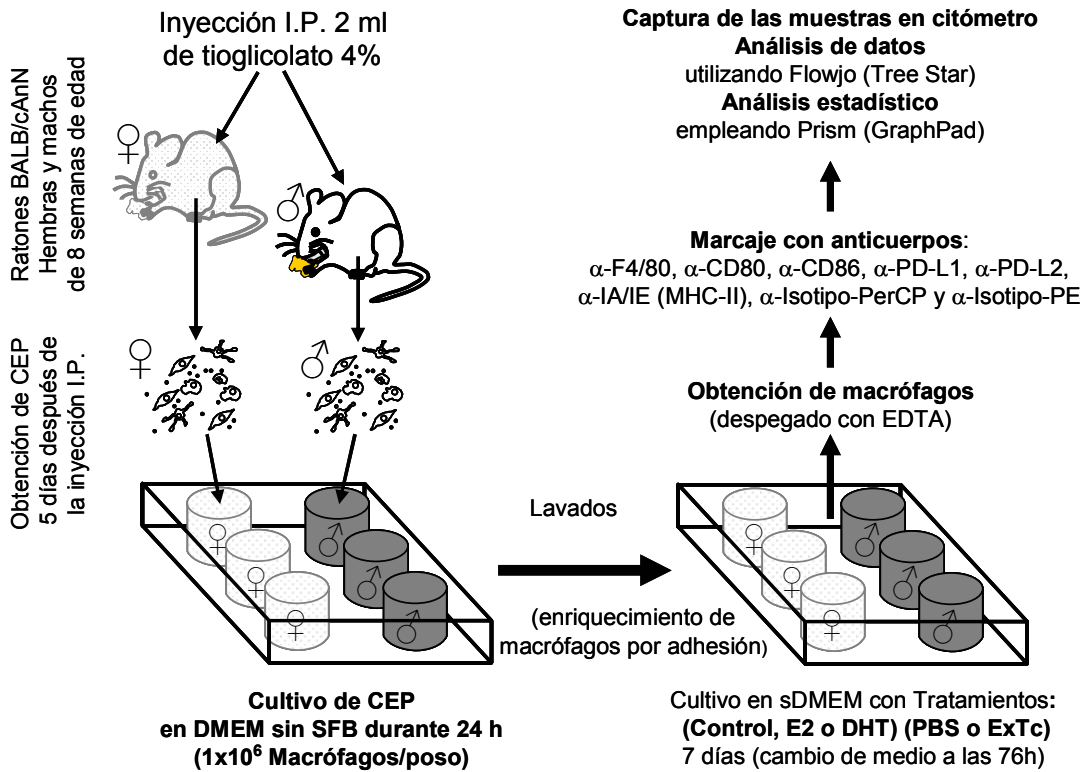


Figura 2. Diseño de los experimentos *in vivo*.

# In vitro



## Tratamientos *in vitro*

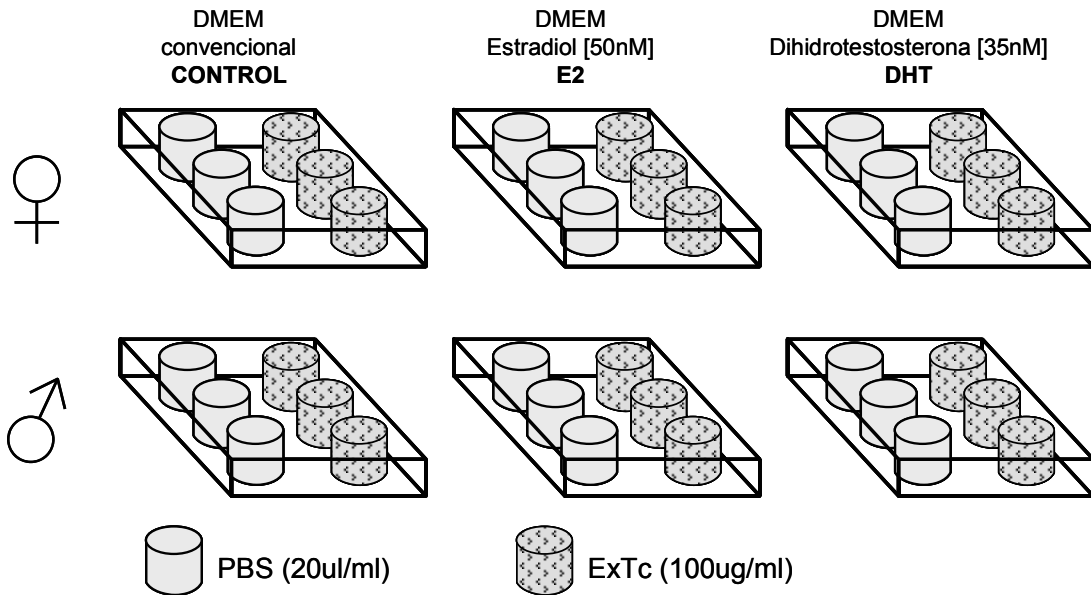


Figura 3. Diseño de los experimentos *in vitro*.

# **VI. Materiales y Métodos**

#### **vi. i. Declaración de principios éticos.**

El comité de cuidado y uso animal del Instituto de Investigaciones Biomédicas evaluó el cuidado animal y las prácticas experimentales conforme a las regulaciones de la Norma Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) en estricto acuerdo con las recomendaciones en la guía para el cuidado y empleo de animales de laboratorio del *National Institutes of Health* (NIH and the Weatherall Report). El Comité de Ética del Instituto de Investigaciones Biomédicas aprobó este protocolo (Número de permiso: 2009-13).

#### **vi. ii. Animales.**

En este estudio se emplearon ratones hembras y machos de la cepa BALB/cAnN (H2-d) obtenidos de Harlam (Ciudad de México). Los animales se mantuvieron en las instalaciones del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, (UNAM), en condiciones de temperatura controladas y ciclos de luz-obscuridad de 12 horas, con luz de las 7:00 a las 19:00 horas. Los animales se alimentaron con Purina Diet 5015 (Purina, St. Louis, MO) y agua esterilizada *ad libitum*.

#### **vi. iii. Preparación de antígenos de *T. crassiceps* e infección experimental.**

En condiciones asépticas, se extrajeron los cisticercos de la cepa ORF de *T. crassiceps* de hembras con 4 meses de infección. Los cisticercos fueron lavados con solución salina estéril (Solución CS, Laboratorios PISA S.A. de C.V. [NaCl 0.98]) fría. El extracto soluble de *T. crassiceps* (ExTc) se preparó en condiciones asépticas y en frío, homogenizando cisticercos completos mediante 3 pulsos de 60 Hz con una duración de 1 segundo, utilizando un homogenizador ultrasónico (Vibracell, SONICS & MATERIALS, Newtown, USA). Los homogenizados fueron centrifugados a 200 g, 4°C durante 30 minutos, se colectaron los sobrenadantes con los antígenos solubles y se mantuvieron a -20°C hasta ser empleados. La concentración de proteínas en el ExTc se estimó por el método de Bradford empleando un paquete comercial (BioRad). Se realizaron 3 tratamientos distintos en ratones de ambos sexos, un tratamiento consistió en la infección con la cepa ORF de *T. crassiceps* que se realizó inyectando intraperitonealmente (i.p.) 20 cisticercos (de aproximadamente 2 mm de diámetro y sin gemas) suspendidos en 300 µl de solución salina. Otros ratones recibieron una inyección intraperitoneal de 400 µg de ExTc

en 300 µl de solución salina, y los grupos controles recibieron 300 µl de solución salina. Seis días después de haber sido inyectados, los ratones se sacrificaron por una sobredosis de Sevofluorano (Sevorane, Abbott) y las células peritoneales se colectaron para ser analizadas.

#### **vi. iv. Obtención de células de exudado peritoneal (CEP).**

Se obtuvieron las células de exudado peritoneal (CEP) de ratones hembras y machos inyectados con solución salina, ExTc o infectados. La obtención de las CEP se realizó tras haber sacrificado a los ratones por dosis letal de Sevofluorano (Seborane, Abbot) inhalado, los ratones se sumergieron en etanol al 70%, en condiciones de asepsia, se retiró 1 cm<sup>2</sup> de piel del abdomen, exponiendo la membrana peritoneal. Con cuidado de no causar hemorragias o perforar los órganos, se inyectaron i.p. 7 ml de solución salina estéril fría utilizando una aguja 30G y se dio masaje al abdomen durante aproximadamente 30 segundos, posteriormente se recuperaron 6 ml de la solución salina con las CEP del peritoneo utilizando una jeringa con aguja 21G, las CEP fueron transferidas a tubos Falcon de 15 estériles (BD Falcon<sup>TM</sup>, EUA), el volumen se ajustó a 14ml con solución salina estéril fría y las células se mantuvieron en hielo hasta ser centrifugadas. Los tubos se centrifugaron a 30 g durante 7 minutos a 4°C, la solución salina se decantó y fue sustituida por nueva solución salina, ajustando nuevamente a 14 ml y se repitió el proceso de centrifugado y decantado. En este punto, se evaluó la viabilidad de las células por exclusión de azul tripan (rutinariamente mayor al 95%) y se contaron las células viables utilizando un hemocitómetro. Las células empleadas para análisis por citometría se ajustaron a 1×10<sup>6</sup> CEP por ml de solución salina estéril.

#### **vi. v. Evaluación de la carga parasitaria**

Ratones hembras y machos fueron infectados con 20 cisticercos utilizando una aguja G21. Después de haber recuperado las CEP de los ratones infectados, se realizó una incisión en la membrana peritoneal. Cuidadosamente, los órganos contenidos en el peritoneo fueron vertiendo en una caja de Petri y enjuagados con solución salina, los órganos del ratón y la cavidad peritoneal se examinaron en búsqueda de cisticercos.



#### **vi. vi. Obtención y cultivo de macrófagos**

Para los análisis *in vitro* se emplearon macrófagos peritoneales reclutados por tioglicolato de Na, obtenidos de la siguiente manera: se inyectaron 2ml de tioglicolato de Na al 3% estéril (Merck Millipore, México) i.p. utilizando una jeringa 30G a ratones hembras y machos. 5 días después de la inyección, los ratones fueron sacrificados por dosis letal de Sebofluorano inhalado, se sumergieron en etanol al 70% y en condiciones asépticas se obtuvieron las CEP como se describe en el punto anterior. El enriquecimiento de macrófagos se realizó cultivando en cajas de cultivo con 6 pozos (Corning®, Sigma-Aldrich, EUA),  $2 \times 10^6$  CEP en 1.5 ml del medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma Aldrich, EUA), suplementado con 20 mM HEPES, 2 mM L-glutamina, 0.1 mM aminoácidos no esenciales, 1% de penicilina/estreptomicina y 0.05 mM  $\beta$ -mercaptoetanol. Los cultivos se mantuvieron durante 3 a 4 horas en una atmósfera húmeda  $\text{CO}_2$  5% a  $36^\circ\text{C}$ . Transcurrido este tiempo, se retiró el medio drenando a las células no adherentes, se agregaron 1 ml de DMEM y 1 ml de solución de fosfatos (PBS, estéril) con 0.05% EDTA, las células adheridas a la placa de cultivo se incubaron durante 5 minutos a  $36^\circ\text{C}$ , posteriormente, las células adherentes se rasparon utilizando un gendarme estéril. Las células se transfirieron a un tubo Falcon de 15 ml y el volumen se ajustó a 14 ml de DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, inactivado y filtrado). Las células se centrifugaron a 30 g durante 7 minutos a  $4^\circ\text{C}$ , el medio se decantó y se resuspendieron en 1 ml de DMEM. En este punto se analizó la viabilidad de las células que fue normalmente mayor al 90%, las células se ajustaron a  $1 \times 10^6$  en 1 ml de DMEM suplementado con 10% de SFB. Se sembraron  $1.5 \times 10^6$  células adherentes en 2 ml de DMEM suplementado con 10% de SFB.

#### **vi. vii. Tratamientos hormonales y con antígenos de *T. crassiceps* in vitro.**

Para analizar el efecto de los estrógenos y andrógenos, así como de los antígenos de *T. crassiceps* sobre la expresión de las moléculas estudiadas, se cultivaron macrófagos (células adherentes) en presencia de concentraciones fisiológicas de  $17\beta$ -estradiol (E2) o dihidrotestosterona (DHT) más 100  $\mu\text{g}$  de ExTc en 20  $\mu\text{l}$  de solución salina o solución salina como control. El tratamiento con E2 se realizó con DMEM suplementado con 50 nM  $17\beta$ -estradiol encapsulado en ciclodextrina (Sigma-Aldrich, EUA) que es soluble en agua. Para

el tratamiento con DHT se empleo DMEM suplementado con 35nM de DHT (Sigma-Aldrich, EUA). La DHT se diluyo en etanol absoluto a una concentración de 1 mM y sucesivamente diluida en DMEM. Como control se empleo la dilución de etanol en DMEM. Todas las preparaciones hormonales fueron filtradas por 0.22  $\mu$ m. El medio de cultivo se renovó cada tercer día con sus respectivos tratamientos. El séptimo día de cultivo, se recupero el medio de cultivo y se conservo a -70°C. Las células se despegaron de la caja de cultivo resuspendiendo en 1 ml de DMEM más 1 ml de PBS EDTA al 0.05% e incubando 5 a 7 minutos a 36°C y posteriormente, colocando las células en frío y utilizando un gendarme. Las células se resuspendieron en solución salina, se lavaron y se analizó la viabilidad que en este punto fue normalmente mayor al 90%. Las células se ajustaron a  $1 \times 10^6$  células por ml y la expresión de los marcadores fue analizada por citometría de flujo.

#### **vi. viii. Análisis de la expresión de marcadores en la superficie de los macrófagos.**

La expresión de moléculas en la membrana de las CEP se analizo mediante citometría de flujo. Las CEP se suspendieron en solución de fosfatos (PBS) con 2% de suero fetal bovino y 0.02%  $\text{NaN}_3$ . Los receptores de fragmento constante de las inmunoglobulinas (FcR) fueron bloqueados incubando las células durante 20 minutos a 4°C con anticuerpos  $\alpha$ -CD16/CD32 de ratón. Posteriormente las células se marcaron con una combinación de tres anticuerpos, utilizando anticuerpos  $\alpha$ -F4/80 conjugados a alofococianina (APC), anticuerpos conjugados a ficoeritrina (PE)  $\alpha$ -CD86 o  $\alpha$ -PD-L2, anticuerpos conjugados a PerCP  $\alpha$ -IA/IE (moléculas de la clase ii del complejo principal de histocompatibilidad), anticuerpos conjugados a PE-Cy5  $\alpha$ -CD80, anticuerpos conjugados a biotina  $\alpha$ -PD-L1 y estreptoabidina conjugada a PE-Cy5. Todos los anticuerpos fueron adquiridos de BioLegend (BioLegend, San Diego, California, EUA). Tras haber sido marcadas, las células se fijaron en PBS con 0.5% de formaldehído.

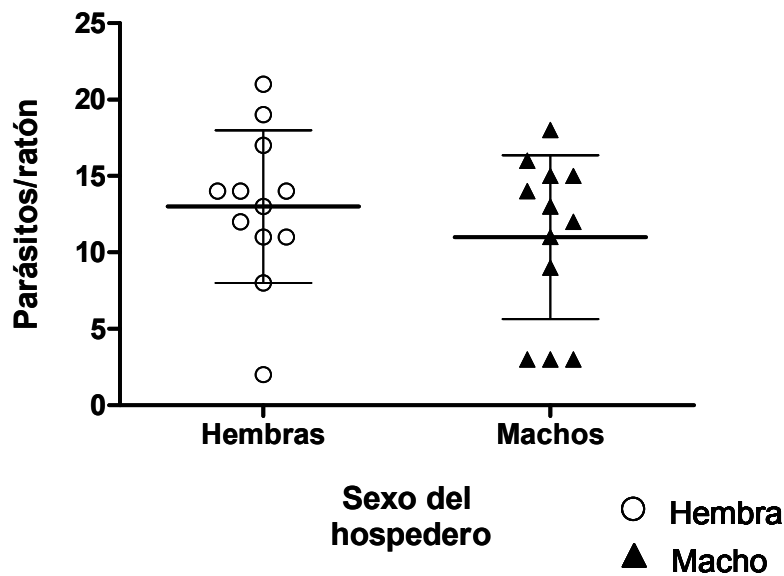
Las células marcadas se capturaron utilizando un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson) y los datos se analizaron empleando el software FlowJo (TreeStar). Los números absolutos en los ensayos se calcularon conforme al número de CEP obtenidas de cada individuo y el porcentaje de macrófagos que expresaron cada marcador. El porcentaje de células positivas se calculo por el método de substracción de Overton, comparando la

población de interés contra el control de isotipo correspondiente. La intensidad media relativa (IMR) se calculó dividiendo la señal media de fluorescencia de la población de interés sobre la media de fluorescencia del control de isotipo de la misma población.

**vi. ix. Análisis estadístico.**

Los datos obtenidos de tres réplicas de cada experimento se combinaron y se presentan la media y la desviación estándar. Cuando las comparaciones se realizaron entre dos grupos experimentales, los datos se analizaron por el método de t de Student, cuando las comparaciones fueron de más de tres grupos se empleó el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey para identificar diferencias entre los grupos. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando  $P < 0.05$ .

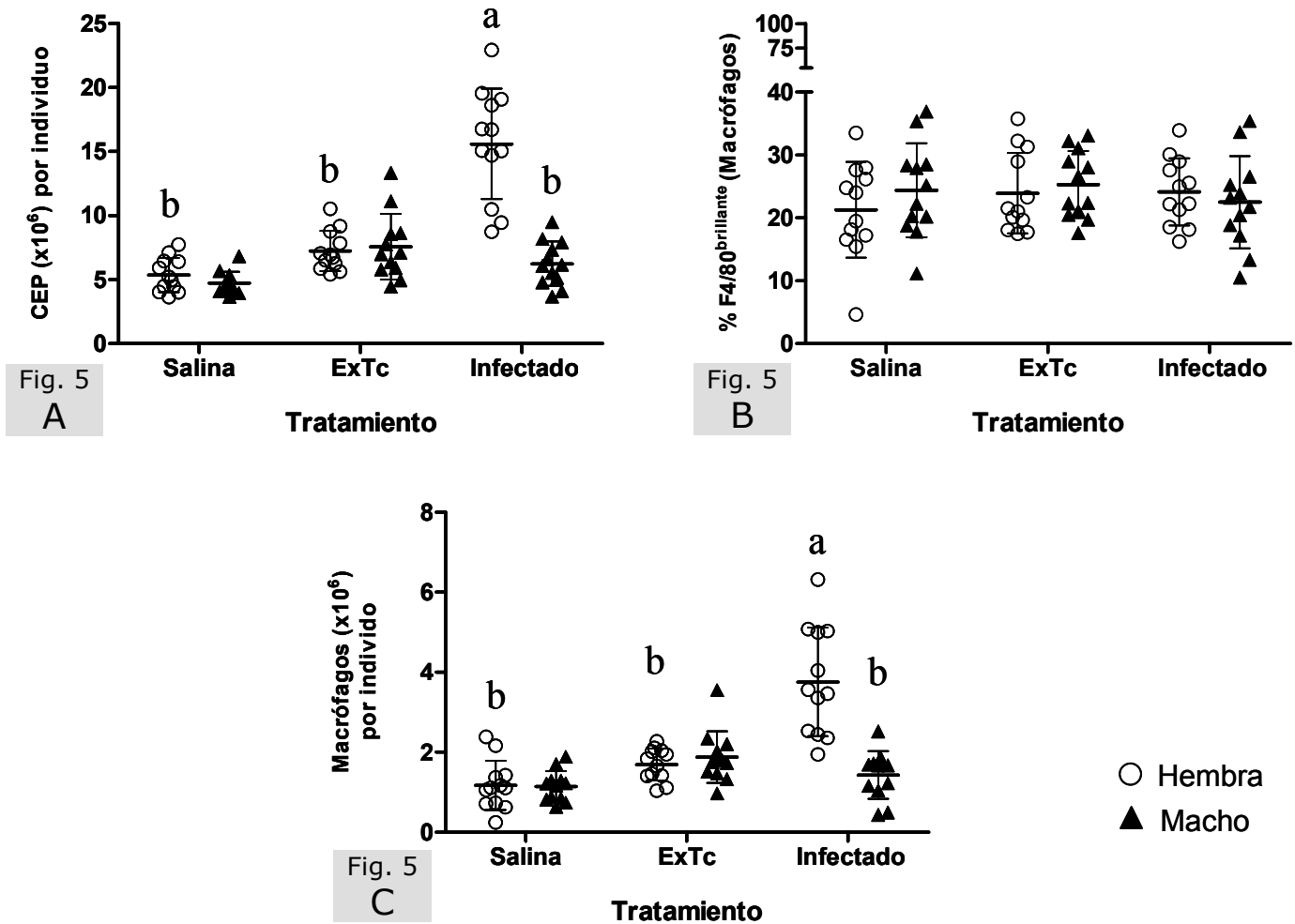
# **VII. Resultados**



**Figura 4: Cargas parasitarias obtenidas de hembras y machos.** Los datos muestran el número de parásitos recuperados del peritoneo tras 6 días de infección con 20 cisticercos. En este momento de la infección, no hay diferencias entre hembras y machos en las cargas parasitarias ( $P > 0.05$ ). El dimorfismo sexual de las cargas parasitarias es observado en periodos posteriores. Cada punto representa una carga parasitaria individual.

**vii. i. Las cargas parasitarias no variaron entre los sexos durante la primera semana de cisticercosis por *T. crassiceps*.**

Para determinar el papel del sexo en la resistencia del hospedero durante la infección temprana, se infectaron ratones de ambos sexos y se sacrificaron 6 días después. Como se había reportado previamente (117), en este tiempo de la infección, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las cargas parasitarias de hembras y machos (Figura 4). Este resultado es consistente con la observación de que el dimorfismo sexual en la cepa BALB/cAnN comienza después de la primera semana de infección por *T. crassiceps* (118).



**Figura 5: Cinética de las células de exudado peritoneal (CEP) recuperadas del peritoneo tras 6 días de infección con *T. crassiceps*.** (A) Las células peritoneales se obtuvieron de ratones BALB/cAnN hembras (círculos) y machos (triángulos) tras 6 días de haber sido inyectados intraperitonealmente con solución salina (Salina), 400 µg de extracto total soluble de *T. crassiceps* (ExTc) o infectados con 20 cisticercos de *T. crassiceps* (Infectado). Sin ningún estímulo adicional, las células fueron procesadas para citometría de flujo y analizadas. (B) El análisis de citometría de flujo muestra que 6 días después de la inyección intraperitoneal, no hubo diferencias en el porcentaje de macrófagos (células F4/80<sup>brillante</sup>) reclutados al peritoneo. (C) Observamos un incremento en el número de macrófagos relacionado a la infección y al sexo, las hembras infectadas presentaron más macrófagos en comparación a los machos. Las letras denotan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ( $a \neq b$ ,  $P < 0.001$ ).

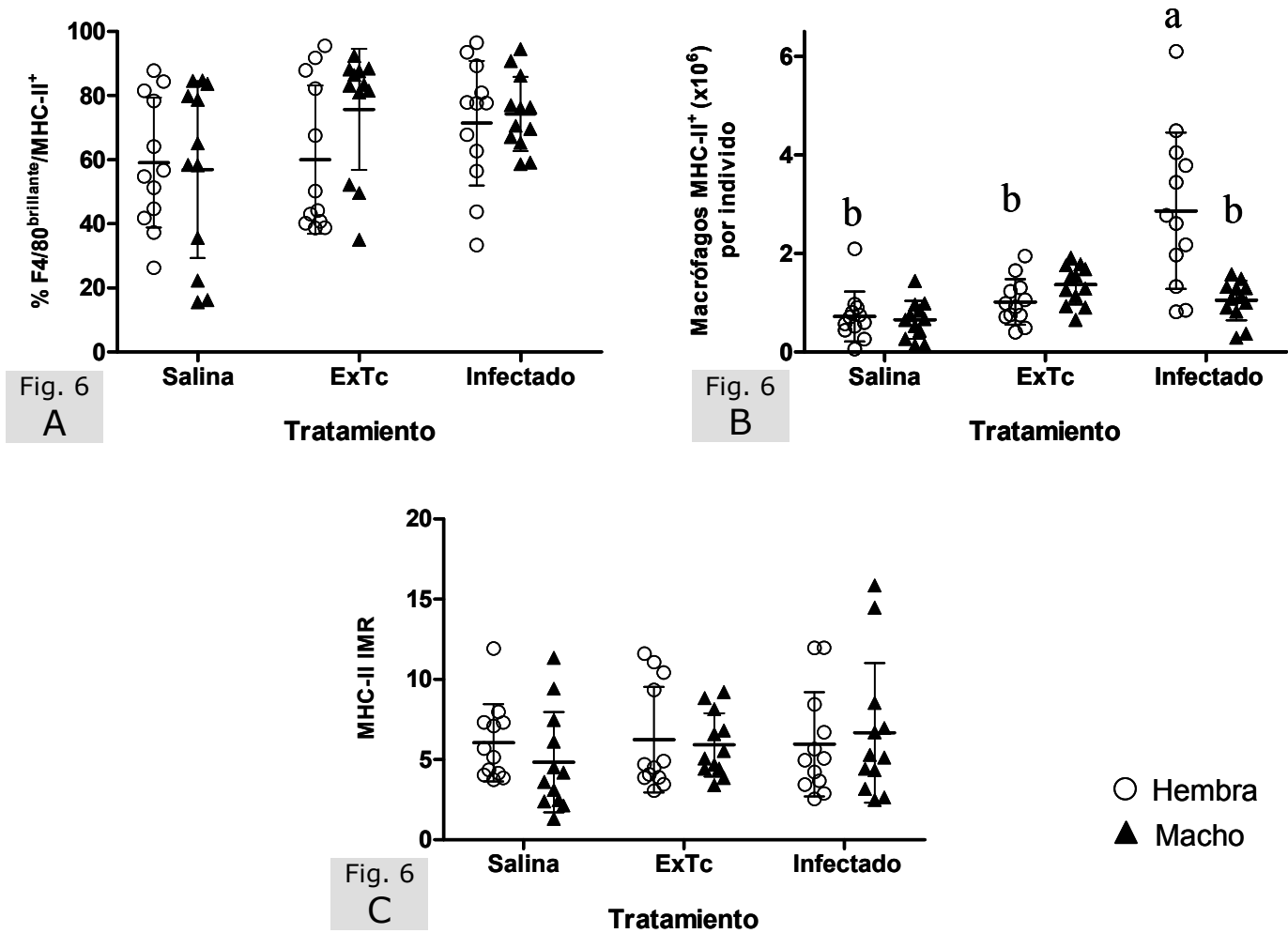
**vii. ii. El reclutamiento de células al peritoneo durante la primera semana de la cisticercosis por *T. crassiceps* fue mayor en las hembras.**

A los 6 días de infección, hubo un aumento del número total de CEP en las hembras en comparación a las hembras tratadas con solución salina ( $P < 0.001$ ), durante este tiempo de la infección, el número de CEP fue mayor en las hembras en comparación a los machos ( $P < 0.001$ ) (Figura 5A), mientras que el número de CEP de los machos infectados no difirió en relación a los machos tratados con salina ( $P > 0.05$ ). Curiosamente, el ExTc causó un modesto incremento en el número de CEP en los machos en comparación ( $P < 0.05$ ), pero las diferencias no llegaron a ser significativas en las hembras (Figura 5A).

**vii. iii. Durante la primera semana de infección, el porcentaje de macrófagos no varió entre los sexos, pero el número total fue mayor en las hembras.**

Ya que los macrófagos han sido involucrados en la susceptibilidad a la cisticercosis murina por *T. crassiceps* (67), decidimos analizar el porcentaje (Figura 5B) y el número total de macrófagos reclutados al peritoneo (Figura 5C) identificándolos por su elevada expresión de la molécula F4/80 (F4/80<sup>brillante</sup>). No encontramos diferencias entre los sexos en el porcentaje de células F4/80<sup>brillante</sup> (Figura 5B). Tampoco encontramos diferencias del porcentaje de macrófagos relacionadas a la infección o a el ExTc (Figura 5B). Sin embargo, al comparar el número total de macrófagos obtenidos del peritoneo, encontramos que las hembras infectadas presentaron un número claramente mayor de macrófagos en comparación a las hembras tratadas con salina o con ExTc ( $P < 0.001$ , en ambos casos). El número de total de macrófagos de las hembras infectadas también fue mayor que el de los machos infectados ( $P < 0.001$ ), que en contraste con las hembras, no presentaron aumento del número de macrófagos reclutados en este tiempo de la infección (Figura 5C).

Mediante citometría de flujo analizamos la expresión del MHC-II (Figura 6), las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 (Figura 7), así como de las moléculas accesorias supresoras PD-L1 y PD-L2 (Figura 8) en los macrófagos de ratones con 6 días de infección, tratados con ExTc o con solución salina como control.



**Figura 6:** Caracterización de la expresión de moléculas del MHC-II en los macrófagos recuperados del peritoneo después de 6 días de infección con *T. crassiceps*. Se determinó la expresión de moléculas del MHC-II (Ia e Ie) en macrófagos (F4/80<sup>brillante</sup>) reclutados tras 6 días de infección con 20 cisticercos de *T. crassiceps*. Se muestran, el porcentaje (A), número total (B) y la expresión relativa de esta molécula por macrófago (intensidad media relativa de señal, IMR) (C). Las letras sobre los datos denotan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ( $a \neq b$ ,  $P < 0.001$ ).

**vii. iv. El sexo no afectó la expresión del MHC-II en los macrófagos reclutados durante la primera semana de cisticercosis por *T. crassiceps*.**

En la figura 6A se muestra el porcentaje de macrófagos (F4/80<sup>brillante</sup>) que expresaron moléculas del MHC-II (MHC-II<sup>+</sup>). No encontramos efecto del ExTc, la infección o el sexo sobre el porcentaje de macrófagos que expresaron MHC-II en este



tiempo de la infección. De cualquier manera, como se mostró en el número total de CEP, el número total de macrófagos MHC-II<sup>+</sup> fue mayor en las hembras infectadas en comparación a los machos, o a las hembras tratadas con salina o ExTc ( $P < 0.001$ , en los tres casos) (Figura 6B). Respecto a la intensidad media relativa (IMR) de la expresión del MHC-II (una medida de la expresión del MHC-II por célula), no hubo diferencias entre los animales, ni relacionadas al sexo o al tratamiento (Figura 6C).

**vii. v. La infección por *T. crassiceps* alteró la expresión de las moléculas coestimuladoras en los macrófagos, pero no hubo diferencias asociadas al sexo en la expresión de CD80 o CD86.**

En la figura 7 se muestra el análisis de la expresión de las moléculas coestimuladoras. La infección causó el aumento del porcentaje de macrófagos que expresa CD80 en ambos sexos ( $P < 0.01$ , respecto al mismo sexo tratado con salina) (Figura 7A), sin embargo, no detectamos diferencias entre los sexos en el porcentaje de macrófagos CD80<sup>+</sup>, tampoco observamos diferencias respecto a los animales tratados con ExTc (Figura 7A). El número total de macrófagos CD80<sup>+</sup> fue notoriamente mayor en las hembras infectadas en comparación a los machos infectados ( $P < 0.001$ ) o a las hembras de los otros dos grupos ( $P < 0.001$ ) (Figura 7B). La IMR de CD80 aumentó en los macrófagos de los machos infectados en comparación a los machos tratados con salina ( $P < 0.05$ ). Sin embargo, no hubo diferencias en la IMR de CD80 entre las hembras y los machos (Figura 7C).

En contraste a la expresión de CD80, la infección disminuyó el porcentaje de macrófagos CD86<sup>+</sup> en los machos ( $P < 0.05$ ), en las hembras se presentó la misma tendencia, pero no llegó a ser significativa ( $P > 0.05$ ) (Figura 7D). De hecho, el número total de macrófagos CD86<sup>+</sup> fue mayor en las hembras en comparación a los machos infectados o a las hembras de los otros dos grupos ( $P < 0.001$ ) (Figura 7E). Respecto a intensidad media relativa, la IMR de CD86 en los macrófagos de machos tendió a ser menor en los machos tratados con ExTc e infectados en comparación a los machos tratados con salina, pero estas diferencias no llegaron a ser significativas ( $P > 0.05$ ), de igual manera, la IMR de los machos tratados con ExTc e infectados tendió a ser menor en comparación a las hembras, pero aquí tampoco encontramos significancia (Figura 7F).

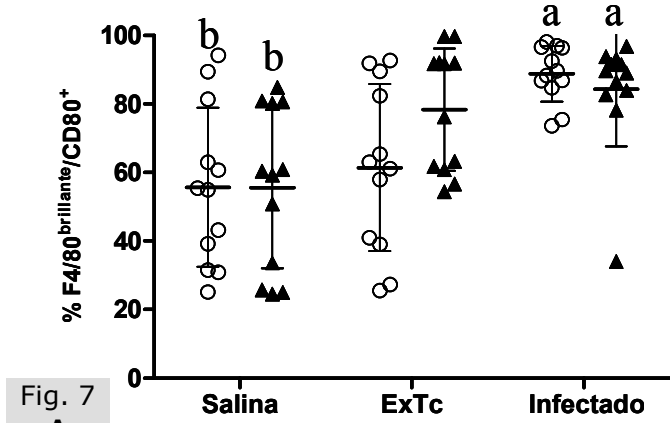


Fig. 7  
A

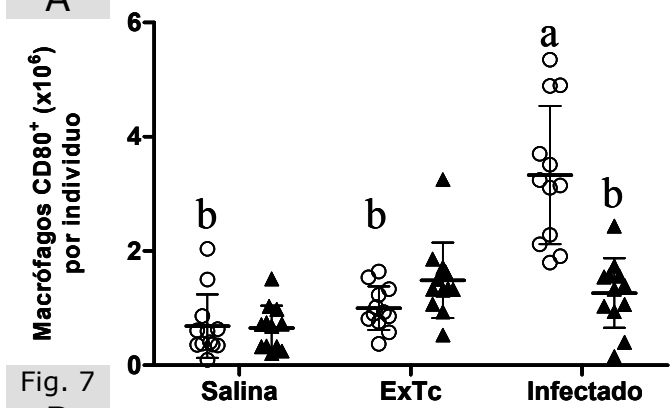


Fig. 7  
B

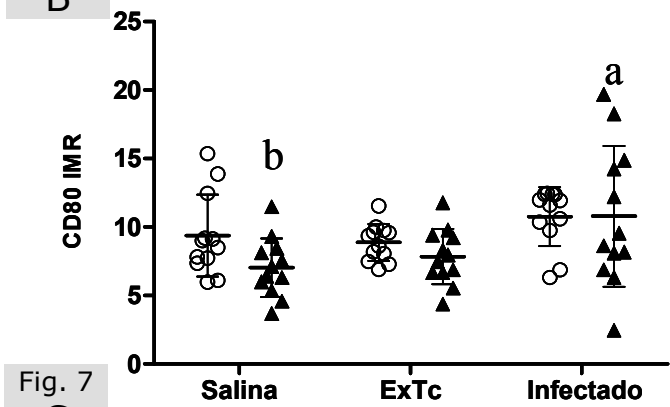


Fig. 7  
C

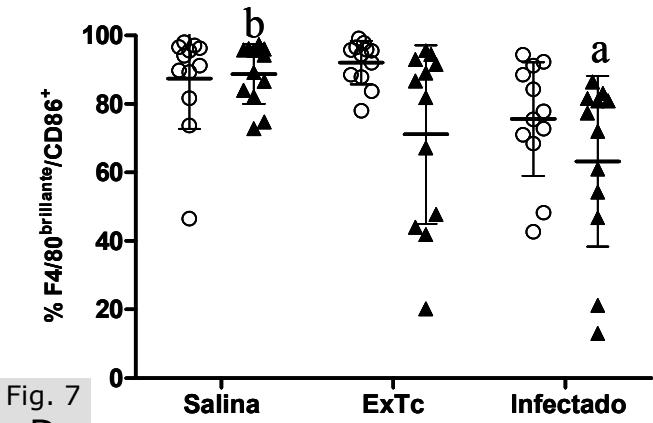


Fig. 7  
D

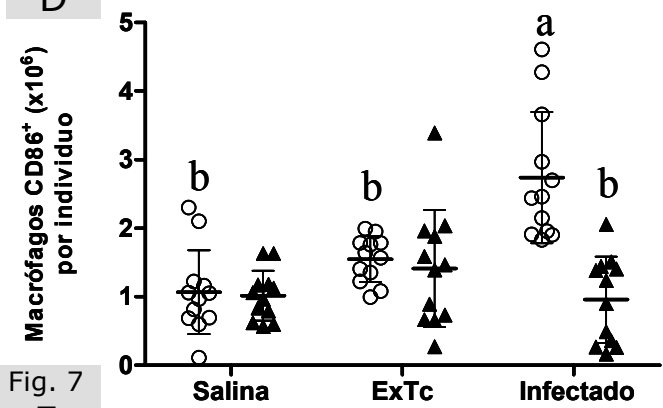


Fig. 7  
E

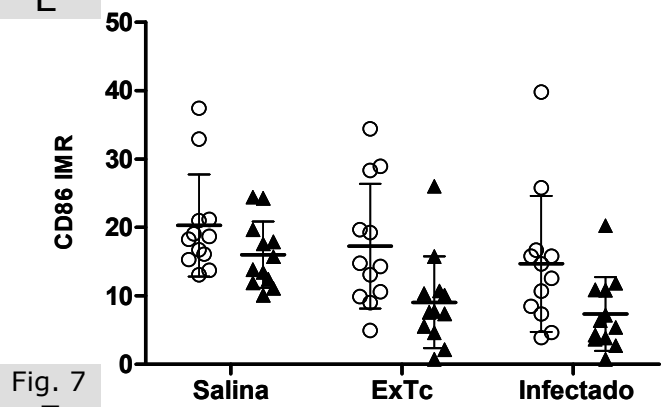


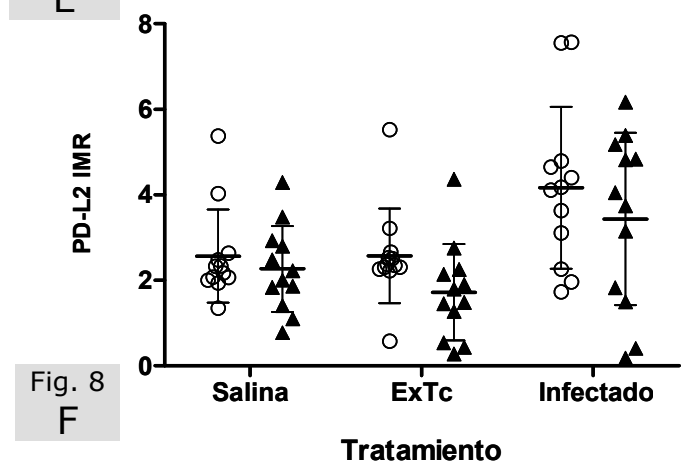
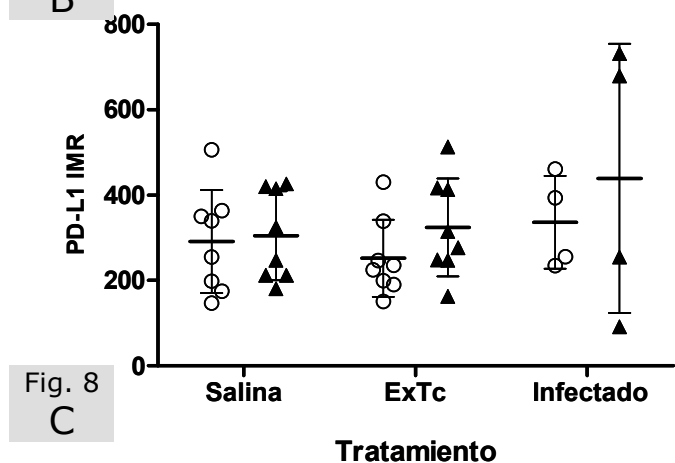
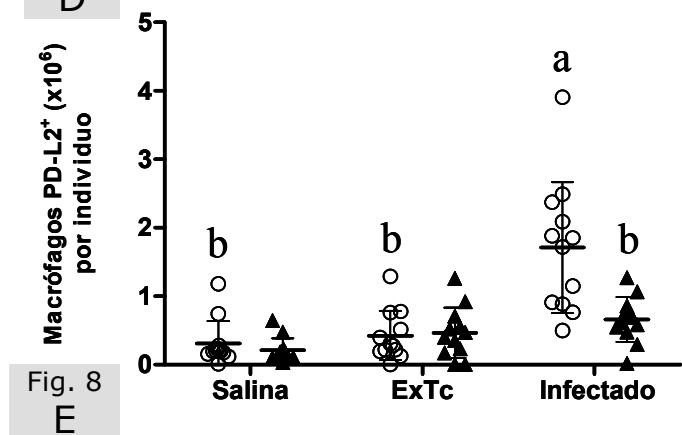
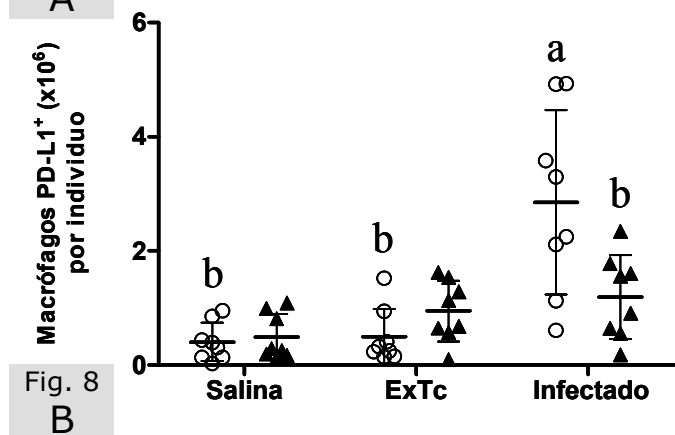
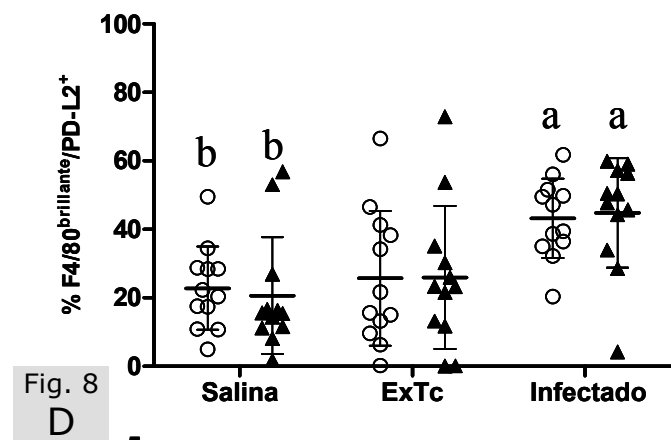
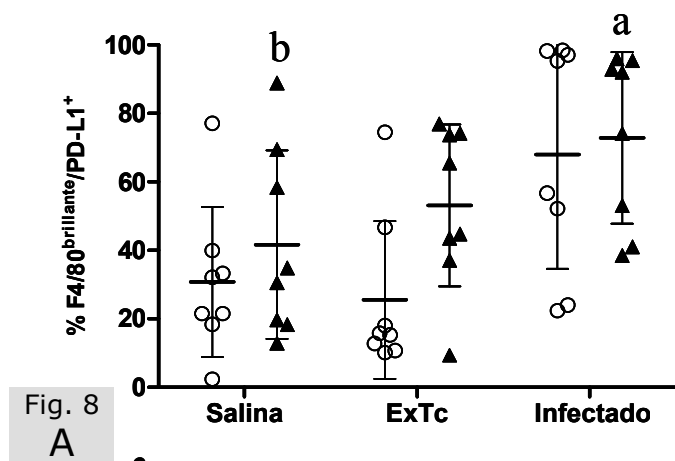
Fig. 7  
F

○ Hembra  
▲ Macho

**Figura 7: Caracterización de CD80 y CD86 en macrófagos recuperados del peritoneo de ratones infectados con *T. crassiceps*.** Se determinó la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 en macrófagos (F4/80<sup>brillante</sup>) reclutados tras 6 días de infección con 20 cisticercos de *T. crassiceps*. Se muestran, el porcentaje (A) y (D), número total de macrófagos CD80<sup>+</sup> (B) y CD86<sup>+</sup> (E), y la IMR de CD80 (C) y CD86 (F) en los macrófagos. Las letras sobre los datos denotan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (a≠b, los valores de P se describen en el texto).

**vii. vi. La infección por *T. crassiceps* indujo la expresión de moléculas supresoras PD-L1 y PD-L2 en los macrófagos de ambos sexos.**

Se ha descrito que la infección induce la expresión de PD-L1 y PD-L2, notoriamente después de la primera semana (11 y 67). Encontramos que en la infección temprana, el porcentaje de macrófagos F4/80<sup>brillante</sup>/PD-L1<sup>+</sup> aumentó en los machos infectados en comparación a los machos tratados con salina ( $P < 0.01$ ), en las hembras hubo una tendencia semejante, pero no llegó a ser significativa (Figura 8A). Mientras que el número total de macrófagos PD-L1<sup>+</sup> (Figura 8B) y PD-L2<sup>+</sup> (Figura 8E) por individuo fue mayor en las hembras infectadas en comparación a los machos o a las hembras tratadas con ExTc o solución salina ( $P < 0.001$ , en todos los casos). No encontramos efecto del sexo o diferencias entre los tratamientos en la IMR de PD-L1 en los macrófagos (Figura 8C). La infección causó el aumento del porcentaje de macrófagos PD-L2<sup>+</sup> en las hembras ( $P < 0.05$ ) y en los machos ( $P < 0.01$ ) en comparación a los animales tratados con salina (Figura 8D), pero no observamos diferencias entre los sexos o por efecto del ExTc sobre el porcentaje de macrófagos PD-L2<sup>+</sup>.

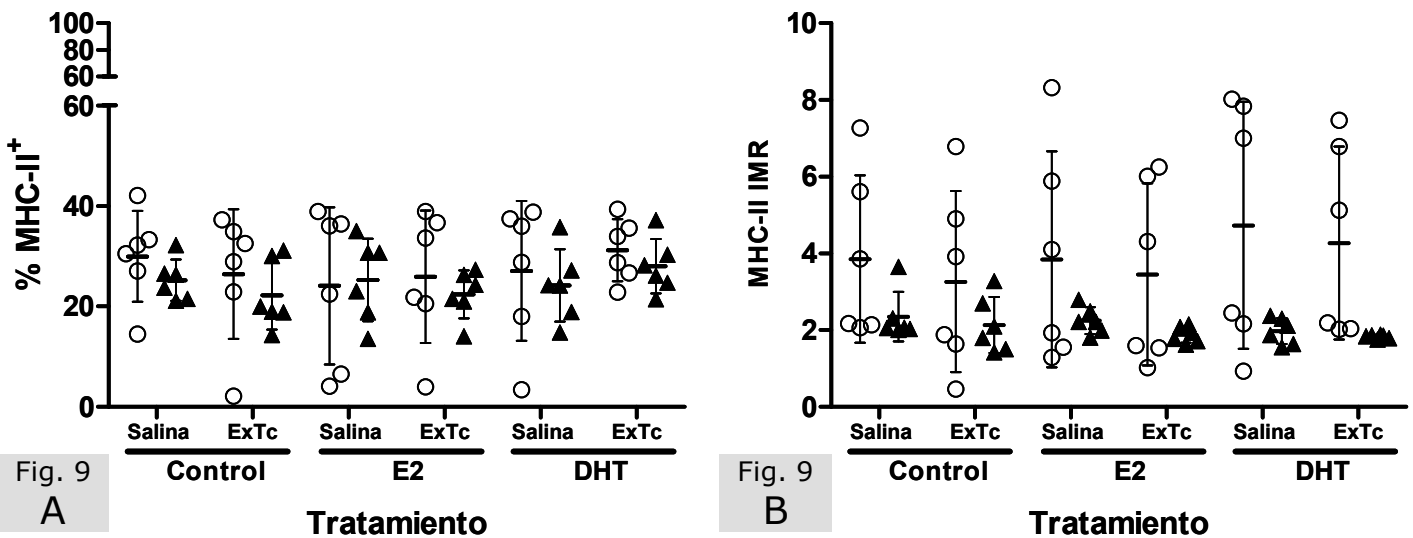


○ Hembra  
▲ Macho

**Figura 8: Caracterización de PD-L1 y PD-L2 en macrófagos recuperados del peritoneo durante la cisticercosis aguda por *T. crassiceps*.** La expresión de las moléculas accesorias inhibitoras PD-L1 y PD-L2 se analizó en macrófagos (F4/80<sup>brillante</sup>) reclutados al peritoneo tras 6 días de infección con 20 cisticercos de *T. crassiceps*. Se muestran, el porcentaje de macrófagos PD-L1<sup>+</sup> (A) y PD-L2<sup>+</sup> (D), el número total de macrófagos PD-L1<sup>+</sup> (B) y PD-L2<sup>+</sup> (E), y la IMR de PD-L1 (C) y PD-L2 (F) en los macrófagos. Las letras sobre los datos denotan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ( $a \neq b$ , los valores de P se describen en el texto).

**vii. La expresión de las moléculas del MHC-II en los macrófagos no fue alterada por el sexo, los esteroides sexuales E2 y DHT o por el ExTc *in vitro*.**

Los esteroides sexuales regulan la resistencia del hospedero a la infección, los estrógenos promueven el crecimiento de la carga parasitaria, mientras que los andrógenos la limitan (77). Con el propósito de analizar el efecto del estrógeno estradiol (E2) y del andrógeno dihidrotestosterona (DHT) sobre la expresión de las moléculas del MHC-II, coestimuladoras y accesorias supresoras en los macrófagos estimulados con moléculas del parásito, obtuvimos macrófagos peritoneales reclutados con tioglicolato de sodio de ratones hembras y machos y los cultivamos en medios suplementados con concentraciones fisiológicas de E2 (50 nM) y DHT (35 nM) (79).



○ Hembra  
▲ Macho

**Figura 9: Análisis de la expresión del MCH-II en macrófagos cultivados con antígenos y distintos tratamientos hormonales.** Se obtuvieron macrófagos peritoneales (células adherentes F4/80<sup>brillante</sup>) de ratones hembra y machos y fueron cultivados en medio DMEM convencional (control), medio DMEM suplementado con E2 50 nM o suplementado con DHT 35 nM. Los macrófagos de ambos sexos, en todas las condiciones de cultivo fueron tratados con 100 µg de ExTc o 20 µl de solución salina como control. (A) Se muestra el porcentaje de macrófagos que expresaron MHC-II (MCH-II<sup>+</sup>). (B) Se presenta la intensidad media relativa (IMR) del MHC-II en los macrófagos.

En la figura 9 se muestra el análisis de la expresión del MHC-II en los macrófagos cultivados. No encontramos diferencias en el porcentaje de macrófagos MHC-II<sup>+</sup> entre los sexos, tampoco observamos efecto de las hormonas E2 o DHT ni del extracto del parásito (ExTc) (Figura 9A). De igual manera, la IMR del MHC-II<sup>+</sup> no vario entre los grupos (Figura 9B).

**vii. viii. La expresión de CD80 en los macrófagos cultivados, no fue afectada por el sexo, el E2 o la DHT, ni por el ExTc.**

La mayor parte de los macrófagos cultivados expresa CD80, sin embargo, no encontramos diferencias entre los distintos tratamientos o asociadas al sexo en el porcentaje de macrófagos CD80<sup>+</sup> (Figura 10A), tampoco observamos diferencias asociadas al sexo o al ambiente hormonal sobre la IMR de CD80 en los macrófagos cultivados (Figura 10B).

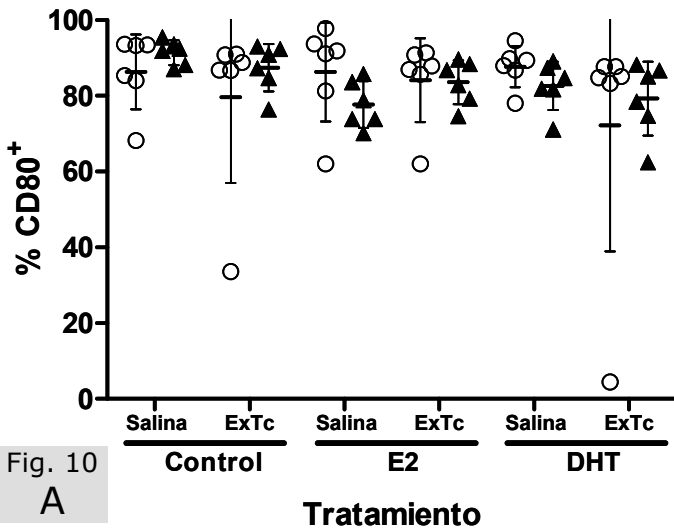


Fig. 10  
A

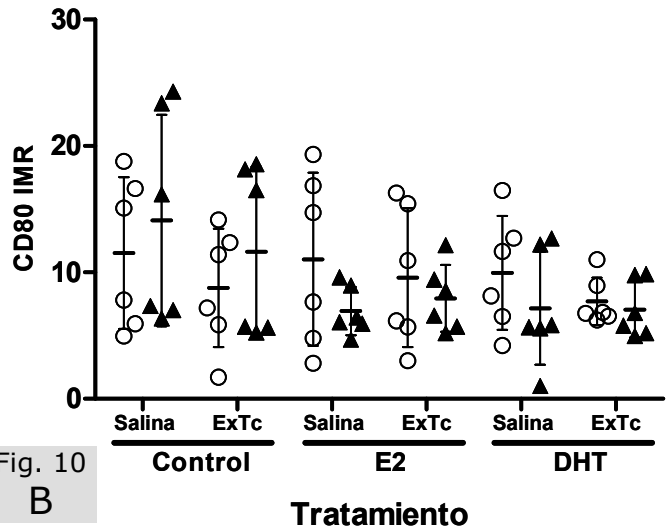


Fig. 10  
B

- Hembra
- ▲ Macho

**Figura 10: Efecto del sexo y el ambiente hormonal sobre la expresión de CD80 en macrófagos cultivados en presencia de ExTc.** Se muestran (A) el porcentaje de macrófagos CD80<sup>+</sup>, (B) Intensidad media relativa (IMR) de CD80 en los macrófagos. Los macrófagos de ratones hembras y machos se cultivaron durante 7 días en medio convencional (control), medio suplementado con E2 50nM (E2) o medio suplementado con DHT 35 Nm (DHT). Los macrófagos se cultivaron con 100 µg de ExTc por ml de medio o 20 µl de solución salina como control.

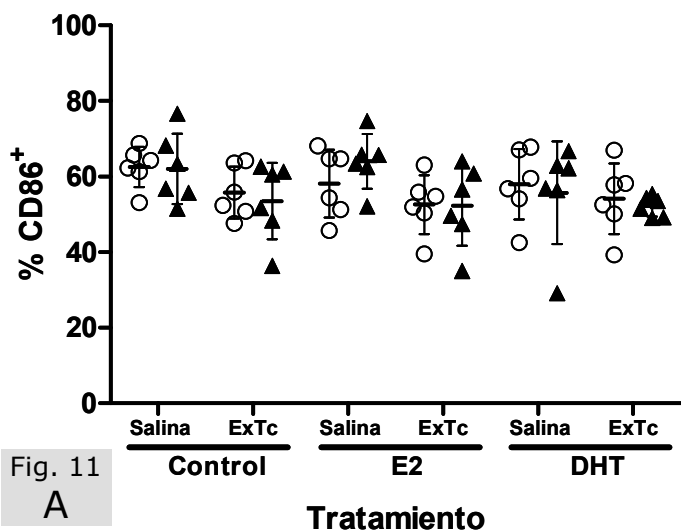


Fig. 11  
A

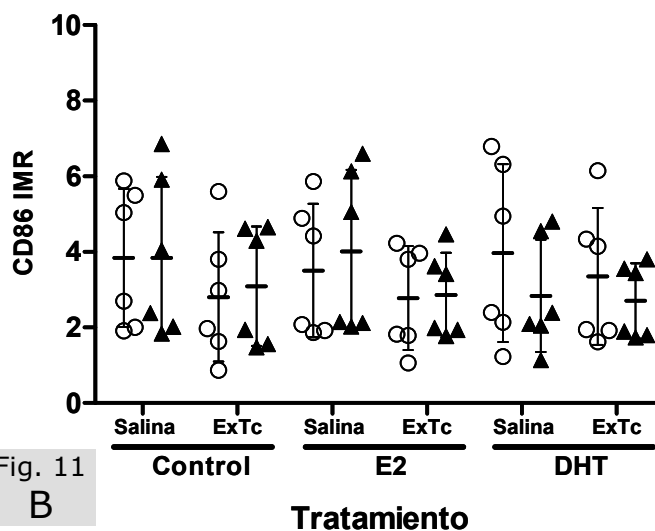


Fig. 11  
B

○ Hembra  
▲ Macho

**Figura 11: Análisis de la expresión de CD86 en macrófagos cultivados con estrógenos o andrógenos y estimulados con ExTc.** Se muestran (A) el porcentaje de macrófagos CD86<sup>+</sup>, (B) Intensidad media relativa (IMR) de CD86 en los macrófagos. Los macrófagos de ratones hembras y machos se cultivaron durante 7 días en medio convencional (control), medio suplementado con E2 50nM (E2) o medio suplementado con DHT 35 nM. Se realizaron cultivos con 100 μg ExTc por ml de medio o 20 μl de solución salina como control.

**vii. ix. La expresión de CD86 no fue alterada por el sexo, el E2 o la DHT, pero si por el ExTc en los macrófagos cultivados.**

Al analizar la expresión de CD86, no encontramos diferencias asociadas al sexo o al ambiente hormonal sobre el porcentaje de macrófagos CD86<sup>+</sup>. Sin embargo, el ExTc disminuyó el porcentaje de los macrófagos los macrófagos CD86<sup>+</sup> independientemente del sexo o el ambiente hormonal (P<0.01) (Figura 11A). En relación a la IMR de CD86, no observamos diferencias significativas entre los grupos (Figura 11B).

**vii. x. La expresión de PD-L1 no varió entre los sexo o los tratamientos con E2 y DHT, ni fue inducida en los macrófagos por el ExTc *in vitro*.**

No observamos patrones de expresión en el porcentaje de los macrófagos PD-L1<sup>+</sup>, que se asocien al sexo, el ambiente hormonal o el ExTc (Figura 12A), ni en la IMR de PD-L1 en los macrófagos (Figura 12B).

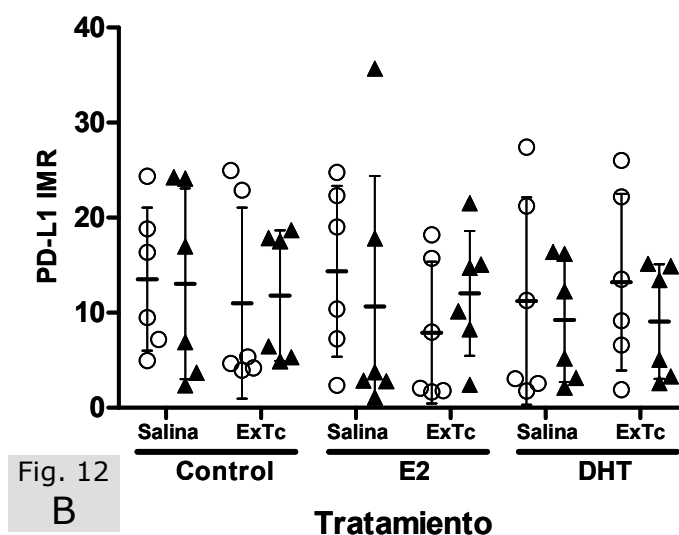
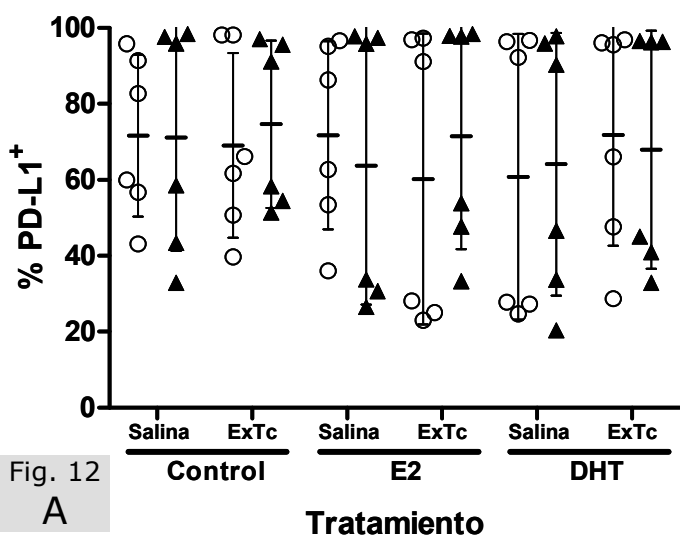


Fig. 12  
A

Fig. 12  
B

- Hembra
- ▲ Macho

**Figura 12: Expresión de PD-L1 en macrófagos cultivados con E2 o DHT y ExTc.** Caracterización de la expresión de PD-L1 en macrófagos de hembras y machos tras 7 días de cultivo. (A) El porcentaje de macrófagos PD-L1<sup>+</sup> y (B) la intensidad media relativa (IMR) de PD-L1 en macrófagos de ratones de ambos sexos. Se realizaron cultivos con distintas condiciones, empleando medio DMEM (Control), medio DMEM suplementado con E2 50 nM (E2) o DHT 35 nM (DHT). Los macrófagos se cultivaron con 100 µg de ExTc por ml de medio o solución salina como control.



**vii. xi. La expresión de PD-L2 no fue afectada por el sexo o los esteroides sexuales E2 y DHT, tampoco fue inducida por el ExTc en los macrófagos *in vitro*.**

PD-L2 es una moléculas que no se expresa en condiciones básicas, pero es inducida durante la infección (11) (Fig. 13A). Al analizar la expresión de esta molécula en los macrófagos cultivados, no encontramos efecto del sexo, los esteroides sexuales E2 o DHT, ni tampoco del ExTc sobre el porcentaje de macrófagos PD-L2<sup>+</sup>. En todos los casos, el porcentaje promedio de la expresión de PD-L2 fue menor al 30% (Figura 13A). Así mismo, la intensidad media relativa (IMR) de PD-L2 no varía entre los grupos y se mantiene próxima al 1, indicando que en los macrófagos cultivados la densidad de expresión de esta molécula es muy baja (Figura 13B).

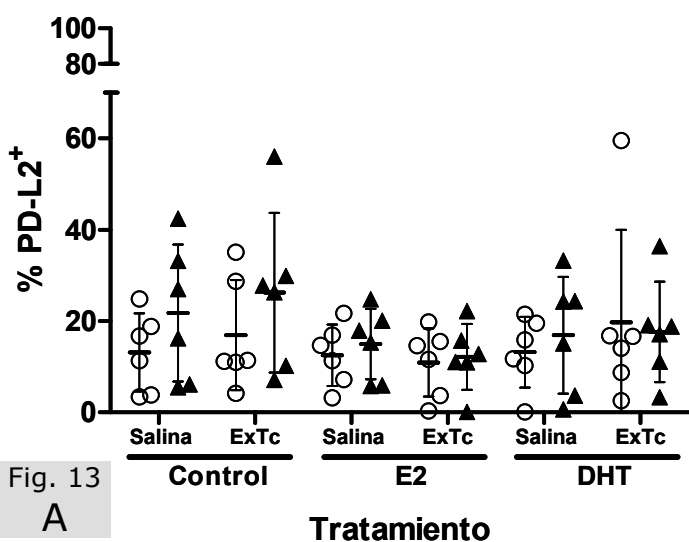


Fig. 13  
A

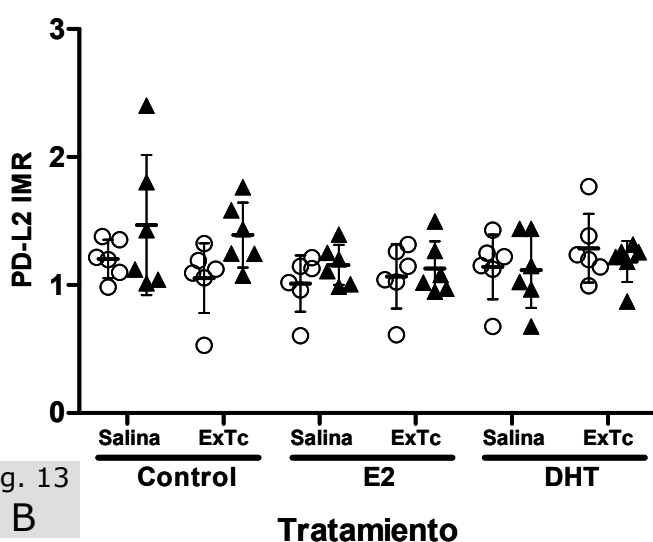


Fig. 13  
B

- Hembra
- ▲ Macho

**Figura 13: Caracterización de PD-L2 en macrófagos cultivados con E2 o DHT y expuestos a los antígenos de *T. crassiceps*.** Se muestran, (A) el porcentaje de macrófagos PD-L2<sup>+</sup> y (B) la intensidad media relativa (IMR) de PD-L2 en macrófagos de ratones de ambos sexos, cultivados en medio DMEM suplementado de manera convencional (cotrol), con E2 50nM o DHT 35 nM. Se añadieron 100 µg de ExTc por ml o 20 µl de solución salina estéril a los cultivos.

# **VIII. Discusión**

La comunicación entre las células presentadoras de antígenos y los linfocitos T tiene gran importancia en el desarrollo de las respuestas inmunes, ya que las interacciones entre estas células inician las respuestas inmunes adaptativas, definen el perfil de activación del linfocito T ( $T_H1$ ,  $T_H2$  u otro), promueven o limitan el desarrollo o terminan a la respuesta inmune y mantiene la tolerancia (16 y 120). La expresión de moléculas del MHC y accesorias tiene un papel central en la comunicación entre las células presentadoras de antígenos y los linfocitos T, pues la interacción entre las moléculas del MHC y el TCR determinan la especificidad del antígeno al que se dirige la respuesta inmune, así como el efecto de las señales secundarias sobre los linfocitos T. Las moléculas coestimuladoras son indispensables en la activación de los linfocitos T vírgenes y el inicio de la respuesta inmune adaptativa. Además, las moléculas coestimuladoras puedan extender la magnitud e intensidad de la respuesta por los linfocitos T activados. Así mismo, las señales supresoras conferidas por las moléculas PD-L1 y PD-L2, son necesarias en la regulación de la intensidad de las respuestas inmunes y en la prevención el daño que la respuesta inmune puede causar al organismo propio (11, 16 y 120).

Por otro lado, se reconocen diferencias entre los sexos en el funcionamiento del sistema inmune, las hembras son más resistentes a varias infecciones, pero también son más susceptibles a padecer enfermedades autoinmunes (121). En muchas de estas enfermedades, las diferencias en susceptibilidad/resistencia pueden ser moduladas mediante la gonadectomía y los tratamientos hormonales (36, 42, 96, 103 y 122). Se han descrito los efectos de las hormonas sexuales sobre varias funciones del sistema inmune, entre las que se incluye la diferenciación, maduración, proliferación y producción de citocinas por células dendríticas, los macrófagos y los linfocitos T (103). Sin embargo, las diferencias entre los sexos y el efecto de los esteroides sexuales sobre la expresión de moléculas del MHC y de las moléculas accesorias ha sido poco estudiada, particularmente en las infecciones parasitarias.

A grandes rasgos, los estudios realizados en el tema se pueden dividir en tres categorías, los que analizan el efecto (*in vivo*) del sexo y de los niveles hormonales sobre expresión de moléculas accesorias y del MCHS en las células en el un organismo (122 a 141), los que estudian el efecto (*ex vivo*) de las hormonas sobre células cultivadas, pero

diferenciadas en un organismo (142 a 145) y aquellos estudios que evalúan el efecto *in vitro* de los esteroides sexuales sobre la diferenciación de las células (124, 146 a 151).

En 1984 Weinstein y colaboradores tras demostrar que las células del bazo de las hembras causan mayor proliferación de los linfocitos T, sugirieron que las diferencias en la respuesta inmune observadas entre los sexos podrían estar relacionadas al MHC (138). Estudios posteriores empleando células del bazo o de placas arteroescleróticas han reportado que las células presentadoras de antígenos de las hembras expresan más moléculas del MHC y son más eficientes en la activación de linfocitos T en comparación a los machos (138, 140 y 141). Sin embargo, estas diferencias no se observan en todas las células, como es el caso de las células dendríticas del timo (123).

Las concentraciones fisiológicas de estrógenos incrementa la expresión de moléculas del MHC-II, CD80 o CD86 en las células del timo (123), en el tracto reproductivo humano durante la infección con *Chlamydia* (126), en los órganos reproductivos de la gallina (*Gallus gallus*) (130 y 131) y en los linfocitos B de ratones a los que se induce artritis (137). Las concentraciones fisiológicas de estrógenos también se asocian al aumento de la capacidad de las células presentadoras de antígenos para activar a los linfocitos T (128). Pero los estrógenos también pueden tener el efecto contrario, el tratamiento con estradiol disminuye la expresión de las moléculas del MHC-II en los leucocitos del caballo (*Cabia porcellus*) (139), o no causar diferencia en el porcentaje o intensidad de expresión de las moléculas del MHC ni de moléculas coestimuladoras entre las células dendríticas del bazo de animales tratados con estradiol, animales intactos o animales gonadectomizados (124).

Se ha propuesto que no solo hay diferencias en la frecuencia e intensidad de expresión de las moléculas del MHC, sino que los mecanismos que regulan la expresión de estas moléculas son distintos entre hembras y machos (141).

La mayoría de los estudios del efecto de los estrógenos sobre la expresión de PD-1 y sus ligandos se han realizado en el modelo de encefalitis experimental autoinmune. Empleando concentraciones de estrógenos (estriol o estradiol) semejantes a las que se observan durante el embarazo se ha documentado que los estrógenos incrementan la expresión de las moléculas CD80, CD86 y del MCH, pero también aumentan la expresión de PD-1 en los linfocitos T reguladores (FoxP3<sup>+</sup>), de PD-L1 en los linfocitos B (122), así

como de PD-L1 y PD-L2 en las células dendríticas del bazo (135). De manera interesante, el tratamiento con estrógenos previo a la inducción de la encefalitis experimental autoinmune disminuye la severidad de la enfermedad y se asocia a la polarización hacia  $T_H2$  de la respuesta inmune (122, 135 y 136).

Algunos de los efectos más notorios de las hormonas sexuales sobre la expresión de moléculas del MHC, CD80 y CD86 se han observado *in vitro*, al analizar el efecto del estradiol sobre la diferenciación de células dendríticas a partir de precursores de médula ósea estimulados con el factor estimulante formador de colonia de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, por sus siglas en inglés). La ausencia de estradiol en el medio de cultivo en el que se diferencian las células dendríticas disminuye el porcentaje de células diferenciadas y las células dendríticas que llegan a diferenciarse poseen menor expresión de las moléculas del MHC-II y de CD86, además de ser menos eficientes en la activación de linfocitos T en comparación a las células dendríticas diferenciadas en medios con estradiol (124, 146 y 147). También se ha reportado el efecto de otras hormonas sobre la expresión de moléculas del MHC y accesorias. Por ejemplo, la progesterona también afecta la expresión de moléculas del MHC-II y de CD80 en las células dendríticas diferenciadas *in vitro* activadas por LPS (150). Al igual que en los estudios *in vivo*, las concentraciones de estrógenos semejantes a las del embarazo disminuyen la capacidad de las células presentadoras de antígenos a pesar de no afectar la expresión de moléculas del MHC o de CD80 y CD86 (148). El sexo del cual se obtienen los precursores para diferenciar a las células dendríticas, también parece tener efectos sobre la respuesta de las células a las hormonas en el medio (151).

En la cisticercosis murina por *T. crassiceps* se ha descrito un claro dimorfismo sexual en la resistencia del hospedero a la infección, los machos son más resistentes que las hembras (75) y el dimorfismo sexual en la resistencia contra la cisticercosis, coincide con diferencias en la respuesta inmune entre los sexos. Entre la segunda y cuarta semana de infección, la producción de IL-10 por las células del bazo (principalmente linfocitos T) es mayor en las hembras, al mismo tiempo que la producción de IFN- $\gamma$  es mayor en los machos (49). El IFN- $\gamma$  limita el desarrollo de las cargas parasitarias, mientras que IL-10 podría favorecer el establecimiento del parásito al inhibir la respuesta  $T_H1$  (57).

La eliminación de las fuentes de esteroides sexuales mediante la gonadectomía, iguala las cargas parasitarias entre los sexos. En ambos sexos, el tratamiento con E2 aumenta las cargas parasitarias y el tratamiento con los andrógenos T4 o DHT las reduce. Los cambios en las cargas parasitarias en los animales tratados con esteroides sexuales se asocian a diferencias en la respuesta inmune, que han sido descritos en la infección crónica.

En los animales tratados con DHT, tras 8 semanas de infección la producción de IFN- $\gamma$  es mayor en comparación a los animales castrados, en ambos casos, la producción de IFN- $\gamma$  es mayor en comparación a los animales tratados con E2. El tratamiento con E2 también profundiza la pérdida de la respuesta proliferativa, mientras que el tratamiento con DHT la previene (79).

El efecto de los esteroides sexuales sobre la carga parasitaria parece depender del sistema inmune, ya que la timectomía y la irradiación total de los ratones igualan las cargas parasitarias entre los sexos (11 y 12). A pesar de que se conoce que los esteroides sexuales afectan el desarrollo de la carga parasitaria y la respuesta inmune contra *T. crassiceps*, se desconocen los mecanismos mediante los cuales las hormonas sexuales regulan la producción de citocinas por las células del bazo. Además, las diferencias entre los sexos en la expresión de moléculas accesorias durante los primeros días de la cisticercosis, hasta ahora no han sido reportadas.

Ya que la activación de los linfocitos T depende de las células presentadoras de antígenos y los macrófagos están involucrados en el cambio de TH1 a TH2 y la supresión de la respuesta proliferativa (67), en este estudio buscamos diferencias entre los sexos en la expresión de las moléculas del MHC-II y de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 en los macrófagos, así como de las moléculas PD-L1 y PD-L2, cuya participación ha sido reportada en la supresión observada en la cisticercosis por *T. crassiceps* (11).

Una explicación posible a las diferencias entre los sexos en la respuesta inmune contra *T. crassiceps*, sería que los macrófagos de los machos expresan más moléculas del MHC-II y moléculas coestimuladoras en comparación a las hembras. Otra posibilidad sería que la expresión de las moléculas supresoras es mayor en los macrófagos de las hembras en comparación a los machos.

Observamos diferencias en la expresión de moléculas entre los machos infectados y los machos tratados con solución salina (controles), aunque las hembras presentan

tendencias semejantes, los cambios en la expresión de las moléculas CD80, CD86, PD-L1 no llegan ser significativos en las hembras. Las diferencias de significancia entre los sexos muestran que la expresión de CD80 tendió a ser menor en los machos controles en comparación a las hembras (aunque las diferencias no llegaran a ser significativas). Por otro lado, en los machos infectados los cambios en de la expresión de CD80 y CD86 fueron más marcados en comparación a las hembras, alcanzando significancia solo en los machos (Fig. 7C y 7D). Durante la infección se observa una sucesión en la expresión de marcadores en los macrófagos (67), nuestros resultados sugieren que la expresión de CD86 disminuiría y que CD80 aumentaría más rápido en los macrófagos de los machos, en comparación a las hembras, sin embargo esto tiene que ser analizado. No encontramos diferencias significativas asociadas al sexo durante la primera semana de infección en la expresión de las moléculas del MHC-II, coestimuladoras o supresoras.

De manera interesante, durante la cisticercosis por *T. crassiceps* no todos los parámetros son afectados por el ambiente hormonal del hospedero. Por ejemplo, durante la infección crónica, la producción de IL-10 por las células del bazo no parece ser afectada por el sexo del hospedero, ni por el tratamiento con andrógenos o estrógenos, en contraste a la producción de IFN- $\gamma$  que es regulada por el ambiente hormonal (79).

Por otro lado, el aumento en las hembras del número de CEP y por lo tanto de macrófagos, enmascara las tendencias en la expresión de las moléculas examinadas, sin importar cuál fuere la molécula analizada, el número total de macrófagos que la expresan fue mayor en las hembras infectadas en comparación a los machos o a las hembras tratadas con solución salina. Es interesante que en las hembras infectadas el número de macrófagos aumento, mientras que en los machos infectados no hubo cambios en comparación a los machos tratados con solución salina. Se ha descrito que los macrófagos promueven el establecimiento del parásito y que la remoción de estas células durante la primera semana de infección reduce notoriamente las cargas parasitarias (67), esto sugiere que el dimorfismo sexual en la resistencia a la cisticercosis podría involucrar a las diferencias en el reclutamiento de células durante la infección aguda.

Al analizar el efecto *in vitro* del E2 y la DHT sobre la expresión de las moléculas del MHC-II, CD80, CD86, PD-L1 y PD-L2, no encontramos ningún efecto de los esteroides sexuales sobre la expresión de estas moléculas en los macrófagos, ya fuera en

ausencia de estímulos o al cultivarlos con ExTc. El único efecto *in vitro* que observamos correspondió a la disminución del porcentaje de macrófagos CD86<sup>+</sup> al cultivarlos en presencia del ExTc (Fig. 11A). Por otro lado, resulta interesante que el ExTc no indujera la expresión de PD-L2 en los macrófagos cultivados, sugiriendo que la expresión de esta molécula en los macrófagos depende de factores producidos por otras células durante la infección. Sin embargo, el ExTc es una mezcla compleja y puede variar dependiendo del sexo del hospedero del que se obtuvieron los cisticercos, tiempo de que duró la infección y otros factores (27).

Se ha reportado que la producción de IFN- $\gamma$  por las células del bazo durante la cisticercosis por *T. crassiceps* es más intensa y comienza antes en los machos, de hecho las diferencias entre los sexos en la producción de esta citocina se observan tras una semana de infección (49). Así mismo se ha descrito que las cargas parasitarias llegan a ser mayores en las hembras entre el final de la primera semana y la cuarta semana de infección. Ya que no encontramos diferencias entre los sexos en la expresión de las moléculas del MHC-II, coestimuladoras o supresoras al final de la primera semana de la infección, nuestros resultados sugieren que el dimorfismo sexual en la resistencia a la cisticercosis no es causado por la expresión diferencial de estas moléculas en los macrófagos, al menos durante la primera semana de infección. Sin embargo, no podemos descartar que estas moléculas estén involucradas en el dimorfismo sexual inmune en tiempos posteriores de la cisticercosis por *T. crassiceps*.



# **IX. Conclusiones**

## Conclusiones particulares

- 1) No hay diferencia asociadas al sexo en la composición de las poblaciones definidas por F4/80, es decir, en la proporción de macrófagos y monocitos peritoneales durante la primera semana de cisticercosis por *T. crassiceps*.
- 2) El sexo del hospedero no afecta la expresión de las moléculas del MHC-II o de las moléculas coestimuladoras en los macrófagos durante la cisticercosis temprana por *T. crassiceps*.
- 3) El reclutamiento de células durante la primera semana de cisticercosis es sexualmente dimórfico, las hembras reclutan más células al peritoneo.
- 4) Durante la primera semana de cisticercosis, la expresión de las moléculas accesorias supresoras es inducida por la infección.
- 5) No hay efecto del E2 o de la DHT *in vitro* sobre la expresión de moléculas del MHC-II, CD86, PD-L1 o PD-L2 en los macrófagos cultivados.
- 6) El ExTc no induce la expresión de las moléculas PD-L1 o PD-L2 en los macrófagos *in vitro*.

## **Conclusión general**

El dimorfismo sexual en la resistencia del hospedero y la respuesta inmune adaptativa observados durante la cisticercosis por *T. crassiceps*, no son causados por diferencias en la expresión de moléculas del MHC-II, de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86, ni de las moléculas supresoras PD-L1 y PD-L2 durante la primera semana de la infección. Así mismo, nuestros resultados sugieren que la expresión de estas moléculas no es regulada por estrógenos o andrógenos en la cisticercosis por *T. crassiceps*.

# **X. Referencias**

1. Murphy K, Geha R, Notarangelo L. (2011). Immunobiology, The Immune System in Health and Disease. 8<sup>o</sup> edición, Garland Science.
2. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature Rev. Immunol.* 2011, 11: 723–737
3. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Rev. Immunol.* 2008, 8: 958-969.
4. Akira S, Takeda K. TOLL-LIKE RECEPTOR SIGNALLING. *Nature Rev. Immunol.* 2004, 4: 499–511.
5. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Rev. Immunol.* 2005, 5: 953–964.
6. Gordon S. ALTERNATIVE ACTIVATION OF MACROPHAGES. *Nature Rev. Immunol.* 2003, 3: 23-35.
7. Ostuni R, Natoli G. Transcriptional control of macrophage diversity and specialization. *Eur. J. Immunol.* 2011, 41: 2486–2490.
8. Bogdan C. Nitric Oxide and the immune response. *Nature Immunol.* 2001, 2 (10): 907–916.
9. Terrazas LI, Walsh KL, Piskorska D, McGuire E, Harn DA JR. The schistosome oligosaccharide lacto-N-neotetraose expands Gr1(+) cells that secrete anti-inflammatory cytokines and inhibit proliferation of naive CD4(+) cells: a potential mechanism for immune polarization in helminth infections. *J Immunol.* 2001, 167 (9): 5294–303.
10. Rodríguez-Sosa M, Satoskar AR, Calderón R, Gomez-Garcia L, Saavedra R, Bojalil R, Terrazas LI. Chronic helminth infection induces alternatively activated macrophages expressing high levels of CCR5 with low interleukin-12 production and Th2-biasing ability. *Infect Immun.* 2002; 70 (7): 3656–64.
11. Terrazas LI, Montero D, Terrazas CA, Reyes JL, Rodríguez-Sosa M. Role of the programmed Death-1 pathway in the suppressive activity of alternatively activated macrophages in experimental cysticercosis. *Int J Parasitol.* 2005; 35 (13): 1349–58.
12. Hume DA. Macrophages as APC and the Dendritic Cell Myth. *J. Immunol.* 2008, 181: 5829–5835.
13. Geissmann F, Gordon S, Hume DA, Mowat AM, Randolph GJ. Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity. *Nature Rev. Immunol.* 2010, 10: 453–460.

14. Liu K, Victora GD, Schwickert TA, Guermonprez P, Meredith MM. *et al.* *In vivo* analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science* 2009, 324: 392–397.
15. Paul WE, Zhu J. How are T<sub>H</sub>2-type immune responses initiated and amplified?. *Nat. Rev. Immunol.* 2010, 10: 225–235.
16. Sharpe AH, Freeman GJ. THE B7-CD28 SUPERFAMILY. *Nat. Rev. Immunol.* 2002, 2: 116–126.
17. Gerdes N, Zirlik A. Co-stimulatory molecules in and beyond co-stimulation – tipping the balance in atherosclerosis?. *Thrombosis and Haemostasis* 2011, 106 (5): 804–813.
18. Krow MK. Modification of accessory molecules signaling. *Springer Semin Immun.* 2006. 27:409–424
19. Folkl A, Bienzle D. Structure and function of programmed death (PD) molecules. *Veterinary Immunol and Immunopatol.* 2010. 134: 33-38.
20. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. THE B7 FAMILY REVISITED. *Annu. Rev. Immunol.* 2005. 23:515–48
21. Bhatia S, Edidin M, Almob SC, Nathenson SG. B7-1 and B7-2: Similar coestimulatory ligands with different biochemical, oligomeric and signaling properties. 2006. *Immunol. Letters.* 104: 70–75.
22. Willms K, Zurabian R. *Taenia crassiceps*: *in vivo* and *in vitro* models. *Parasitology.* 2010, 137: 335–346.
23. Larralde C, Sciotto E, Huerta L, Terrazas I, Fragoso G, Trueba L, Lemus D, Lomelí C, Tapia G, Montoya RM, et al. 1989. Experimental cysticercosis by *Taenia crassiceps* in mice: factors involved in susceptibility. *Acta Leiden.* 1989, 57(2):131–134.
24. Fleury A, Gomez T, Alvarez I, Meza D, Huerta M. High prevalence of calcified silent neurocysticercosis in a rural village of Mexico. *Neuroepidemiology.* 2003, 22 (2): 139–45
25. Morales J, Martínez JJ, Garcia-Castella J, Peña N, Maza V, Villalobos N, Aluja AS, Fleury A, Fragoso G, Larralde C, Sciotto E. *Taenia solium*: the complex interactions, of biological, social, geographical and commercial factors, involved in the transmission dynamics of pig cysticercosis in highly endemic areas. *Ann Trop Med Parasitol.* 2006, 100 (2): 123–135.
26. Sciotto E, Chavarria A, Fragoso G, Fleury A, Larralde C. The immune response in *Taenia solium* cisticercosis: protection and injury. *Parasite Immunol.* 2007, 29: 621–636.

27. Esquivel-Velázquez M, Ostoa-Saloma P, Morales-Montor J, Hernández-Bello R, Larralde C. 2011. Immunodiagnosis of neurocysticercosis: ways to focus on the challenge. *J Biomed Biotechnol*; 2011:516042.
28. Morales J, Martínez JJ, Rosetti M, Fleury A, Maza V, Hernandez M, Villalobos N, Fragoso G, de Aluja AS, Larralde C, Sciutto E. Spatial distribution of *Taenia solium* porcine cysticercosis within a rural area of Mexico. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008, 2(9):e284
29. Fleury A, Escobar A, Fragoso G, Sciutto E, Larralde C. Clinical heterogeneity of human neurocysticercosis results from complex interactions among parasite, host and environmental factors. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2010, 104 (4): 243–250.
30. Fleury A, Moreno García J, Valdez Aguerrebere P, de Sayve Durán M, Becerril Rodríguez P, Larralde C, Sciutto E. Neurocysticercosis, a persisting health problem in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010, 24;4(8):e805.
31. Larralde C, Montoya RM, Sciutto E, Diaz ML, Govezensky T, Coltorti E. Deciphering western blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus*, and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. *Am J Trop Med Hyg*. 1989, 40 (3): 282–90.
32. Larralde C, Sotelo J, Montoya RM, Palencia G, Padilla A, Govezensky T, Diaz ML, Sciutto E. Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid. Antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitute those from porcine *Taenia solium*. *Arch Pathol Lab Med*. 1990, 114(9): 926–8.
33. Sciutto E, Fragoso G, Trueba L, Lemus D, Montoya RM, Diaz ML, Govezensky T, Lomeli C, Tapia G, Larralde C. Cysticercosis vaccine: cross protecting immunity with *T. solium* antigens against experimental murine *T. crassiceps* cysticercosis. *Parasite Immunol*. 1990, 12(6): 687–696.
34. Gevorkian G, Manoutcharian K, Larralde C, Hernandez M, Almagro JC, Viveros M, Sotelo J, Garcia E, Sciutto E. Immunodominant synthetic peptides of *Taenia crassiceps* in murine and human cysticercosis. *Immunol Lett*. 1996, 49(3):185–189.
35. Toledo A, Larralde C, Fragoso G, Gevorkian G, Manoutcharian K, *et al*. Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. *Infect Immun*. 1999, 67 (5): 2522–2530.

- 36.** Morales-Montor J, Larralde C. The role of sex steroids in the complex physiology of the host-parasite relationship: the case of the larval cestode of *Taenia crassiceps*. *Parasitology*. 2005, 131(3):287–294.
- 37.** Huerta M, Sciutto E, García G, Villalobos N, Hernández M, *et al.* Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in underfed rustic pigs of México: roles of age, genetic background and antibody response. *Vet Parasitol*. 2000, 90 (3): 209–219.
- 38.** Fleury A, Morales J, Bobes RJ, Dumas M, Yáñez O, Piña J, Carrillo-Mezo R, Martínez JJ, Fragoso G, Dessein A, Larralde C, Sciutto E. An epidemiological study of familial neurocysticercosis in an endemic Mexican community. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2006, 100 (6):551–558.
- 39.** Morales J, Martínez JJ, Manoutcharian K, Hernández M, Fleury A, *et al.* Inexpensive anti-cysticercosis vaccine: S3Pvac expressed in heat inactivated M13 filamentous phage proves effective against naturally acquired *Taenia solium* porcine cysticercosis. *Vaccine*. 2008, 26 (23): 2899–905.
- 40.** Vázquez-Talavera J, Solís CF, Terrazas LI, Laclette JP. Characterization and protective potential of the immune response to *Taenia solium* paramyosin in a murine model of cysticercosis. *Infect Immun*. 2001, 69 (9): 5412–6.
- 41.** Díaz MA, Villalobos N, de Aluja A, Rosas G, Gómez-Conde E, Hernández P, Larralde C, Sciutto E, Fragoso G. Th1 and Th2 indices of the immune response in pigs vaccinated against *Taenia solium* cysticercosis suggest various host immune strategies against the parasite. *Vet Immunol Immunopathol*. 2003, 20;93(3-4): 81–90.
- 42.** Bojalil R, Terrazas LI, Govezensky T, Sciutto E, Larralde C. Thymus-related cellular immune mechanisms in sex-associated resistance to experimental murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J Parasitol*. 1993, 79 (3): 384–389.
- 43.** Morales-Montor J, Baig S, Mitchell R, Deway K, Hallal-Calleros C, Damian RT. Immunoendocrine interactions during chronic cysticercosis determine male mouse feminization: role of IL-6. *J Immunol*. 2001, 167 (8): 4527–4533.
- 44.** García G, Sciutto E, Fragoso G, Cruz-Revilla C, Toledo A, Villalobos N, Flores I, Aluja A, José MV, Larralde C. Inhibitory role of antibodies in the development of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* toward reproductive and pathogenic stages. *J Parasitol*. 2001, 87 (3): 582–586.



45. Rodríguez-Sosa M, Saavedra R, Tenorio EP, Rosas LE, Satoskar AR, Terrazas LI. A STAT4-dependent Th1 response is required for resistance to the helminth parasite *Taenia crassiceps*. *Infect Immun*. 2004, 72 (8): 4552–4560.
46. Terrazas LI, Cruz M, Rodríguez-Sosa M, Bojalil R, García-Tamayo F, Larralde C. Th1-type cytokines improve resistance to murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*. *Parasitol Res*. 1999, 85 (2): 135–141.
47. Rodríguez-Sosa M, Satoskar AR, David JR, Terrazas LI. Altered T helper responses in CD40 and interleukin-12 deficient mice reveal a critical role for Th1 responses in eliminating the helminth parasite *Taenia crassiceps*. *Int J Parasitol*. 2003, 33 (7): 703–711.
48. Becerra-Díaz M, Valderrama-Carvajal H, Terrazas LI. Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT) family members in helminth infections. *Int J Biol Sci*. 2011, 7 (9): 1371–1381.
49. Terrazas LI, Bojalil R, Govezensky T, Larralde C. Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J Parasitol*. 1998, 84 (1): 74–81.
50. Rodríguez-Sosa M, David JR, Bojalil R, Satoskar AR, Terrazas LI. Cutting edge: susceptibility to the larval stage of the helminth parasite *Taenia crassiceps* is mediated by Th2 response induced via STAT6 signaling. *J Immunol*. 2002, 168 (7): 3135–3139.
51. Paul WP, Shu J. How are TH2-type immune responses initiated and amplified?. *Nat Rev Immunol*. 2010, 10: 225–235.
52. Morales J, Velasco T, Tovar V, Fragoso G, Fleury A, Beltrán C, Villalobos N, Aluja A, Rodarte LF, Sciutto E, Larralde C. Castration and pregnancy of rural pigs significantly increase the prevalence of naturally acquired *Taenia solium* cysticercosis. *Vet Parasitol*. 2002, 108 (1): 41–48.
53. Villa OF, Kuhn RE. Mice infected with the larvae of *Taenia crassiceps* exhibit a Th2-like immune response with concomitant anergy and downregulation of Th1-associated phenomena. *Parasitology*. 1996, 112 (6): 561–570.
54. Sciutto E, Fragoso G, Baca M, De la Cruz V, Lemus L, Lamoyi E. Depressed T-cell proliferation associated with susceptibility to experimental *Taenia crassiceps* infection. *Infect Immun*. 1995, 63 (6): 2277–2281.

55. Toenjes SA, Kuhn RE. The initial immune response during experimental cysticercosis is of the mixed Th1/ Th2 type. *Parasitol Res.* 2003, 89: 407–413.
56. Reyes JL, Terrazas CA, Vera-Arias L, Terrazas LI. Differential response of antigen presenting cells from susceptible and resistant strains of mice to *Taenia crassiceps* infection. *Infect Genet Evol.* 2009, 9 (6): 1115–1127.
57. Toenjes SA, Spolski RJ, Mooney KA, Kuhn RE. The systemic immune response of BALB/c mice infected with larval *Taenia crassiceps* is a mixed Th1/Th2-type response. *Parasitol.* 1999, 118: 623–633.
58. Alonso-Trujillo J, Rivera-Montoya I, Rodríguez-Sosa M, Terrazas LI. Nitric oxide contributes to host resistance against experimental *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Parasitol Res.* 2007, 100 (6): 1341–1350.
59. Reyes JL, Espinoza-Jiménez AF, González MI, Verdin L, Terrazas LI. *Taenia crassiceps* infection abrogates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol.* 2011, 267 (2): 77–87.
60. Gómez-García L, Rivera-Montoya I, Rodríguez-Sosa M, Terrazas LI. Carbohydrate components of *Taenia crassiceps* metacestodes display Th2-adjuvant and anti-inflammatory properties when co-injected with bystander antigen. *Parasitol Res.* 2006, 99 (4): 440–448.
61. Landa A, Jiménez L, Willms K, Jiménez-García LF, Lara-Martínez R, Robert L, Cirioni O, Baranska-Rybak, Kamysz W. Antimicrobial peptides (Temporin A and Iseganan IB-367): Effect on the cysticerci of *Taenia crassiceps*. *Mol. & Bioch. Parasitol.* 2009, 164: 126–130.
62. Mooney KA, Spolski RJ, See EJ, Kuhn RE. Immune destruction of the larval *Taenia crassiceps* in mice. *Infect. Immun.* 2000, 68 (5):2393.
63. Aldridge JR, Johnson EC, Kuhn RE. CpG Stimulates Protective Immunity In Balb/cJ Mice Infected with Larval *Taenia crassiceps*. *J Parasitol.* 2010, 96 (5): 920–928.
64. Reyes JL, González MI, Ledesma-Soto Y, Satoskar AR, Terrazas LI. TLR2 mediates immunity to experimental cysticercosis. *Int J Biol Sci.* 2011, 7 (9): 1323–1333.
65. Gómez-García L, López-Marín LM, Saavedra R, Reyes JL, Rodríguez-Sosa M, Terrazas LI. Intact glycans from cestode antigens are involved in innate activation of myeloid suppressor cells. *Parasite Immunol.* 2005, 27(10-11): 395–405.

66. Gordon S, Hamann J, Lin HH, Stacey M. F4/80 and the related adhesion-GPCRs. *Eur. J. Immunol.* 2011, 41: 2470–2525.
67. Reyes JL, Terrazas CA, Alonso-Trujillo J, van Rooijen N, Satoskar AR, Terrazas LI. Early removal of alternatively activated macrophages leads to *Taenia crassiceps* cysticercosis clearance *in vivo*. *Int J Parasitol.* 2010, 40 (6): 731–742.
68. Rodríguez M, Terrazas LI, Márquez R, Bojalil R. Susceptibility to *Trypanosoma cruzi* is modified by a previous non-related infection. *Parasite Immunol.* 1999, 21 (4): 177–185.
69. Rodríguez-Sosa M, Rosas LE, David JR, Bojalil R, Satoskar AR, Terrazas LI. Macrophage migration inhibitory factor plays a critical role in mediating protection against the helminth parasite *Taenia crassiceps*. *Infect Immun.* 2003, 71 (3): 1247–1254.
70. Rodríguez-Sosa M, Rivera-Montoya I, Espinoza A, Romero-Grijalva M, López-Flores R, *et al.* Acute cysticercosis favours rapid and more severe lesions caused by *Leishmania major* and *Leishmania mexicana* infection, a role for alternatively activated macrophages. *Cell Immunol.* 2006, 242 (2): 61–71.
71. López-Navarrete G, Ramos-Martínez E, Suárez-Álvarez K, Aguirre-García J, Ledezma-Soto Y, *et al.* Th2-associated alternative Kupffer cell activation promotes liver fibrosis without inducing local inflammation. *Int J Biol Sci.* 2011, 7 (9): 1273–1286.
72. Terrazas CA, Sánchez-Muñoz F, Mejía-Domínguez AM, Amezcua-Guerra LM, Terrazas LI, Bojalil R, Gómez-García L. Cestode antigens induce a tolerogenic-like phenotype and inhibit LPS inflammatory responses in human dendritic cells. *Int J Biol Sci.* 2011, 7 (9): 1391–400.
73. Terrazas CA, Gómez-García L, Terrazas LI. Impaired pro-inflammatory cytokine production and increased Th2-biasing ability of dendritic cells exposed to *Taenia* excreted/secreted antigens: A critical role for carbohydrates but not for STAT6 signaling. *Int J Parasitol.* 2010, 40 (9): 1051–1062.
74. Sciutto E, Fragoso G, Diaz ML, Valdez F, Montoya RM, Govezensky T, Lomeli C, Larralde C. Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 complex and sex influence on susceptibility. *Parasitol Res.* 1991, 77 (3): 243–246.
75. Fragoso G, Meneses G, Sciutto E, Fleury A, Larralde C. Preferential growth of *Taenia crassiceps* cysticerci in female mice holds across several laboratory mice strains and parasite lines. *J Parasitol.* 2008, 94 (2): 551–553.

76. García G, Sciutto E, Fragoso G, Cruz-Revilla C, Toledo A, Villalobos N, Flores I, Aluja A, José MV, Larralde C. Inhibitory role of antibodies in the development of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* toward reproductive and pathogenic stages. *J Parasitol.* 2001, 87 (3): 582–586.
77. Cruz-Revilla C, Rosas G, Fragoso G, López-Casillas F, Toledo A, Larralde C, Sciutto E. *Taenia crassiceps* cysticercosis: protective effect and immune response elicited by DNA immunization. *J Parasitol.* 2000, 86 (1): 67–74.
78. Morales-Montor J, Chavarria A, De León MA, Del Castillo LI, Escobedo EG, *et al.* Host gender in parasitic infections of mammals: an evaluation of the female host supremacy paradigm. *J Parasitol.* 2004, 90 (3): 531–546.
79. Morales-Montor J, Baig S, Hallal-Calleros C, Damian RT. *Taenia crassiceps*: androgen reconstitution of the host leads to protection during cysticercosis. *Exp Parasitol.* 2002, 100 (4): 209–216.
80. Vargas-Villavicencio JA, Larralde C, De León-Nava MA, Morales-Montor J. Regulation of the immune response to cestode infection by progesterone is due to its metabolism to estradiol. *Microbes Infect.* 2005, 7 (3): 485–493.
81. Toledo A, Fragoso G, Rosas G, Hernández M, Gevorkian G, López-Casillas F, Hernández B, Acero G, Huerta M, Larralde C, Sciutto E. Two epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* confer protection against murine *T. crassiceps* cysticercosis along with a prominent T1 response. *Infect Immun.* 2001, 69 (3): 1766–1773.
82. Fleury A, Dessein A, Preux PM, Dumas M, Tapia G, Larralde C, Sciutto E. Symptomatic human neurocysticercosis-age, sex and exposure factors relating with disease heterogeneity. *J Neurol.* 2004, 251 (7): 830–837.
83. Romero R, Saenz B, Rosetti F, Perez-Tamayo R, Fragoso G, Huerta M, Arcega-Revilla R, Larralde C, Sciutto E, Fleury A. Human neurocysticercosis: rightward hemisphere asymmetry in the cerebral distribution of a single cysticercus. *J Parasitol.* 2007, 93 (5): 1238–1240.
84. Suzuki T, Shimizu T, Yu HP, Hsieh YC, Choudhry MA, Chaudry IH: Salutary effects of 17 $\beta$ -estradiol on T-cell signaling and cytokine production after trauma-hemorrhage are mediated primarily via estrogen receptor- $\alpha$ . *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007, 292:C2103–C2111.

85. Couto DD, Peixoto Júnior AA, Farias JL, Sales DD, Lima JP, *et al.* Gender and mortality in sepsis: do sex hormones impact the outcome? *Rev Bras Ter Intensiva.* 2011, 23 (3): 297–303.
86. Angele MK, Schwacha MG, Ayala A, Chaudry IH. Effect of gender and sex hormones on immune responses following shock. *Shock.* 2000, 14 (2): 81–90.
87. Whitacre CC. Sex differences in autoimmune disease. *Nat Immunol.* 2001, 2(9):777–780.
88. McCombe PA, Greer JM, Mackay IR. Sexual dimorphism in autoimmune disease. *Curr Mol Med.* 2009, 9(9):1058-79.
89. Ober C, Loisel DA, Gilad Y. Sex-specific genetic architecture of human disease. *Nat Rev Genet.* 2008, 9 (12):911–922.
90. Kovacs WJ, Olsen NJ. Sexual dimorphism of RA manifestations: genes, hormones and behavior. *Nat Rev Rheumatol.* 2011, 7 (5): 307–310.
91. De León-Nava MA, Morales-Montor J. Immune sexual dimorphism: can sex steroids affect the Th1/Th2 cytokine profile?. *Rev Invest Clin.* 2006, 58 (2): 161–169.
92. Escobedo G, Roberts CW, Carrero JC, Morales-Montor J. Parasite regulation by host hormones: an old mechanism of host exploitation?. *Trends Parasitol.* 2005, 21(12):588-593.
93. Papenfuss TL, Rogers CJ, Gienapp I, Yurrita M, McClain M, *et al.* Sex differences in experimental autoimmune encephalomyelitis in multiple murine strains. *J Neuroimmunol.* 2004, 150(1-2):59-69.
94. Yu CY, Whitacre CC. Sex, MHC and complement C4 in autoimmune diseases. *Trends Immunol.* 2004, 25 (12): 694–699.
95. C W Roberts, S M Cruickshank, J Alexander. Sex-determined resistance to *Toxoplasma gondii* is associated with temporal differences in cytokine production. *Infect Immun.* 1995, 63 (7): 2549–2555
96. Roberts CW, Walker W, Alexander J. Sex-Associated Hormones and Immunity to Protozoan Parasites. *Clin. Microbiol. Rev.* 2001, 14(3):476.
97. Morales-Montor J, Hall CA. The host-parasite neuroimmunoendocrine network in schistosomiasis: consequences to the host and the parasite. *Parasite Immunol.* 2007, 29 (12): 599–608.

98. Huerta L, Terrazas LI, Sciutto E, Larralde C. Immunological mediation of gonadal effects on experimental murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps* metacestodes. *J Parasitol.* 1992, 78 (3): 471–476.
99. Huy NT, Van Giang T, Thuy DH, Kikuchi M, Hien TT, Zamora J, Hirayama K. Factors associated with dengue shock syndrome: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013, 7 (9): 26.
100. Roberts CW, Cruickshank SM, Alexander J. Sex-determined resistance to *Toxoplasma gondii* is associated with temporal differences in cytokine production. *Infect. Immun.* 1995, 63 (7): 2549.
101. Lamason R, Zhao P, Rawat R, Davis A, Hall JC, *et al.* Sexual dimorphism in immune response genes as a function of puberty. *BMC immunol.* 2006, 7:2.
102. De León-Nava MA, Nava K, Soldevila G, López-Griego L, Chávez-Ríos JR, Vargas-Villavicencio JA, Morales-Montor J. Immune sexual dimorphism: effect of gonadal steroids on the expression of cytokines, sex steroid receptors, and lymphocyte proliferation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2009, 113 (1-2): 57–64.
103. Muñoz-Cruz S, Tognio-Pierce C, Morales-Montor J. Non-reproductive effects of sex steroids: their immunoregulatory role. *Curr Top Med Chem.* 2011, 11 (13): 1714–1727.
104. Terrazas LI, Bojalil R, Govezensky T, Larralde C. A role for 17-beta-estradiol in immunoendocrine regulation of murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J Parasitol.* 1994, 80 (4): 563–568.
105. Morales-Montor J, Mohamed F, Damian RT. *Schistosoma mansoni*: the effect of adrenalectomy on the murine model. *Microbes Infect.* 2004, 6 (5): 475–480.
106. Bottasso O, Morales-Montor J. Neuroimmunomodulation during infectious diseases: mechanisms, causes and consequences for the host. *Neuroimmunomodulation.* 2009, 16 (2): 65–67.
107. Vargas-Villavicencio JA, De León-Nava MA, Morales-Montor J. Immunoendocrine mechanisms associated with resistance or susceptibility to parasitic diseases during pregnancy. *Neuroimmunomodulation.* 2009, 16 (2): 114–121.
108. Hernández-Bello R, Escobedo G, Guzmán C, Ibarra-Coronado EG, López-Griego L, Morales-Montor J. Immunoendocrine host-parasite interactions during helminth infections:

from the basic knowledge to its possible therapeutic applications. *Parasite Immunol.* Sep-2010, 32 (9-10): 633–643.

**109.** Vargas-Villavicencio JA, Larralde C, Morales-Montor J. Gonadectomy and progesterone treatment induce protection in murine cysticercosis. *Parasite Immunol.* 2006, 28 (12): 667–674.

**110.** Escobedo G, Camacho-Arroyo I, Nava-Luna P, Olivos A, Pérez-Torres A, Leon-Cabrera S, Carrero JC, Morales-Montor J. Progesterone induces mucosal immunity in a rodent model of human taeniosis by *Taenia solium*. *Int J Biol Sci.* 2011, 7 (9): 1443–1456.

**111.** Morales-Montor J, Hallal-Calleros C, Romano MC, Damian RT. Inhibition of p-450 aromatase prevents feminisation and induces protection during cysticercosis. *Int J Parasitol.* 2002, 32 (11): 1379–1387.

**112.** Morales-Montor J, Baig S, Kabbani A, Damian RT. Do interleukin-6 and macrophage-migration inhibitory factor play a role during sex-associated susceptibility in murine cysticercosis?. *Parasitol Res.* 2002, 88 (10): 901–904.

**113.** Rodríguez-Dorantes M, López-Griego L, Zarazúa-Cruz CM, Morales-Montor J. Altered expression of cytokines and sex steroid receptors in the reproductive tract of cysticercotic male mice. *Parasite Immunol.* 2010, 32 (2): 91–100.

**114.** Morales-Montor J, Rodríguez-Dorantes M, Mendoza-Rodríguez CA, Camacho-Arroyo I, Cerbón MA. Differential expression of the estrogen-regulated proto-oncogenes c-fos, c-jun, and bcl-2 and of the tumor-suppressor p53 gene in the male mouse chronically infected with *Taenia crassiceps* cysticerci. *Parasitol Res.* 1998, 84 (8): 616–622.

**115.** Vargas-Villavicencio JA, Larralde C, Morales-Montor J. Gonadectomy and progesterone treatment induce protection in murine cysticercosis. *Parasite Immunol.* 2006, 28 (12): 667–674.

**116.** Chavarría A, Roger B, Fragoso G, Tapia G, Fleury A, Dumas M, Dessein A, Larralde C, Sciutto E. TH2 profile in asymptomatic *Taenia solium* human neurocysticercosis. *Microbes Infect.* 2003, 5 (12): 1109–1115.

**117.** Morales-Montor J, Escobedo G, Rodríguez-Dorantes M, Téllez-Ascencio N, Cerbón MA, Larralde C. Differential expression of AP-1 transcription factor genes c-fos and c-jun in the helminth parasites *Taenia crassiceps* and *Taenia solium*. *Parasitology.* 2004, 129 (2): 233–243.

- 118.** Escobedo G, Larralde C, Chavarria A, Cerbón MA, Morales-Montor J. Molecular mechanisms involved in the differential effects of sex steroids on the reproduction and infectivity of *Taenia crassiceps*. J Parasitol. 2004, 90 (6): 1235–1244.
- 119.** Vargas-Villavicencio JA, Larralde C, Morales-Montor J. Treatment with dehydroepiandrosterone *in vivo* and *in vitro* inhibits reproduction, growth and viability of *Taenia crassiceps* metacestodes. Int J Parasitol. 2008, 38 (7): 775–781.
- 120.** Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ. The functions of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. Nat. Immunol. 8, 3: 239–245 (2007).
- 121.** Jacobson DL, Gange SJ, Rose NR, Graham NM. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. Clin Immunol Immunopathol. 1997 Sep;84(3):223-43.
- 122.** Bodhankar S, Wang C, Vandenbark AA, Offner H. Estrogen-induced protection against experimental autoimmune encephalomyelitis is abrogated in the absence of B cells. Eur J Immunol. 2011 Apr;41(4):1165-75.
- 123.** Wira CR, Fahey JV, Abrahams VM, Rossoll RM. Influence of stage of the reproductive cycle and estradiol on thymus cell antigen presentation. J Steroid Biochem Mol Biol. 2003 Jan;84(1):79-87.
- 124.** Siracusa MC, Overstreet MG, Housseau F, Scott AL, Klein SL. 17beta-estradiol alters the activity of conventional and IFN-producing killer dendritic cells. J Immunol. 2008 Feb 1;180(3):1423-31.
- 125.** Kósa JP, Balla B, Kiss J, Podani J, Takács I, *et al.* Postmenopausal expression changes of immune system-related genes in human bone tissue. J Clin Immunol. 2009 Nov;29(6):761-8.
- 126.** Agrawal T, Vats V, Wallace PK, Salhan S, Mittal A. Role of cervical dendritic cell subsets, co-stimulatory molecules, cytokine secretion profile and beta-estradiol in development of sequaleae to *Chlamydia trachomatis* infection. Reprod Biol Endocrinol. 2008 Oct 1;6:46.
- 127.** Parr MB, Kepple L, McDermott MR, Drew MD, Bozzola JJ, Parr EL. A mouse model for studies of mucosal immunity to vaginal infection by herpes simplex virus type 2. Lab Invest. 1994 Mar;70(3):369-80.



- 128.** Prabhala RH, Wira CR. Sex hormone and IL-6 regulation of antigen presentation in the female reproductive tract mucosal tissues. *J Immunol.* 1995 Dec 15;155(12):5566-73.
- 129.** Kaushic C, Murdin AD, Underdown BJ, Wira CR. *Chlamydia trachomatis* infection in the female reproductive tract of the rat: influence of progesterone on infectivity and immune response. *Infect Immun.* 1998 Mar;66(3):893-8.
- 130.** Zheng WM, Yoshimura Y, Tamura T. Effects of age and gonadal steroids on the localization of antigen-presenting cells, and T and B cells in the chicken oviduct. *J Reprod Fertil.* 1998 Sep;114(1):45-54.
- 131.** Barua A, Yoshimura Y. Immunolocalization of MHC-II+ cells in the ovary of immature, young laying and old laying hens *Gallus domesticus*. *J Reprod Fertil.* 1999 Jul;116(2):385-9.
- 132.** Vicetti Miguel RD, Hendricks RL, Aguirre AJ, Melan MA, Harvey SA, *et al.* Dendritic cell activation and memory cell development are impaired among mice administered medroxyprogesterone acetate prior to mucosal herpes simplex virus type 1 infection. *J. Immunol.* 2012 Oct 1;189(7):3449-61.
- 133.** Klein SL, Cernetich A, Hilmer S, Hoffman EP, Scott AL, Glass GE. Differential expression of immunoregulatory genes in male and female Norway rats following infection with Seoul virus. *J Med Virol.* 2004 Sep;74(1):180-90.
- 134.** Mayr S, Walz CR, Angele P, Hernandez-Richter T, Chaudry IH, *et al.* Castration prevents suppression of MHC class II (Ia) expression on macrophages after trauma-hemorrhage. *J Appl Physiol (1985).* 2006 Aug;101(2):448-53.
- 135.** Papenfuss TL, Powell ND, McClain MA, Bedarf A, Singh A, *et al.* Estriol generates tolerogenic dendritic cells *in vivo* that protect against autoimmunity. *J Immunol.* 2011 Mar 15;186(6):3346-55.
- 136.** Matejuk A, Hopke C, Vandenbark AA, Hurn PD, Offner H. Middle-age male mice have increased severity of experimental autoimmune encephalomyelitis and are unresponsive to testosterone therapy. *J Immunol.* 2005 Feb 15;174(4):2387-95.
- 137.** Luckey D, Medina K, Taneja V. B cells as effectors and regulators of sex-biased arthritis. *Autoimmunity.* 2012 Aug;45(5):364-76.
- 138.** Weinstein Y, Ran S, Segal S. Sex-associated differences in the regulation of immune responses controlled by the MHC of the mouse. *J Immunol.* 1984 Feb;132(2):656-61.

- 139.** Debout C, Lefroit-Jolij M, Neveu T, Izard J. 17 beta estradiol affects the expression of guinea pig blood leukocyte MHC antigens. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1991 Jun;38(6):695-701.
- 140.** Griffin AC, Whitacre CC. Sex and strain differences in the circadian rhythm fluctuation of endocrine and immune function in the rat: implications for rodent models of autoimmune disease. *J Neuroimmunol.* 1991 Dec;35(1-3):53-64.
- 141.** Whitman SC, Ravisankar P, Daugherty A. IFN-gamma deficiency exerts gender-specific effects on atherogenesis in apolipoprotein E<sup>-/-</sup> mice. *J Interferon Cytokine Res.* 2002 Jun;22(6):661-70.
- 142.** Pelfrey CM, Moldovan IR, Cotleur AC, Zamor N, Rudick RA. Effects of sex hormones on costimulatory molecule expression in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2005 Oct;167(1-2):190-203.
- 143.** Yang L, Hu Y, Hou Y. Effects of 17beta-estradiol on the maturation, nuclear factor kappa B p65 and functions of murine spleen CD11c-positive dendritic cells. *Mol Immunol.* 2006 Feb;43(4):357-66. Epub 2005 Mar 19.
- 144.** Yang L, Li X, Zhao J, Hou Y. Progesterone is involved in the maturation of murine spleen CD11c-positive dendritic cells. *Steroids.* 2006 Oct;71(10):922-9. Epub 2006 Aug 21.
- 145.** Liarte S, Chaves-Pozo E, Abellán E, Meseguer J, Mulero V, Canario AV, García-Ayala A. Estrogen-responsive genes in macrophages of the bony fish gilthead seabream: a transcriptomic approach. *Dev Comp Immunol.* 2011 Aug;35(8):840-9.
- 146.** Paharkova-Vatchkova V, Maldonado R, Kovats S. Estrogen preferentially promotes the differentiation of CD11c<sup>+</sup> CD11b(intermediate) dendritic cells from bone marrow precursors. *J Immunol.* 2004 Feb 1;172(3):1426-36.
- 147.** Douin-Echinard V, Laffont S, Seillet C, Delpy L, Krust A, *et al.* Estrogen receptor alpha, but not beta, is required for optimal dendritic cell differentiation and [corrected] CD40-induced cytokine production. *J Immunol.* 2008 Mar 15;180(6):3661-9.
- 148.** Segerer SE, Müller N, van den Brandt J, Kapp M, Dietl J, *et al.* Impact of female sex hormones on the maturation and function of human dendritic cells. *Am J Reprod Immunol.* 2009 Sep;62(3):165-73.

- 149.** Xu Y, Fan H, Li X, Sun L, Hou Y.  $17\beta$ -Estradiol enhances response of mice spleen B cells elicited by TLR9 agonist. *Cell Immunol.* 2012 Jul-Aug;278(1-2):125-35.
- 150.** Butts CL, Shukair SA, Duncan KM, Bowers E, Horn C, Belyavskaya E, Tonelli L, Sternberg EM. Progesterone inhibits mature rat dendritic cells in a receptor-mediated fashion. *Int Immunol.* 2007 Mar;19(3):287-96.
- 151.** Butts CL, Bowers E, Horn JC, Shukair SA, Belyavskaya E, Tonelli L, Sternberg EM. Inhibitory effects of progesterone differ in dendritic cells from female and male rodents. *Gend Med.* 2008 Dec;5(4):434-47.

# **XI. Apéndices**

## **Apéndice i**

### Publicaciones en revistas indexadas

#### Artículo de investigación

a. Togno-Peirce C, Nava-Castro K, Terrazas LI, Morales-Montor J. Sex-Associated Expression of Co-Stimulatory Molecules CD80, CD86, and Accessory Molecules, PDL-1, PDL-2 and MHC-II, in F480+ Macrophages during Murine Cysticercosis. *BioMed Research International*. (2013), Volume 2013, Article ID 570158.

#### Artículos de revisión

b. Togno-Peirce C, Morales-Montor J. Esteroides sexuales e inmunidad: el papel del estradiol sobre las células dendríticas. *Revista de investigación clínica*. (2009). 61(6): 521–532.

c. Muños-Cruz S, Togno-Pierce C, Morales-Montor J. Non-Reproductive Effects of Sex Steroids: Their Immunoregulatory Role. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. (2011). 11: 1714–1727.

## **Apéndice ii.**

### Colaboraciones en libros

a. Morales Montor J, Velázquez Moctezuma J. Integración neuroinmunoendócrina. 1° Ed, UNAM, México, 2010, pp 27-54.

b. Camacho Arroyo I, Morales Montor J, Velázquez Moctezuma J. Efectos no reproductivos de hormonas esteroides. 1° Ed, Universidad Autónoma Metropolitana, Sociedad Mexicana de Parasitología, México, 2011, pp 27-54

# **Apéndice i. a.**

## Research Article

# Sex-Associated Expression of Co-Stimulatory Molecules CD80, CD86, and Accessory Molecules, PDL-1, PDL-2 and MHC-II, in F480+ Macrophages during Murine Cysticercosis

Cristián Togno-Peirce,<sup>1</sup> Karen Nava-Castro,<sup>2</sup>  
Luis Ignacio Terrazas,<sup>3</sup> and Jorge Morales-Montor<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70228, 04510 México, DF, Mexico

<sup>2</sup>Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, DF, Mexico

<sup>3</sup>Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida de Los Barrios No. 1 Los Reyes Iztacala, 54090 Tlalnepantla de Baz, MEX, Mexico

Correspondence should be addressed to Jorge Morales-Montor; [jmontor66@biomedicas.unam.mx](mailto:jmontor66@biomedicas.unam.mx)

Received 31 August 2012; Revised 1 November 2012; Accepted 15 November 2012

Academic Editor: Miriam Rodríguez-Sosa

Copyright © 2013 Cristián Togno-Peirce et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Macrophages are critically involved in the interaction between *T. crassiceps* and the murine host immune system. Also, a strong gender-associated susceptibility to murine cysticercosis has been reported. Here, we examined the sex-associated expression of molecules MHC-II, CD80, CD86, PD-L1, and PD-L2 on peritoneal F4/80<sup>hi</sup> macrophages of BALB/c mice infected with *Taenia crassiceps*. Peritoneal macrophages from both sexes of mice were exposed to *T. crassiceps* total extract (TcEx). BALB/c Females mice recruit higher number of macrophages to the peritoneum. Macrophages from infected animals show increased expression of PDL2 and CD80 that was dependent from the sex of the host. These findings suggest that macrophage recruitment at early time points during *T. crassiceps* infection is a possible mechanism that underlies the differential sex-associated susceptibility displayed by the mouse gender.

## 1. Introduction

Gender of the host influences the outcome of many parasitic diseases. For example, in *Leishmania major* infection, female mice mount a strong Th1 response and resolve the infection. In contrast, male mice mount a Th2-dominant response and develop chronic lesions [1]. In other protozoan infections, such as toxoplasmosis, an opposite finding was observed: female mice succumb to *Toxoplasma gondii* infection despite a Th1 response, whereas male mice display resistance and survive for a longer period of time to similar challenges [2].

In helminth infections, the gender of the host also plays an important role in the outcome of the infection by inducing different responses depending on the sex [3, 4]. In contrast to the well-described adaptive immunity against these helminthic infections, the role of macrophages (Mφs)

is still unclear. There have been only limited studies on the macrophage response to helminth-derived antigens and the impact of these responses on the outcome of the infection is not known. Much lesser information exists in relation to the role of sex on the macrophage response to helminth-derived antigens.

A sexual dimorphism exists in the acquired immune response against different pathologies and in many autoimmune diseases, which suggests a linkage between the immune and reproductive endocrine system [5]. Moreover, reciprocal endocrine interactions between host and parasite are a strong factor that has an influence in parasite success [6, 7].

Experimental murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps* [8, 9] is well known as a manageable experimental system which explores the role of biological factors involved

in host susceptibility [10]. Interestingly, in *T. crassiceps* cysticercosis, females of all strains of mice studied sustain larger intensities of infection than males [11]. At the same time, the cellular immune response (Th1) is markedly diminished in both sexes, and the humoral response is enhanced (Th2) [12]. Estradiol is involved in the immunoendocrine regulation of murine *T. crassiceps* cysticercosis as a major protagonist in promoting cysticercus growth by interfering with the thymus dependent cellular immune mechanisms that obstruct parasite growth [13]. Gonadectomy alters this resistance pattern and makes intensities equal in both sexes by increasing that of male mice and diminishing it in female mice [14]. In addition, the hormonal substitution of gonadectomized males and reconstitution of female mice with 17 $\beta$ -estradiol increased parasite loads [13]. Also, specific splenocyte cell proliferation, IL-2, and IFN- $\gamma$  production were depressed in gonadectomized-parasitized mice of both genders, and after the reconstitution with testosterone or dihydrotestosterone, there was a significant recovery of the splenocyte proliferation and Th1 cytokine production on these animals. On the other hand, mice treated with estradiol were not able to induce these cellular responses [15].

Macrophages are phagocytic cells that are widely distributed on the organism and have an important role in the maintenance of the homeostasis [16]. These cells are involved in T cell activation through antigen presentation by the expression of MHC molecules and costimulatory/inhibitory molecules. It has been demonstrated that the expression of MHC molecules and the expression of costimulatory molecules such as B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) could modulate T cell activation and Th1/Th2 polarization during infection and autoimmunity [17, 18]. Programmed death ligand 1 (PD-L1) and programmed death ligand 2 (PD-L2) have been related to alternate activated phenotype in macrophages induced during *Taenia crassiceps* infection [19]. Macrophages also have a broad participation in the development of the immune response to many pathogens, particularly to helminthes [20] by polarizing T helper (Th) cells activation in Th1 or Th2, and also have a role in tissue remodeling and wound repair [21]. In the context of immunoendocrine communication, it has been shown that sex steroids are able to modulate survival of human macrophages cell lines [22], the recruitment of macrophages to the site of inflammation, and their effector functions [23]. As occurred with other immune cells, the effect of sex steroids on macrophages depends on the concentration, type, and the context in which macrophages are studied [24]. Furthermore, it has been previously established that sex steroid effects on macrophages depend on the expression of the androgen receptor (AR) [25, 26], progesterone receptor (PR) [27], and both types of estrogen receptor (ER $\alpha$  y ER $\beta$ ) [28].

Since macrophages have been importantly involved in susceptibility/resistance in murine cysticercosis and also can be modulated by sex steroids, we evaluated and compared the response of molecules of early activation of recruited F4/80<sup>hi</sup> macrophages, such as MHC-II, CD80, CD86, PD-L1, and PD-L2 in both gender infected mice. Our results showed that

indeed there is a differential expression of these molecules in female and male mice and that this could partially impact the different sex-associated susceptibility to cysticercosis in mice.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Ethics Statement.** The Animal Care and Use Committee at the Instituto de Investigaciones Biomédicas evaluated animal care and experimentation practices according to the official Mexican regulations (NOM-062-ZOO-1999) in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health (NIH and the Weatherall Report) of the USA. The Ethics Committee of the Instituto de Investigaciones Biomédicas approved this protocol (Permission Number 2009-13).

**2.2. Animals and Experimental Infections.** Male and female BALB/cAnN (H2-d) inbred mice obtained from Harlan (Mexico City) were used in all experiments. Animals were housed in the animal care facilities at Instituto de Investigaciones Biomédicas, (UNAM), under controlled conditions of temperature and 12 h dark-light cycles with lights on between 0700 and 1900. They were fed Purina Diet 5015 (Purina, St. Louis, MO) and given tap water ad libitum.

**2.3. Aantigen Extraction and Infection.** Metacestodes of *Taenia crassiceps* of the ORF strain were harvested in aseptic conditions from the peritoneal cavity of female BALB/cAnN mice after 4 months of infection. Metacestodes were washed with cold sterile saline (Solución CS, Laboratorios PISA. S.A. de C.V. [NaCl 0.9%]). *T. crassiceps* soluble extract (TcEx) was prepared in cold aseptic conditions, homogenizing whole metacestodes (30 mL volume) with three pulses of 60 Hz with a duration of 1 s, by using an ultrasonic homogenizer (Vibracell, SONICS & MATERIALS, Newtown, USA). The homogenates were centrifuged at 20,000 g for 30 min at 4°C, and the supernatants containing saline-soluble antigens were collected and frozen at -20°C until further use. Protein concentration was estimated by Bradford protein kit assay (BioRad). Sex- and age-matched mice were infected by intraperitoneal (ip) injection with 20 small (approximately 2 mm) nonbudding cysticerci/300  $\mu$ L saline, with 400  $\mu$ g TcEx in 300  $\mu$ L saline or 300  $\mu$ L saline as control. Six days after-injection, animals were sacrificed by inhalation of an overdose of sevoflurane (Sevorane; Abbott) and peritoneal cells were collected for analysis.

**2.4. Isolation of Peritoneal Macrophages.** Peritoneal exudate cells (PECs) were obtained from saline, TcEx-treated, or 6-day-*T. crassiceps* infected mice (BALB/c male or female) by peritoneal lavage with 7 mL of sterile ice-cold saline (Laboratorios PISA. S.A. de C.V. [NaCl 0.9%]). The cells were washed twice with cold PBS. After two washes, the viable cells were counted by trypan blue exclusion with a Neubauer hemocytometer. Viable cells were counted and adjusted to 1  $\times$  10<sup>6</sup> cells/mL. Viability was measured by trypan blue exclusion. Routinely viability was around over 95%.



**2.5. Analysis of Cell Surface Markers in Macrophages.** The surface expression of macrophage markers was analyzed using multicolor flow cytometry. M $\phi$ s were suspended in cold PBS containing 2% FCS and 0.02% NaN<sub>3</sub>. The Fc receptors were blocked with anti-mouse CD16/CD32 for 20 min at 4°C. The cells were washed and triple stained with an APC-conjugated mAbs against F4/80, PE-conjugated mAbs against CD86 or PD-L2, PerCP-conjugated IA/IE (MHC-II), PE-Cy5-conjugated CD80 or Biotin-conjugated PD-L1, and PE-Cy5-conjugated Streptavidin. All Abs were purchased from BioLegend (BioLegend, San Diego, CA, USA). A gate including high forward light scatter (FSC)/high side light scatter (SSC) cells was generated and in that gate the different markers were analyzed. The stained cells were captured using a FACsCalibur flow cytometer (Becton Dickinson) and data analyzed with the FlowJo (Tree Star) software. Absolute numbers in all assays were calculated according to the percentage of positive macrophages and the total numbers of PECs.

**2.6. Statistical Analysis.** The data of the three replications of each experiment were pooled and expressed as their average. The data were analyzed using analysis of variance (ANOVA) with sex (2 levels) and number of experiment (3 levels) as independent variables and as dependent variables: the total number of developed cysticerci and the expression of each molecule. If significant differences between treatments were found by ANOVA, differences between the group means were assessed within each experiment by means of Tukey test using the residual variance estimated by ANOVA to test for significance. Differences were considered significant when  $P < 0.05$ .

### 3. Results

In order to determine the role of sex during early infection, mice of both sexes were infected and sacrificed 6 days after-infection. As previously reported [29], at this time point of infection, there is no statistical difference in parasite loads between males and females, though there is a slight trend in males to have less parasites than females (Figure 1). This result is also consistent with the observation that sexual dimorphism begins after the first week of infection in BALB/c mice [30].

To detect the presence of M $\phi$ s and to look for a difference in the number of total M $\phi$ s during early infection, we analyzed the population of PECs recruited to the peritoneal cavity (site of infection) of saline-treated, TcEx, and infected mice of both sexes. Total PECs recruitment in infected male mice is decreased ( $P < 0.05$ ) compared to infected females, while treatment with saline solution or TcEx did not affect the total number of PECs recruited (Figure 2(a)). Since M $\phi$ s have been previously involved in the susceptibility/resistance to murine cysticercosis, we decided to analyze their percentage (Figure 2(b)) and their total number (Figure 2(c)), defined by their high expression of F4/80 (F4/80<sup>hi</sup>). We found no differences in the percentage of F4/80<sup>hi</sup> cells between sexes (Figure 2(b)), but there was a marked increase in the total number of M $\phi$ s detected in infected females with respect to

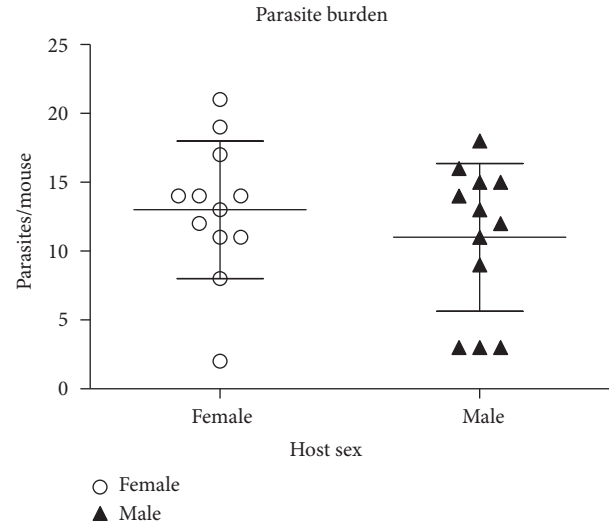


FIGURE 1: Parasite load obtained of Female (F) and male (M) mice. Data show the number of parasites recovered from the peritoneal cavity at 6 days post-infection. At this time of infection, animals did not show the typical sexual dimorphism of this infection observed in longer infection times. Each point represents individual parasite loads.

infected males. This difference was not observed in the other treatments (Figure 2(c)).

To characterize the phenotype of M $\phi$ s recruited of the peritoneal cavity of infected mice of both sexes, we look for the expression of MHC-II (Figure 3), CD80/CD86 (Figure 4), and PD-L1/PD-L2 (Figure 5) by flow cytometry. In Figure 3(a), the percentage of MHC-II+ cells found is depicted. There is no difference associated to treatment or sex, in the percentage of M $\phi$ s expressing these molecule. However, as seen in the total number of PECs of infected female mice, the total number of M $\phi$ s MHC-II+ is also increased (Figure 3(b)). As for the relative mean intensity of the expression of MHC-II (a measure of the amount of the total MHC-II per cell), there is no difference between animals, either by treatment or sex (Figure 3(c)).

In Figure 4, the analysis of the expression of CD80 and CD86 is plotted. There were no differences associated to sex in the percentage of M $\phi$ s expressing CD80 or CD86 (Figures 4(a) and 4(d)). However, there is a marked difference in the total number of CD80+ or CD86+ M $\phi$ s that is observed in infected mice; female mice show an increased number of this population when compared to male mice (Figures 4(b) and 4(e)). We also compared the relative mean intensity (MSR) of the expression of these molecules, in terms to define differences in the coestimulatory ability of these cells. We found no differences between male and female mice in terms of CD80 expression either by treatment or sex (Figure 4(c)). However, CD86 appeared less expressed in male mice than in female mice, even when these data did not show significance (Figure 4(f)).

Finally we look for differences in the expression of PD-L1 and PD-L2 inhibitory molecules. As shown in Figures 5(a)

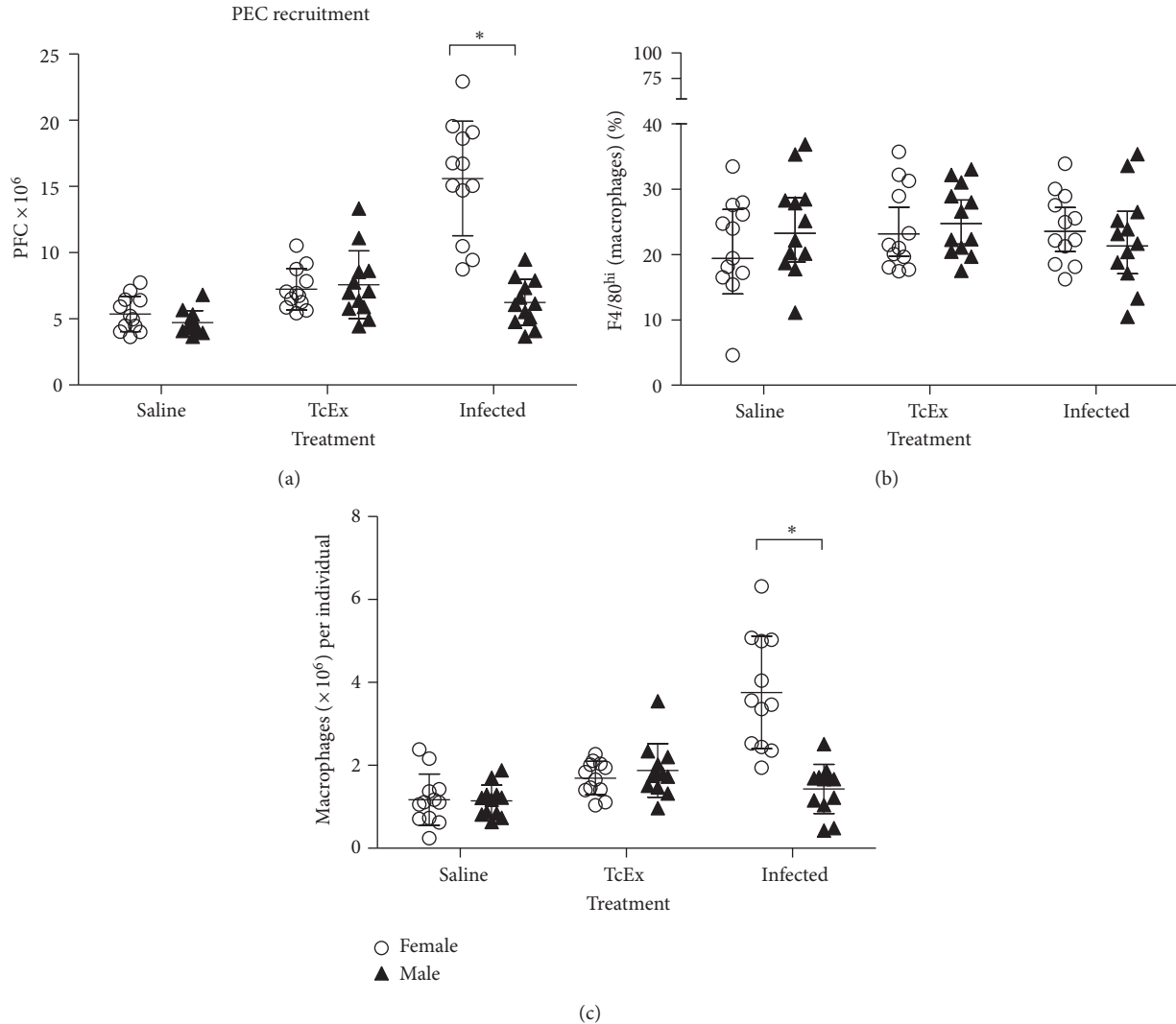


FIGURE 2: Kinetics of total peritoneal exudate cells (PECs) recovered from the peritoneum after *T. crassiceps* infection. (a) Peritoneal cells were isolated from male and female BALB/c at 6 days after infection with twenty cysticerci. Without any additional stimulation, the cells were processed for flow cytometry and analyzed. (b) Flow cytometry analysis shows that macrophages (F4/80<sup>hi</sup>) are recruited within 6 days p.i. (d.p.i.). (c) Increased numbers are detected per individual associated to sex as infection progresses peritoneal exudate cells.

and 5(d), there were no differences in the percentage of PD-L1 or PD-L2 expressing M $\phi$ s among males and females, but there were differences among treatment: infection induced a higher expression of PD-L1/2 than TcEx. As observed for CD80/86, there were also higher numbers of PD-L1- or PD-L2-positive M $\phi$ s in infected female mice than in infected male mice (Figures 5(b) and 5(e)); but there were no changes in the expression of these molecules on M $\phi$ s (Figures 5(c) and 5(f)).

#### 4. Discussion

Given the reported importance of sex- and pregnancy-associated hormones in the establishment and outcome of parasitic diseases, this is an area of research that is likely to grow. The important role that sex steroids plays during murine cysticercosis has been previously demonstrated

in experiments in which gonadectomy, thymectomy, and whole body irradiation showed that both the endocrine and immune systems of the mice were involved in the parasite load differences between the host sexes. Interestingly orchidectomy in male mice raises parasite loads while ovariectomy has the opposite effect; it increased them 3-fold [14]. Thymus hindered parasite reproduction in both sexes but more so in males than in females, thus tending to equalize the number of parasites in thymectomized mice of both sexes [31].

Macrophages play a key role in directing the host immune response to parasites and they can also function as effector cells. The recruitment and activation of macrophages by helminth-derived molecules initiate with the expression of accessory molecules. These immune mediators play crucial roles in the development of immunity against a variety of

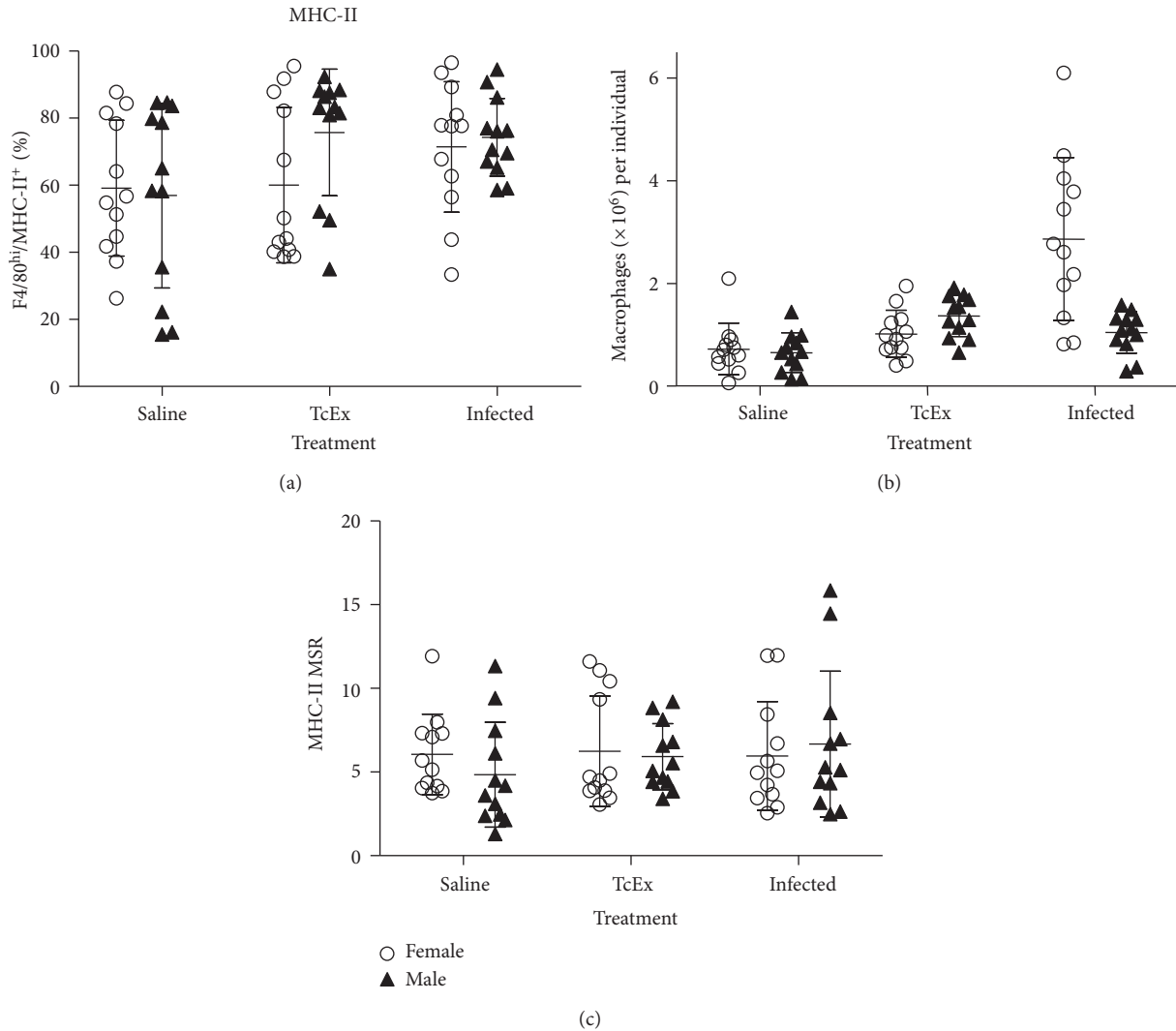


FIGURE 3: MHC-II characterization in Mφs recovered from the peritoneum after *T. crassiceps* infection. MHC-II expression was determined on Mφs (F4/80<sup>hi</sup>) recruited after 6 days of infection with 20 cysts of *T. crassiceps*. The percentage (a), total numbers (b), and the expression of this molecule (relative mean intensity, MSR) (c) are shown.

pathogens, but their role in helminthic infections is less well understood [32, 33]. In this study, we found an increased number of recruited macrophages from *T. crassiceps*-infected female BALB/c mice in comparison with male mice and expressed MHC-II, the coestimulatory molecules CD80, CD86, and the accessory molecules PD-L1 and PD-L2. However, the major difference that we found was associated to infection, though a clear difference in the number of parasites did not exist. There were more Mφs in infected females compared to those observed in infected males after similar stimulation. These data are consistent with the susceptible phenotype observed in IL-12 KO mice [34] and suggest a major role for macrophages in cysticercosis. The mechanism underlying the differential expression of MHC-II, CD80, CD86, PD-L1, and PD-L2 in our system remains to be elucidated; however, it may be associated with an impaired

intracellular signaling in BALB/c male mice but not in female mice.

The relevance of these observations is highlighted by the finding that macrophages from BALB/c female mice became more rapidly alternatively activated in *T. crassiceps* chronic infection, whereas macrophages from male mice presented a transient and incomplete alternate activation during early infection [35]. Thus, the presence and the persistence of AAMφ are another striking difference between the susceptible and resistant sex of mice to *T. crassiceps* infection.

In the context of immunoendocrine communication, it has been previously established that macrophages express the androgen receptor (AR) [25, 26], progesterone receptor (PR) [27], and both types of estrogen receptor (ERα and ERβ) [28]. It has been shown that sex steroids are able to modulate survival of human macrophages cell lines [22], the recruitment of

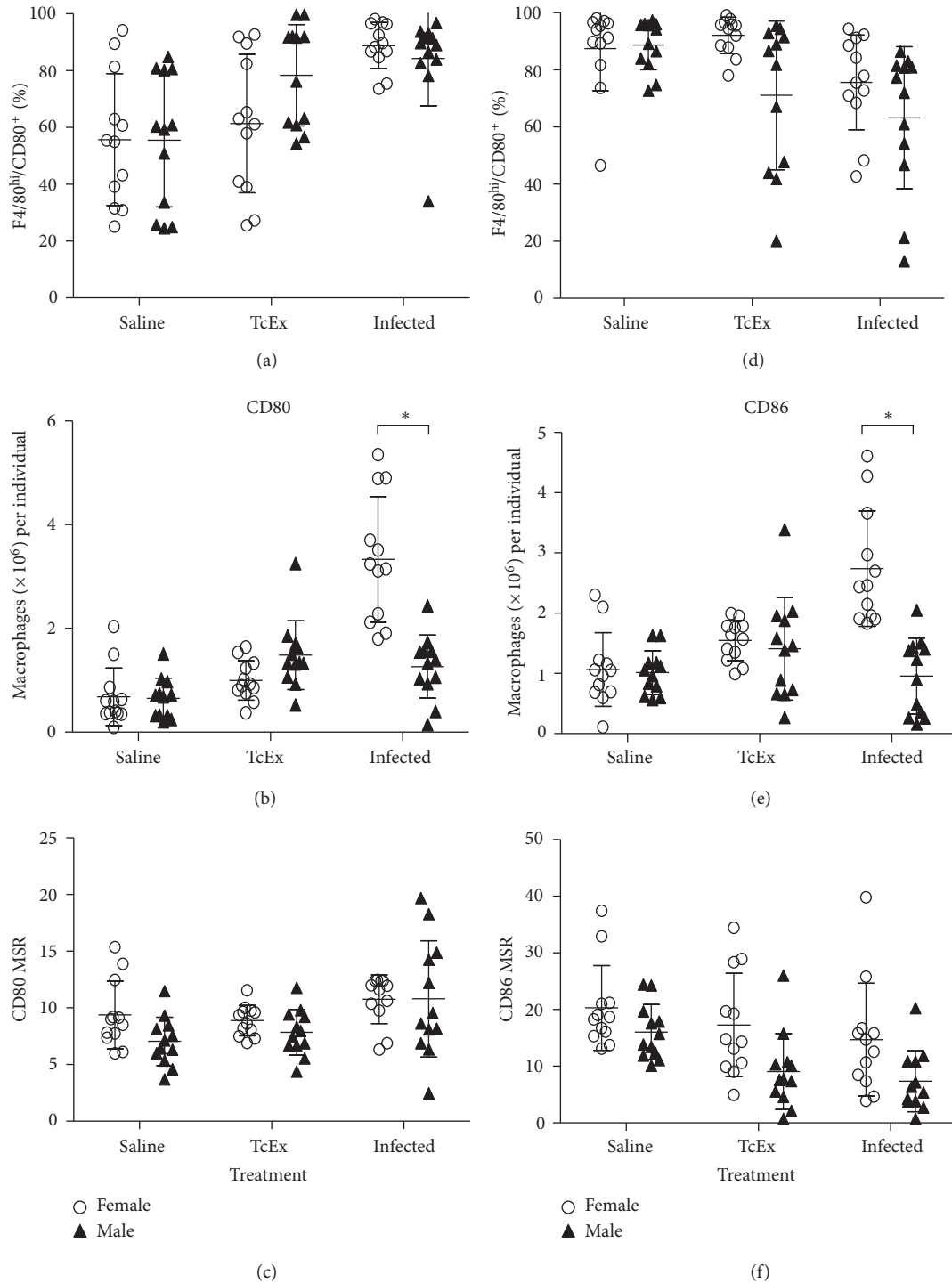


FIGURE 4: CD80/CD86 characterization in Mφs recovered from the peritoneum after *T. crassiceps* infection. Costimulatory molecules CD80 and CD86 expression was determined on Mφs (F4/80<sup>hi</sup>) recruited after 6 days of infection with 20 cysts of *T. crassiceps*. The percentages (a) and (d), Total numbers (b) and (e), and the expression of these molecule (relative mean intensity, MSR) (c) and (f) are shown.

macrophages to the site of inflammation [23], and their effector functions. As occurred with other immune cells, the effect of sex steroids on macrophages depends on the concentration, type, and the context in which macrophages are studied [24].

For instance, in the murine model of incisional wound, gonadectomy of females is associated to an increased inflammation and delay in wound healing. This effect is due to the fact that ovariectomy induces an increase in the secretion of TNF- $\alpha$  and MIF, as well as in the number of infiltrated

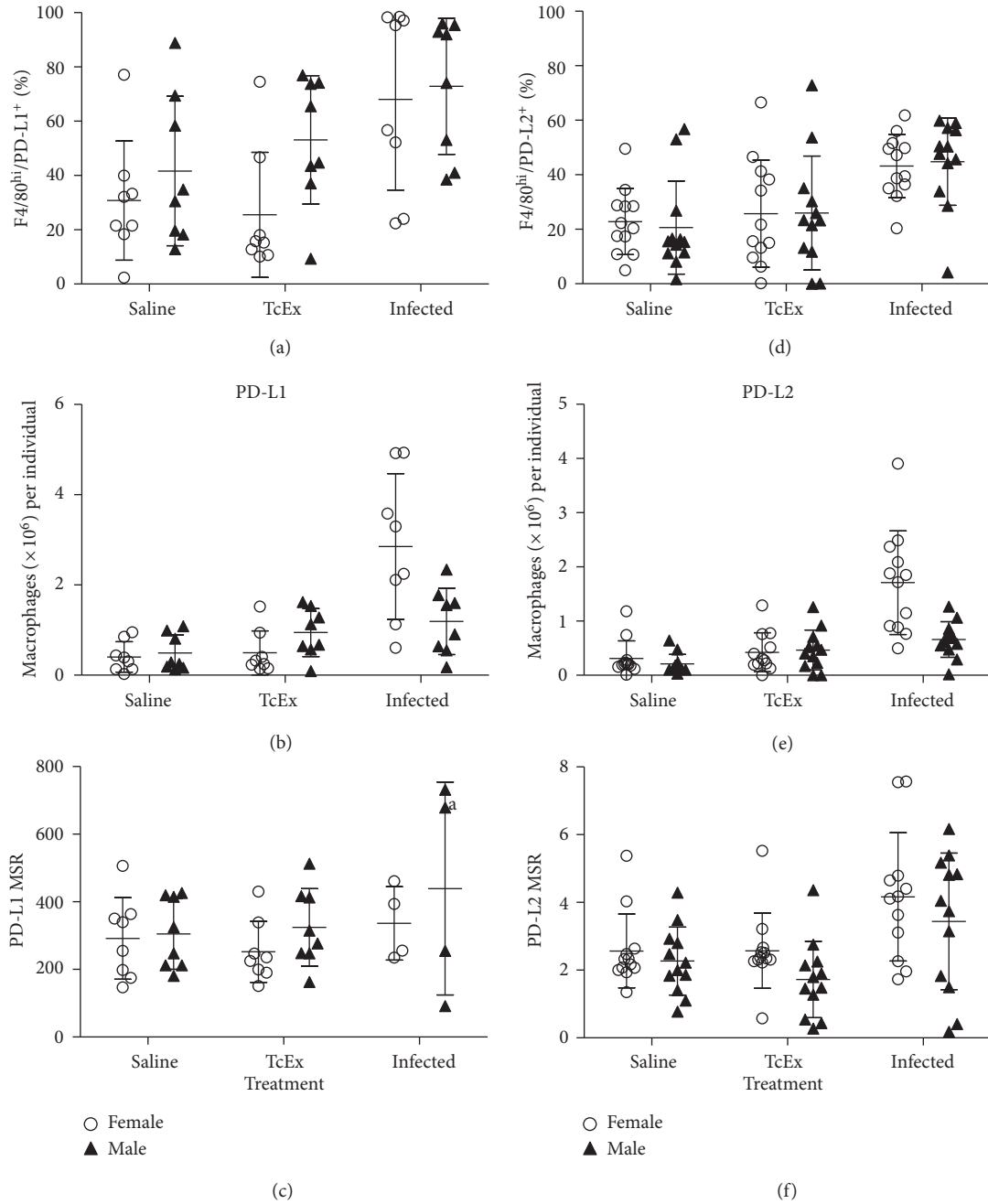


FIGURE 5: PD-L1/PD-L2 characterization in  $M\phi$ s recovered of the peritoneum after *T. crassiceps* infection. Inhibitory molecule, PD-L1, and PD-L2 expression was determined on  $M\phi$ s ( $F4/80^{hi}$ ) recruited after 6 days of infection with 20 cysts of *T. crassiceps*. The percentages (a) and (d), total numbers (b and e), and the expression of these molecules (relative mean intensity, MSR) (c) and (f) are shown.

macrophages at the site of the lesion. Also, the percentage of alternatively activated macrophages is decreased [23, 36]. If castrated females are reconstituted with E2 concentrations observed during estrous, then the production of  $TNF-\alpha$ , MIF, and the total number of infiltrated macrophages in the wounds are decreased. However, treatment with physiological levels of progesterone has a modest effect, in comparison to the effect induced by estradiol, on the same parameters studied [23]. Moreover, sex steroids regulate the production

of nitric oxide (NO) by macrophages, in a dichotomic way. At low concentrations, E2 stimulates the secretion of NO by LPS-activated macrophages in vitro; however, at high concentrations of E2, there is a decrease of NO [37, 38]. Furthermore, estradiol and to a lesser extent progesterone decrease the activity of the enzyme catalase, a very important modulator of the NO synthesis [39]. As such, these data may represent an important mechanism underlying the immunomodulating effects of sex steroids.

Previously, we showed that during murine cysticercosis, an impressive feminization process is produced in the male host, characterized by an increase in serum estradiol level of 200 times above their normal value, roughly similar to those of normal females, while those of testosterone decreased by 90% relative to controls [29]. These changes in the hormonal milieu of the host equalize the parasite loads between genders. In the same way, progesterone treatment tends to equalize parasite loads in females and males, which suggests that other gonad-associated factors are involved in the control of parasite growth. Therefore, a more intricate strategy of parasite activity has to be considered. Perhaps, high estrogen levels are the main feature of this intriguing puzzle, since, in males, the parasite loads increased more markedly than in females. We suppose that expression of costimulatory molecules early during infection could be differential, and this fact impacts the parasite loads that are different among males and females, late during infection. This hypothesis was tested in this study and found that always females have higher expression of MHC-II, CD80, CD86, PD-L1, and PD-L2 during infection, but not in response to saline or TcEx. Interestingly, estradiol concentrations are higher in infected females early in infection [29].

## 5. Conclusion

In summary, the results presented here demonstrate that recruitment and expression of MHC-II, CD80, CD86, PD-L1, and PD-L2 in M $\phi$  of peritoneal cavity in *T. crassiceps* early at infection is associated to the sex of the host, although at the time of infection the number of parasites does not differ between both sexes. Whatever the cysticercosis-relevant "sex steroid target" may prove to be, the fact steroids positively may interfere with the development of protective immune mechanisms against *Taenia crassiceps* cysticerci has an important implication for future vaccine and vaccination trials, among others projections.

## Acknowledgments

Financial support was obtained by Grant number IN214011 from Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), of the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), from Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) to J. Morales-Montor. C. Togno-Peirce had a Ph.D. fellowship from CONACyT, México, and from UNAM. K. Nava-Castro is a Postdoctoral Fellow from DGAPA, U.N.A.M.

## References

- [1] A. Satoskar and J. Alexander, "Sex-determined susceptibility and differential IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  mRNA expression in DBA/2 mice infected with *Leishmania mexicana*," *Immunology*, vol. 84, no. 1, pp. 1–4, 1995.
- [2] O. Liesenfeld, T. A. Nguyen, C. Pharke, and Y. Suzuki, "Importance of gender and sex hormones in regulation of susceptibility of the small intestine to peroral infection with *Toxoplasma gondii* tissue cysts," *Journal of Parasitology*, vol. 87, no. 6, pp. 1491–1493, 2001.
- [3] K. Nava-Castro, R. Hernández-Bello, S. Muñoz-Hernández, I. Camacho-Arroyo, and J. Morales-Montor, "Sex steroids, immune system, and parasitic infections: facts and hypotheses," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1262, no. 1, pp. 16–26, 2012.
- [4] R. Poulin, "Helminth growth in vertebrate hosts: does host sex matter?" *International Journal for Parasitology*, vol. 26, no. 11, pp. 1311–1315, 1996.
- [5] H. O. Besedovsky and A. del Rey, "Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses," *Endocrine Reviews*, vol. 17, no. 1, pp. 64–102, 1996.
- [6] J. Morales-Montor, S. Baig, R. Mitchell, K. Deway, C. Hallal-Calleros, and R. T. Damian, "Immunoendocrine interactions during chronic cysticercosis determine male mouse feminization: role of IL-6," *Journal of Immunology*, vol. 167, no. 8, pp. 4527–4533, 2001.
- [7] J. Morales-Montor, G. Escobedo, J. A. Vargas-Villavicencio, and C. Larralde, "The neuroimmunoendocrine network in the complex host-parasite relationship during murine cysticercosis," *Current Topics in Medicinal Chemistry*, vol. 8, no. 5, pp. 400–407, 2008.
- [8] K. L. Culbreth, G. W. Esch, and R. E. Kühn, "Growth and development of larval *Taenia crassiceps* (Cestoda). III. The relationship between larval biomass and the uptake and incorporation of <sup>14</sup>C-leucine," *Experimental Parasitology*, vol. 32, no. 2, pp. 272–281, 1972.
- [9] R. S. Freeman, "Studies on responses of intermediate host to infection with *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) (Cestoda)," *Canadian Journal of Zoology*, vol. 42, no. 3, pp. 367–385, 1964.
- [10] E. Scitutto, G. Fragoso, and C. Larralde, "*Taenia crassiceps* as a model for *Taenia solium* and the S3Pvac vaccine," *Parasite Immunology*, vol. 33, no. 1, pp. 79–80, 2011.
- [11] G. Fragoso, G. Meneses, E. Scitutto, A. Fleury, and C. Larralde, "Preferential growth of *Taenia crassiceps* cysticerci in female mice holds across several laboratory mice strains and parasite lines," *Journal of Parasitology*, vol. 94, no. 2, pp. 551–553, 2008.
- [12] L. I. Terrazas, R. Bojalil, T. Govezensky, and C. Larralde, "Shift from an early protective TH1-type immune response to a late permissive TH2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*)," *Journal of Parasitology*, vol. 84, no. 1, pp. 74–81, 1998.
- [13] L. I. Terrazas, R. Bojalil, T. Govezensky, and C. Larralde, "A role for 17- $\beta$ -estradiol in immunoendocrine regulation of murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*)," *Journal of Parasitology*, vol. 80, no. 4, pp. 563–568, 1994.
- [14] L. Huerta, L. I. Terrazas, E. Scitutto, and C. Larralde, "Immunological mediation of gonadal effects on experimental murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps* metacestodes," *Journal of Parasitology*, vol. 78, no. 3, pp. 471–476, 1992.
- [15] J. Morales-Montor, S. Baig, C. Hallal-Calleros, and R. T. Damian, "*Taenia crassiceps*: androgen reconstitution of the host leads to protection during cysticercosis," *Experimental Parasitology*, vol. 100, no. 4, pp. 209–216, 2002.
- [16] P. J. Murray and T. A. Wynn, "Protective and pathogenic functions of macrophage subsets," *Nature Reviews Immunology*, vol. 11, no. 11, pp. 723–737, 2011.
- [17] B. Salomon and J. A. Bluestone, "Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation," *Annual Review of Immunology*, vol. 19, no. 1, pp. 225–252, 2001.

- [18] A. N. Schweitzer and A. H. Sharpe, "Studies using antigen-presenting cells lacking expression of both B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) show distinct requirements for B7 molecules during priming versus restimulation of Th2 but not Th1 cytokine production," *Journal of Immunology*, vol. 161, no. 6, pp. 2762–2771, 1998.
- [19] L. I. Terrazas, D. Montero, C. A. Terrazas, J. L. Reyes, and M. Rodríguez-Sosa, "Role of the programmed Death-1 pathway in the suppressive activity of alternatively activated macrophages in experimental cysticercosis," *International Journal for Parasitology*, vol. 35, no. 13, pp. 1349–1358, 2005.
- [20] S. J. Jenkins and J. E. Allen, "Similarity and diversity in macrophage activation by nematodes, trematodes, and cestodes," *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, vol. 2010, Article ID 262609, 14 pages, 2010.
- [21] A. Sica and A. Mantovani, "Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 122, no. 3, pp. 787–795, 2012.
- [22] M. Subramanian and C. Shaha, "Up-regulation of Bcl-2 through ERK phosphorylation is associated with human macrophage survival in an estrogen microenvironment," *Journal of Immunology*, vol. 179, no. 4, pp. 2330–2338, 2007.
- [23] C. E. Routley and G. S. Ashcroft, "Effect of estrogen and progesterone on macrophage activation during wound healing," *Wound Repair and Regeneration*, vol. 17, no. 1, pp. 42–50, 2009.
- [24] S. Muñoz-Cruz, C. Togno-Pierce, and J. Morales-Montor, "Non-reproductive effects of sex steroids: their immunoregulatory role," *Current Topics in Medicinal Chemistry*, vol. 11, no. 13, pp. 1714–1727, 2011.
- [25] K. Ahmadi and A. B. McCrudden, "Macrophage may responses to androgen via its receptor," *Medical Science Monitor*, vol. 12, no. 1, pp. BR15–BR20, 2006.
- [26] G. S. Ashcroft and S. J. Mills, "Androgen receptor-mediated inhibition of cutaneous wound healing," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 110, no. 5, pp. 615–624, 2002.
- [27] K. N. Khan, H. Masuzaki, A. Fujishita et al., "Estrogen and progesterone receptor expression in macrophages and regulation of hepatocyte growth factor by ovarian steroids in women with endometriosis," *Human Reproduction*, vol. 20, no. 7, pp. 2004–2013, 2005.
- [28] Y. Wang, L. Wang, J. Zhao, and Z. Qiao, "Estrogen, but not testosterone, down-regulates cytokine production in nicotine-induced murine macrophage," *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, vol. 27, no. 5, pp. 311–316, 2005.
- [29] C. Larralde, J. Morales, I. Terrazas, T. Govezensky, and M. C. Romano, "Sex hormone changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis," *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 52, no. 6, pp. 575–580, 1995.
- [30] E. Scitutto, G. Fragoso, M. L. Diaz et al., "Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 complex and sex influence on susceptibility," *Parasitology Research*, vol. 77, no. 3, pp. 243–246, 1991.
- [31] R. Bojalil, L. I. Terrazas, T. Govezensky, E. Scitutto, and C. Larralde, "Thymus-related cellular immune mechanisms in sex-associated resistance to experimental murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*)," *Journal of Parasitology*, vol. 79, no. 3, pp. 384–389, 1993.
- [32] J. E. Allen and P. Loke, "Divergent roles for macrophages in lymphatic filariasis," *Parasite Immunology*, vol. 23, no. 7, pp. 345–352, 2001.
- [33] H. S. Goodridge, E. H. Wilson, W. Harnett, C. C. Campbell, M. M. Harnett, and F. Y. Liew, "Modulation of macrophage cytokine production by ES-62, a secreted product of the filarial nematode *Acanthocheilonema viteae*," *Journal of Immunology*, vol. 167, no. 2, pp. 940–945, 2001.
- [34] M. Rodríguez-Sosa, A. R. Satoskar, J. R. David, and L. I. Terrazas, "Altered T helper responses in CD40 and interleukin-12 deficient mice reveal a critical role for Th1 responses in eliminating the helminth parasite *Taenia crassiceps*," *International Journal for Parasitology*, vol. 33, no. 7, pp. 703–711, 2003.
- [35] M. Rodríguez-Sosa, A. R. Satoskar, R. Calderón et al., "Chronic helminth infection induces alternatively activated macrophages expressing high levels of CCR5 with low interleukin-12 production and Th2-biasing ability," *Infection and Immunity*, vol. 70, no. 7, pp. 3656–3664, 2002.
- [36] S. C. Gilliver, J. J. Ashworth, S. J. Mills, M. J. Hardman, and G. S. Ashcroft, "Androgens modulate the inflammatory response during acute wound healing," *Journal of Cell Science*, vol. 119, no. 4, pp. 722–732, 2006.
- [37] T. C. Chao, H. H. Chao, M. F. Chen, J. A. Greager, and R. J. Walter, "Female sex hormones modulate the function of LPS-treated macrophages," *The American Journal of Reproductive Immunology*, vol. 44, no. 5, pp. 310–318, 2000.
- [38] H. Huang, J. He, Y. Yuan et al., "Opposing effects of estradiol and progesterone on the oxidative stress-induced production of chemokine and proinflammatory cytokines in murine peritoneal macrophages," *Journal of Medical Investigation*, vol. 55, no. 1-2, pp. 133–141, 2008.
- [39] F. Gay-Andrieu, G. J. N. Cozon, J. Ferrandiz, and F. Peyron, "Progesterone fails to modulate *Toxoplasma gondii* replication in the RAW 264.7 murine macrophage cell line," *Parasite Immunology*, vol. 24, no. 4, pp. 173–178, 2002.

# **Apéndice i. b.**



# Esteroides sexuales e inmunidad: el papel del estradiol sobre las células dendríticas

Cristián Togno-Peirce,\* Jorge Morales-Montor\*

\* Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

*Sex steroids and immunity:  
the role of estrogens on dendritic cells*

## ABSTRACT

*It is well known that 17 $\beta$ -estradiol have diverse effects on the development of sexual traits, fertility and survival of neurons. On top of these effects, its participation as an important modulator of several immune functions has been described. For instance, estradiol participation has been invoked in relation to the immune sexual dimorphism, and, on sex associated incidence of several autoimmune diseases. Furthermore, its role during the resistance or susceptibility to many diverse infections (such as viral, bacterial and parasitic) has also been demonstrated. Dendritic cells (DCs) have a central role in the activation of the adaptative immune response, and in the maintenance of tolerance. In the last few years, the study of the effects of 17 $\beta$ -estradiol on DCs has shown that this hormone regulates their differentiation and function, in vitro as well as in vivo. Depending on the context, 17 $\beta$ -estradiol is able to exert benefic or deleterious effects. In the present communication, we summarize the described effects of estradiol on DCs, comparing the information obtained from studies in vitro versus the information from in vivo experiments.*

**Key words.** Sex steroids. Dendritic cells. 17 $\beta$ -estradiol. Immune system. Antigen presentation. Autoimmunity. Sexual dimorphism.

## INTRODUCCIÓN

Es bien conocido que algunas hormonas esteroideas, tales como los glucocorticoides poseen efectos sobre el sistema inmune.<sup>1</sup> Pero, los glucocorticoides son sólo un ejemplo de una extensa lista de hormo-

## RESUMEN

El estradiol (17 $\beta$ -estradiol) es una hormona esteroidea que tiene efectos biológicos bien conocidos en diferentes especies de vertebrados. Sus efectos se han descrito principalmente en el desarrollo de los caracteres sexuales, sobre la fertilidad, e incluso en la sobrevivencia de las neuronas. Además de participar en estos procesos biológicos, se ha demostrado que existen diversos efectos del estradiol sobre varias funciones del sistema inmune. Debido a su participación en la regulación de las respuestas inmune, se le ha relacionado en el dimorfismo sexual inmunitario, a la frecuencia de enfermedades autoinmunes, y a la resistencia o susceptibilidad a varias infecciones, tanto virales y bacterianas, como parasitarias.

Las células dendríticas DCs (utilizaremos la abreviatura DCs, por sus siglas en inglés, que usaremos a lo largo de este escrito para evitar confusión con el término CD “cluster of differentiation”) poseen un papel central en la activación de la respuesta inmune y en el mantenimiento de la tolerancia. En los últimos años, se ha demostrado que el estradiol regula la diferenciación, y algunas otras funciones de las DCs, tanto *in vitro*, como *in vivo*. En general, es importante destacar que el estradiol puede tener efectos benéficos o perjudiciales, dependiendo del contexto fisiológico. El presente trabajo presenta un resumen de los efectos descritos del estradiol sobre las DCs, comparando la información obtenida de los estudios *in vitro* contra los efectos del estradiol sobre las DCs *in vivo*, haciendo énfasis en su papel durante la enfermedad y el posible uso de ésta información para su aplicación clínica.

**Palabras clave.** Esteroides sexuales. Células dendríticas. 17 $\beta$ -estradiol. Sistema inmune. Presentación antigénica. Autoinmunidad. Dimorfismo sexual.

nas con efectos inmunorreguladores, que forman parte de una red de comunicación entre los sistemas inmune, nervioso central y endocrino. Mediante esta red de comunicación, se coordinan varios procesos biológicos, tales como el metabolismo, la reproducción y el desarrollo de diversas respuestas inmunes,

por lo que es muy importante para mantener la homeostasis en los vertebrados en general, y en los mamíferos en particular.<sup>1</sup> Entre las varias hormonas que participan en la comunicación neuroinmunoendocrina, se encuentran los esteroides sexuales, reconocidos por su participación en el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios y su relación con la fertilidad. Sin embargo, también poseen una extensa gama de otros efectos, que no son sólo reproductivos sobre el organismo. Se ha demostrado previamente, que los esteroides sexuales modulan el estado de ánimo, la masa ósea, la presión arterial, la neuroprotección a enfermedades neurodegenerativas, pero, sobre todo, las funciones de varios tipos celulares dentro del sistema inmune.

El efecto de los esteroides sexuales sobre el sistema inmune merece atención, ya que varias enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso generalizado, la esclerosis múltiple y la artritis reumatoide, son más frecuentes en las mujeres que en los hombres. Por otro lado, las mujeres son más resistentes a varias infecciones (por varios patógenos), y es claro que las diferencias en susceptibilidad entre los sexos se pueden observar mejor en el laboratorio con diversos modelos animales. Se ha sugerido que las hembras poseen un sistema inmune más robusto que los machos, y que estas diferencias son el resultado, al menos en parte, de los efectos del 17 $\beta$ -estradiol (E2) sobre el sistema inmune.<sup>2-5</sup> Particularmente, el E2 afecta las funciones de células NK, macrófagos, mastocitos y linfocitos,<sup>5</sup> además de que puede modular la resistencia a infecciones parasitarias.<sup>6</sup> Sin embargo, los efectos del E2 sobre el sistema inmune dependen del contexto y no siempre necesariamente se relacionan a la resistencia contra las infecciones, como es en el caso de la cisticercosis experimental murina,<sup>6</sup> o a la susceptibilidad en la autoinmunidad, cómo en la encefalomiелitis experimental autoinmune o el lupus eritematoso generalizado.<sup>7</sup> Los efectos del E2 sobre el sistema inmune son pleiotrópicos, y su participación en el desarrollo de las respuestas inmunes puede ser mejor entendido como la suma de los efectos del E2 sobre los distintos tipos celulares que participan en éstas. A su vez, los efectos del E2 sobre el sistema inmune varían en función del contexto en el que son analizadas, como discutiremos más adelante.

En el presente trabajo nos enfocamos a analizar y discutir los efectos del E2 sobre uno de los protagonistas del sistema inmune que sirven de interfase entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa, como son las DCs.

Desde hace más de 30 años, las DCs se han reconocido como potentes estimuladoras de la respuesta proliferativa de los linfocitos T, y hoy se distinguen como las células presentadoras de antígenos más eficientes, ya que son superiores a los macrófagos en el desempeño de esta función.<sup>8</sup> Esta condición resalta su importancia en la defensa del organismo contra las infecciones y en el desarrollo de enfermedades autoinmunes.

Las DCs son capaces de endocitar células apoptóticas, y además también hacen lo propio a diversos patógenos y sus productos. Las DCs procesan y presentan a los productos de endocitosis a los linfocitos T en el contexto de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (CPH), en forma de complejos antigénicos. Las interacciones entre DCs y linfocitos T pueden llevar a la activación de la inmunidad adaptativa o a la generación de tolerancia periférica, dependiendo de las características de los elementos endocitados por las DCs, y de las condiciones en que esto ocurre.<sup>8,9</sup> En el primer caso, las DCs presentan complejos antigénicos junto con señales co-estimuladoras que son transmitidas por la expresión de las moléculas CD80 y CD86 (también llamadas B7.1 y B7.2, respectivamente), activando a aquellos linfocitos que reconozcan al complejo antigénico. Además de activar a los linfocitos T, las DCs pueden programar la diferenciación de los linfocitos T cooperadores hacia un perfil Th1 o Th2, mediante la secreción de citocinas y patrones de expresión de las moléculas co-estimuladoras.<sup>10</sup> En el segundo caso, las DCs pueden causar anergia o la apoptosis de los linfocitos T que reconocen los antígenos presentados por las DCs en ausencia de señales co-estimuladoras o por la expresión de moléculas accesorias supresoras como PD-L1 y PD-L2.<sup>11</sup>

Una vez iniciada la respuesta inmune, las DCs regulan la duración e intensidad de las respuestas con utilidad para el control de enfermedades inflamatorias.<sup>12</sup> También poseen funciones efectoras en las respuestas inmunes innatas, producen interferón alfa (IFN- $\alpha$ ) ante el reconocimiento de virus,<sup>13</sup> iniciando procesos inflamatorios tras reconocer patrones moleculares asociados a patógenos y activando a otras células de la inmunidad innata como las NK.<sup>14</sup>

## TIPOS DE DCs

Las DCs son un conjunto bastante heterogéneo de células que varían en fenotipo y función; sin embargo, la mayoría de estas células se puede distin-

guir por expresar niveles elevados de la molécula CD11c y de moléculas de la clase II del CPH (CPH-II). La clasificación de las DCs ha sido abordada recientemente en dos revisiones.<sup>15,16</sup>

Los estudios del efecto del E2 sobre las DCs se han enfocado a tres categorías de este tipo celular, reconocibles por la expresión de marcadores de membrana y diferencias funcionales, éstas son: las DCs convencionales (cDCs) caracterizadas por expresar los marcadores CD11c y CPH-II en ausencia de los marcadores B220 y NK1.1 (CD11c<sup>+</sup>/CPH-II<sup>+</sup>/B220<sup>-</sup>/NK1.1<sup>-</sup>), y en general secretan IL-12 en respuesta a los estímulos por lipopolisacáridos (LPS).<sup>15,16</sup> Las cDCs pueden ser subdivididas en varias categorías con base en la expresión de otros marcadores como CD11b, Ly6C y el homodímero CD8 $\alpha$ .<sup>15,16</sup> El segundo grupo de DCs al que nos referiremos son las células dendríticas plasmacitoides (pDCs) que expresan los marcadores CD11c<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup>/NK1.1<sup>-</sup> y niveles variables de CPH-II. Estas células se caracterizan por una abundante secreción de interferones del tipo I (IFN-I) en respuesta a varios tipos de patógenos intracelulares como los virus encapsulados.<sup>17</sup> El tercer tipo, son las recientemente descritas DCs asesinas productoras de interferón (IKDCs).<sup>18</sup> Las IKDCs pueden secretar IL-12, IFN- $\gamma$  o IFN del tipo I dependiendo del estímulo, y se distinguen por expresar una combinación de marcadores de moléculas membranales característicos de DCs y de células NK que incluyen a CD11c<sup>+</sup>/CPH-II<sup>+</sup>/B220<sup>-</sup>/NK1.1<sup>+</sup>/CD49b<sup>+</sup>.<sup>19</sup> La naturaleza de las IKDCs es polémica, algunos sugirieron que en realidad son células NK activadas,<sup>20</sup> mientras que otros sostienen que su ontogenia difiere de las NK.<sup>21</sup>

## ESTRADIOL Y SUS RECEPTORES

Los estrógenos son un conjunto de hormonas esteroideas que incluyen al estriol, la estrona y el estradiol. El estradiol (E2) es el más abundante y de mayor relevancia fisiológica en las mujeres en edad reproductiva. Los estrógenos son producidos por la aromatización de los andrógenos, por ejemplo, la testosterona sufre la pérdida del grupo angular C-19 y la formación de un anillo aromático y da origen al E2. La principal fuente de estrógenos son los ovarios y la placenta, aunque hay otros órganos importantes de producción de estrógenos como la piel y el cerebro.

Los estrógenos señalizan a través de receptores citoplasmáticos llamados receptor a estrógenos (RE), de los que hay dos subtipos principales, que son codificados por dos diferentes genes: el RE $\alpha$  y el

RE $\beta$ . La unión del E2 a los RE causa la dimerización del receptor y su translocación al núcleo, en donde interactúan con secuencias del DNA llamadas elementos de respuesta a estrógenos, y promueve o inhibe la expresión de genes. Cada dímero del RE posee distintas afinidades por los elementos de respuesta a estrógenos, y el número de cada isoforma de RE varía entre células, razón por la cual la gama de efectos del E2 es bastante amplia.<sup>22</sup>

A lo anterior se suman los efectos no genómicos del E2, mediados por receptores de membrana entre los que se incluye GPR30, que a diferencia de los receptores ubicados en el citoplasma generan efectos en tiempos muy cortos caracterizados por cambios en el flujo intracelular de iones y la fosforilación de proteínas, que a su vez pueden llevar a la activación de genes.<sup>23</sup>

## DIFERENCIACIÓN DE DCs *IN VITRO*

Las DCs pueden diferenciarse a partir de precursores mieloides y linfoides contenidos en la población Lin<sup>-</sup>/c-kit<sup>+</sup>/Flt3<sup>+</sup> de las células de la médula ósea del ratón, entre los que se incluyen el progenitor multipotencial de médula ósea, el progenitor común mieloides y el progenitor común linfoides.<sup>24</sup> Cabe resaltar que cada uno de los progenitores es capaz de generar pDCs y todos los subtipos de cDCs, es decir, el fenotipo de las cDCs no es un reflejo de su linaje mieloides o linfoides, razón por la cual se ha considerado que los términos DCs “linfoides” (CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>) y DCs “mieloides” (CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>) no son adecuados; sin embargo, siguen siendo frecuentes en la literatura.

Los precursores para la diferenciación de DCs *in vitro* se obtienen típicamente de la médula ósea de animales, o de monocitos periféricos CD14<sup>+</sup> de sangre periférica del humano.<sup>25</sup> Hay varios métodos para la diferenciación de DCs *in vitro*, pero únicamente se han empleado dos de éstos para el estudio de los efectos del E2 sobre las DCs. El primero de estos métodos consiste en cultivar durante aproximadamente ocho días precursores en un medio que contenga factor estimulante formador de colonia de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, por sus siglas en inglés), lo que da origen a cDCs CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> “mieloides”. El GM-CSF puede ser empleado junto con otras citocinas como IL-4, generando DCs que presentan características distintas en comparación a las diferenciadas con GM-CSF únicamente.<sup>16,26,27</sup>

El segundo método para diferenciar DCs, es muy semejante al primero, pero en este caso GM-CSF es sustituido por el ligando de la tirosina cinasa Flt3

(Flt3-L), de esta manera se da origen a varios subtipos de cDCs y a pDCs. Los tipos de DCs generadas varían dependiendo del uso del GM-CSF o Flt3-L. Ambas citocinas tienen papeles importantes en la diferenciación de las DCs *in vivo*, el GM-CSF se ha relacionado a la resistencia contra infecciones y tumores, además de regular el desarrollo de inflamación patológica.<sup>28</sup> Flt3-L ha demostrado ser indispensable para el mantenimiento de varias poblaciones de DCs en condiciones fisiológicas (en ausencia de inflamación o infección).<sup>29,30</sup>

### EFFECTOS DEL E2 SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE DCs *IN VITRO*

El efecto del E2 y la participación de los RE sobre la diferenciación de DCs en cultivos estimulados por el GM-CSF han sido abordados por varios grupos de investigadores y es el mejor caracterizado. El E2 es un componente relevante en los medios de cultivo para la diferenciación de DCs, a pesar de que esto no resulte obvio ya que en la mayoría de los cultivos se emplean medios "regulares" que contienen rojo fenol y suero fetal bovino, el primero es un agonista débil de los RE,<sup>31</sup> mientras que el suero fetal bovino contiene E2 y mantienen las concentraciones de esta hormona entre 0.03 y 0.55 nM.<sup>32,33</sup>

Varios grupos han demostrado que el porcentaje de DCs (CD11c<sup>+</sup>/CPH-II<sup>+</sup>) diferenciadas en cultivos estimulados por el GM-CSF, es considerablemente mayor en medios que contienen E2 en concentraciones entre 0.01 y 1.0 nM, en comparación a los medios que contienen concentraciones menores, o en los que se incluyó algún antagonista de los RE como ISI182, 780 (ISI) o Tamoxifen.<sup>30,32,34,35</sup> El aumento en el porcentaje de DCs estimulado por E2 es proporcional a la disminución en el porcentaje de células mieloides, caracterizadas por la expresión de marcadores CD11c/Gr-1<sup>+</sup>/CPH-II<sup>-</sup>, que pueden contener precursores no diferenciados de las DCs.<sup>35,36</sup> El E2 no afecta la sobrevivencia de las células en los cultivos estimulados por el GM-CSF.<sup>34,36,37</sup>

En línea con lo anterior, el porcentaje de DCs generadas por progenitores en los que se ha suprimido la expresión del RE $\alpha$  (RE $\alpha$ <sup>-/-</sup>) es equivalente a la proporción de DCs generada en medios deficientes de esteroides, que es hasta cuatro veces menor a las DCs generadas en medios regulares (que contienen suero fetal bovino y por tanto E2) empleando precursores silvestres. Los precursores RE $\alpha$ <sup>-/-</sup> no responden a diferencias en la concentración del E2, mientras que los efectos sobre el porcentaje de DCs derivadas de precursores RE $\beta$ <sup>-/-</sup> son más modestos y responden a

cambios en la concentración del E2. Lo anterior implica que el RE $\alpha$  tiene un papel central en los efectos del E2 sobre la diferenciación de las DCs en cultivos estimulados por el GM-CSF.<sup>36,37</sup>

Las DCs diferenciadas en medios regulares que contengan suero fetal bovino son tan capaces como las DCs diferenciadas en medios que contengan 10.0 nM del E2 (mucho más de lo que contienen los medios regulares) para estimular la respuesta proliferativa en reacciones mixtas alogénicas, pero el número de DCs diferenciadas aumenta en función de la concentración del E2.<sup>32,36</sup>

### EFFECTOS DEL E2 Y LOS RE EN LA COMPOSICIÓN DE DCs *IN VITRO* EN CULTIVOS ESTIMULADOS POR EL GM-CSF

Los cultivos de células de médula ósea contienen varios progenitores de linajes distintos, cada progenitor puede dar origen a distintos subtipos de cDCs al ser estimulados por GM-CSF.

El E2 regula la diferenciación de distintas subtipos de DCs a partir de un mismo progenitor purificado, es decir, progenitores que comparten un mismo fenotipo.<sup>37</sup> Además, los efectos del E2 son efectuados directamente sobre las células en diferenciación, y son independientes de la producción de factores de crecimiento por otras células de la médula ósea en el cultivo.<sup>36</sup>

Los efectos del E2 sobre la diferenciación de las DCs a partir de precursores de médula ósea estimulados por el GM-CSF varían entre las subpoblaciones de DCs (CD11c<sup>+</sup>/CPH-II<sup>+</sup>) diferenciadas,<sup>32,35,36</sup> estas subpoblaciones se pueden distinguir de las demás por la intensidad con la que expresan CD11b, así como por la presencia o ausencia de expresión de Ly6C, de manera que se pueden reconocer algunas subpoblaciones que expresan Ly6C y niveles de medios a altos de CD11b (CD11b<sup>brillante/med</sup>/Ly6C<sup>+</sup>) y una subpoblación que expresa niveles medios de CD11b pero que carece de Ly6C (CD11b<sup>med</sup>/Ly6C<sup>-</sup>).<sup>32,35,36</sup> Esta última presenta varias características semejantes a las células de Langerhans en la piel como la morfología, posesión de gránulos de Bribeck y transcripción de mRNA para Langerina.<sup>35</sup>

La diferenciación de las DCs Ly6C<sup>+</sup>/CD11b<sup>med</sup> que contiene a las DCs con características de Langerhans<sup>35</sup> depende del RE $\alpha$ <sup>36</sup> y su porcentaje es hasta cuatro veces mayor en los medios que contienen E2 en comparación a los medios deficientes en esteroides.<sup>32,35,36</sup> Las poblaciones de DCs Ly6C<sup>+</sup> parecen ser más heterogéneas en su dependencia por E2, mientras que la población de DCs Ly6C<sup>+</sup>/CD11b<sup>brillante</sup>

quizás sea favorecida por la presencia del E2,<sup>35</sup> el número absoluto de la subpoblación Ly6C<sup>+</sup>/CD11b<sup>med</sup> no es afectado por la concentración del E2.<sup>36</sup>

De cualquier manera, la concentración del E2 puede cambiar la composición de las DCs diferenciadas en cultivos estimulados por el GM-CSF. Las DCs Ly6C<sup>+</sup>/CD11b<sup>med</sup> son la subpoblación dominante de DCs diferenciadas por el GM-CSF en medios con concentraciones del E2 próximas o mayores a 0.1 nM, mientras que en concentraciones menores del E2, o en cultivos iniciados con precursores RE $\alpha$ <sup>-</sup> la gran mayoría de las DCs diferenciadas corresponden a las Ly6C<sup>+</sup>/CD11b<sup>med/brillante</sup>.<sup>36</sup>

Las diferencias en la composición de DCs tienen consecuencias funcionales, ya que las DCs Ly6C<sup>+</sup>/CD11b<sup>brillante</sup> son más eficientes en la endocitosis de varias moléculas como dextran y albúmina en comparación a las Ly6C<sup>-</sup>/CD11b<sup>med</sup>.<sup>32</sup> Las DCs Ly6C<sup>-</sup>/CD11b<sup>med</sup> presenta una expresión menor del receptor semejante a Toll 4 (TLR4, por sus siglas en inglés), no obstante su expresión de moléculas del CPH y la molécula coestimuladoras CD86 es más intensa tras la exposición a lipopolisacáridos (LPS). Las DCs Ly6C<sup>-</sup> en comparación a las DCs Ly6C<sup>+</sup> son más potentes en la estimulación de la respuesta proliferativa de linfocitos T en reacciones mixtas alógenas.<sup>35</sup>

#### CONSECUENCIAS FUNCIONALES RELACIONADAS A LA EXPOSICIÓN A E2 DURANTE LA DIFERENCIACIÓN DE DCs EN MEDIOS ESTIMULADOS POR EL GM-CSF *IN VITRO*

Además de moldear a las subpoblaciones durante la diferenciación de las DCs, la activación del RE $\alpha$  regula la adquisición de funciones efectoras dentro de una misma subpoblación de DCs.<sup>36</sup> La expresión de moléculas del CPH-II en las DCs no estimuladas es proporcional a la concentración del E2 en el medio de cultivo, especialmente entre concentraciones de 0.01 a 0.1 nM. Estas diferencias también se observan tras algunos estímulos. La expresión de CD40, CD86 y CPH-II, así como la producción de IL-12 tras la estimulación por LPS u oligodeoxinucleótidos de citosina guanina (CpG), es mayor en las DCs diferenciadas en medios cuya concentración del E2 es 1.0 nM en comparación a las DCs diferenciadas en concentraciones menores. Sin embargo, la concentración del E2 durante la diferenciación de las DCs no parece tener efectos sobre la expresión de los marcadores mencionados arriba cuando las DCs son

estimuladas con RNA de doble cadena sintético (poli I:C) o a la combinación de IL-12 e IL-18.<sup>34</sup> Como sería de esperar, DCs diferenciadas en medio con concentraciones del E2 menores a 0.01 nM, son mucho menos eficientes en la estimulación de la respuesta proliferativa de los linfocitos T, aún tras ser estimuladas por ligandos de los TLRs incluyendo poli I:C,<sup>34-36</sup> esto podría relacionarse con una disminución en la expresión de moléculas del CPH y CD86 aún en las DCs Ly6C<sup>+</sup>.<sup>34,35</sup>

Sorpresivamente, las DCs RE $\alpha$ <sup>-</sup> secretan más TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12p70 al ser estimuladas por LPS o poli I:C, pero producen ligeramente menos citocinas al ser estimuladas por CpG en comparación a las DCs silvestres. Las DCs RE $\alpha$ <sup>-</sup> como las DCs diferenciadas en medios deficientes de esteroides son sumamente ineficientes en la producción de IL-6 e IL-12p40 al ser estimuladas por CD40L y en la estimulación de la respuesta proliferativa de linfocitos T.<sup>36</sup>

#### E2 AFECTA LA DIFERENCIACIÓN DE MONOCITOS CD14<sup>+</sup> DE SANGRE HUMANA ESTIMULADOS POR EL GM-CSF + IL-4 *IN VITRO*

Los RE probablemente regulen la diferenciación de DCs a partir de monocitos CD14<sup>+</sup> de sangre periférica estimulados *in vitro* por el GM-CSF e IL-4, ya que los antagonistas de los RE ICI 182,780 inhiben la expresión del marcador CD1a y la formación de procesos dendríticos. Sin embargo, las DCs diferenciadas a partir de precursores de sangre periférica presentan niveles comparables en la expresión de CD1a o formación de procesos dendríticos al ser cultivadas en medios con concentraciones del E2 entre 0.7 y 0.13 nM.<sup>33</sup>

#### E2 REDUCE LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS EN LOS CULTIVOS ESTIMULADOS POR FLT3-L *IN VITRO*

Los efectos del E2 en la diferenciación de DCs a partir de cultivos estimulados por Flt3-L han sido menos estudiados, de hecho sólo encontramos un ejemplo en literatura.<sup>37</sup> En este estudio describen tres poblaciones de DCs, una población que corresponde a pDCs (CD11c<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup>/CPH-II<sup>+</sup>), y dos poblaciones de cDCs (CD11c<sup>+</sup>/B220<sup>-</sup>/CPH-II<sup>+</sup>) una que podría corresponder a DCs "linfoides", es decir, CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> definida por los autores como (CD11c<sup>+</sup>/CD11b<sup>-med</sup>) y otra población de cDCs que los autores definen como (CD11c<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>).<sup>37</sup> En concentraciones iguales o mayores a 0.1 nM, el E2 disminuye

**Cuadro 1.** Efectos de la concentración del E2 en el medio de cultivo de DCs del bazo cultivadas *ex vivo*.

	Concentración del E2			
	0.1nM	10 nM	0.1 uM	1.0 uM
<b>Fenotipo de DCs</b>				
MHC-I	=	=	=	=
MHC-II	=	↑	↑	↑
CD40	=	↑	=	=
CD54	=	↑	=	=
CD80	=	=	=	=
CD86	=	=	=	=
<b>Función de DCs</b>				
Sobrevivencia de DCs	=	=	↑	=
Traslocación de NfkBp65 al núcleo	=	=	↓	↓
Endocitosis	=	↓	↓↓	↓↓
Capacidad para estimular linfocitos T	=	↑	↓	↓
<b>Producción de citocinas</b>				
IL-6	=	=	↑	↑
IL-10	=	=	↑	↑
IL-12	=	↓*	↑*	↓*
TNF- $\alpha$	=	=	=	=

↑: Incrementa. ↓: Disminuye. \*: Las diferencias no llegan a ser estadísticamente significativas ( $P > 0.05$ ), pero se aproximan. Tabla desarrollada a partir de la información presentada por Yang L, *et al.*<sup>40</sup>

drásticamente la viabilidad de las células en los cultivos estimulados por Flt3-L, especialmente de las células que al final del cultivo no se diferencian en DCs, esto resulta en el aumento del porcentaje de DCs diferenciadas en relación al total de células viables, pero reduciendo notoriamente el número total de DCs que sobrevive al final del cultivo. Los efectos del E2 sobre la viabilidad de las células en los cultivos estimulados por Flt3-L son mediados principalmente por el RE $\alpha$ .<sup>37</sup> Las subpoblaciones de DCs más sensibles al efecto del E2 en este modelo de diferenciación son las pDCs (CD11c<sup>+</sup>/B220<sup>+</sup>) y la subpoblación de cDCs “linfoides” (CD11c<sup>+</sup>/CD11b<sup>-</sup>/med).<sup>37</sup> No parece haber diferencias en la respuesta a LPS o CpG entre las pDCs diferenciadas en medios deficientes en esteroides y las pDCs diferenciadas en medios con E2 en concentración de 1.0 nM, ambos grupos incrementan de manera semejante la expresión de CD40, CD86 y CPH-II. En contraste, E2 promueve la expresión de los marcadores mencionados en las cDCs al estimularlas con LPS.<sup>37</sup>

#### E2 REGULA LAS FUNCIONES DE LAS DCs DESPUÉS DE SU DIFERENCIACIÓN *IN VITRO*

Los efectos del E2 sobre las DCs no se limitan a su diferenciación, las DCs expresan los RE nuclea-

res y un receptor de estrógenos de membrana (GPR30).<sup>33,38,39</sup> Las DCs del bazo tienen un tiempo de vida de 10 a 14 días y las células de Langerhans permanecen en la piel por periodos mucho mayores,<sup>26</sup> durante este tiempo las concentraciones del E2 podrían tener efectos sobre las DCs presentes en los tejidos.

Las concentraciones próximas a 1.0  $\mu$ M del E2 que se observan durante el último trimestre del embarazo, incrementan modestamente la sobrevivencia y aumentan significativamente la producción de IL-6 e IL-10 por las DCs del bazo mantenidas en cultivo, pero disminuyen la expresión de CD40, CD54, y la translocación de NF $\kappa$ B al núcleo, así como la capacidad de las DCs del bazo para estimular la respuesta proliferativa en cultivos mixtos alogénicos. Las concentraciones menores del E2, próximas 10 nM tienen efectos muy distintos, disminuyen la endocitosis, promueven la expresión de CD40 y CD54 así como la capacidad de las DCs para estimular respuestas proliferativas. E2 no parece regular la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86, ni tampoco la producción de IL-12 o TNF- $\alpha$  en ausencia de estímulos en los cultivos de DCs del bazo del ratón.<sup>40</sup>

Otro estudio basado en los efectos del E2 sobre DCs obtenidas a partir de monocitos CD14<sup>+</sup> de sangre periférica humana diferenciadas por el GM-CSF

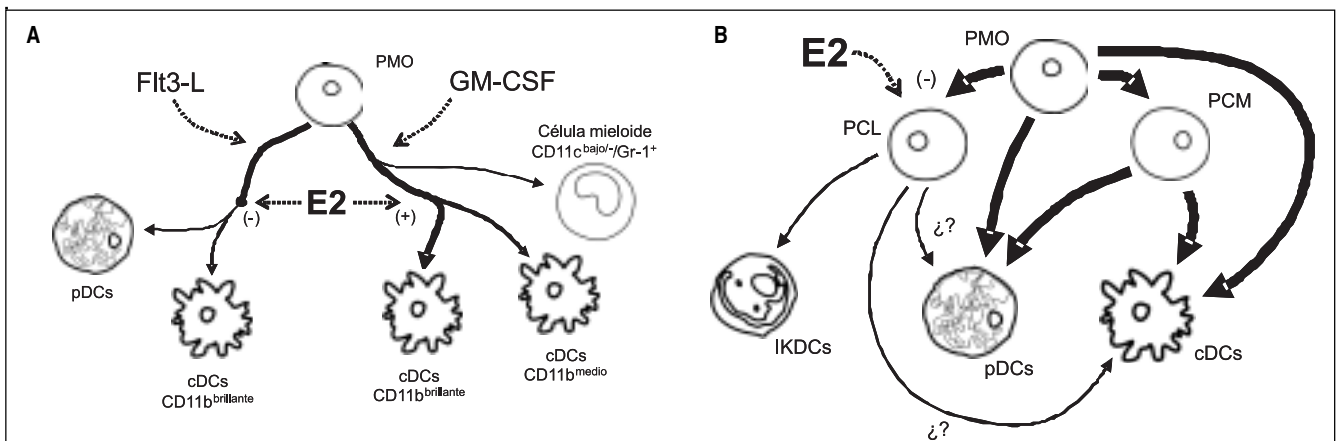
e IL-4 *in vitro*, demuestra que E2 promueve la secreción de CCL1 cuando las DCs son estimuladas por LPS. CCL1 es una quimiocina implicada en el reclutamiento de linfocitos T reguladores y Th2, sugiriendo que E2 y particularmente el RE tienen un papel importante en la colocalización de distintos tipos de linfocitos T y las DCs *in vivo*.<sup>33</sup> En este mismo estudio, reportan que las concentraciones del E2 no afectan la expresión de CPH-II, CD40, CD80, CD83, CD86, CD1a, ni tampoco la producción de la mayoría de las quimiocinas o la capacidad de las DCs para estimular la respuesta proliferativa cuando las DCs son expuestas a LPS. Sin embargo, la concentración del E2 en el medio regula la secreción de IL-10 e IL-12p70 por las DCs estimuladas mediante CD40L. De manera interesante, cuando las DCs son activadas por LPS previo a ser estimuladas por CD40L, producen menos citocinas en comparación a las DCs estimuladas únicamente por CD40L. En estas condiciones, las DCs que después de diferenciadas fueron cultivadas en medios con concentraciones cercanas a 0.1 uM del E2 mantienen una secreción mayor de ambas citocinas en comparación a las DCs mantenidas en concentraciones menores del E2, estas diferencias son más notorias en la producción de IL-10. En línea con lo anterior, cuando las DCs son estimuladas por LPS y CD40L, la producción de las citocinas IL-5, IL-10 e IL-13 por los linfocitos T aumenta en función de la concentración del E2 en el medio de las DCs que los estimularon, con los efectos más marcados en un rango de 0.001 a 0.1 uM.<sup>33</sup> Otro estudio presenta datos similares, la exposición

de las DCs a E2 previo a la activación de los linfocitos T disminuye la producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  por los linfocitos.<sup>41</sup>

### EFECTOS DEL E2 SOBRE LAS DCs *IN VIVO*

A diferencia de lo que podría esperarse a partir de los experimentos *in vitro*, en donde se ha demostrado que el E2 reduce el número pDCs por su efecto sobre la viabilidad de precursores estimulados por Flt3-L<sup>37</sup> y altera las proporciones de cDCs diferenciadas en respuesta al GM-CSF,<sup>32,35,36</sup> en el modelo murino la administración de cápsulas de liberación prolongada del E2 reduce drásticamente el número de los progenitores linfoides pero no afecta el número de pDCs diferenciadas en la médula ósea ni en el bazo,<sup>34,42</sup> por lo que se ha sugerido que al menos en condiciones fisiológicas las pDCs derivan de un progenitor mieloide resistente al E2.<sup>42</sup>

En ausencia de estímulos inmunes o de condiciones estresantes, el rango de concentraciones del E2 observados entre hembras gonadectomizadas, intactas y tratadas con cápsulas de liberación prolongada del E2 (manteniendo niveles constantes de esta hormona semejantes a los del estro) no afectan el número absoluto de DCs (CD11c<sup>+</sup>/CPH-II<sup>brillante</sup>) en el bazo o la composición de las cDCs, es decir el porcentaje de DCs CD11b<sup>+</sup>, CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>, ni la expresión de CD40 o CD86.<sup>34</sup> Sin embargo, la exposición a niveles constantes del E2 disminuye el número de IKDCs en el bazo y en la médula ósea,<sup>20,34</sup> promueve su pro-



**Figura 1.** Efectos del E2 sobre la diferenciación de las DCs. **A.** Efectos del E2 en la generación de DCs *in vitro* a partir de precursores de médula ósea (PMO). **B.** Efectos del E2 *in vivo* sobre la diferenciación de DCs a partir de progenitores de médula ósea, observado en la composición de DCs del bazo. Flt3-L: ligando de la tirosina cinasa Flt3; GM-CSF: Factor estimulante formador de colonia de macrófagos y monocitos; PCL: Precursor común linfóide; PCM: Precursor común mieloide; IKDCs: Células dendríticas asesinas productoras de interferón; pDCs: Células dendríticas plasmacitoides; cDCs: Células dendríticas convencionales; Promueve (+); Inhibe (-). El grosor de las flechas indica el número de DCs diferenciadas.

ducción de IFN- $\gamma$  al ser estimuladas por la combinación de IL-12 e IL-18<sup>34</sup> y tiene el efecto contrario cuando las IKDCs son estimuladas por CpG.<sup>20</sup>

### ESTRADIOL PROTEGE A LAS DCs DEL CHOQUE HEMORRÁGICO *IN VIVO*

Varios reportes informan que hay diferencias marcadas entre los sexos en el funcionamiento del sistema inmune después de las lesiones hemorrágicas o de procedimientos quirúrgicos. La sepsis y falla orgánica múltiple es más frecuente en los hombres y las personas de edad avanzada, en comparación a las mujeres en edad reproductiva que tienden a presentar un mejor progreso.<sup>43</sup> Estas observaciones se han estudiado en modelos animales de trauma hemorrágico, en los que se confirma que las hembras de ratón durante el proestro mantienen un mejor funcionamiento cardiovascular e inmune en comparación a machos y hembras en otras etapas del ciclo estral. La administración del E2 tiene efectos protectores en los machos. La inmunosupresión durante el periodo post-choque se caracteriza por deficiencia en las funciones de varias células inmunes entre las que se encuentran linfocitos B y T, macrófagos y DCs, además se observa una fuerte liberación de IL-6 y TNF- $\alpha$  al poco tiempo de la hemorragia, seguida por un pico elevado de IL-10. La administración del E2 junto con suero durante el rescate tiene la facultad de mantener los niveles de citocinas semejantes a los de animales sanos.<sup>44,45</sup>

Tan sólo dos horas después del choque hemorrágico se observa una reducción en el porcentaje de DCs (CD11c) en el bazo, las DCs que permanecen disminuyen drásticamente la expresión del TLR4 y la producción de las citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12 ante el estímulo por LPS, además de la producción de IFN- $\gamma$  estimulada por IL-12.

En los modelos animales no parece haber efecto del trauma sobre la expresión de CD80 y CD86 en las DCs del bazo, pero si en la expresión de CPH-II y de CD83 que es disminuida al igual que su capacidad para activar la respuesta proliferativa de linfocitos T.<sup>43,46</sup>

Al igual que con las funciones de otras células del sistema inmune como los macrófagos, la administración subcutánea del E2 (50ug/k de masa corporal) previene los efectos del trauma hemorrágico en las DCs del bazo, disminuyendo la tasa de apoptosis de las DCs, promoviendo la secreción de IL-12 e IFN- $\gamma$  en respuesta a LPS, así como la activación de linfocitos Th1.<sup>44,45</sup>

Tanto la administración del E2 como del propil pirazole triol (PPT), un agonista del RE $\alpha$  protegen a

machos y hembras, mientras que el antagonista selectivo del RE $\beta$ , diarilpropionitrilo no presentó efectos protectores, sugiriendo que la benevolencia de los estrógenos sobre las DCs durante el trauma hemorrágico son mediadas a través del RE $\alpha$ . Los autores de este estudio sugieren que los efectos del E2 sobre las DCs son una de las causas de las diferencias observadas entre los sexos en el desarrollo de sepsis tras el choque hemorrágico.<sup>47</sup>

### E2 SOBRE LAS DCs EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE *IN VIVO*

La esclerosis múltiple es una enfermedad crónica en la que el paciente sufre la desmielinización del sistema nervioso central, y se considera que posee al menos un componente autoinmune contra antígenos de la mielina,<sup>48</sup> entre los que se incluyen linfocitos Th1 y Th17. En años recientes los linfocitos Th17 han ganado interés, estos linfocitos se caracterizan por la secreción de las citocinas IL-17 y en menor medida IL-21, poseen un papel importante en el desarrollo de varias enfermedades inflamatorias autoinmunes.<sup>68</sup> Los linfocitos Th17 pueden permear la barrera hematoencefálica mediante la secreción de IL-17 e IL-22, participando en la inflamación del sistema nervioso central y en el reclutamiento de otras células inmunes, además, los linfocitos Th17 poseen actividad citolítica.<sup>69</sup>

La esclerosis múltiple ha sido ampliamente estudiada en modelos animales de encefalomiелitis experimental autoinmune (EEA) en los que se induce una respuesta autoinmune contra antígenos restringidos al sistema nervioso central con el empleo de adyuvantes.<sup>49</sup>

Como en muchas otras enfermedades autoinmunes, la incidencia de la esclerosis múltiple es notablemente mayor en las mujeres en comparación a los hombres. Posiblemente las diferencias entre los sexos sea el resultado de varios factores, pero se piensa que las hormonas sexuales tiene un papel determinante.<sup>50</sup> De manera interesante, se ha reportado que los niveles séricos del E2 de los hombres que padecen esta enfermedad son más del doble en comparación a hombres sanos,<sup>51</sup> quizás estas diferencias sean consecuencia de la aromatización de la testosterona a E2 estimulada por el incremento de citocinas pro inflamatorias.<sup>52</sup> Sin embargo, los niveles elevados del E2 en los hombres se presentan durante las recaídas y en periodos de remisión, y son siempre menores a los niveles del E2 en las mujeres en el último trimestre del embarazo, que como veremos tiene efectos protectores, sugiriendo que la concen-



tración del E2 en la sangre puede estar relacionada al desarrollo de la enfermedad en ambos sexos.

En los modelos de EEA y en el humano, durante el periodo final del embarazo hay una marcada disminución en la severidad de la enfermedad y en el número de recaídas.<sup>53,54</sup> Algunos estudios sostienen que en este periodo, la respuesta proliferativa de los linfocitos T, la secreción de citocinas proinflamatorias, Th1 y Th17 disminuyen significativamente, mientras que aumenta el porcentaje de células T reguladoras.<sup>54</sup> La protección se limita al periodo final del embarazo, fuera de este periodo la producción de las citocinas IL-2, 4, 10, 17 e IFN- $\gamma$  y la respuesta proliferativa de los linfocitos T son iguales a los de individuos no embarazados. El suero de los animales en el último periodo del embarazo es capaz de inhibir la respuesta proliferativa y la secreción de IL-2 *in vitro*.<sup>54-58</sup> Los efectos protectores del E2 sobre el sistema inmune en la EEA dependen de la expresión del RE $\alpha$  y no son mediados directamente sobre los linfocitos T reactivos a la mielina,<sup>59</sup> pero están relacionados al efecto de esta hormona sobre macrófagos y DCs.<sup>60,61</sup> Desde hace varios años se ha considerado que las DCs tienen un papel importante en el desarrollo de la EEA,<sup>62</sup> por otro lado, pueden inducir tolerancia y posiblemente tengan potencial terapéutico en la esclerosis múltiple.<sup>63</sup>

Durante la etapa activa de la enfermedad las DCs migran hacia el cerebro y se localizan en los focos inflamatorios junto con linfocitos T, en donde presentan marcadores de maduración como CPH-II, y moléculas coestimuladoras. Se sabe que pueden activar linfocitos T durante el inicio de la enfermedad y se ha sugerido que también pueden participar en la expansión del repertorio de linfocitos reactivos a determinantes de la mielina.<sup>64</sup> En los modelos animales, el tratamiento con E2 una semana antes de la inducción de la EEA, reduce dramáticamente el porcentaje de DCs (CD11c<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>) en el cerebro, antes, durante el inicio, y en el pico de la encefalomiéltis. Una vez que la EEA ha iniciado, la disminución del número de DCs observada en el cerebro se extiende al bazo y los nódulos linfáticos, en donde las DCs restantes producen menos TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ .<sup>41</sup> De manera interesante, los ratones nulos en la expresión de IL-4 o IL-10 también son protegidos por el tratamiento con E2 de los síntomas de la EEA, tanto como sus contrapartes silvestres, sugiriendo que la protección brindada por el E2 no depende de Th2.<sup>65</sup> Algunos autores reportan que no hay diferencias en la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86, ni en las moléculas accesorias supresoras PD-L1 y PD-L2 antes, durante el emba-

razo o al término de éste.<sup>54</sup> Sin embargo, la protección del E2 durante la EEA depende de la expresión de PD-1, el receptor de PD-L1 y PD-L2, que a su vez se asocia a una disminución en el porcentaje de linfocitos Th17.<sup>41,70</sup>

El E2 también posee efectos protectores en las ratas con EEA; sin embargo, en este modelo el E2 puede incrementar la expresión de CD80 y CD86 en las DCs, aunque también se observa una disminución en su capacidad para estimular a los linfocitos T reactivos a la mielina.<sup>66</sup> La reducción de la respuesta proliferativa de los linfocitos T probablemente esté relacionada a un incremento de la síntesis de la enzima indolemina 2,3-dioxygenasa (IDO) estimulado por el E2 en las DCs.<sup>66,58</sup>

#### EFFECTOS DEL E2 SOBRE LAS DCs EN EL DESARROLLO DE *MIASTENIA GRAVIS IN VIVO*

La administración de cápsulas de liberación prolongada del E2 tres semanas antes de la inmunización aumenta la respuesta Th1 contra el receptor de acetilcolina (AChR). En los animales tratados ocurre un incremento en la producción de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , e IL-6, sin afectar la producción de IL-4 e IL-10. En este estudio, E2 se relaciona a un aumento en el número de linfocitos Th1 y anticuerpos fijadores de complemento (IgG1a e IgG1b) reactivos al AChR. Sin embargo, los efectos mencionados dependen de la administración de cápsulas de liberación prolongada del E2 tres semanas antes de la inoculación, ya que la administración de las cápsulas del E2 al momento de la inoculación no genera ninguno de los efectos mencionados.

Catorce días después de la inmunización, los autores analizaron la composición de células en el bazo, encontrando que en estas condiciones E2 aumenta el número de linfocitos B y de DCs "linfoides" (CD11c<sup>+</sup>/CD11b<sup>-</sup>/CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>). También encontraron que las células del bazo estimuladas con células de *Staphylococcus aureus* e IFN- $\gamma$  de los animales tratados con E2 producen más IL-12. Sugieren que este efecto puede estar relacionado con el incremento en el número de DCs CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>, que en comparación con las DCs CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> producen más IL-12 y son mejores promotoras de la activación de linfocitos Th1.<sup>67</sup>

#### CONCLUSIONES

Los efectos del E2 sobre las DCs dependen del contexto en el que se estudien; sin embargo, parece ser que hay algunas constantes. E2 y el RE $\alpha$  parecen ser indispensables en la estimulación de las DCs

por CD40L *in vitro*, la constancia de este requerimiento tiene que ser confirmada *in vivo*, ya que hay varias diferencias entre los resultados *in vitro* e *in vivo*. Entre las diferencias más notorias se encuentran los efectos del E2 en la diferenciación de las DCs, *in vitro* E2 promueve la diferenciación de cDCs a partir de precursores de médula ósea estimulados por el GM-CSF, mientras que reduce el número de pDCs diferenciadas a partir de los mismos precursores estimulados por Flt3-L. E2 no parece afectar el número de cDCs o pDCs en el bazo ni en otros órganos, sino que disminuye el número de IKDCs, probablemente por efectos sobre los precursores linfoides.

Por otro lado, las concentraciones del E2 observadas durante el embarazo pueden regular las funciones de las DCs después de su diferenciación, esto podría tener importancia en algunas circunstancias como en el choque hemorrágico, pero es interesante notar la necesidad de tratar a los animales con E2 varios días antes del reto antigénico para observar efectos de esta hormona en el desarrollo de las enfermedades experimentales autoinmunes mencionadas en este trabajo.

El E2 tiene efectos pleiotrópicos sobre las células del sistema inmune, los cuales se manifiestan durante las condiciones fisiológicas y en el desarrollo de las respuestas inmunes, esta regulación incluye a las DCs, a las que el E2 puede estimular como promotoras de Th1 o Th2, activadoras o supresoras dependiendo del contexto en el que esto se estudie. El estudio de los efectos del E2 sobre las DCs en el desarrollo de las respuestas inmunes puede ser una valiosa fuente de información sobre los mecanismos que causan el dimorfismo sexual observado tanto en la autoinmunidad como en la resistencia a las infecciones.

## PERSPECTIVAS

Recientemente se ha descubierto que las células dendríticas tienen distintas funciones efectoras durante la respuesta inmune. Es cada vez más grande el número de trabajos que atribuyen a estas células acciones clave para suprimir una respuesta inmune contra antígenos propios, previniendo o favoreciendo enfermedades autoinmunes. También existen evidencias de que las DCs 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. Así, se abre la posibilidad de que la terapia hormonal sea una opción prometedora para combatir o poder manipular el tipo de respuesta inmune a favor de la salud del paciente. Los esteroides sexuales, como los estrógenos, 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 del estradiol no puede generalizarse y afirmar que tiene en particular un efecto específico potenciando o inhibiendo el desarrollo de DCs. Un entendimiento más claro de esta red de interacciones inmunoendocrinas está cambiando considerablemente nuestra concepción de la fisiología y podría afectar profundamente el tratamiento de diversas enfermedades.

## REFERENCIAS

1. Besedovsky HO, del Rey A. Immune-Neuro-Endocrine interactions: Facts and Hypotheses. *Endocrine Rev* 1996; 17: 64-102.
2. Whitacre CC, Reingold SC, O'Looney PA. A gender gap in autoimmunity. *Science* 1999; 283: 1277-8.
3. De León-Nava MA, Morales-Montor J. Immune sexual dimorphism: can sex steroids affect the Th1/Th2 cytokine profile?. *Rev Invest Clin* 2006; 58: 161-169.
4. Klein SL. The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior. *Neurosci Biobehav Rev* 2000; 24: 627-638.
5. Roberts CW, Walker W, Alexander J. Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 476-88.
6. Morales-Montor J, Baig S, Hallal-Calleros C, Damian RT. *Taenia crassiceps*: androgen reconstitution of the host leads to protection during cysticercosis. *Exper Parasitol* 2002; 100: 209-16.
7. Matejuk A, Bakke AC, Hopke C, Dwyer J, Vandenbark AA, Offner H. Estrogen Treatment Induces a Novel Population of Regulatory Cells, Which Suppresses Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Neuroscience Res* 2004; 77: 119-26.
8. Blander JM. Signalling and phagocytosis in the orchestration of host defence. *Cell Microbiol* 2007; 9: 849-50.
9. Steinman RM. The control of immunity and tolerance by dendritic cell. *Pathol Biol* 2003; 51: 59-60.
10. Böttcher I, Bellinghausen I, König B, Knop J, Saloga J. Different regulation of T helper 1- and T helper 2-promoting cytokine signalling factors in human dendritic cells after exposure to protein versus contact allergens. *Immunol* 2008; 123: 139-44.
11. Collins M, Ling V, Carreno BM. The B7 family of immune-regulatory ligands. *Genome Biol* 2005; 6(6): 223 (doi:10.1186/gb-2005-6-6-223).
12. Fujita S, Seino K, Sato K, Sato Y, Eizumi K, et al. Regulatory dendritic cells act as regulators of acute lethal systemic inflammatory response. *Blood* 2006; 107: 3656-64.
13. Fonteneau JF, Gilliet M, Larsson M, Dasilva I, Muñoz C, et al. Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity. *Blood* 2003; 101: 3520-6.

14. Chan CW, Housseau F. The 'kiss of death' by dendritic cells to cancer cells. *Cell Death Differ* 2008; 15: 58-69.
15. Sato K, Fujita S. Dendritic Cells-Nature and Classification. *Allergol International* 2007; 56: 183-91.
16. Naik SH. Demystifying the development of dendritic cell subtypes, a little. *Immunol Cell Biol* 2008; 86: 439-52.
17. Smit JJ, Lindell DM, Boon L, Kool M, Lambrecht BN, Lukacs NW. The balance between plasmacytoid DC versus conventional DC determines pulmonary immunity to virus infections. *PLoS ONE* 2008; 3(3): e1720.
18. Taieb J, Chaput N, Ménard C, et al. A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance. *Nat Med* 2006; 12: 214-19.
19. Spits H, Lanier LL. Natural killer or dendritic: what's in a name? *Immunity* 2007; 26: 11-16.
20. Vosshenrich CA, Lesjean-Pottier S, Hasan M, Richard-Le Goff O, Corcuff E, et al. CD11c<sup>lo</sup>B220<sup>+</sup> interferon-producing killer dendritic cells are activated natural killer cells. *J Exp Med* 2007; 204: 2569-78.
21. Welner RS, Pelayo R, Garrett KP, Chen X, Perry SS, et al. Interferon-producing killer dendritic cells (IKDCs) arise via a unique differentiation pathway from primitive c-kit<sup>Hi</sup>CD62L<sup>+</sup> lymphoid progenitors. *Blood* 2007; 109(11): 4825-31.
22. Chen JQ, Delannoy M, Cooke C, Yager JD. Mitochondrial localization of ERalpha and ERbeta in human MCF7 cells. *Am J Physiol Endocrinol* 2004; 286: E1011-E1022.
23. Madak-Erdogan Z, Kieser KJ, Kim SH, Komm B, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. Nuclear and extranuclear pathway inputs in the regulation of global gene expression by estrogen receptors. *Mol Endocrinol* 2008; 22: 2116-27.
24. D'Amico A, Wu L. The early progenitors of mouse dendritic cells and plasmacytoid predendritic cells are within the bone marrow hemopoietic precursors expressing Flt3. *J Exp Med* 2003; 198: 293-303.
25. Kierscher SM, Roth MD. Human CD14<sup>+</sup> leukocytes acquire the phenotype and function of antigen-presenting dendritic cells when cultured in GM-CSF and IL-4. *J Leukoc Biol* 1996; 59: 208-18.
26. Jacobs B, Wuttke M, Papewalis C, Seissler J, Schott M. Dendritic cell subtypes and in vitro generation of dendritic cells. *Horm Metab Res* 2008; 40: 99-107.
27. Angelov GS, Tomkowiak M, Marçais A, Leverrier Y, Marvel J. Flt3 Ligand-Generated Murine Plasmacytoid and Conventional Dendritic Cells Differ in Their Capacity to Prime Naive CD8 T Cells and to Generate Memory Cells In Vivo. *J Immunol* 2005; 175: 189-95.
28. Fleetwood AJ, Cook AD, Hamilton JA. Functions of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Crit Rev Immunol* 2005; 25: 405-08.
29. Maraskovsky E, Brasel K, Teepe M, Roux ER, Lyman SD, et al. Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J Exp Med* 1996; 184: 1953-62.
30. McKenna HJ, Stocking KL, Miller RE, Brasel K, De Smedt T, et al. Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* 2000; 95: 3489-97.
31. Berthois Y, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 2496-2500.
32. Paharkova-Vatchkova V, Maldonado R, Kovats S. Estrogen preferentially promotes the differentiation of CD11c + CD11b(intermediate) dendritic cells from bone marrow precursors. *J Immunol* 2004; 172: 1426-36.
33. Uemura Y, Liu TY, Narita Y, Suzuki M, Matsushita S. 17 Beta-estradiol (E2) plus tumor necrosis factor-alpha induces a distorted maturation of human monocyte-derived dendritic cells and promotes their capacity to initiate T-helper 2 responses. *Hum Immunol* 2008; 69: 149-57.
34. Siracusa MC, Overstreet MG, Housseau F, Scott AL, Klein SL. 17b-Estradiol Alters the Activity of Conventional and IFN-Producing Killer Dendritic Cells. *J Immunol* 2008; 180: 1423-31.
35. Mao A, Paharkova-Vatchkova V, Hardy J, Miller MM, Kovats S. Estrogen selectively promotes the differentiation of dendritic cells with characteristics of Langerhans cells. *J Immunol* 2005; 175: 5146-51.
36. Douine-Echinard V, Laffont S, Seillet C, Delpy L, Krust A, et al. Estrogen Receptor a, but Not b, Is Required for Optimal Dendritic Cell Differentiation and of CD40-Induced Cytokine Production. *J Immunol* 2008; 180: 3661-9.
37. Carreras E, Turner S, Paharkova-Vatchkova V, Mao A, Dascher C, Kovats S. Estradiol Acts Directly on Bone Marrow Myeloid Progenitors to Differentially Regulate GM-CSF or Flt3 Ligand-Mediated Dendritic Cell Differentiation. *J Immunol* 2008; 180: 727-38.
38. Kawasaki T, Choudhry MA, Suzuki T, Schwacha MG, Bland KI, Choudhry IH. 17b-Estradiol's salutary effects on splenic dendritic cell functions following trauma-hemorrhage are mediated via estrogen receptor-a. *Mol Immunol* 2008; 45(2): 376-85.
39. Sapino A, Cassoni P, Ferrero E, Bongiovanni M, Righi L, et al. Estrogen receptor {alpha} is a novel marker expressed by follicular dendritic cells in lymph nodes and tumor-associated lymphoid infiltrates. *Am J Pathol* 2003; 163: 1313-20.
40. Yang L, Hu Y, Hou Y. Effects of 17b-estradiol on the maturation, nuclear factor kappa B p65 and functions of murine spleen CD11c-positive dendritic cells. *Mol Immunol* 2006; 43: 357-366.
41. Liu HY, Buenafe AC, Matejuk A, Ito A, Zamora A, et al. Estrogen Inhibition of EAE Involves Effects on Dendritic Cell Function. *J Neuroscience Res* 2002; 70: 238-48.
42. Harman BC, Miller JP, Nikbakht N, Gerstein R, Allman D. Mouse plasmacytoid dendritic cells derive exclusively from estrogen-resistant myeloid progenitors. *Blood* 2006; 108: 878-85.
43. Kawasaki T, Choudhry MA, Schwacha MG, Fujimi S, Lederer JA, et al. Trauma-hemorrhage inhibits splenic dendritic cell proinflammatory cytokine production via a mitogen-activated protein kinase process. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 294: 754-64.
44. Raju R, Bland KI, Chaudry IH. Estrogen: A Novel Therapeutic Adjunct for the Treatment of Trauma-Hemorrhage-Induced Immunological Alterations. *Mol Med* 2008; 14: 213-21.
45. Angele MK, Frantz MC, Chaudry IH. Gender and sex hormones influence the response to trauma and sepsis: potential therapeutic approaches. *Clinics* 2006; 61: 479-88.
46. Kawasaki T, Fujimi S, Lederer JA, Hubbard WJ, Choudhry MA, et al. Trauma-hemorrhage induces depressed splenic dendritic cell functions in mice. *J Immunol* 2006; 177: 4514-20.
47. Kawasaki T, Choudhry MA, Suzuki T, Schwacha MG, Bland KI, Chaudry IH. 17b-estradiol's salutary effects on splenic dendritic cell functions following traumahemorrhage are mediated via estrogen receptor alpha. *Mol Immunol* 2008; 45: 376-85.
48. Wingerchuk DM, Lucchinetti CF, Noseworthy JH. Multiple sclerosis: current pathophysiological concepts. *Lab Invest* 2001; 81: 263-81.
49. Baxter AG. The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 904-12.
50. Eskandari F, Webster JI, Sternberg EM. Neural immune pathways and their connection to inflammatory diseases. *Arthritis Res Ther* 2003; 5: 251-65.

51. Andrés C, Rodríguez-Sáinz MC, Muñoz-Fernández MA, López-Lazareno N, Rodríguez-Mahou M, Vicente A, et al. Short-term sequential analysis of sex hormones and helper T cells type 1 (Th1) and helper T cells type 2 (Th2) cytokines during and after multiple sclerosis relapse. *Eur Cytokine Netw* 2004; 15: 197-202.
52. Spangelo BL, Judd AM, Isakson PC, McLeod R. Interleukin-6 stimulates anterior pituitary hormones release in vitro. *Endocrinol* 1989; 125: 575-80.
53. Vukusic S, Hutchinson M, Hours M, Moreau T, Cortinovis-Tourniaire P, Adeleine P, Confavreux C, The Pregnancy In Multiple Sclerosis Group. Pregnancy and multiple sclerosis (the PRIMS study): clinical predictors of post-partum relapse. *Brain* 2004; 127: 1353-1360.
54. McClain MA, Gatson NN, Powell ND, Papenfuss TL, Gienapp IE, et al. Pregnancy suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis through immunoregulatory cytokine production. *J Immunol* 2007; 179(12): 8146-52.
55. Langer-Gould A, Garren H, Slansky A, Ruiz PJ, Steinman L. Late Pregnancy Suppresses Relapses in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: Evidence for a Suppressive Pregnancy-Related Serum Factor. *J Immunol* 2002; 169: 1084-91.
56. Saraste M, Väisänen S, Alanen A, Airas L. Finnish Multiple Sclerosis And Pregnancy Study Group. Clinical and immunologic evaluation of women with multiple sclerosis during and after pregnancy. *Gend Med* 2007; 4: 45-55.
57. Matejuk A, Bakke AC, Hopke C, Dwyer J, Vandebark AA, Offner H. Estrogen Treatment Induces a Novel Population of Regulatory Cells, Which Suppresses Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Neuroscience Res* 2004; 77: 119-26.
58. Xiao BG, Liu X, Link H. Antigen-specific T cell functions are suppressed over the estrogen-dendritic cell-indoleamine 2,3-dioxygenase axis. *Steroids* 2004; 69: 653-9.
59. Polanczyk M, Zamora A, Subramanian S, Matejuk A, Hess DL, et al. The protective effect of 17beta-estradiol on experimental autoimmune encephalomyelitis is mediated through estrogen receptor-alpha. *Am J Pathol* 2003; 163: 1599-605.
60. Vegeto E, Belcredito S, Etteri S, Ghisletti S, Brusadelli A, et al. Estrogen receptor-a mediates the brain antiinflammatory activity of estradiol. *PNAS* 2003; 100: 9614-19.
61. Polanczyk MJ, Jones RJ, Subramanian S, Afentoulis M, Rich C, et al. T Lymphocytes Do Not Directly Mediate the Protective Effect of Estrogen on Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Am J Pathol* 2004; 165: 2069-77.
62. Gautam AM, Glynn P. Lewis rat lymphoid dendritic cells can efficiently present homologous myelin basic protein to encephalitogenic lymphocytes. *J Neuroimmunol* 1989; 22: 113-21.
63. Zhang QH, Link H, Xiao BG. Efficacy of peripheral tolerance induced by dendritic cells is dependent on route of delivery. *Autoimmun* 2004; 23: 37-43.
64. Serafini B, Columba-Cabezas S, DiRosa F, Aloisi F. Intracerebral recruitment and maturation of dendritic cells in the onset and progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol* 2000; 157: 1991-2002.
65. Ito A, Bebo BF Jr, Matejuk A, Zamora A, Silverman M, et al. Estrogen treatment down-regulates TNF-alpha production and reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis in cytokine knockout mice. *J Immunol* 2001; 167: 542-52.
66. Zhang QH, Hu YZ, Cao J, Zhong YQ, Zhao YF, Mei QB. Estrogen influences the differentiation, maturation and function of dendritic cells in rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Acta Farmacol Sin* 2004; 25: 508-13.
67. Delpy L, Douin-Echinard V, Garidou L, Bruand C, Saoudi A, Guéry JC. Estrogen Enhances Susceptibility to Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis by Promoting Type 1-Polarized Immune Responses. *J Immunol* 2005; 175: 5050-7.
68. Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 2008; 453(7198): 1051-7.
69. Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med* 2007; 13: 1173-5.
70. Wang C, Dehghani B, Li Y, Kaler LJ, Proctor T, et al. Membrane estrogen receptor regulates experimental autoimmune encephalomyelitis through up-regulation of programmed death 1. *J Immunol* 2009; 182: 3294-303.
71. Bebo BF Jr, Dehghani B, Foster S, Kurniawan A, Lopez FJ, Sherman LS. Treatment with selective estrogen receptor modulators regulates myelin specific T-cells and suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia* 2009; 57: 777-90.

Reimpresos:

**Biol. Cristian Togno-Peirce**

Departamento de Inmunología,  
 Instituto de Investigaciones Biomédicas,  
 Universidad Nacional Autónoma de México.  
 AP 70228,  
 Ciudad Universitaria  
 04510 México, D.F.  
 Tel.: 5622-3158, fax: 5550-3982/5622-3842  
 Correo electrónico: cristiantogno@yahoo.com

Recibido el 6 de febrero de 2009.  
 Aceptado el 13 de noviembre de 2009.

# **Apéndice i. c.**

# Non-Reproductive Effects of Sex Steroids: Their Immunoregulatory Role

Samira Muñoz-Cruz<sup>1</sup>, Cristian Togno-Pierce<sup>2</sup> and Jorge Morales-Montor<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Instituto Mexicano del Seguro Social, México D.F, México. <sup>2</sup>Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP70228, México D.F. 04510, México

**Abstract:** Sex hormones play an important role as modulators of the immune system. A growing body of evidence shows reciprocal relationship between sex steroids and the immune system. Since the innate immune response determines the type of adaptive immune response, hormonal effects on the innate immune response may affect subsequent adaptive immunity. The sex steroids estrogens, progesterone and testosterone regulate growth, differentiation, survival and function of many cell types involved in homeostasis and immunity. The presence of sex steroid receptors on immune cells indicates that sex steroids may exert their biological effects by binding to these receptors. Sex steroids and immunity are closely connected, and their mutual regulation is involved in the maintenance of immune balance. Understanding the mechanisms of action of sex steroids on immune cells is important for further progress in the development of novel therapies for chronic diseases associated to immune dysregulation. This review describes the effects of sex steroids on the different immune system cells, and the possible implications of these effects on the incidence of many diseases.

**Keywords:** Sex steroids, innate immune response, adaptive immunity, infection, sexual dimorphism.

## INTRODUCTION

The mammalian immune system is startlingly capable of distinguishing between self and non-self, and has complex and evolving dynamic mechanisms that are essential for protection against invading pathogens. At first, the immune system was thought to be largely self-regulated; however, it slowly became clear that it interrelates direct and bidirectionally with the neuroendocrine system [1]. The immune response, being a homeostatic response under physiological control, contributes to maintain the integrity of body and tissue cells. Hence, efficient immuno-endocrine communication implies the existence of afferent and efferent pathways, which constitute a complex feedback system [2]. Sex based differences in infection and immunity suggests that sex steroids may be responsible for these gender differences. It therefore seems logical to envisage that, in addition to the different immune factors involved in the regulation of the complex immuno-endocrine network, gender can play an important role in determining the immune response [3].

A reciprocal relationship between sex steroids and the immune system has been suggested for several years, and there is now evidence indicating that sex hormones influence the distribution and function of many cells of the innate and adaptive immune system Fig. (1). In addition, gender and sex steroids play a clear role in the development and prevalence of many human diseases. Therefore, understanding the basis of sex differences in the immune response is important for developing new approaches for prevention, diagnosis and treatment of infectious and autoimmune diseases.

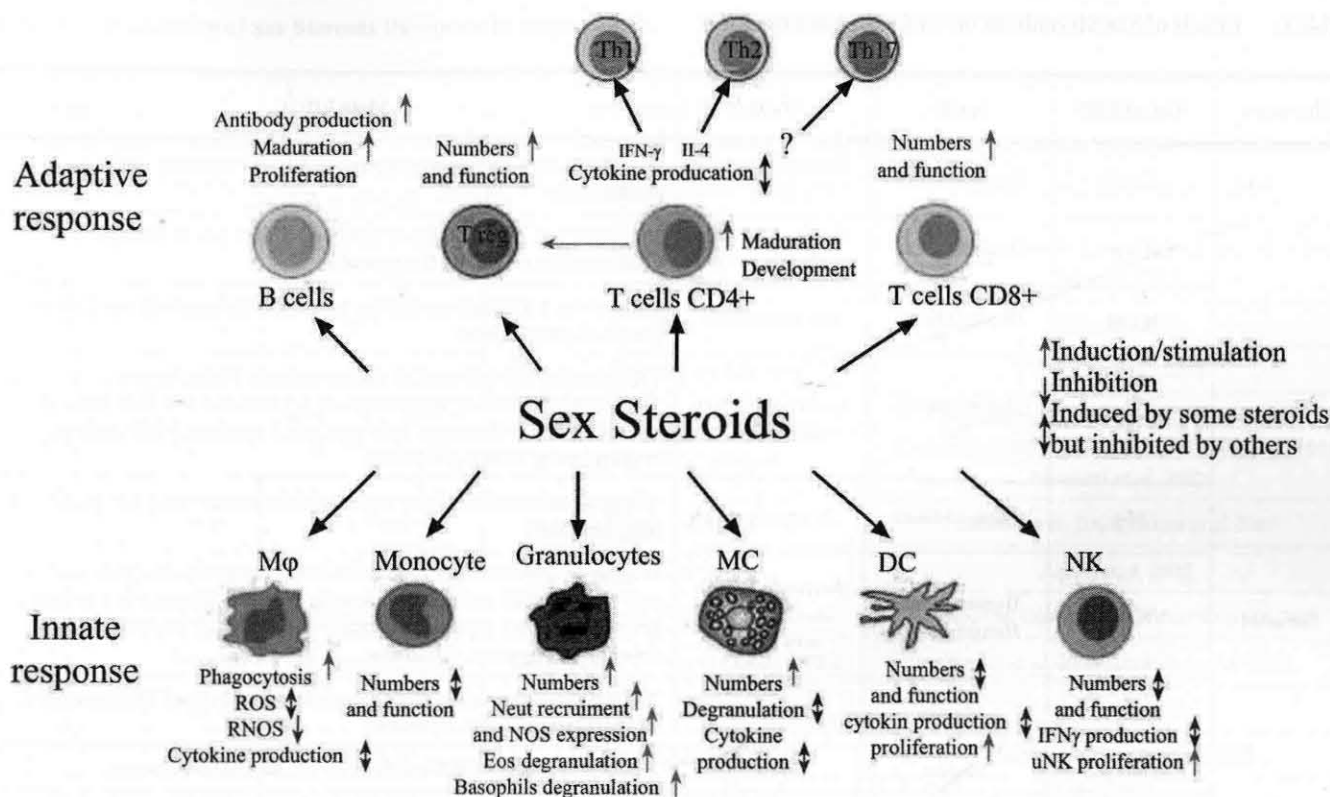
\*Address correspondence to this author at the Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP70228, México D.F. 04510, México; Tel: 005255+56223158; Fax: 5556223369; E-mails: jmontor66@biomédicas.unam.mx; jmontor66@hotmail.com

The present review addresses various aspects of the effects of sex steroids on innate and adaptive immune response and some mechanisms of action of sex steroids on immune system cells.

## SEXUAL DIMORPHISM OF THE IMMUNE RESPONSE

In many sexually dimorphic species the determination of the sexual genotype upon conception, followed by the organism's physiological and endocrinological development, brings about numerous and complex differences between males and females. Starting in infancy, and thereafter along reproductive life, these differences are based on the production, secretion, and circulating concentrations of estrogens, progesterone and testosterone. These differences are mainly based on the function and development of the hypothalamus-pituitary-gonad axis (HPG) [4]. The complex interaction between hormones produced by the HPG axis and other hormones, in addition to sex-independent gene products, determine the male and female phenotypes [1].

It may thus be inferred that, in addition to their effects on sexual differentiation and reproduction, sex hormones may also determine the differences between the sexes regarding their immune response to the same antigenic stimulus. Immunological dimorphism has long been demonstrated with the finding that females of different species produce higher levels of circulating immunoglobulins, and typically display a more pronounced humoral response against infection. There is a growing body of evidence showing a sexual dimorphism in the immune response in humans; in comparison with men, women mount more vigorous antibody and cell-mediated immune responses following infection or vaccination. Clinical and epidemiological findings that autoimmune diseases are more common in women than in men, and more frequent in women of reproductive age, suggests that sex



**Fig. (1).** Sex steroids effects on cells of innate and adaptive immunity. Besides their effects on sexual differentiation and reproduction, sex steroids (estradiol, progesterone and testosterone) can influence the immune system by affecting differently many of the functions of virtually all immune cells types. Sex hormones regulate the innate immune response through their effects on macrophages (M $\phi$ ), monocytes, mast cells (MC), dendritic cells (DC), natural killer cells (NK) and granulocytes: neutrophils (neut), eosinophils (eos) and basophils. These cells form the first line of defense against infections and play an important role in determining the type of the developing adaptive immune response. Thus sex steroids effects on the innate immune response may affect subsequent adaptive immunity. In addition, sex steroids also influence the functions of the adaptive immune response cells mainly T and B lymphocytes. uNK: uterine natural killer; ROS: Reactive oxygen species; RNOS: reactive nitrogen oxide species.

hormones are crucial in determining these differences. According with data published by the health systems of several countries, more than 75% of patients with autoimmune diseases are women and in some extreme cases, specifically of lupus erythematosus, 9 out of every 10 patients are women [5]. Furthermore, sex-associated differences in immune response are thought to be responsible for the greater susceptibility of females to autoimmune diseases such as multiple sclerosis (MS), rheumatoid arthritis (RA), and systemic lupus erythematosus (SLE) [6]. Sex-associated differences have also been observed in relation with infectious diseases. These include sexual dimorphism of the immune response as well as dimorphism associated to infection parameters [4b, 7].

Besides their effects on sexual differentiation and reproduction, sex steroids (estradiol, progesterone and testosterone) can influence the immune system by affecting differently many of the functions of virtually all immune cells types (Table 1). In fact, sexual hormones modulate a large variety of phenomena involved in the immune response, including thymocyte maturation and selection, cellular transit, lymphocyte proliferation, expression of class II major histocompatibility complex molecules and receptors, and cytokine production [8]. Furthermore, the presence of sex steroid

receptors on immune cells (Table 2), indicates that one mechanism by which sex steroids may exert their biological effects involves interactions with either cytoplasmic or nuclear receptors.

## SEX STEROID EFFECTS ON ADAPTIVE IMMUNE CELLS

### B Cells

B lymphocytes are characterized by a unique and highly specialized developmental pathway that is responsible for their vast phenotypic and function diversity. The majority of mature B cells reside within lymphoid follicles of the spleen and lymph nodes, where they encounter and respond to T cell-dependent foreign antigens, proliferate, and either differentiate into plasma cells or enter germinal center reactions [9]. B-cell subsets with individualized functions such as B-1 and marginal zone (MZ) B cells have also been identified. These B cell subsets participate in T cell-independent Ab responses and function as part of the innate immune response, recognizing a restricted spectrum of Ags [9].

Some studies have demonstrated that the altered development and function of B cells may play a prominent role in many autoimmune disorders. Interestingly, it has been de-

Table 1. Effects of Sex Steroids on the different Immune Cells

Hormone	Target Cell	Specie	Study	Main Effect
Estradiol	T cell	Human Mouse	<i>In vitro In vivo In vitro</i>	↑ Differentiation and cytokine secretion ↑ IL-4 Pregnancy: ↑Th2 ↑ proliferation
	Treg	Human Mouse	<i>In vitro In vitro/In vivo</i>	↑ Proliferation and suppression function ↑ Development, function and numbers; ↑ Foxp3 and IL-10 expression
	B cell	Human Mouse	<i>In vitro In vitro</i>	↑ Activation; ↑ Antibody production ↑ Antibody/autoantibody production; ↑ survival ↓ mitogenesis
	Mast cell	Human Mouse Rat	<i>In vitro In vitro In vivo In vitro</i>	↑ Degranulation; ↑ IgE-mediated degranulation High concentration: ↓ TNFα and IL6 release ↓ Degranulation; ↓ TNFα, IL6 and IL-13 release: dose dependent ↑ Histamine concentration; ↑ numbers ↑ IgE-mediated degranulation; ↑ LTC4 production
	Mφ	Human Mouse	<i>In vitro In vitro</i>	↑ Phagocytosis and survival ↑ IL-6 and TNFα production; ↓ NO production: dose dependent
	NK uNK	Human Mouse Human Mouse	<i>In vivo In vitro In vivo In vitro In vivo In vivo</i>	Pregnancy: ↓ Numbers, ↓ cytotoxic activity ↑ inhibitory receptors expression ↑ Proliferation and cytotoxic activity: high dose dependent ↓ activity; pregnancy: ↓ IFNγ production ↓ cytotoxic activity and proliferation: dose dependent Pregnancy: ↑ Numbers
	DC	Mouse	<i>In vivo In vitro</i>	↑ Differentiation, proliferation and cytokine production ↓ Differentiation and proliferation: dose dependent
	Neutrophil	Human	<i>In vitro</i>	↓ ROS production: dose dependent; ↑ NOS and NO production
	Eosinophil	Human	<i>In vitro</i>	↑ Degranulation and adhesion
	Basophil	Human	<i>In vitro</i>	↑ IgE-mediated histamine release
	T cell	Mouse	<i>In vivo</i>	↓ Proliferation; ↑ Apoptosis, induce cytostasis
	Treg	Human	<i>In vivo</i>	Pregnancy: ↑ Numbers
	B cell	Human	<i>In vitro</i>	↑ Apoptosis, induce cytostasis
	Mast cell	Mouse Rat	<i>In vivo In vitro</i>	Pregnancy: ↑ histamine concentration ↑ Numbers ↓ histamine release
	Mφ	Mouse	<i>In vitro</i>	↓ cytokine and NO production; ↑ alternative activation
Progesterone	NK uNK	Human Mouse Mouse	<i>In vitro In vitro In vivo In vitro</i>	↑ Apoptosis ↓ cytotoxic activity and proliferation: dose dependent Pregnancy: ↑ Numbers ↑ Proliferation and differentiation
	DC	Rat	<i>In vitro</i>	↓ proinflammatory cytokine and differentiation
	Neutrophil	Human	<i>In vitro In vivo</i>	↓ ROS production: dose dependent ↑ NO production
	Eosinophil	Human Mouse	<i>In vitro In vivo</i>	↑ Degranulation ↑ Recruitment and IL-5 production
	Basophil	Human	<i>In vitro</i>	↑ IL-4 release; no effect on histamine release
Testosterone	T cell	Mouse	<i>In vitro</i>	↑ IL-10 ↓ IL-12 production
	Treg	Human	<i>In vivo</i>	Maintain numbers
	B cell	Human	<i>In vivo/In vitro</i>	↓ antibody/autoantibody production
	Mast cell	Rat	<i>In vitro</i>	↓ histamine and serotonin release
	Mφ	Human	<i>In vivo/In vitro</i>	↓ NO and TNFα production; ↓ TLR4 expression
	NK	Human	<i>In vivo</i>	↓ proliferation
	DC	?		?
	Neutrophil	Human	<i>In vitro</i>	↓ ROS production: dose dependent ↓ leukotriene production
	Eosinophil	Human	<i>In vitro</i>	↓ Adhesion and viability
Basophil	Human	<i>In vitro</i>	No effect on secretion	

↑ Induction or stimulation; ↓ Inhibition; ↓ Dose dependent/dual effect; DC, dendritic cell; Mφ, macrophage; NK, natural killer cells; uNK, uterine natural killer cells; NO, nitric oxide; ROS reactive oxygen species.



Table 2. Expression of Sex Steroids Receptors in Immune Cells

Cell		Type	Sex Steroid Receptor	Reference
T cell	Human	Jurkat cell line Peripheral blood	ER $\alpha$ (+) ER $\beta$ (+) mPR $\alpha$ (+) mPR $\beta$ (+)	Hirano <i>et al.</i> 2006 Dosiu <i>et al.</i> 2008
	Mouse	Splenic	ER $\alpha$ (+) ER $\beta$ (+) AR (+) mAR (+)	Sakazaki <i>et al.</i> 2002; Liva and Voskuhl, 2001; Benten <i>et al.</i> 1999
T reg	Mouse	Splenic	ER $\alpha$ (+)	Tai <i>et al.</i> 2008
B cell	Mouse	Splenic	ER $\alpha$ (+) ER $\beta$ (-) mER (-) AR (+) mAR (-)	Sakazaki <i>et al.</i> 2002
Mast cell	Human	Nasal mucosa HMC-1 Upper airways Bladder Arterial	ER $\alpha$ (+) ER $\alpha$ (+) ER $\beta$ (-) ER (+) PR (+) ER (+) PR (+) ER $\alpha$ (+)	Shirasaki <i>et al.</i> 2004 Harnish <i>et al.</i> 2004; Zaitzu <i>et al.</i> 2007 Zhao <i>et al.</i> 2001 Pang <i>et al.</i> 1995 Nicovani <i>et al.</i> 2002
	Mouse	Bone Marrow	ER $\alpha$ ((+) ER $\beta$ (-)	Harnish <i>et al.</i> 2004; Zaitzu <i>et al.</i> 2007
	Rat	RBL-2H3	ER $\alpha$ (+)	Zaitzu <i>et al.</i> 2007
NK	Human	Peripheral	ER $\alpha$ and ER $\beta$ (+) PR (+)	Dosiou and Giudice, 2005 Arruvito <i>et al.</i> 2008
	Mouse	Peripheral Uterus	ER $\alpha$ (+) ER $\beta$ (+) ER $\beta$ (+) ER $\alpha$ (-) PR (-)	Currant <i>et al.</i> 2001 Henderson <i>et al.</i> 2003
M $\phi$	Human	Peritoneal	ER (+) PR (+)	Khan <i>et al.</i> 2005
	Mouse	Peritoneal	AR (+) ER $\alpha$ (+) ER $\beta$ (+)	Wang <i>et al.</i> 2005; Ahmadi 2006
DC	Human	Follicular	ER $\alpha$ (+) PR (+) AR (-)	Sapino <i>et al.</i> 2003
	Mouse	Bone marrow	ER $\alpha$ (+) ER $\beta$ (+) AR (-)	Paharkova <i>et al.</i> 2004
	Rat	Bone Marrow	PR (+) AR (+)	Butts <i>et al.</i> 2008
Eosinophil	Human	Conjunctiva	ER (+) PR (+)	Bonini <i>et al.</i> 1995
Neutrophil	?		?	
Basophil	?		?	

AR, androgen receptor; DC, dendritic cell; ER, estrogen receptor; M $\phi$ , macrophage; NK, natural killer cells; PR progesterone receptor.

onstrated that hormonal milieu may be an important determinant of mature B cell differentiation. Studies in mice demonstrated that the same DNA-reactive B cells can mature to either subset, depending on the hormonal environment, for example: anti-DNA B cells in estradiol-treated mice become marginal zone cells while identical cells from prolactin-treated mice become follicular cells. These observations might have implications for the pathogenesis and treatment of autoimmune disease [9].

Some studies have shown that B lymphocyte function differs between males and females. Indeed, females have stronger immune B-cell-mediated immunity than males, as evidenced by their better immune responses to a variety of self-antigens and non-self-antigens [10]. *In vitro* studies in human cells have shown that estrogens are implicated in the regulation of IgM, IgA, and IgG levels and the increase of antibody production to several nonself-antigens and self-antigens [11].

Estrogen is thought to contribute to the higher frequency of autoimmune disorders that occur in females, but the molecular bases for its effects on autoimmunity remain to be elucidated. Estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  are expressed on B cells and are functional. Moreover, several genes involved in

B cell activation and survival are upregulated by estrogen in B cells. Taken together, these data suggest that an elevation in E2 leads directly to molecular changes in B cells that alter survival of immature B cells, and generates autoreactive B cells that would normally be deleted [12].

The therapeutic potential of tamoxifen, a selective estrogen receptor modulator, on estrogen-induced lupus has also been studied. Mice treated with both E2 and tamoxifen showed no elevation in anti-DNA antibody titers and the DNA-reactive B cell population rescued by estrogen was present in an anergic state in these mice. These results suggest that, drugs that modulate some of the effects of estrogen may be beneficial in patients with SLE [13].

Another steroid hormone that affects B cells is progesterone. *In vitro*, progesterone has a dose-dependent inhibitory effect on the frequency of immunoglobulin secreting cells (ISC) in peripheral blood mononuclear cell (PBMC) cultures. The *in vitro* effect of progesterone on ISC frequency was not produced by incubating enriched B cells alone with the hormone, but required the presence of CD8<sup>+</sup> T cells [14].

It is clear that ovarian sex steroid levels exert a particular influence on female genital tract immunity. One study in rats found that the stage of the estrous cycle influences the accu-

mulation of IgA and IgG of uterine secretions [11]. Furthermore, in healthy women, IgA and IgG levels in cervical secretions are lowest during the periovulatory stage of the menstrual cycle. These results provide the first clear link between the effects of ovarian hormones on B cell function *in vivo*. On the other hand, testosterone have an inhibitory effect on B cell antibody production. *In vitro*, testosterone inhibits IgG and IgM production by human PBMC both in males and females [15]. In line with these results, it has also been shown that testosterone decreased while estrogen enhanced autoantibody production in PBMC from patients with SLE [16]. Understanding the effects of sex steroids on B cells in humans could be of help in the development of treatment for humoral autoimmune diseases.

### T Cells

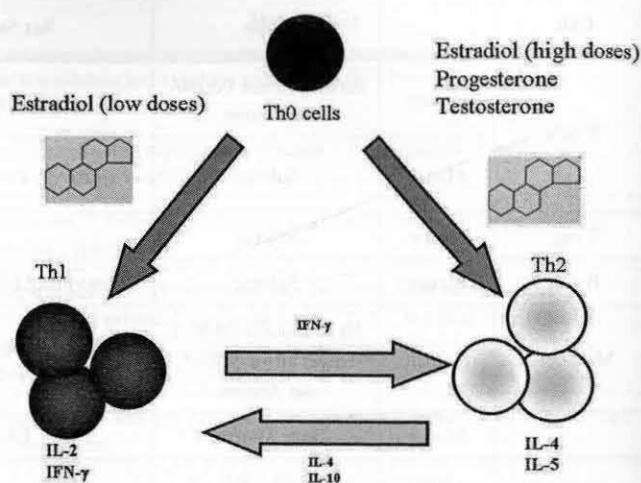
There are a number of T cell populations that have been identified to perform a variety of immune responses. A particular cell population, CD4<sup>+</sup> T helper lymphocytes (Th), orchestrates the immune response against a given antigenic challenge. The two main subclasses of Th lymphocytes, Th1 and Th2, show different patterns of cytokine production, and consequently play different roles during the immune response. Th1 cells secrete interferon (IFN)- $\gamma$ , and promote cellular immune responses, while Th2 cells secrete IL-4, IL-5, IL-9 and IL-13, and provide optimal help for humoral immune responses. Recently, other Th cell subsets have been described, including IL-17 producing T cells (Th17) and T cells with regulatory function (Tregs), which produce IL-10 and TGF- $\beta$  [17].

Immune Th1/Th2 balance is crucial for immunoregulation and its malfunction causes various immune diseases. Th1/Th2 balance is not only controlled by Th1 and Th2 cells, but also by other regulatory factors, including sexual hormones Fig. (2).

In mice, estrogens have been found to regulate T-cell dependent inflammatory processes, not only by reducing the amount of cells at the inflammation site, but also by decreasing the expression of activation markers such as CD40, CD44, CD69 and of the IL-2 receptor [18]. In addition, they lower the levels of IL-2 and IFN- $\gamma$  expression, while increasing those of IL-4 [18]. Other studies have shown that estrogens increase Th2 cytokine production, e.g. of IL-5, and decrease Th1 cytokines such as IL-2 [10]. In general, estrogens seem to have a dual effect on the polarization of the immune response that depends on concentration of the steroid. Some studies suggest that E2 may potentiate both Th1 and Th2 cytokine production. In these studies, high E2 concentrations (>5000 pg ml<sup>-1</sup>) were found to stimulate IL-10 secretion by T cells, while low concentrations stimulated IFN- $\gamma$  secretion. Also, a biphasic effect of E2 on TNF- $\alpha$  secretion was shown, i.e. low E2 concentrations increased TNF- $\alpha$  secretion, while high E2 concentrations diminished TNF- $\alpha$  secretion [19].

Sex steroids seem to affect Th1 and Th2 cytokine production differentially; however few *in vivo* studies of sex differences involving cytokine production have been reported. So the contradictory results may be due to the differences between *in vitro* and *in vivo* conditions. In that case, the effects of sex hormones on the immune system may vary, even with the same hormone. However, the effects of sex

hormones on the immune system to modulate immune response are unequivocal.



**Fig. (2).** Regulation of cytokine production in Th1 and Th2 lymphocytes by sex steroids. The differentiation from Th0 towards Th1 or Th2 is symmetric, each one controls a unique type of immune response and increases the development of cells of the same subclass while suppress the expansion and effector functions of the other subtype. Sex steroids can control Th1/Th2 balance by inducing the development of one subtype and inhibit the other subtype. Estradiol effects clearly depend on concentration, having a dual effect. Progesterone and testosterone, on the other hand, favour the expansion of Th2 cells.

Progesterone, another pregnancy-associated steroid hormone, is able to regulate cytokine production by CD4<sup>+</sup> T cells. Progesterone enhances secretion of IL-4 by CD4<sup>+</sup> T cell clones isolated from patients with the demyelinating disease, MS, and from normal control subjects, in concentrations equivalent to those found in the peripheral circulation during the normal menstrual cycle (0.1–30 ng/ml), during pregnancy (10–400 ng/ml), as well as in pharmacologic doses (12–35 ng/ml). Also, *in vitro* progesterone favors T-cell differentiation along the Th2 pathway by human Th1 T cell clones [19b, 20]. Progesterone directly enhances differentiation of mouse double-positive thymocytes, as well as mouse splenic naive cluster of differentiation CD4<sup>+</sup> T cells along the Th2 pathway while inhibiting Th1 cell development [21]. It has also been shown that progesterone induces IL-4 and IL-5 secretion [22]. Further evidence that progesterone has influence on the polarization of the immune response is that, during the luteal phase of the menstrual cycle, cytokine secretion is altered. During this phase, women with regular menstrual cycle show an inclination of the immune response towards the Th2-type response, reflected as a rise in IL-4 production [23].

It has been demonstrated *in vitro* that testosterone increase IL-10 secretion by CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. Stimulation of splenocytes in the presence of a physiologic dose of DHT caused a significant increase in IL-10 secretion and decreased IL-12 production, while IFN- $\gamma$  secretion was not significantly changed [24].

Recently, the effect of estradiol, progesterone and testosterone on T lymphocyte proliferation has been evaluated

[25]. It was found that female mouse T lymphocytes always showed more proliferation than male cells, when activated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. Furthermore, E2 treatment at pharmaceutical concentration, inhibited proliferation in cells of both sexes, while progesterone diminished proliferation in female T cells and had no effect on male cells. Finally, testosterone had no effect on either female or male cells [25].

Few studies have been done to investigate the effect of sex steroids on CD8<sup>+</sup>T cells. Studies in humans and rodents have demonstrated that CD8 T cells numbers in uterine tissues are influenced by the stage of the hormonal cycle, and they are dependent on E2 and progesterone levels [26].

### Treg Cells

Two classes of regulatory T (Treg) cells play a pivotal role in the maintenance of immunological tolerance and prevention of autoimmune diseases: naturally occurring regulatory cells (nTreg) and adaptive or induced regulatory cells (iTreg). Naturally arising CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Treg cells are derived from the thymus, and specifically express the gene for forkhead/winged helix transcription factor (FoxP3) and suppress the immune response via cell contact-dependent mechanisms. In contrast, iTreg cells can be generated in response to specific microenvironments, and develop from the activation and differentiation of mature CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells in the peripheral blood. One of the mechanisms by which they achieve suppression is dependent on the secretion of cytokines, such as IL-10 and TGF- $\beta$  [27].

Modulation of the Treg function by sex hormones has been suggested. During pregnancy a period with high serum levels of female sex hormones, Treg cell numbers are elevated [28]. Additionally, some studies suggest that Treg cells may play an important role in mediating maternal tolerance to the fetus during pregnancy [29].

Interestingly, the percentage of peripheral blood CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg cells in men and women is comparable, and there is no difference regarding the phases of the menstrual cycle. These results and the lack of association between the percentage of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg cells and the levels of progesterone in women, as well as of testosterone, progesterone or estradiol in healthy male volunteers, suggests that in basal immune conditions, physiological levels of sex hormones do not substantially alter the number of Treg cells [27]. In contrast, when purified Treg cells from peripheral blood of healthy male donors were treated with physiological doses of E2 found during pregnancy, combined with activation through CD3/CD28, cell proliferation increased significantly, in an E2 dose-dependent manner [27]. Recently, using *in vivo* and *in vitro* mouse models it has been observed that E2 at physiological doses not only expanded Treg cells in spleen, lymph nodes and peripheral blood, but also increased expression of the Foxp3 gene, a transcriptional repressor required for the development and function of Treg. The presence of estrogen receptor (ER) has been found in the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells and the conversion of these cells into CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells stimulated by estrogens was inhibited by a specific inhibitor of ER. This indicates that estrogens could be a potential physiological regulatory factor for the peripheral development of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> during pregnancy, and this

effect might be regulated via maternal estrogen secretion [30].

Other studies in mice have reported that E2 plays a protective role against autoimmune diseases such as collagen induced arthritis (CIA) [31] and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) [8a]. The ability of E2 to protect mice from EAE and CIA correlated with its ability to augment *Foxp3* mRNA and protein expression in the CD4<sup>+</sup> T cell compartment. Although previous data do not prove that E2 inhibits autoimmunity by expansion of Treg, they do show that E2 is capable of increasing the number of Treg. Because depletion of Treg causes autoimmunity, this could be a plausible mechanism [32]. Together, these data suggest that estrogens can modulate the function of Treg cells by promoting their proliferation, and highlight a potential use of estrogen, or its analogs, as a therapeutic agent to prevent progression in a variety of autoimmune diseases because Treg cells have the potential of suppressing immune responses to a broad range of self antigens.

One study in humans showed that testosterone and/or its metabolites E2 and DHT, may modulate cell-mediated immunity in healthy men. These data demonstrated modifications in the cellular immune composition in medically castrated men (compared both with their baseline and with the two control groups). The population of Treg cells was significantly reduced, whereas the percentages of CD4 and CD8 T cells and the ratio of CD4 to CD8 T cells remained unchanged. Interestingly, these changes were prevented by testosterone replacement, suggesting that testosterone and/or its metabolites play an important physiological role in regulating immunity at the cellular level [33]. Deficiency in either the number or function of Treg cells has been implicated in a number of human autoimmune diseases such as human inflammatory bowel disease and SLE. Interestingly, androgen administration has recently been demonstrated to improve disease activity in women with SLE [34]. Together, these data suggest that androgens may be important in maintaining the number of potential regulatory T cells, a mechanism through which testosterone and/or its active metabolites might preserve immune tolerance and protect men from autoimmune diseases.

## SEX STEROID EFFECTS ON INNATE IMMUNE CELLS

### Macrophages

Macrophages are phagocytic cells that are widely distributed on the organism, and have an important role in the maintenance of the homeostasis. They also have a broad participation in the development of the immune response to many pathogens, ranging from bacteria to helminths. In the context of infection, macrophages are able to promote or modulate inflammation, to polarize T helper (Th) cells activation in Th1 or Th2, and also have a role in tissue remodeling and wound repair.

The ability of macrophages to polarize the Th cells into Th1 or Th2 profiles responds to different kinds of activation, which can be divided in two broad categories by their production of IL-12. Macrophages with a high production of IL-12 are termed M1, inflammatory or classically activated, and

these macrophages promote the activation of Th cells toward Th1 phenotype [35]. The second category of macrophages is characterized by a low production of IL-12 and is termed M2. This category includes alternatively activated macrophages that are activated in an environment rich in the Th2 cytokines: IL-4 or IL-13, and also promote the differentiation of Th2 cells [35].

In the context of immunoendocrine communication, it has been previously established that macrophages express the androgen receptor (AR) [36], progesterone receptor (PR) [37] and both types of estrogen receptor (ER- $\alpha$  y ER- $\beta$ ) [38]. It has been shown that sex steroids are able to modulate survival of human macrophages cell lines [39], the recruitment of macrophages to the site of inflammation [40] and their effector functions. As occurred with other immune cells, the effect of sex steroids on macrophages depends on the concentration, type and the context in which macrophages are studied.

For instance, in the murine model of incisional wound, gonadectomy of females is associated to an increased inflammation and delay in wound healing. This effect is due to the fact that ovariectomy induces an increase in the secretion of TNF- $\alpha$  and MIF, as well as in the number of infiltrated macrophages at the site of the lesion. Also, the percentage of alternatively activated macrophages are increased [40-41]. If castrated females are reconstituted with E2 concentrations observed during estrous, then the production of TNF- $\alpha$ , MIF and the total number of infiltrated macrophages in the wounds are decreased. However, treatment with physiological levels of progesterone has a modest effect, in comparison to the effect induced by estradiol, on the same parameters studied [40]. On this circumstances, androgens seems to have the opposite role than that for E2, since castrated males showed a decrease in the number of macrophages at the lesion in the mouse, and a decrease also in the production of TNF- $\alpha$ . The antagonist of androgens, flutamide, also reduces the production of TNF- $\alpha$  by macrophages obtained from lesions in humans (men) [36a].

Moreover, sex-steroides regulate the production of nitric oxide (NO) by macrophages, in a dichotomic way. At low concentrations, E2 stimulates the secretion of NO by LPS-activated macrophages *in vitro*, however, at high concentrations of E2, there is a decrease of NO [42]. Testosterone also decrease NO production by macrophages cell lines and in astrocytes, affecting the expression of the iNOS [43]. Furthermore, E2 and to a lesser extent Progesterone, decrease the activity of the enzyme catalase, a very important modulator of the NO synthesis [44]. In mouse macrophage cell lines, testosterone induces IL-10 synthesis and exerts anti-inflammatory effects by inhibition of TNF- $\alpha$ , while estradiol increases TNF- $\alpha$  production and decreases IL-10 synthesis in cultures stimulated with lipopolysaccharide (LPS) [45].

Furthermore, testosterone decreases the expression of TLR4 and the sensibility to the ligand in macrophages cultured in media that contains physiological concentrations of this hormone. Orchidectomized mice were significantly more susceptible to endotoxic shock and macrophages isolated from these animals have significantly higher TLR4 cell surface expression than those derived from sham gonadectomized mice. Importantly, these effects were not apparent in

orchidectomized animals which received exogenous testosterone treatment. As such, these data may represent an important mechanism underlying the immunosuppressive effects of testosterone [46].

### Granulocytes

It is well known that granulocytes are key cellular components of the innate immune system. Granulocytes constitute approximately 65% of all white blood cells and are commonly divided in neutrophils (90–95%), eosinophils (3–5%) and basophils (0.5–1%). Neutrophils have been the best investigated granulocyte population as far as effects of sex hormones are concerned. Neutrophils are an essential component of the acute inflammatory response and play important roles in host defense against all classes of infectious agents. The effects of sex hormones on granulocytes functions have been investigated in a few studies and some yielded contradictory data. In this context, it has been shown that sex steroids have different actions on reactive oxygen species (ROS) generation by human neutrophils. Treatment of human neutrophils with 17-beta-estradiol, progesterone and testosterone, *in vitro*, significantly reduced ROS production [47]. In contrast, neutrophil free radical production has been shown to be increased after treatment with physiological doses of estradiol or progesterone [48]. Furthermore, the effect of synthetic hormones in granulocytes is not clear, since depending on the type of oral contraceptive used, they may or may not increase granulocyte numbers [49]. Other effects of sex steroids on neutrophils are the effects of estrogen and progesterone on NO production. *In vivo*, estrogen and progesterone can increase expression of NO synthase. It is correlated with *in vitro* experiments demonstrating that estrogen can up-regulate NO synthase expression in human neutrophils [50]. Furthermore, leukotriene production in stimulated neutrophils is suppressed by testosterone and different testosterone levels in males and females cause a differential activation in human neutrophils, which mediates sex differences in leukotriene production [51].

Eosinophils are pleiotropic multifunctional leukocytes involved in initiation and propagation of diverse inflammatory responses, as well as modulators of innate and adaptive immunity. Human eosinophils have both estrogen and progesterone receptors, while the expression of estrogen receptor has been demonstrated in rodents [52], thus sex hormones may influence the activity of eosinophils through their receptors. There are some studies reporting the effect of sex steroids on the main functions of eosinophils. Such studies have demonstrated that treatment with a combination of estradiol and progesterone significantly enhances human eosinophils degranulation, *in vitro* [53]. Also, progesterone alone induces degranulation of blood eosinophils *in vitro* [54]. Similarly, estradiol has been shown to induce degranulation of human blood eosinophils *in vivo* and *in vitro* [55]. In addition, estradiol treatment significantly enhances the eosinophil adhesion to human mucosal microvascular endothelial cells. In contrast, testosterone treatment reduces human eosinophil adhesion and viability [53]. Progesterone has also been shown to increase the eosinophilic airway inflammation in a mouse model of allergic asthma, by enhancing systemic IL-5 production [56]. Since eosinophils are involved in the pathogenesis of asthma, then sex hormones, through the

interaction with eosinophils, might affect the severity and evolution of this disease.

The role of basophils, the rarest of blood granulocytes, in host immunity has recently gain prominence with the discovery that they function as antigen-presenting cells and are sufficient to drive Th2 cell differentiation [57]. Although basophils are found mainly in the blood, they are rapidly recruited to the lymph nodes during a primary response to the soluble antigens of parasites. Basophils initiate allergen- and helminth-driven CD4+ T helper type 2 responses by functioning as antigen-presenting cells in draining lymph nodes [57].

Little information is available about the effects of sex steroids on basophils. One study showed that estradiol enhances the histamine release of sensitized human basophils upon stimulation with anti-IgE, while incubation with estrogens alone, without challenge with anti-IgE, did not give any detectable histamine release [58]. Another study reported that the sex steroids, testosterone and estrogen, showed no effect on the *in vitro* release of IL-4 by human basophils, induced by anti-IgE antibodies or on the release of histamine induced by the human recombinant histamine-releasing factor [59].

In summary, although much more research is needed, it appears that sex steroids can affect innate immunity by regulating the function of granulocytes.

### Dendritic Cells

Dendritic cells (DCs), are an heterogeneous group of cells that can be derived from myeloid and lymphoid progenitors. Several classifications have been proposed for this cell type, however, the studies of the effect of sex steroids have been focused on the next categories of DCs: conventional DCs (cDCs), plasmacytoid DCs (pDCs) and the newly discovered interferon producing killer dendritic cells (IKDCs). DCs are best known as antigen-presenting cells that initiate adaptive immune responses; they have a central role on the regulation of the function of the immune system, serving as a link between innate and acquired immunity.

Human cDCs express estrogen receptors (ER- $\beta$  and ER- $\beta$ ) and progesterone receptors (PR-A and PR-B) [60]. Several studies of the effect of female sex hormones on DCs have focused on the differentiation of these cells from bone marrow precursors grown *in vitro* and stimulated by the Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF), or the tyrosine Flt3 ligand [60b, 61]. These studies have shown that E2 is an important component in the culture media for the differentiation of DCs. Perhaps this is not obvious, since most of the cultures to differentiate DCs use fetal bovine serum and, since this contains significant concentrations of estrogen, it promotes the differentiation of DCs in cultures [60b, 62]. Importantly, high concentrations of E2 *in vivo* does not seem to generate the same effects as no differences were found between animals treated with this hormone and its controls, particularly on the number of pDCs in bone marrow or spleen, despite the fact that treatment with E2 significantly reduces the number of lymphoid precursors [61b].

The effects of E2 on DCs are not limited to their differentiation, but also regulate the ability of DCs to activate the immune response and a polarized Th1 or Th2. The spleen DCs exposed to concentrations of E2 *ex vivo*, secrete more IL-6 and IL-10 and are less efficient in the activation of naive T cell compared to DCs maintained in media with lower concentrations [63]. In line with this, the DCs exposed to high concentrations of E2 appear to have a tendency to stimulate Th2 cells [62].

Progesterone is known to have immunomodulatory effects on DCs. One study reported direct effects of progesterone on DCs from female rodents, primarily affecting mature DC function. Progesterone effects on DCs included inhibition of secretion of the proinflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in a dose-dependent manner and downregulation of cell surface markers (major histocompatibility complex class II and CD80) expression. In addition, progesterone inhibited DC-stimulated proliferation of T cells [64].

Recently, the differential expression of steroid hormone receptor has been assessed in immature bone marrow-derived DCs (BMDCs) from male and female rats. Higher numbers of immature BMDCs expressed androgen receptor (AR) protein in males than in females, while higher numbers of immature BMDCs from females expressed PR protein compared with males. Conversely, BMDCs from females were more sensitive to progesterone, as indicated by a more dramatic reduction in proinflammatory cytokine secretion. These findings suggest that the effects of progesterone on DCs in rodents may be more pronounced in females than in males, and this is likely due to differences in PR protein expression [64]. These data indicate that estradiol and progesterone directly modulate DC capacity to drive proinflammatory responses. This mechanism could contribute to or account for some of the differential expression of autoimmune/inflammatory disease in females. Thus, through direct actions on DCs, female sex steroids may influence immunity, autoimmunity and tolerance. Since most of the studies analyzing the effects of steroid hormones on DCs have utilized whole DC populations, studies using specific DC subsets are needed to understand the precise effect of sex steroids and their role in DC immunity.

### Mast Cells

Mast cells (MC) are key elements of the immune system. They are widely distributed throughout the body in particularly close proximity to mucosal surfaces. Recent studies have shown that MC have important roles in innate and adaptive immune responses. MC respond to danger signals not only with immediate and delayed release of a wide variety of inflammatory mediators such as tumor necrosis factor (TNF) and histamine, but also with recognition of a diversity of invading micro organisms and recruitment of neutrophils, dendritic cells and T cells. Moreover, many mast cell-derived products have effects that can significantly influence the survival, proliferation, phenotype or function of many other cell types that participate in inflammation, immunity and tissue remodeling. MC have long been known as major effector cells of IgE-mediated allergic inflammation such as asthma and other allergic disorders, and are active in many diseases characterized by inflammation and tissue remodel-

ing [65]. Many of these conditions are associated with mast cell activation and changes in the numbers of MC at the affected organ or anatomical site. A number of clinical and epidemiological studies suggest that sexual hormones regulate immune functions through their effects on MC functions, including mast cell secretion. In this context, a relationship between female hormones, mast cell-derived mediators and development of asthma and other allergic and inflammatory diseases has been suggested [66]. Furthermore, it has been demonstrated by several investigators that sex steroids influence the function of MC and their distribution in several tissues [67]. In mice, it has been observed that histamine content and MC density in the uterus increase during pregnancy and after treatment with progesterone [67a]. Other experiments in rats confirm a stimulatory effect of estradiol on MC activation and allergic sensitization, while progesterone is shown to suppress histamine release but potentiate IgE stimulation [58, 67b, 68]. In stimulated rat peritoneal mast cells 17  $\beta$ -estradiol augmented secretion of histamine and serotonin, in a dose-dependent manner. In contrast, testosterone inhibited histamine secretion in stimulated rat mast cells [67b]. In humans, the distribution and activation of MC in the endometrium are modulated throughout the menstrual cycle [69]. It has also been shown, that progesterone at physiological concentration reduced the spontaneous proliferation of a human mast cell line to half that of cells cultured without hormone [67c].

MC express high affinity estrogen receptor (ER) and progesterone receptor. ER alpha has been identified in human bladder MC [70], in the human MC line HMC-1 [71], in arterial MC [72] and in human nasal mucosa MC [73]. Furthermore, ER- $\alpha$  mRNA was detected in the rat MC line RBL-2H3 and in the mouse bone marrow MC [71]. In addition, expression of progesterone and estrogen receptors have recently been identified in MC in the upper airways, indicating that this may be a major route for the involvement of sex hormones in airway inflammation when exposed to the higher and varying concentration of estrogen and progesterone characteristic of females [74].

Very few studies of sex differences involving cytokine production by mast cells have been reported to date. These studies provide evidence that estrogen treatment significantly inhibit TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-13 release from stimulated MC [75]. Interestingly, it has been found that MC can also be activated or regulated by environmental estrogens. Stimulation of MC with a variety of environmental estrogens with and without estradiol or IgE and allergens caused rapid dose-related degranulation of MC and enhanced IgE-mediated release of allergic mediators. Furthermore, the combination of physiologic concentrations of 17 $\beta$ -estradiol and several concentrations of environmental estrogens has additive effects on MC degranulation. Thus estrogenic environmental pollutants might promote allergic diseases by inducing and enhancing MC degranulation [76]. In addition, the possible impact of estrogen mimetics, in the environment and in food, on the development of disease associated with MC activation must be considered. Finally, since MC are involved in a variety of diseases, all of which have a higher prevalence in women, it is necessary a better understanding of the gender and sex hormones influences on MC function in humans, in order to produce, novel therapeutic approaches.

## NK Cells

NK cells are a subset of lymphocytes with unique phenotypic characterization and functional properties. Some of the functions of NK cells include perforin-dependent cytotoxicity, cytokine production (especially IFN- $\gamma$ , IL-5 and IL-13), and induction of costimulatory molecules. In this capacity, NK cells participate in early immunity against certain viruses, intracellular bacteria and parasites and can facilitate adaptive immunity [77]. Besides their role in early immunity, the role of NK cells in human reproduction has been extensively investigated, primarily because they constitute the predominant leukocyte population present in the endometrium at the time of implantation and in early pregnancy [78]. One of the most striking examples of interaction between the endocrine system and the immune system in humans occurs at the level of the decidua (endometrium of pregnancy). Here, under the influence of sex steroids, there is a dramatic increase of a unique population of lymphocytes, the uterine natural killer (uNK) cells, in early pregnancy. These cells derive predominantly from a subset of peripheral blood NK cells, which under hormonal influence gets recruited to the uterus. The role of these cells in human pregnancy has not been definitely established; however, they are believed to provide immunomodulation at the maternal-fetal interface [79]. It has been demonstrated that human uNK cells express both mRNA and protein for ER $\beta$ 1 suggesting that estrogens could be acting directly on uNK cells through ER [78]. Other studies have shown an influence of female sex hormones upon peripheral blood NK cells number and function. During normal human pregnancy, peripheral NK cells decrease in number and exhibit decreased lytic activity compared with NK cells from controls [6, 79]. The changes in peripheral NK cell numbers, phenotype, and activity during pregnancy indicate that NK cells are hormonally regulated.

There are various reports on the effect of the sex estrogens on the main activity of NK cells, their ability to lyse other cells. Higher NK activity has been found in postmenopausal women and in males as compared to females [80], suggesting a suppression of NK activity by progesterone or E2. Studies *in vivo* on the effects of 17 $\beta$ -estradiol on castrated mice showed significant inhibition of NK cell activity after continuous exposure to estrogen [79]. Consistent with this, a study in ovariectomized mice treated with estrogen demonstrated that purified splenic NK cells had a significant reduction in cytotoxicity compared with control ovariectomized animals [81]. Also, *in vitro* it has been demonstrated that sex hormones affect NK cell function. However, this effect depends on the incubation time and dose (reviewed in [6]). The effect of hormones on peripheral NK cells could be either direct, through receptors on NK cells, or indirect, through action on neighboring cells. Estrogen receptor alpha (ER- $\alpha$  and ER- $\beta$  have been identified in mouse spleen and peripheral blood NK cells [81]. Also, peripheral blood NK cells express classical progesterone receptor (PR) and this makes NK cells susceptible to progesterone-induced apoptosis [82].

Another function of NK cells is cytokine production. The cytokine repertoire of peripheral NK cells is mainly type 1 cytokines (IL-2, IFN- $\gamma$ ). Although there are many studies

into cytokine production of uterine NK cells during pregnancy, little is known about effects of sex hormones on cytokine production by peripheral NK. It has been observed, that production of IFN- $\gamma$  by stimulated peripheral NK cells is decreased during pregnancy [83]. Also, the effect of estrogen on cytokine production by a rare but important subset of NK cell the invariant natural killer T (iNKT) cells, has been described. In this respect, *in vivo* activation of iNKT cells induced significantly higher concentrations of IFN- $\gamma$  in the serum of female than in that of male mice, while IL-4 production was not affected. In support of a crucial role of ovarian hormones in this phenomenon, a significant decrease of serum IFN- $\gamma$  concentration occurred in ovariectomized females, while orchidectomy affected neither IFN- nor IL-4 serum concentrations in males. Furthermore, *in vitro* and *in vivo* experiments demonstrated an increased synthesis of IFN- $\gamma$  by activated iNKT cells upon exposure to estradiol [84].

The current literature suggests that immunomodulation of NK cells by sex steroids is complex. In humans, it has been demonstrated that both, reduced testosterone and E2 levels during medical castration induces an increase in peripheral NK cells [33]. Furthermore, it was found that NK cells were unaffected when testosterone and E2 levels were maintained in the physiological range with testosterone replacement. These data indicate that testosterone and/or its metabolites may suppress NK cell proliferation in healthy men.

The mechanism by which sex steroids influence immune composition or cellular immune function is not well understood. Because of the important role of NK cells in innate immunity and the crucial role of iNKT cells in immune regulation, it seems highly probable that estrogens participate in the sexual dimorphism associated with autoimmunity and infectious diseases, at least in part, by modulating NK and iNKT cells functions.

## CONCLUDING REMARKS

The sex hormones estrogens, testosterone and progesterone, affect the processes of differentiation, maturation and function of many cell types of the immune system. The determination of the cell types that are targets of sex steroids and the better understanding of the mechanisms by which these factors modify immune cell activity are of crucial importance to unravel the causes of gender differences in autoimmune and infectious diseases and to design the most appropriate therapeutic strategies.

Currently, available evidence suggests that the effects of sex steroids on the immune system cannot be generalized, since these effects may vary from immunosuppression to immunopotentialization, even with the same hormone. This review shows that the data on the effects of sex hormones on the various immune cells are conflicting. Conflicting results may be due to handling of the cells for *in vitro* research, which may result in changes in expression of various receptors or in priming of the cells. Furthermore, variability in results may be explained by differences between systems. These include, *in vitro* and *in vivo* studies, dose of hormones (low vs high doses), age and sex-hormonal status, route and time of administration, the metabolism of hormones (e.g.

metabolism of testosterone to estrogen) and the effect of systemic treatment on the levels of other steroid hormones.

On the other hand, conflicting results can also (partly) be explained by different experimental methods used: the use of whole blood cells versus isolated cells, since isolation per se may affect the leukocytes, while the stimulation of the cells takes place in a setting, which is very different from the *in vivo* environment. Thus in starting to unravel the mechanism by which the reproductive condition and sex hormones regulate immune responses, we should not only standardize our experiments, but we should also direct our focus towards other factors, such as the anti-inflammatory factors produced during the follicular phase [6].

Experimental and clinical evidence in many models has indicated a link between sex steroid hormones including estradiol, testosterone and progesterone, and autoimmune diseases such as: multiple sclerosis (MS), rheumatoid arthritis (RA), SLE and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). Based on these observations, some clinical trials based on hormone therapy and strategies to modulate autoimmunity via selective estrogen receptor modulators, have been performed. However, sex steroid treatments are a complicated clinical issue that raises questions on risks vs. benefits. Clearly, further basic science information is essential to our understanding of the immune and neural implications of clinically used sex steroids and sex steroid receptor modulating drugs. Such studies will certainly provide the basis for new therapeutic strategies for autoimmune and infectious diseases.

In recent years it has become evident that rapid effects (non-genomic) of steroid hormones are mediated by interactions with components of various signal transduction pathways, including adenylyl cyclase, mitogen-activated protein kinases (MAPKs), and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) [85].

Indeed, estrogens and androgens acting via a non-genotropic action of their classical receptors (ER- $\alpha$ , ER- $\beta$ , or AR), affect the function of several different cell types, by rapidly activating the Src/Shc/ERK and PI3K and down-regulating the JNK signaling pathways. Unlike its classical transcriptional action, this effect requires only the ligand binding, not the DNA binding, domain of the receptor [85b, 86]. Also, there is evidence that nuclear hormone receptors (NHRs) are important regulators of cytokine action. NHRs regulate cytokine receptor signaling by affecting STAT expression and by acting as coregulators of STAT transcriptional action [87]. Furthermore, ubiquitous signaling pathways traditionally believed to mediate the signals of growth factors or cytokines have been found to be recruited by sex steroid hormones via their nuclear or membrane receptors. These include tyrosine kinases, c-Src, G proteins, phosphatidylinositol 3-OH kinase/Akt, and MAPKs. These cascades lead to rapid actions and are also critical for the regulation of the expression of several target genes in the nucleus, indicating a tight integration of the non-genomic and genomic pathways of sex steroid signaling [88]. Despite these studies, the molecular mechanisms underlying sex steroids regulation of cytokine signaling are not completely understood. Then studies directed to understanding of the molecular basis of the non-genomic actions of sex steroids on the cytokine sig-

naling are needed, and may become relevant for clinical purposes in the future.

Finally, our work and the work of others reveal that hormones, including androgens, estrogens, and glucocorticoids, affect both the parasite and host responses to infection. Future studies must continue to consider the interactions of hormones with cytokines in a network that result in sex differences in response to infection.

Our hypothesis would be that the immune system of males and females are not dimorphic; rather, the immune responses generated against both self and non-self antigen are different between the sexes. Immunological sensitivity to hormones, and possibly neurotransmitters, may have evolved as an adaptation for individuals of either sex to confront infection successfully, even if by different mechanisms. Sex differences in immune function also may have evolved to solve sex-specific challenges, like pregnancy or competition for territories or mates. Selective pressures may have driven the evolution of dimorphic immunity to infection and create a need to balance the defense of the host against infection with successful reproduction and survival of the host. A compromise may be achieved by a transient enhancement or suppression of immunity, which could allow pregnancy in females with offspring that are partially non-self and to allow males to utilize high androgen concentrations to develop secondary sex traits, defend territories, and obtain mates. Pregnancy, in particular, demands for immunological allowance that would be beneficial for offspring survival and transient immunoendocrine regulation by hormones and cytokines may ensure that the fetus is not damaged. Similarly, males that can better cope with the stress of competition and can balance this with susceptibility to infection may be more likely to achieve successful matings and reproductive success.

## ACKNOWLEDGMENTS

J.M-M. acknowledges financial support from Consejo Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DAGAPA), Universidad Nacional Autónoma de México (Grant IN-208103). C. Togno-Pierce has a doctoral fellowship from CONACyT, México.

## REFERENCES

- [1] Besedovsky, H. O.; del Rey, A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr. Rev.*, **1996**, *17* (1), 64-102.
- [2] Armstrong, M. D.; Klein, J. R. Immune-endocrine interactions of the hypothalamus-pituitary-thyroid axis: integration, communication and homeostasis. *Arch. Immunol. Ther. Exp., (Warsz)* **2001**, *49* (3), 231-237.
- [3] Chikanza, I. C.; Grossman, A. B. Reciprocal interactions between the neuroendocrine and immune systems during inflammation. *Rheum. Dis. Clin. N. Am.*, **2000**, *26* (4), 693-711.
- [4] Grossman, C. J.; Roselle, G. A.; Mendenhall, C. L. Sex steroid regulation of autoimmunity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **1991**, *40* (4-6), 649-59; (b) Morales-Montor, J.; Baig, S.; Hallal-Calleros, C.; Damian, R. T. *Taenia crassiceps*: androgen reconstitution of the host leads to protection during cysticercosis. *Exp. Parasitol.*, **2002**, *100* (4), 209-216.
- [5] Jacobson, D. L.; Gange, S. J.; Rose, N. R.; Graham, N. M. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **1997**, *84* (3), 223-243; (b) Cooper, G. S.; Stroehla, B. C. The epidemiology of autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.*, **2003**, *2* (3), 119-125.
- [6] Bouman, A.; Heineman, M. J.; Faas, M. M. Sex hormones and the immune response in humans. *Hum. Reprod. Update*, **2005**, *11* (4), 411-423.
- [7] Zuk, M.; McKean, K. A. Sex differences in parasite infections: patterns and processes. *Int. J. Parasitol.*, **1996**, *26* (10), 1009-1023.
- [8] Bebo, B. F. Jr.; Fyfe-Johnson, A.; Adlard, K.; Beam, A. G.; Vandenberg, A. A.; Offner, H. Low-dose estrogen therapy ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in two different inbred mouse strains. *J. Immunol.*, **2001**, *166* (3), 2080-2089; (b) Da Silva, J. A. Sex hormones and glucocorticoids: interactions with the immune system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1999**, *876*, 102-117; discussion 117-8.
- [9] Venkatesh, J.; Peeva, E.; Xu, X.; Diamond, B. Cutting Edge: Hormonal milieu, not antigenic specificity, determines the mature phenotype of autoreactive B cells. *J. Immunol.*, **2006**, *176* (6), 3311-3314.
- [10] Ansar Ahmed, S.; Penhale, W. J.; Talal, N. Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. Mechanisms of sex hormone action. *Am. J. Pathol.*, **1985**, *121* (3), 531-551.
- [11] Wira, C. R.; Sandoe, C. P. Sex steroid hormone regulation of IgA and IgG in rat uterine secretions. *Nature*, **1977**, *268* (5620), 534-536.
- [12] Grimaldi, C. M.; Jeganathan, V.; Diamond, B. Hormonal regulation of B cell development: 17 beta-estradiol impairs negative selection of high-affinity DNA-reactive B cells at more than one developmental checkpoint. *J. Immunol.*, **2006**, *176* (5), 2703-2710.
- [13] Peeva, E.; Venkatesh, J.; Diamond, B. Tamoxifen blocks estrogen-induced B cell maturation but not survival. *J. Immunol.*, **2005**, *175* (3), 1415-1423.
- [14] Lu, F. X.; Abel, K.; Ma, Z.; Rourke, T.; Lu, D.; Torten, J.; McChesney, M.; Miller, C. J. The strength of B cell immunity in female rhesus macaques is controlled by CD8+ T cells under the influence of ovarian steroid hormones. *Clin. Exp. Immunol.*, **2002**, *128* (1), 10-20.
- [15] Kanda, N.; Tsuchida, T.; Tamaki, K. Testosterone suppresses anti-DNA antibody production in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, **1997**, *40* (9), 1703-1711.
- [16] Kanda, N.; Tsuchida, T.; Tamaki, K. Estrogen enhancement of anti-double-stranded DNA antibody and immunoglobulin G production in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, **1999**, *42* (2), 328-337.
- [17] Larosa, D. F.; Orange, J. S. 1. Lymphocytes. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **2008**, *121* (2 Suppl), S364-369; quiz S412; (b) Romagnani, S. Human Th17 cells. *Arthritis Res. Ther.*, **2008**, *10* (2), 206.
- [18] Salem, M. L.; Hossain, M. S.; Nomoto, K. 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-alpha and IFN-gamma. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **2000**, *121* (3), 235-245.
- [19] Gilmore, W.; Weiner, L. P.; Correale, J. Effect of estradiol on cytokine secretion by proteolipid protein-specific T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects. *J. Immunol.*, **1997**, *158* (1), 446-451; (b) Correale, J.; Arias, M.; Gilmore, W. Steroid hormone regulation of cytokine secretion by proteolipid protein-specific CD4+ T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects. *J. Immunol.*, **1998**, *161* (7), 3365-3374.
- [20] Piccinni, M. P.; Giudizi, M. G.; Biagiotti, R.; Beloni, L.; Giannarini, L.; Sampognaro, S.; Parronchi, P.; Manetti, R.; Annunziato, F.; Livi, C. Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. *J. Immunol.*, **1995**, *155* (1), 128-33.
- [21] Miyaura, H.; Iwata, M. Direct and indirect inhibition of Th1 development by progesterone and glucocorticoids. *J. Immunol.*, **2002**, *168* (3), 1087-1094.
- [22] Piccinni, M. P.; Maggi, E.; Romagnani, S. Role of hormone-controlled T-cell cytokines in the maintenance of pregnancy. *Biochem. Soc. Trans.*, **2000**, *28* (2), 212-215.



- [23] Faas, M.; Bouman, A.; Moesa, H.; Heineman, M. J.; de Leij, L.; Schuiling, G. The immune response during the luteal phase of the ovarian cycle: a Th2-type response? *Fertil Steril*, **2000**, *74* (5), 1008-1013.
- [24] Liva, S. M.; Voskuhl, R. R. Testosterone acts directly on CD4+ T lymphocytes to increase IL-10 production. *J. Immunol.*, **2001**, *167* (4), 2060-2067.
- [25] De Leon-Nava, M. A.; Nava, K.; Soldevila, G.; Lopez-Griego, L.; Chavez-Rios, J. R.; Vargas-Villavicencio, J. A.; Morales-Montor, J. Immune sexual dimorphism: effect of gonadal steroids on the expression of cytokines, sex steroid receptors, and lymphocyte proliferation. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, **2009**, *113* (1-2), 57-64.
- [26] Beagley, K. W.; Gockel, C. M. Regulation of innate and adaptive immunity by the female sex hormones oestradiol and progesterone. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **2003**, *38* (1), 13-22.
- [27] Prieto, G. A.; Rosenstein, Y. Oestradiol potentiates the suppressive function of human CD4 CD25 regulatory T cells by promoting their proliferation. *Immunology*, **2006**, *118* (1), 58-65.
- [28] Somerset, D. A.; Zheng, Y.; Kilby, M. D.; Sansom, D. M.; Drayson, M. T. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset. *Immunology*, **2004**, *112* (1), 38-43; (b) Sasaki, Y.; Sakai, M.; Miyazaki, S.; Higuma, S.; Shiozaki, A.; Saito, S. Decidual and peripheral blood CD4+CD25+ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Mol. Hum. Reprod.*, **2004**, *10* (5), 347-353.
- [29] Aluvihare, V. R.; Kallikourdis, M.; Betz, A. G. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat. Immunol.*, **2004**, *5* (3), 266-271.
- [30] Tai, P.; Wang, J.; Jin, H.; Song, X.; Yan, J.; Kang, Y.; Zhao, L.; An, X.; Du, X.; Chen, X.; Wang, S.; Xia, G.; Wang, B. Induction of regulatory T cells by physiological level estrogen. *J. Cell Physiol.*, **2008**, *214* (2), 456-464.
- [31] Latham, K. A.; Zamora, A.; Drought, H.; Subramanian, S.; Matejuk, A.; Offner, H.; Rosloniec, E. F. Estradiol treatment redirects the isotype of the autoantibody response and prevents the development of autoimmune arthritis. *J. Immunol.*, **2003**, *171* (11), 5820-5827.
- [32] Polanczyk, M. J.; Carson, B. D.; Subramanian, S.; Afentoulis, M.; Vandenberg, A. A.; Ziegler, S. F.; Offner, H. Cutting edge: estrogen drives expansion of the CD4+CD25+ regulatory T cell compartment. *J. Immunol.*, **2004**, *173* (4), 2227-2230.
- [33] Page, S. T.; Plymate, S. R.; Bremner, W. J.; Matsumoto, A. M.; Hess, D. L.; Lin, D. W.; Amory, J. K.; Nelson, P. S.; Wu, J. D. Effect of medical castration on CD4+ CD25+ T cells, CD8+ T cell IFN-gamma expression, and NK cells: a physiological role for testosterone and/or its metabolites. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **2006**, *290* (5), E856-863.
- [34] Petri, M. A.; Mease, P. J.; Merrill, J. T.; Lahita, R. G.; Iannini, M. J.; Yocum, D. E.; Ginzler, E. M.; Katz, R. S.; Gluck, O. S.; Genovese, M. C.; Van Vollenhoven, R.; Kalunian, K. C.; Manzi, S.; Greenwald, M. W.; Buyon, J. P.; Olsen, N. J.; Schiff, M. H.; Kavanaugh, A. F.; Caldwell, J. R.; Ramsey-Goldman, R.; St Clair, E. W.; Goldman, A. L.; Egan, R. M.; Polisson, R. P.; Moder, K. G.; Rothfield, N. F.; Spencer, R. T.; Hobbs, K.; Fessler, B. J.; Calabrese, L. H.; Moreland, L. W.; Cohen, S. B.; Quarles, B. J.; Strand, V.; Gurwith, M.; Schwartz, K. E. Effects of prasterone on disease activity and symptoms in women with active systemic lupus erythematosus. *Arthritis. Rheum.*, **2004**, *50* (9), 2858-2868.
- [35] Mantovani, A.; Sica, A.; Sozzani, S.; Allavena, P.; Vecchi, A.; Locati, M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.*, **2004**, *25* (12), 677-686.
- [36] (a) Ashcroft, G. S.; Mills, S. J. Androgen receptor-mediated inhibition of cutaneous wound healing. *J. Clin. Invest.*, **2002**, *110* (5), 615-24; (b) Ahmadi, K.; McCrudden, A. B. Macrophage may responses to androgen via its receptor. *Med. Sci. Monit*, **2006**, *12* (1), BR15-20.
- [37] Khan, K. N.; Masuzaki, H.; Fujishita, A.; Kitajima, M.; Sekine, I.; Matsuyama, T.; Ishimaru, T. Estrogen and progesterone receptor expression in macrophages and regulation of hepatocyte growth factor by ovarian steroids in women with endometriosis. *Hum. Reprod.*, **2005**, *20* (7), 2004-2013.
- [38] Wang, Y.; Wang, L.; Zhao, J.; Qiao, Z. Estrogen, but not testosterone, down-regulates cytokine production in nicotine-induced murine macrophage. *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.*, **2005**, *27* (5), 311-316.
- [39] Subramanian, M.; Shaha, C. Up-regulation of Bcl-2 through ERK phosphorylation is associated with human macrophage survival in an estrogen microenvironment. *J. Immunol.*, **2007**, *179* (4), 2330-2338.
- [40] Routley, C. E.; Ashcroft, G. S. Effect of estrogen and progesterone on macrophage activation during wound healing. *Wound Repair Regen.*, **2009**, *17* (1), 42-50.
- [41] Gilliver, S. C.; Ruckshanthi, J. P.; Hardman, M. J.; Nakayama, T.; Ashcroft, G. S. Sex dimorphism in wound healing: the roles of sex steroids and macrophage migration inhibitory factor. *Endocrinology*, **2008**, *149* (11), 5747-5757.
- [42] Chao, T. C.; Chao, H. H.; Chen, M. F.; Greager, J. A.; Walter, R. J. Female sex hormones modulate the function of LPS-treated macrophages. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **2000**, *44* (5), 310-318; (b) Huang, H.; He, J.; Yuan, Y.; Aoyagi, E.; Takenaka, H.; Itagaki, T.; Sannomiya, K.; Tamaki, K.; Harada, N.; Shono, M.; Shimizu, I.; Takayama, T. Opposing effects of estradiol and progesterone on the oxidative stress-induced production of chemokine and proinflammatory cytokines in murine peritoneal macrophages. *J. Med. Invest.*, **2008**, *55* (1-2), 133-141.
- [43] Juliet, P. A.; Hayashi, T.; Daigo, S.; Matsui-Hirai, H.; Miyazaki, A.; Fukatsu, A.; Funami, J.; Iguchi, A.; Ignarro, L. J. Combined effect of testosterone and apocynin on nitric oxide and superoxide production in PMA-differentiated THP-1 cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **2004**, *1693* (3), 185-191.
- [44] Gay-Andrieu, F.; Cozon, G. J.; Ferrandiz, J.; Peyron, F. Progesterone fails to modulate Toxoplasma gondii replication in the RAW 264.7 murine macrophage cell line. *Parasite Immunol.*, **2002**, *24* (4), 173-178.
- [45] D'Agostino, P.; Milano, S.; Barbera, C.; Di Bella, G.; La Rosa, M.; Ferlazzo, V.; Farruggio, R.; Miceli, D. M.; Miele, M.; Castagnetta, L.; Cillari, E. Sex hormones modulate inflammatory mediators produced by macrophages. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1999**, *876*, 426-429.
- [46] Rettew, J. A.; Huet-Hudson, Y. M.; Marriott, I. Testosterone reduces macrophage expression in the mouse of toll-like receptor 4, a trigger for inflammation and innate immunity. *Biol. Reprod.*, **2008**, *78* (3), 432-437.
- [47] Bekesi, G.; Kakucs, R.; Varbiro, S.; Racz, K.; Sprintz, D.; Feher, J.; Szekacs, B. *In vitro* effects of different steroid hormones on superoxide anion production of human neutrophil granulocytes. *Steroids*, **2000**, *65* (12), 889-894.
- [48] Molloy, E. J.; O'Neill, A. J.; Grantham, J. J.; Sheridan-Pereira, M.; Fitzpatrick, J. M.; Webb, D. W.; Watson, R. W. Sex-specific alterations in neutrophil apoptosis: the role of estradiol and progesterone. *Blood*, **2003**, *102* (7), 2653-2659.
- [49] Klingler, G.; Graser, T.; Mellinger, U.; Moore, C.; Vogelsang, H.; Groh, A.; Latterman, C. A comparative study of the effects of two oral contraceptives containing dienogest or desogestrel on the human immune system. *Gynecol. Endocrinol.*, **2000**, *14* (1), 15-24.
- [50] Garcia-Duran, M.; de Frutos, T.; Diaz-Recasens, J.; Garcia-Galvez, G.; Jimenez, A.; Monton, M.; Farre, J.; Sanchez de Miguel, L.; Gonzalez-Fernandez, F.; Arriero, M. D.; Rico, L.; Garcia, R.; Casado, S.; Lopez-Farre, A. Estrogen stimulates neuronal nitric oxide synthase protein expression in human neutrophils. *Circ. Res.*, **1999**, *85* (11), 1020-1026.
- [51] Pergola, C.; Dodt, G.; Rossi, A.; Neunhoffer, E.; Lawrenz, B.; Northoff, H.; Samuelsson, B.; Radmark, O.; Sautebin, L.; Werz, O. ERK-mediated regulation of leukotriene biosynthesis by androgens: a molecular basis for gender differences in inflammation and asthma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2008**, *105* (50), 19881-19886.
- [52] Bonini, S.; Lambiase, A.; Schiavone, M.; Centofanti, M.; Palma, L. A. Estrogen and progesterone receptors in vernal keratoconjunctivitis. *Ophthalmology*, **1995**, *102* (9), 1374-1379; (b) Lee, S. H. Uterine epithelial and eosinophil estrogen receptors in rats during the estrous cycle. *Histochemistry*, **1982**, *74* (4), 443-452.
- [53] Hamano, N.; Terada, N.; Maesako, K.; Numata, T.; Konno, A. Effect of sex hormones on eosinophilic inflammation in nasal mucosa. *Allergy Asthma Proc.*, **1998**, *19* (5), 263-269.
- [54] Grunert, G.; Porcia, M.; Neumann, G.; Sepulveda, S.; Tchernitchin, A. N. Progesterone interaction with eosinophils and with responses

- already induced by oestrogen in the uterus. *J. Endocrinol.*, **1984**, *102* (3), 295-303.
- [55] Tchernitchin, A. N.; Barrera, J.; Arroyo, P.; Mena, M. A.; Vilches, K.; Grunert, G. Degranulatory action of estradiol on blood eosinophil leukocytes *in vivo* and *in vitro*. *Agents Actions*, **1985**, *17* (1), 60-66.
- [56] Hellings, P. W.; Vandekerckhove, P.; Claeys, R.; Billen, J.; Kasran, A.; Ceuppens, J. L. Progesterone increases airway eosinophilia and hyper-responsiveness in a murine model of allergic asthma. *Clin. Exp. Allergy*, **2003**, *33* (10), 1457-1463.
- [57] Mikhak, Z.; Luster, A. D. The emergence of basophils as antigen-presenting cells in Th2 inflammatory responses. *J. Mol. Cell Biol.*, **2009**, *1* (2), 69-71; (b) Wynn, T. A. Basophils trump dendritic cells as APCs for T(H)2 responses. *Nat. Immunol.*, **2009**, *10* (7), 679-681.
- [58] Cocchiara, R.; Albegiani, G.; Di Trapani, G.; Azzolina, A.; Lampiasi, N.; Rizzo, F.; Geraci, D. Modulation of rat peritoneal mast cell and human basophil histamine release by estrogens. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **1990**, *93* (2-3), 192-197.
- [59] Schroeder, J. T.; MacGlashan, D. W. Jr.; MacDonald, S. M.; Kagey-Sobotka, A.; Lichtenstein, L. M. Regulation of IgE-dependent IL-4 generation by human basophils treated with glucocorticoids. *J. Immunol.*, **1997**, *158* (11), 5448-5454.
- [60] Sapino, A.; Cassoni, P.; Ferrero, E.; Bongiovanni, M.; Righi, L.; Fortunati, N.; Crafa, P.; Chiarle, R.; Bussolati, G. Estrogen receptor alpha is a novel marker expressed by follicular dendritic cells in lymph nodes and tumor-associated lymphoid infiltrates. *Am. J. Pathol.*, **2003**, *163* (4), 1313-1320; (b) Paharkova-Vatchkova, V.; Maldonado, R.; Kovats, S. Estrogen preferentially promotes the differentiation of CD11c<sup>+</sup> CD11b(intermediate) dendritic cells from bone marrow precursors. *J. Immunol.*, **2004**, *172* (3), 1426-1436.
- [61] Carreras, E.; Turner, S.; Paharkova-Vatchkova, V.; Mao, A.; Dascher, C.; Kovats, S. Estradiol acts directly on bone marrow myeloid progenitors to differentially regulate GM-CSF or Flt3 ligand-mediated dendritic cell differentiation. *J. Immunol.*, **2008**, *180* (2), 727-738; (b) Siracusa, M. C.; Overstreet, M. G.; Housseau, F.; Scott, A. L.; Klein, S. L. 17beta-estradiol alters the activity of conventional and IFN-producing killer dendritic cells. *J. Immunol.*, **2008**, *180* (3), 1423-1431.
- [62] Uemura, Y.; Liu, T. Y.; Narita, Y.; Suzuki, M.; Matsushita, S. 17 Beta-estradiol (E2) plus tumor necrosis factor-alpha induces a distorted maturation of human monocyte-derived dendritic cells and promotes their capacity to initiate T-helper 2 responses. *Hum. Immunol.*, **2008**, *69* (3), 149-157.
- [63] Yang, L.; Hu, Y.; Hou, Y. Effects of 17beta-estradiol on the maturation, nuclear factor kappa B p65 and functions of murine spleen CD11c-positive dendritic cells. *Mol. Immunol.*, **2006**, *43* (4), 357-366.
- [64] Butts, C. L.; Shukair, S. A.; Duncan, K. M.; Bowers, E.; Horn, C.; Belyavskaya, E.; Tonelli, L.; Sternberg, E. M. Progesterone inhibits mature rat dendritic cells in a receptor-mediated fashion. *Int. Immunol.*, **2007**, *19* (3), 287-296.
- [65] Galli, S. J.; Tsai, M. Mast cells: versatile regulators of inflammation, tissue remodeling, host defense and homeostasis. *J. Dermatol. Sci.*, **2008**, *49* (1), 7-19.
- [66] de Oliveira, A. P.; Domingos, H. V.; Cavriani, G.; Damazo, A. S.; Dos Santos Franco, A. L.; Oliani, S. M.; Oliveira-Filho, R. M.; Vargaftig, B. B.; de Lima, W. T. Cellular recruitment and cytokine generation in a rat model of allergic lung inflammation are differentially modulated by progesterone and estradiol. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **2007**, *293* (3), C1120-1128.
- [67] Padilla, L.; Reinicke, K.; Montesino, H.; Villena, F.; Asencio, H.; Cruz, M.; Rudolph, M. I. Histamine content and mast cells distribution in mouse uterus: the effect of sexual hormones, gestation and labor. *Cell Mol. Biol.*, **1990**, *36* (1), 93-100; (b) Vasiadi, M.; Kempuraj, D.; Boucher, W.; Kalogeromitos, D.; Theoharides, T. C. Progesterone inhibits mast cell secretion. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, **2006**, *19* (4), 787-794; (c) Belot, M. P.; Abdennebi-Najar, L.; Gaudin, F.; Emilie, D.; Machelon, V. Progesterone increases csk homologous kinase in HMC-1560 human mast cells and reduces cell proliferation. *J. Cell Biochem.*, **2007**, *102* (5), 1271-1280.
- [68] Vliagoftis, H.; Dimitriadou, V.; Boucher, W.; Rozniecki, J. J.; Correia, I.; Raam, S.; Theoharides, T. C. Estradiol augments while tamoxifen inhibits rat mast cell secretion. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **1992**, *98* (4), 398-409.
- [69] Jeziorska, M.; Salamonsen, L. A.; Woolley, D. E. Mast cell and eosinophil distribution and activation in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Biol. Reprod.*, **1995**, *53* (2), 312-320.
- [70] Pang, X.; Cotreau-Bibbo, M. M.; Sant, G. R.; Theoharides, T. C. Bladder mast cell expression of high affinity oestrogen receptors in patients with interstitial cystitis. *Br. J. Urol.*, **1995**, *75* (2), 154-161.
- [71] Zaitou, M.; Narita, S.; Lambert, K. C.; Grady, J. J.; Estes, D. M.; Curran, E. M.; Brooks, E. G.; Watson, C. S.; Goldblum, R. M.; Midoro-Horiuti, T. Estradiol activates mast cells via a non-genomic estrogen receptor-alpha and calcium influx. *Mol. Immunol.*, **2007**, *44* (8), 1977-1985.
- [72] Nicovani, S.; Rudolph, M. I. Estrogen receptors in mast cells from arterial walls. *Biocell*, **2002**, *26* (1), 15-24.
- [73] Shirasaki, H.; Watanabe, K.; Kanaizumi, E.; Konno, N.; Sato, J.; Narita, S.; Himi, T. Expression and localization of steroid receptors in human nasal mucosa. *Acta. Otolaryngol.*, **2004**, *124* (8), 958-963.
- [74] Zhao, X. J.; McKerr, G.; Dong, Z.; Higgins, C. A.; Carson, J.; Yang, Z. Q.; Hannigan, B. M. Expression of oestrogen and progesterone receptors by mast cells alone, but not lymphocytes, macrophages or other immune cells in human upper airways. *Thorax*, **2001**, *56* (3), 205-211.
- [75] Kim, M. S.; Chae, H. J.; Shin, T. Y.; Kim, H. M.; Kim, H. R. Estrogen regulates cytokine release in human mast cells. *Immunopharm. Immunotoxic.*, **2001**, *23* (4), 495-504; (b) Hamish, D. C.; Albert, L. M.; Leathurby, Y.; Eckert, A. M.; Ciarletta, A.; Kasaian, M.; Keith, J. C. Jr. Beneficial effects of estrogen treatment in the HLA-B27 transgenic rat model of inflammatory bowel disease. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **2004**, *286* (1), G118-125.
- [76] Narita, S.; Goldblum, R. M.; Watson, C. S.; Brooks, E. G.; Estes, D. M.; Curran, E. M.; Midoro-Horiuti, T. Environmental estrogens induce mast cell degranulation and enhance IgE-mediated release of allergic mediators. *Environ. Health Perspect.*, **2007**, *115* (1), 48-52.
- [77] Orange, J. S.; Ballas, Z. K. Natural killer cells in human health and disease. *Clin. Immunol.*, **2006**, *118* (1), 1-10.
- [78] Henderson, T. A.; Saunders, P. T.; Moffett-King, A.; Groome, N. P.; Critchley, H. O. Steroid receptor expression in uterine natural killer cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **2003**, *88* (1), 440-449.
- [79] Dosiou, C.; Giudice, L. C. Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives. *Endocr. Rev.*, **2005**, *26* (1), 44-62.
- [80] Souza, S. S.; Castro, F. A.; Mendonca, H. C.; Palma, P. V.; Morais, F. R.; Ferriani, R. A.; Voltarelli, J. C. Influence of menstrual cycle on NK activity. *J. Reprod. Immunol.*, **2001**, *50* (2), 151-159.
- [81] Curran, E. M.; Berghaus, L. J.; Verneti, N. J.; Saporita, A. J.; Lubahn, D. B.; Estes, D. M. Natural killer cells express estrogen receptor-alpha and estrogen receptor-beta and can respond to estrogen via a non-estrogen receptor-alpha-mediated pathway. *Cell Immunol.*, **2001**, *214* (1), 12-20.
- [82] Arruvito, L.; Giulianelli, S.; Flores, A. C.; Paladino, N.; Barboza, M.; Lanari, C.; Fainboim, L. NK cells expressing a progesterone receptor are susceptible to progesterone-induced apoptosis. *J. Immunol.*, **2008**, *180* (8), 5746-5753.
- [83] Bouman, A.; Moes, H.; Heineman, M. J.; de Leij, L. F.; Faas, M. M. Cytokine production by natural killer lymphocytes in follicular and luteal phase of the ovarian cycle in humans. *Am. J. Reprod. Immunol.*, **2001**, *45* (3), 130-134.
- [84] Gourdy, P.; Araujo, L. M.; Zhu, R.; Garmy-Susini, B.; Diem, S.; Laurell, H.; Leite-de-Moraes, M.; Dy, M.; Arnal, J. F.; Bayard, F.; Herbelin, A. Relevance of sexual dimorphism to regulatory T cells: estradiol promotes IFN-gamma production by invariant natural killer T cells. *Blood*, **2005**, *105* (6), 2415-2420.
- [85] Lorenzo, J. A new hypothesis for how sex steroid hormones regulate bone mass. *J. Clin. Invest.*, **2003**, *111* (11), 1641-1643; (b) Vertino, A. M.; Bula, C. M.; Chen, J. R.; Almeida, M.; Han, L.; Bellido, T.; Kousteni, S.; Norman, A. W.; Manolagas, S. C. Nongenotropic, anti-apoptotic signaling of 1alpha,25(OH)2-vitamin D3 and analogs through the ligand binding domain of the vitamin D receptor in osteoblasts and osteocytes. Mediation by Src, phosphatidylinositol 3-, and JNK kinases. *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280* (14), 14130-14137.

- [86] Kousteni, S.; Chen, J. R.; Bellido, T.; Han, L.; Ali, A. A.; O'Brien, C. A.; Plotkin, L.; Fu, Q.; Mancino, A. T.; Wen, Y.; Vertino, A. M.; Powers, C. C.; Stewart, S. A.; Ebert, R.; Parfitt, A. M.; Weinstein, R. S.; Jilka, R. L.; Manolagas, S. C. Reversal of bone loss in mice by nongenotropic signaling of sex steroids. *Science*, **2002**, *298* (5594), 843-846.
- [87] Leung, S. W.; Teoh, H.; Keung, W.; Man, R. Y. Non-genomic vascular actions of female sex hormones: physiological implications and signalling pathways. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **2007**, *34* (8), 822-826.
- [88] Fu, X. D.; Simoncini, T. Non-genomic sex steroid actions in the vascular system. *Semin. Reprod. Med.*, **2007**, *25* (3), 178-186.

Received: March 30, 2010

Accepted: August 18, 2010

# **Apéndice ii. a.**



## LA RED NEUROINMUNOENDÓCRINA HOSPEDERO-PARÁSITO

*Galileo Escobedo, Carolina Guzmán, Romel  
Hernández-Bello, Cristian Togno-Pierce,  
Elizabeth G. Ibarra-Coronado, Lorena López-  
Griego y Jorge Morales-Montor*

### INTRODUCCIÓN

La homeostasis es un rasgo distintivo de todos los organismos vivos, caracterizado por el mantenimiento del equilibrio interno con respecto al medio exterior. Claude Bernard (1813-1878), eminente médico y biólogo teórico, considerado como el padre de la fisiología moderna, postuló en 1865 este término, poniendo especial énfasis en los distintos sistemas dinámicos que un organismo posee, con la finalidad de preservar una condición fisiológica estable, capaz de auto-ajustarse y llevar al organismo a un nuevo estado homeostático. En vertebrados superiores, particularmente mamíferos, existen diversos mecanismos homeostáticos que regulan múltiples aspectos fisiológicos, tales como la temperatura corporal, el balance electrolítico, el intercambio de gases (oxígeno), diversos procesos anabólico-catabólicos, entre otros.

# **Apéndice ii. b.**

## El efecto de los esteroides sexuales sobre la inmunidad adquirida y su impacto en la autoinmunidad e infección

Hernández-Bello R<sup>1</sup>, Muñoz-Cruz S<sup>2</sup>, Nava K<sup>3</sup>, López-Griego L<sup>1</sup>, Hernández-Cervantes R<sup>1</sup>, Martínez-Velázquez N<sup>1</sup>, Sánchez-Acosta AG<sup>1</sup>, Ramírez-Nieto R<sup>1</sup>, Togno-Peirce C<sup>1</sup>, y Morales-Montor J<sup>1</sup>

- (1) Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. México.
- (2) Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Instituto Mexicano del Seguro Social, México D.F, México.
- (3) Departamento de Infectología e Inmunología, Instituto Nacional de Perinatología, México D.F.

### RESUMEN

Las hormonas sexuales tienen una importante participación en la regulación de la respuesta inmunológica. Debido a que la respuesta inmune inicial determina el tipo de respuesta inmune adaptativa, los efectos de hormonas sobre la inmunidad innata podrían afectar a la respuesta inmune adaptativa subsiguiente. Los estrógenos, progestágenos y andrógenos regulan el crecimiento, diferenciación y funcionamiento de varios tipos celulares involucrados en la inmunidad. La presencia de receptores para esteroides sexuales en células del sistema inmune es un indicador de que los esteroides sexuales pueden ejercer sus efectos biológicos uniéndose a dichos receptores. Los esteroides sexuales y la inmunidad están estrechamente conectados y su mutua regulación está ligada al mantenimiento y balance inmunológico. El entendimiento de los mecanismos de acción de los esteroides sexuales sobre el sistema inmune es importante para el desarrollo de nuevas terapias relacionadas con enfermedades crónicas asociadas a la

## Dimorfismo sexual inmunitario: Efecto de los esteroides sexuales sobre la inmunidad innata

Muñoz-Cruz S<sup>1</sup>, Togno-Peirce C<sup>2</sup>, Hernández-Bello R<sup>2</sup>, López-Griego L<sup>2</sup>, Tiempos-Guzmán N<sup>2</sup>, Trejo-Sánchez IG<sup>2</sup>, Ibarra-Coronado E<sup>2</sup>, Navarro-Junco KI<sup>2</sup>, López-Salazar V<sup>2</sup> y Morales-Montor J<sup>2\*</sup>

- (1) Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Instituto Mexicano del Seguro Social, México D.F., México.
- (2) Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. México.

### RESUMEN

Las hormonas sexuales tienen una importante participación en la regulación de la respuesta inmunológica. Diversos estudios han demostrado que existe una relación recíproca entre los esteroides sexuales y el sistema inmune innato. Dado que la respuesta inmune inicial, determina el tipo de respuesta inmune adaptativa, los efectos hormonales sobre la inmunidad innata podrían afectar a la respuesta inmune adaptativa subsiguiente. Los estrógenos, progestágenos y andrógenos regulan el crecimiento, diferenciación y funcionamiento de varios tipos celulares involucrados en la inmunidad innata. La presencia de receptores de esteroides sexuales en células del sistema inmune innato es un indicador de que los esteroides sexuales pueden ejercer sus efectos biológicos uniéndose a dichos receptores. El entendimiento de los mecanismos de acción de los esteroides sexuales sobre el sistema inmune innato es importante para el desarrollo de nuevas terapias relacionadas a enfermedades inflamatorias asociadas a la desregulación de una respuesta inicial. En este capítulo se describen los efectos de los esteroides sexuales sobre la función de diversos tipos de células del sistema inmune innato, así como algunos de los mecanismos de acción de los esteroides sexuales en estas células.