



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**PAPEL DE LAS INHIBINAS EN LA DIFERENCIACIÓN Y MADURACIÓN DE
CÉLULAS DENDRÍTICAS**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias**

**PRESENTA:
ROXANA OLGUÍN ALOR**

**TUTOR PRINCIPAL
Dra. Ma. Gloria Soldevila Melgarejo
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM**

**COMITÉ TUTOR
Dra. Laura Bonifaz Alonso
Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas
Dra. Marina Macías Silva
Instituto de Fisiología Celular, UNAM**

MÉXICO, D. F. Agosto, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

A mis abuelos
Quienes fueron grandes maestros
De lucha y dedicación
“No vengo a ver si puedo,
¡Sino porque puedo vengo!”

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente a la Facultad de Química, por ser mi segunda casa desde la carrera.

A la Dra. Gloria Soldevila Melgarejo por su apoyo laboral y personal, además de la confianza depositada en mi trabajo.

Al Comité tutorial conformado por la Dra. Laura Bonifaz Alonso y la Dra. Marina Macías Silva por sus valiosos consejos.

A los miembros del Jurado: Dr. Edgar Zenteno Galindo, Dr. Enrique Ortega Soto, Dra Martha Robles Flores, Dr. Jesús Chimal Monroy y Dr. Fernando López Casillas por las correcciones realizadas a la presente tesis.

Al CONACyT (No. De becario 289787) por la beca otorgada para realizar mis estudios de maestría.

Este proyecto fue financiado por PAPIIT, DGAPA, UNAM 224411.

A mi compañeros de laboratorio Benjamín, Berenice, Marisol, Carlos, Sandra, Erica, Arimelek, Evelyn, Ebzadrel y Ramsés por su ayuda y su compañerismo.

A Xochitl, amiga y compañera, por enseñarme el verdadero significado de la frase “amor al arte”. Gracias por la ayuda y el entusiasmo al trabajo.

A mis padres quienes me han enseñado grandes valores que me acompañarán a lo largo de mi vida. En gran parte, por ustedes soy la persona que

soy. A Zule, amiga, consejera y confidente, por levantarme en los momentos difíciles. ¡Los amo!

A mi amado Jonathan, regresaste a mí en el momento menos pensado pero el más certero, eres mi soporte y mi fuerza. ¡Te amo!

A mi familia, tía Cuca, tío Miguel, Ana, que siempre me han apoyado y alentado a luchar por mis metas. Ustedes forman gran parte en mi vida.

ÍNDICE

I. ABREVIATURAS	7
II. RESUMEN.....	9
III. INTRODUCCIÓN.....	11
III.I. Células dendríticas.....	12
III.I.I. Clasificación de las células dendríticas	12
III.I.II. Desarrollo de las células dendríticas	14
III.I.III. Maduración de las células dendríticas.....	16
III.I.IV. Tolerancia.....	17
III.II. Inhibina.....	19
III.II.I. Composición de las Inhibinas y las Activinas	20
III.II.II. Mecanismo de acción de las Inhibinas y las Activinas.....	21
IV. ANTECEDENTES	24
V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	26
VI. HIPÓTESIS	27
VII. OBJETIVO GENERAL.....	27
VIII. OBJETIVOS PARTICULARES.....	27
IX. MATERIALES Y MÉTODOS	28
IX.I. Derivación de células dendríticas a partir de células de médula ósea (BMDC)	28

IX.II. Tinción de marcadores extracelulares.....	29
IX.III. Migración <i>in vitro</i> : Quimiotaxis	30
IX.IV. Tinción para microscopía	31
X. RESULTADOS	33
IX.I. Diferenciación de células dendríticas a partir de progenitores de médula ósea <i>in vitro</i>	33
IX.II. Maduración de células dendríticas derivadas de médula ósea	35
IX.III. Migración <i>in vitro</i> de las células dendríticas.....	39
IX.IV. Morfología de las células dendríticas.....	41
XI. DISCUSIÓN.....	44
XII. CONCLUSIÓN.....	50
XIII. PERSPECTIVAS	50
XIV. BIBLIOGRAFÍA.....	51

I. ABREVIATURAS

BMDC	Célula dendrítica derivada de médula ósea
BMP	Proteína morfogénica de hueso
CCR7	Receptor de quimiocina C-C 7
CDP	Progenitor común de células dendríticas
CLP	Progenitor común linfoide
CMP	Progenitor común mieloide
DC	Célula dendrítica
iDC	Célula dendrítica inmadura
mDC	Célula dendrítica madura
FAK	Cinasa de adhesión focal
Flt3	Cinasa de tirosina tipo Fms 3
FSH	Hormona folículo estimulante
GM-CSF	Factor estimulante de colonia de granulocitos y monocitos
INF	Interferon
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
Inh α +/+	Ratón suficiente de Inhibina α
Inh α -/-	Ratón deficiente de Inhibina α
MDP	Progenitor de macrófago y célula dendrítica
MMP-14	Metaloproteinasa 14
Mono	Monocito
pDC	Célula dendrítica plasmacitoide

Pre-DC	Precursor de célula dendrítica
SFB	Suero fetal bobino
TGF β	Factor de crecimiento transformante beta
TipDC	Célula dendrítica productora de TNF e iNOS
TNF	Factor de necrosis tumoral
WASP	Proteína del síndrome de Wiskott Aldrich

II. RESUMEN

Las Inhibinas son citocinas que pertenecen a la superfamilia de TGF β . Tanto las Inhibinas como las Activinas, ligandos altamente relacionados con las Inhibinas, fueron descritas inicialmente como reguladores de la secreción de la hormona folículo estimulante (FSH). Sin embargo, también participan en la regulación de distintos procesos celulares, siendo de especial interés para el presente estudio, su función en células del sistema inmune, como macrófagos, monocitos, células cebadas, células “Natural Killer”, linfocitos T y B y células dendríticas (DCs).

En nuestro laboratorio se ha reportado que, tanto la Inhibina como la Activina, se expresan abundantemente en el estroma tímico, el cual se encuentra constituido por distintos tipos celulares, incluyendo células epiteliales, macrófagos, fibroblastos y DCs. Además de expresar los ligandos, el estroma tímico también expresa receptores tipo I y tipo II para las Activinas (Alk4, ActRIIA), por lo que las células estromales pueden ser competentes a las señales inducidas por las Activinas/Inhibinas.

Debido a lo anterior, en el presente trabajo se evaluó la participación de las Inhibinas en los procesos de la diferenciación y la maduración de las células dendríticas derivadas *in vitro* a partir de progenitores de médula ósea (BMDC) provenientes de ratones silvestres y deficientes de Inhibina. Para evaluar la maduración de las BMDC, las células se estimularon con Lipopolisacárido (LPS) durante 24 horas y se analizó la expresión de moléculas de superficie, mediante

citometría de flujo; además, se evaluó la quimiotaxis en respuesta a la quimiocina CCL19. Finalmente, por medio de microscopía de epifluorescencia, se evaluó la morfología de las BMDC antes y después del estímulo con LPS y en respuesta a CCL19.

Como resultado se observó que, en hembras, las BMDC deficientes de Inhibina presentan baja expresión de MHCII, CD80 y CD86 tras la estimulación con LPS en comparación con las BMDC silvestres. Aunado a lo anterior, la quimiotaxis en respuesta a CCL19 se encuentra alterada en BMDC deficientes de Inhibina estimuladas con LPS. De manera interesante, las BMDC inmaduras deficientes de Inhibina, tanto de hembras como de machos, presentan baja formación de podosomas.

En conclusión, las Inhibinas participan en la maduración y probablemente en la diferenciación de las células dendríticas derivadas de médula ósea.

III. INTRODUCCIÓN

La inmunidad y la tolerancia inmunológica deben estar en perfecto balance para el bienestar de un individuo. Ante la presencia de agentes patógenos, un organismo es capaz de defenderse mediante diversos mecanismos celulares y células que comprenden al sistema inmune, como son: eosinófilos, basófilos, macrófagos, células cebadas (Inmunidad innata); además, linfocitos T, linfocitos B, células dendríticas (Inmunidad adaptativa), entre otras. Por otro lado, un individuo debe mantener la tolerancia inmunológica contra autoantígenos y contra antígenos exógenos tales como los provenientes de la comida y de las bacterias comensales.

Las células dendríticas (DCs por sus siglas en inglés) tienen un papel fundamental dentro de este balance ya que participan en ambos procesos. Por un lado, las DCs regulan la respuesta inmune ya que su activación en presencia de señales de peligro induce su maduración permitiendo la presentación antigénica eficiente que conduce a la respuesta inmune efectora. De manera contraria, las DCs presentan un papel importante en la tolerancia ya que la activación inapropiada o en presencia de señales anti-inflamatorias las mantiene en estado inmaduro; en consecuencia, la presentación antigénica puede conducir a anergia o a la inducción de células T reguladoras (iTreg) [1].

III.I. Células dendríticas

Las células dendríticas, identificadas por Steinman y Cohn en 1973 [2], son células presentadoras de antígeno profesionales, las cuales son altamente capaces de capturar y procesar antígenos para presentarlos a los linfocitos T e inducir una respuesta efectora. Debido a lo anterior, se dice que las DCs forman un puente entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa a través de las interacciones célula-célula y mediante la secreción de citocinas [3].

III.I.I. Clasificación de las células dendríticas

Las DCs son una población altamente heterogénea ya que se encuentran distribuidas en todo el organismo; sin embargo, se han clasificado en dos grupos: DCs convencionales; las cuales tienen como origen los precursores de DCs (pre-DCs), y las DCs no convencionales; las cuales incluyen a las DCs plasmacitoides y a las DCs derivadas de monocitos.

Dentro de las DCs convencionales, se encuentran las células DC migratorias, las cuales se encuentran en órganos de la periferia como la piel, el pulmón, tracto intestinal, hígado y riñones. Las DC migratorias se caracterizan por la habilidad de capturar antígeno y migrar subsecuentemente a los ganglios linfáticos drenantes, donde toma lugar la interacción con los linfocitos T. Por otro lado, también se encuentran las DCs linfoides las cuales se encuentran en

órganos linfoides como los ganglios linfáticos, bazo y timo. Este subgrupo ha sido dividido dependiendo la expresión de CD4 y CD8 en las células dendríticas.

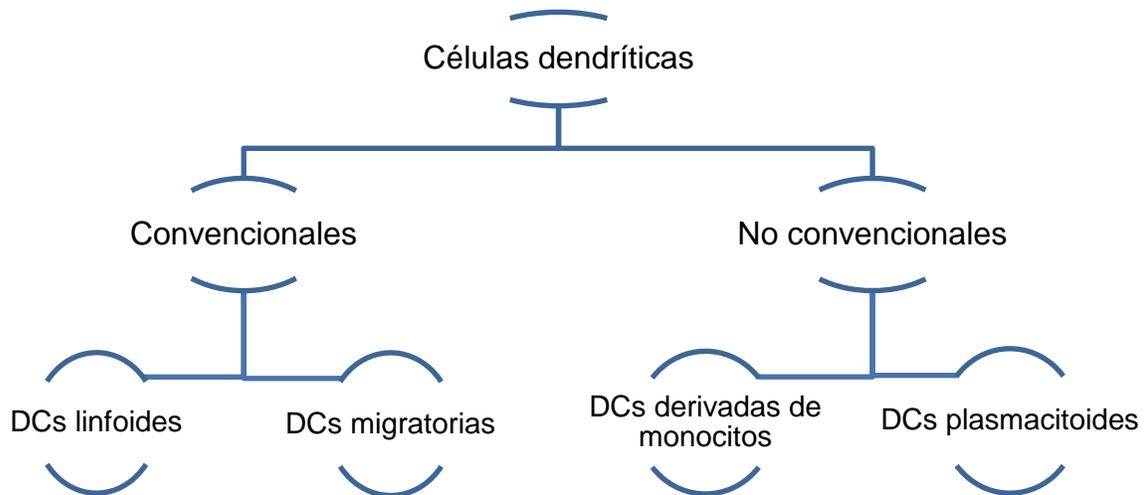


Figura 1. Clasificación de las células dendríticas. Tomado y modificado de [4].

Las DCs no convencionales incluyen a las DCs plasmacitoides, las cuales tienen la habilidad de secretar grandes cantidades de Interferon (INF) lo que las distingue de las células DCs convencionales. También se incluyen a las DCs derivadas de monocitos las cuales se diferencian bajo condiciones inflamatorias. Las DCs derivadas de monocitos, las cuales comparten la habilidad de capturar antígeno y migrar a ganglios linfáticos drenantes, se encuentran en órganos periféricos como intestino, pulmón, piel y riñones.

III.I.II. Desarrollo de las células dendríticas

Al igual que otros leucocitos, las DCs se desarrollan a partir de progenitores de médula ósea. Las DCs comparten un origen común con los monocitos, macrófagos y leucocitos polimorfonucleares ya que se originan a partir del progenitor mieloide común (CMP por sus siglas en inglés) (Figura 2).

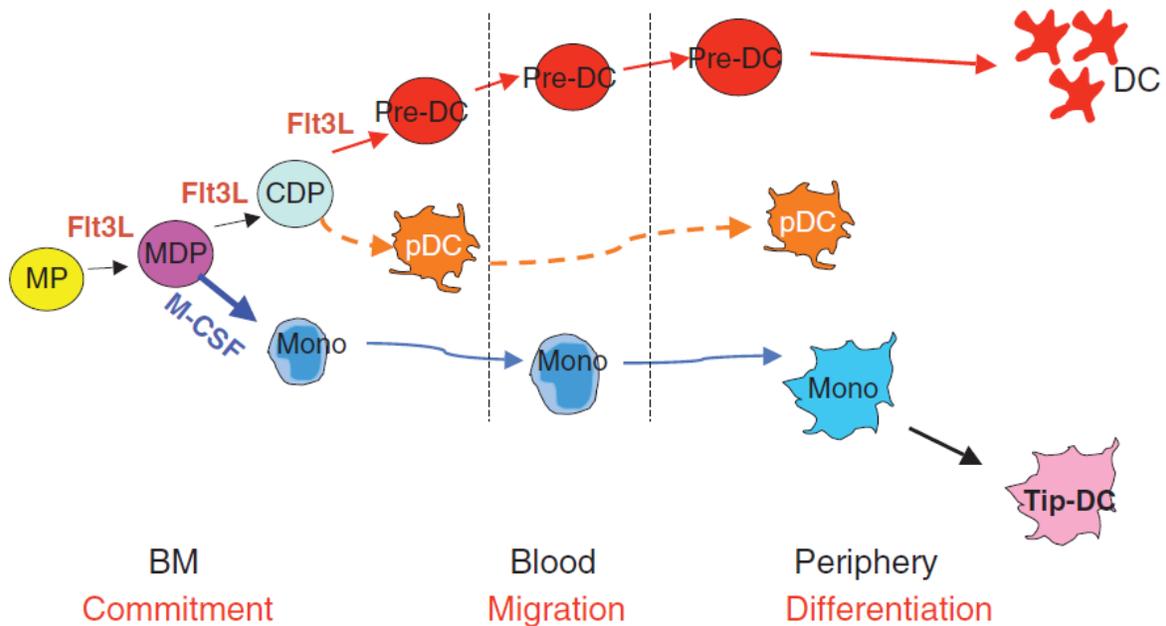


Figura 2. Desarrollo de células dendríticas. MP: progenitor mieloide. MDP: progenitor de macrófago y DC. CDP: Progenitor de DC común. Pre-DC: precursor de Célula Dendrítica. pDC: Célula Dendrítica plasmacitoide. Mono: Monocito. Tip-DC: célula tipo dendrítica. [5]

Diversos ensayos se han realizado para establecer el desarrollo de las DCs (revisado en [5]). De acuerdo con dichos ensayos, los progenitores de DCs expresan Flt3, por lo que se logró identificar a un precursor común para monocitos, macrófagos y DCs (progenitor macrófago-dendrítica MDP) [6]. En seguida se identificó a un progenitor restringido a DCs que produce DCs plasmacitoides y convencionales pero no monocitos tanto *in vitro* [7] como *in vivo* [8-10], el cual fue llamado progenitor de célula dendrítica común (CDP por sus siglas en inglés). Ensayos de transferencia adoptiva de CMP y MDP revelaron que CDP se encuentra en un estado más diferenciado que las anteriores; además, estos experimentos mostraron que la divergencia entre los linajes monocíticos y DCs ocurre en la médula ósea entre los estadios de diferenciación MDP y CDP [9].

Los precursores de DCs se generan en la médula ósea para después salir a la sangre y distribuirse en los tejidos linfoides y no linfoides del organismo. Se ha demostrado que las pre-DC son progenitores con alta plasticidad ya que en ensayos de transferencia adoptiva, las pre-DCs aisladas de médula ósea, sangre o bazo se diferencian en las subpoblaciones residentes de bazo, ganglios linfáticos [5] y DCs característicos de piel, pulmón, riñón e intestino. Por tanto, los pre-DCs terminan la diferenciación a DC en los diferentes tejidos.

Por otro lado, se ha observado que existen células dendríticas provenientes de monocitos y del progenitor linfoide común (CLP por sus siglas en inglés), sin embargo, es probable que la diferenciación a partir de estos progenitores sea a

subpoblaciones especializadas de DC y sólo bajo condiciones específicas. (Revisado en [4]).

III.I.III. Maduración de las células dendríticas

Las DCs que han terminado de diferenciarse en tejido periférico se encuentran en estado inmaduro. Las DCs inmaduras (iDCs) se caracterizan por tener una alta capacidad de endocitosis, la cual ocurre continuamente en homeostasis para detectar la presencia de antígenos. Las iDCs expresan bajas cantidades de moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad Clase II (MHC II) y de moléculas coestimuladoras como CD40, CD80, CD86.

Cuando las iDCs capturan y procesan antígenos comienzan un proceso de maduración y migran hacia los ganglios linfáticos. Durante dicho proceso, las DCs incrementan la expresión del receptor de quimiocina CCR7, el cual es importante para la llegada de las células a los ganglios linfáticos; MHC II, CD40, CD80 y CD86 dando como consecuencia funcional, que las DCs maduras (mDCs) presenten antígenos y activen a los linfocitos T (LT). Adicionalmente, las mDCs producen citocinas proinflamatorias como IL-12, TNF- α , IL-1 β e IL-6 (revisado en [11, 12]). Además, las DCs modifican su morfología y capacidad migratoria. Las iDCs tienen una morfología extendida presentando podosomas, las cuales son estructuras de adhesión formadas por actina filamentosa y moléculas de anclaje como la cinasa de adhesión focal (FAK por sus siglas en inglés), Vinculina,

Cofilina, la proteína del síndrome de Wiskott Aldrich (WASP por sus siglas en inglés), entre otras [13, 14]; además, se ha observado que los podosomas son protrusivos e invasivos capaces de expresar metaloproteasas (MMP-14) para degradar matriz extracelular y de esta manera abrir paso entre el tejido [15]. Asimismo, las iDCs expresan diversos receptores de quimiocinas dependiendo del tejido en donde se encuentren. Debido a lo anterior, la migración que presentan las iDCs es lenta y errante.

En consecuencia a la captura de antígeno, las DCs modifican su morfología presentándose en forma contraída, acompañada por la disolución de los podosomas [16]. Aunado a lo anterior, el patrón de expresión de receptores de quimiocinas de las DCs se modifica de tal manera que principalmente se encuentra en superficie el receptor CCR7, dirigiendo la migración hacia los ganglios linfáticos. Debido a lo anterior, la migración que presentan las mDCs es rápida y dirigida.

II.I.IV. Tolerancia

A pesar de la capacidad para establecer la respuesta inmune adaptativa, las DCs también tienen una función en generar la tolerancia inmunológica. Como se mencionó anteriormente, las DCs son centinelas que continuamente están fagocitando antígenos que, en homeostasis, la gran mayoría serán antígenos propios del organismo o antígenos de la microbiota comensal; sin embargo, no se establece una respuesta inmune contra dichos antígenos. En tal caso, las DCs se modifican de tal manera que pueden incrementar MHCII, CD80 y CD86 pero son

incapaces de secretar citocinas proinflamatorias dando como consecuencia que los LTs no se activen por completo. Por el contrario, las DCs pueden generar otro tipo de citocinas como TGF β e IL-10 para generar células T reguladoras (Treg). A dichas DCs capaces de generar Treg se les conoce como DCs tolerogénicas.

¿Qué influencia que las DCs generen una respuesta inmune o tolerancia? Las citocinas del microambiente (TGF β , IL-10, etc.) y el contacto con otro tipo celular (Tregs, estroma, etc.) son las que influyen directamente a las DCs para decidir entre su completa maduración o adquirir un fenotipo que induzca tolerancia (revisado en [17]).

A pesar de que la primera función descrita para las DCs fue la generación de la respuesta inmunológica, ahora se sabe que las DCs en homeostasis se encuentran ejerciendo la tolerancia en un organismo.

III.II. Inhibina

Las Inhibinas son citocinas que pertenecen a la superfamilia de TGF β (factor transformante de crecimiento), la cual está conformada por tres familias: TGF β s, proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs por sus siglas en inglés) e Inhibinas/Activinas. La superfamilia de TGF β se encuentra involucrada en gran variedad de procesos celulares como: diferenciación, proliferación, migración, control del crecimiento celular, apoptosis, adhesión y decisión de linaje [18].

Inicialmente, las Inhibinas se caracterizaron como hormonas que forman parte del eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada [19] ya que son producidas por las gónadas y actúan de manera endócrina regulando negativamente la síntesis y secreción de la hormona folículo estimulante (FSH por sus siglas en inglés). Sin embargo, es cada vez más amplio el espectro de células que son afectadas por estas hormonas incluidas células del sistema inmune como macrófagos, células dendríticas, linfocitos T y B [20].

Debido a la principal función de las Inhibinas, se dice que las mismas antagonizan las funciones de sus homólogas, las Activinas, ya que las Activinas promueven la síntesis y secreción de la FSH; sin embargo, se ha demostrado en diversos ensayos utilizando células del sistema inmune que las Inhibinas pueden tener un mecanismo de acción propio y que la función que ejercen no es necesariamente la opuesta a las Activinas (Revisado en [21]).

III.II.I. Composición de las Inhibinas y las Activinas

Las Inhibinas son heterodímeros conformados por una subunidad α y una β unidas por un puente disulfuro, mientras que las Activinas son dímeros compuestos por dos subunidades β [22].

Hasta el momento, se ha descrito un único tipo de subunidad α ; sin embargo, existen diferentes tipos de subunidades β : A, B, C y E, generando diferentes subtipos tanto de Inhibinas como de Activinas, las cuales se denominan de acuerdo al tipo de subunidad β que las compongan, de tal manera que la Inhibina A es un dímero $\alpha\beta_A$, la Inhibina B es $\alpha\beta_B$, la Activina A $\beta_A\beta_A$, Activina B $\beta_B\beta_B$ y la Activina AB es $\beta_A\beta_B$ (Figura 3).

Cada subunidad es inicialmente traducida como pre-pro-proteína que posee, en el extremo N-terminal, un dominio pro necesario para el adecuado plegamiento y dimerización de las subunidades y, en la región C-terminal, el dominio maduro de la subunidad. Una vez que las subunidades se encuentran dimerizadas, el dominio pro es cortado para que el ligando se encuentre biológicamente activo (revisado en [23]).

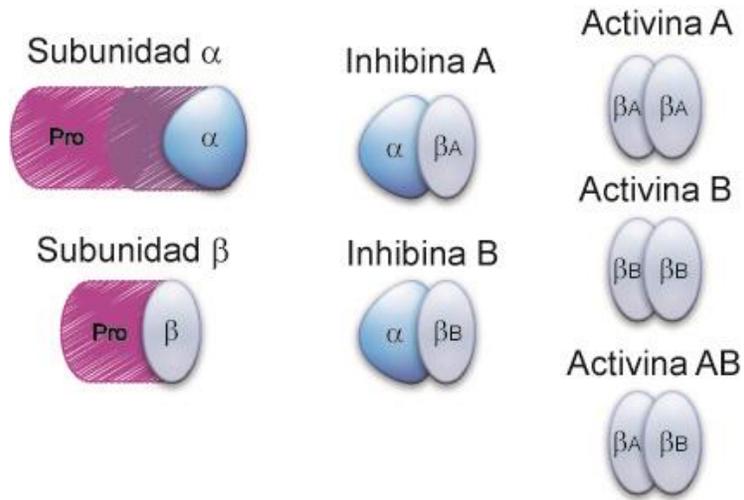


Figura 3. Composición de las Inhibinas y las Activinas.

III.II.II. Mecanismo de acción de las Inhibinas y las Activinas

El mecanismo de acción de la superfamilia de TGF β es conservado y depende de pares de receptores de membrana tipo I (Activin Like Kinase ALK) y tipo II con actividad cinasa de serina y treonina, y de las proteínas Smads, las cuales actúan como factores de transcripción. En vertebrados, se han descrito 7 receptores tipo I (ALK 1-7) y 5 receptores tipo II.

Inicialmente, para el caso de la Activina, el ligando se une al receptor tipo II (ACTRII, ACTRIIB) y en consecuencia, se recluta el receptor tipo I (ALK4), el cual es fosforilado por el receptor tipo II. En seguida, el receptor tipo I fosforila a las proteínas Smad (Smad2/3), las cuales se unen con la Smad común (Smad-4)

permitiendo su translocación a núcleo para actuar como factores de transcripción (Revisado en [18]).

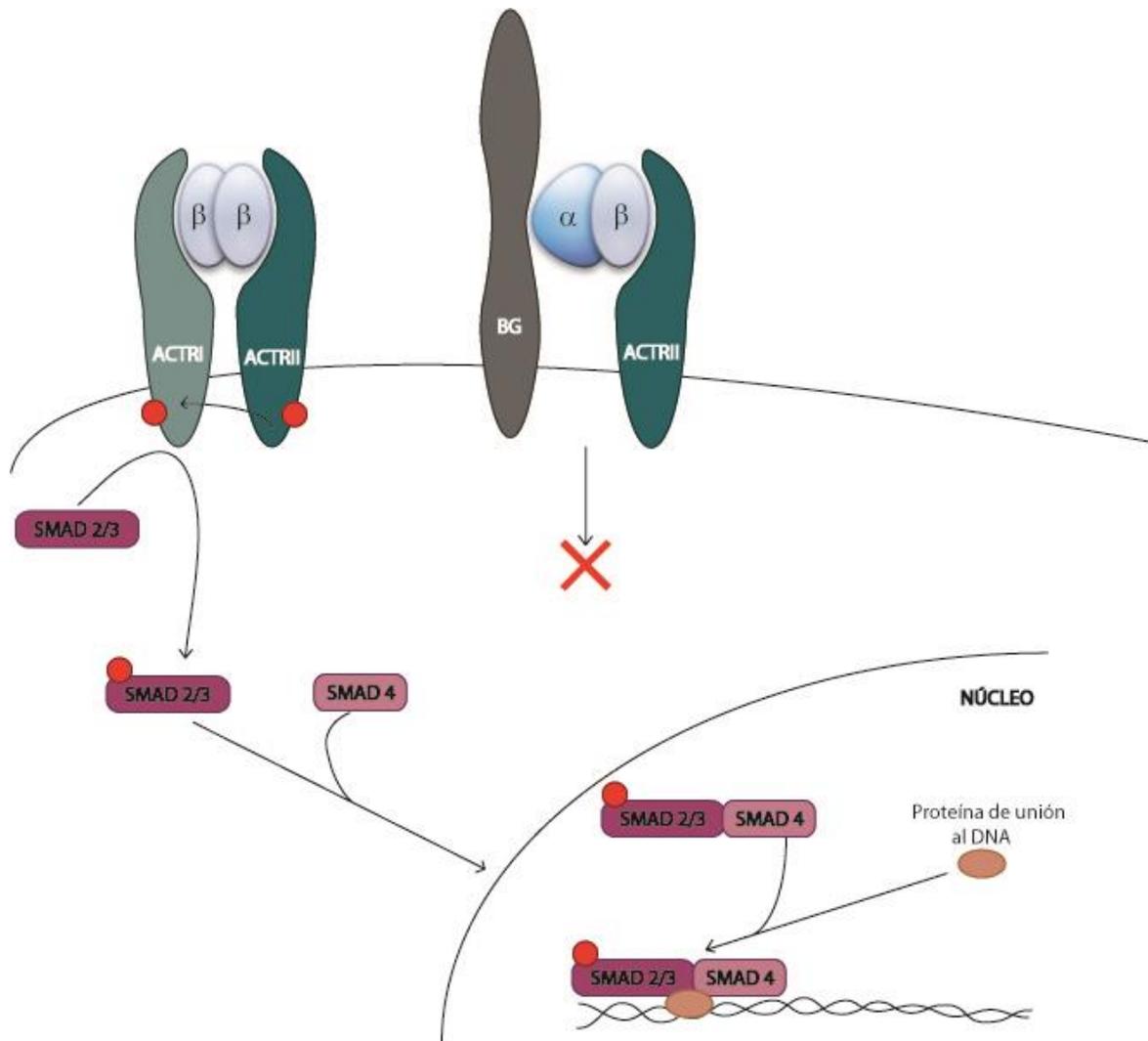


Figura 4. Mecanismo de acción de las Inhibinas y las Activinas. Activina: $\beta\beta$, Inhibina: $\alpha\beta$, Receptor tipo I: ACTRI, Receptor tipo II: ACTRII, Betaglicano: BG.

Para el caso de las Inhibinas se ha descrito que se unen al receptor tipo II (ACTRII, ACTRIIB) por la subunidad β pero es incapaz de unirse al receptor ALK4; sin embargo, no se ha estudiado la unión de las Inhibinas con otro receptor tipo I. Además, la Inhibina puede unirse a un receptor accesorio (Betaglicano) el cual es incapaz de fosforilar proteínas Smad, por lo que se dice que las Inhibinas no señalizan a través de Smad [24, 25].

IV. ANTECEDENTES

Recientemente, nuestro grupo de investigación evaluó la participación de la Inhibina A y la Activina A durante el desarrollo de los linfocitos T y reportó que, en ensayos de FTOC (Fetal Thymic Organ Culture) en presencia de Inhibina A o Activina A recombinante, la Inhibina A promueve el paso de los timocitos en estadio doble negativo (DN, CD4⁻ CD8⁻) 3 a DN4, al igual que la Activina A [26], lo cual implica que las Inhibinas no necesariamente antagonizan las funciones de Activinas. Además, se demostró que la Inhibina A promueve el paso del estadio DN4 a doble positivo (DP, CD4⁺ CD8⁺) mientras que la Activina A retrasa dicha transición promoviendo la acumulación de células transitorias simples positivas CD8⁺, lo que implica que las Inhibinas pueden tener una función y mecanismo de acción diferente de las Activinas.

Aunado a lo anterior, en datos no publicados de nuestro grupo de investigación, se ha observado que la estimulación de timocitos y células Jurkat con la Inhibina A y la Inhibina B resulta en la fosforilación del factor de transcripción Smad 2 dependiente del receptor tipo I (ACTRI), lo cual sugiere que las Inhibinas puede unirse a un receptor tipo I para inducir una señal intracelular en la célula [27].

También, nuestro laboratorio ha reportado que, tanto la Inhibina como la Activina, se expresan abundantemente en el estroma tímico, que se encuentra constituido por distintos tipos celulares, incluyendo células epiteliales, macrófagos, fibroblastos y células dendríticas (DC) [28]. Además de expresar los ligandos, el

estroma tímico también expresa receptores tipo I y tipo II para Activinas (Alk4, ActRIIA), por lo que las células estromales pueden ser competentes a las señales inducidas por las Activinas y las Inhibinas. Con base en esta evidencia, se postula que estos ligandos pudieran también regular la diferenciación de células dendríticas, las cuales representan un porcentaje elevado de las células presentes en la médula tímica.

Existen reportes donde demuestran la influencia de las Activinas en la diferenciación, regulación de la respuesta, migración y maduración de diferentes subtipos de DC [29-31]; sin embargo, existe una única evidencia en donde se le atribuye un papel inmunomodulador a la Inhibina A durante la maduración de células dendríticas [32]. En dicho reporte, Segerer et al. evaluaron la maduración de las células dendríticas derivadas de monocitos humanos (mo-DC) en presencia de Inhibina A o Activina A. Ellos reportaron que la maduración de mo-DC inducida por un coctel de citocinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6, TNF α y PGE2) en presencia tanto de Inhibina A como de Activina A genera que las mo-DC presenten un fenotipo tipo “tolerogénico”, ya que estructuralmente mantienen los podosomas característicos de una DC inmadura y además, en ensayos de reacción leucocitaria mixta (MLR), la proliferación de linfocitos T alogénicos se encontró disminuida en comparación con las mo-DC maduras sin Inhibina A ni Activina A.

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha demostrado la participación de la Inhibina A en el desarrollo de linfocitos T, en donde se demostró que la actividad que presenta no es necesariamente antagonista de la Activina A sino que, dependiendo del estado de maduración, la Inhibina puede actuar de manera similar o distinta a la Activina. Más aún, datos no publicados de nuestro laboratorio [27] indican que las Inhibinas pueden inducir la fosforilación de SMAD 2 en timocitos y células Jurkat dependiente de un receptor tipo I.

Por otro lado, en el estroma tímico, donde hay gran cantidad de células dendríticas, se expresan tanto las Inhibinas como sus receptores, haciéndolas susceptibles a su señalización. Además, se ha sugerido la influencia de la Inhibina A en la maduración de las células dendríticas humanas derivadas de monocitos provocando un fenotipo tipo inmaduro y como consecuencia disminuyendo la proliferación de linfocitos T; sin embargo, no se discernió la participación de la Activina en dichos ensayos.

Debido a lo anterior, se planteó estudiar la participación de las Inhibinas en el proceso de diferenciación y maduración de las células dendríticas derivadas de médula ósea.

VI. HIPÓTESIS

La ausencia de Inhibinas afecta el proceso de diferenciación y maduración de las células dendríticas murinas derivadas de médula ósea.

VII. OBJETIVO GENERAL

Investigar el papel de las Inhibinas en el proceso de diferenciación y maduración de las células dendríticas murinas.

VIII. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar la participación de las Inhibinas en la diferenciación de células dendríticas a partir de progenitores de médula ósea *in vitro*.
2. Evaluar el papel de las Inhibinas en la maduración de células dendríticas derivadas de médula ósea.
3. Evaluar el papel de las Inhibinas en la migración *in vitro* e *in vivo* de las células dendríticas.
4. Analizar la morfología de las células dendríticas inmaduras y maduras estimuladas con CCL19.

IX. MATERIALES Y MÉTODOS

IX.I. Derivación de células dendríticas a partir de células de médula ósea (BMDC)

Se utilizaron ratones silvestres ($\text{Inh}\alpha$ +/+) y deficientes de la subunidad α de la Inhibina ($\text{Inh}\alpha$ -/-) los cuales fueron generados [33] y donados por el Dr. Martin Matzuk (Baylor College of Medicine, Houston TX).

Los experimentos fueron realizados con ratones de 9 semanas de edad, los cuales se mantuvieron en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas siguiendo las normas de ética y salud animal, aprobadas por la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales del Laboratorio (CICUAL), autorizado por el Comité para el Uso y cuidado de los animales

Se obtuvo médula ósea de fémures y tibias de ratones $\text{Inh}\alpha$ +/+ e $\text{Inh}\alpha$ -/- en RPMI adicionado con 10% Suero Fetal Bovino (SFB). A continuación, se hizo pasar 3mL de RPMI 10% SFB a través de los huesos, mediante el uso de jeringa y aguja de 27G, para drenar la médula ósea la cual fue recolectada en una caja de Petri. La médula ósea se disgregó mediante el uso de la jeringa sin aguja, se filtró con una malla de nylon de $50\mu\text{m}$ y se recolectó en un tubo de 15mL, el cual se centrifugó a 1500 rpm durante 5min para, finalmente, ser resuspendidas en 3 mL de RPMI 10% SFB. Se obtuvo una alícuota de $200\mu\text{L}$, a la cual se lisaron los eritrocitos con ACT (Tris buffer Amonium Chloride), para realizar el recuento de las células. Finalmente, se sembraron 5×10^6 células en 10mL de RPMI 10% SFB y

sobrenadante de células CHO productoras del factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) en cajas bacteriológicas. Al tercer día se adicionó 8mL de RPMI 10% SFB y sobrenadante de células CHO productoras de GM-CSF. Al quinto día, se adicionó 1µg/mL de LPS de *E. coli* 0111:B4 a una caja Petri para inducir la maduración de las células dendríticas y 24h después se obtuvieron las células.

IX.II. Tinción de marcadores extracelulares

Las células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDCs) se obtuvieron de los cultivos anteriormente mencionados recolectando las células no adherentes, las cuales se centrifugaron a 1500rpm durante 5min y se resuspendieron en 3mL de PBS 1x.

La tinción se realizó en placas de 96 pozos en donde se colocó 1×10^6 células por condición. Se centrifugó a 3000rpm durante 1min para ser resuspendidas en 50µL de las diluciones de los anticuerpos a utilizar (anti-CD11c PE, anti-IA/IE biotinilado, anti-CD80 PerCP Cy 5.5, anti-CD86 APC). Se incubó 15min a 4°C en oscuridad y se lavaron con 100µL de Buffer de FACS (PBS 1x, 2% SFB, 0.02% Azida de sodio). Después, se resuspendieron en 50µL de la dilución de Estreptavidina FITC. Se incubó 15min a 4°C en oscuridad y se lavó con 100µL de Buffer de FACS. Finalmente, se fijaron las células con 100µL de Paraformaldehído al 4% en PBS.

El citómetro de flujo FACS Calibur de BD y el programa Flowjo se utilizaron para analizar las muestras.

IX.III. Migración *in vitro*: Quimiotaxis

Las BMDCs, tanto inmaduras como maduras, se marcaron con calceína $1\mu\text{g/mL}$ en HBSS sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} (0.5% BSA) a una densidad de 2×10^6 células/mL durante 15min a 37°C . Se lavaron dos veces con HBSS con Ca^{2+} y Mg^{2+} (0.5% BSA). Finalmente se resuspendieron en HBSS con Ca^{2+} y Mg^{2+} (0.5% BSA) para obtener una densidad de 2×10^6 células/mL.

Los ensayos de quimiotaxis se realizaron en cámara de Boyden de 48 pozos utilizando una membrana de nitrocelulosa con poro de $5\mu\text{m}$ tratada previamente con fibronectina. En la parte inferior de la cámara se colocaron diferentes diluciones de quimiocina (0 ng/mL – 1000 ng/mL). En la parte superior de la cámara se colocaron $50\mu\text{L}$ de la suspensión celular (1×10^5 células por pozo). La cámara se incubó a 37°C durante 1.5h. La intensidad media de fluorescencia en la membrana se determinó en un equipo Typhoon Scanner 9400. Se reporta como índice de quimiotaxis calculado como la división de la intensidad media de fluorescencia de los pozos con quimiocina entre la intensidad media de fluorescencia del pozo sin quimiocina.

IX.IV. Tinción para microscopía

Las células dendríticas maduras e inmaduras se adhirieron a cubreobjetos cubiertos con poli-L-lisina, 3×10^5 células por condición, por medio de citospin. Los cubreobjetos se colocaron en placas de 24 pozos en donde se agregaron 200 μ l de medio RPMI 10% SFB y se incubaron durante 5 minutos a 37°C. En seguida, se sacaron las placas y fueron estimuladas con 50 μ L de solución con CCL19 1500 ng/mL para obtener un pseudogradiante final de 300 ng/mL de la quimiocina. Se incubaron durante 5 minutos a 37°C y se fijaron con 250 μ L de solución de Formaldehído 7.4% (concentración final de Formaldehído: 3.7%). Se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Para permeabilizar a las células, se retiró el sobrenadante y se añadió 250 μ L de Tritón-X100 0.1% en PBS y se incubó 6 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el sobrenadante y se lavó con 500 μ L de PBS. Se bloqueó con una solución de BSA 2% Tween 20 0.1% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente y se realizó un lavado con PBS.

Para la tinción de tubulina, se añadió la dilución del anticuerpo contra tubulina acoplado a FITC y se incubó durante 1 hora a 37°C. En seguida, se realizaron 3 lavados con Tween 20 0.1% en PBS.

Para la tinción de actina, se añadió la dilución de faloidina acoplada a TRITC y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados con PBS.

Finalmente, los cubreobjetos se colocaron en portaobjetos con un medio de montaje especial para microscopía de fluorescencia Dako (Dinamarca).

X. RESULTADOS

IX.I. Diferenciación de células dendríticas a partir de progenitores de médula ósea *in vitro*

Para evaluar la participación de las Inhibinas en la diferenciación de DCs, se realizaron cultivos *in vitro* para derivar DCs a partir de progenitores de médula ósea suficientes y deficientes de Inhibina α , de 9 semanas de edad, en presencia de GM-CSF. Al día 6 de cultivo, las células se colectaron y se tiñeron con anticuerpos contra CD11c y MHC II para seleccionar a las poblaciones Pre-DC (CD11c+ MHC II-) y DC (CD11c+ MHC II+).

En la Figura 5, se muestra la proporción de las poblaciones CD11c-, Pre-DC y DC en los cultivos de médula ósea. Se observa un incremento en la población CD11c-, tanto en machos (Fig. 5B) como en hembras (Fig. 5A) deficientes de la Inhibina; además, la población DC muestra un decremento en porcentaje en el cultivo de células provenientes de hembras $\text{Inh}\alpha^{-/-}$, siendo para los machos una ligera tendencia a disminuir. Debido a que se obtuvo la misma tendencia tanto en machos como en hembras, se realizó el análisis de las poblaciones en conjunto, observándose el incremento de la población CD11c-, el cual no logra ser estadísticamente significativo, mientras que la disminución de la población DC si es estadísticamente significativa.

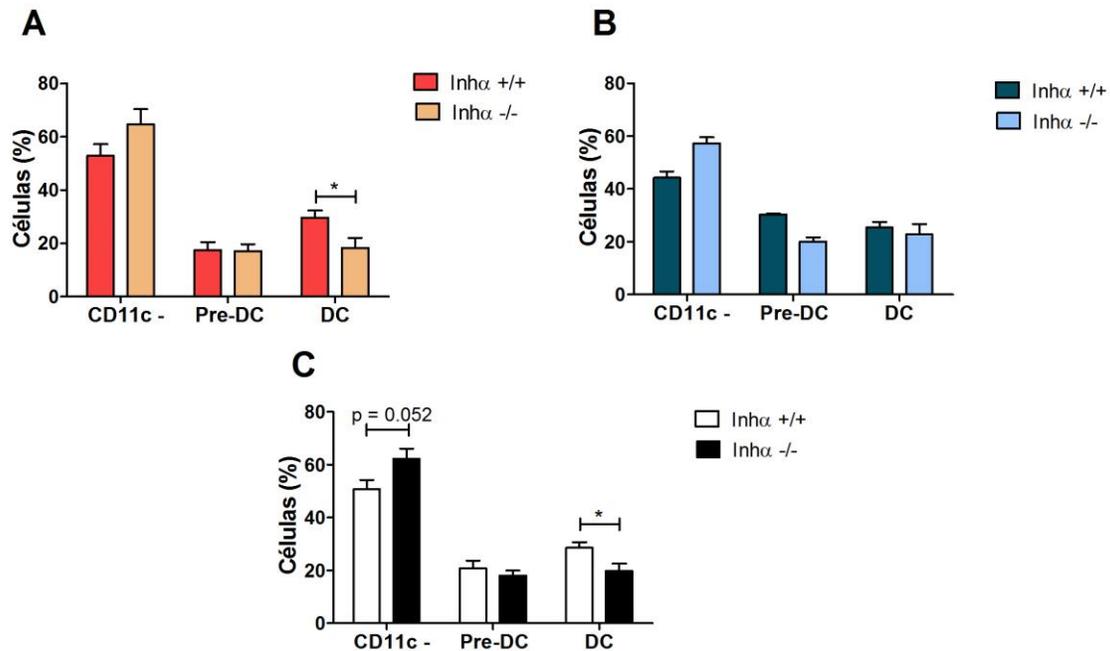


Figura 5. Análisis de subpoblaciones celulares en cultivos de médula ósea.

Se muestran las gráficas de barras de las poblaciones CD11c-, Pre-DC (CD11c+ MHC II-) y DC (CD11c+ MHC II+) cultivos de médula ósea de hembras (A), machos (B) y en conjunto (C). Promedio de 5 experimentos, Hembras: WT (n = 6) KO (n = 4), Machos WT (n = 2) KO (n = 2). Análisis estadístico: Prueba T student ($p < 0.05$).

IX.II. Maduración de células dendríticas derivadas de médula ósea

Al día 5 de cultivo, se añadió LPS (1µg/mL) para inducir la maduración de las DCs. Al día 6, se recolectaron las células y se tiñeron con los anticuerpos contra CD11c, MHC II, CD80 y CD86.

En la Figura 6A se muestra la expresión de los marcadores CD80, CD86 y MHCII en DCs (CD11c⁺ MHCII⁺) de hembras de 9 semanas de edad, en donde se observa el incremento en la expresión de dichos marcadores en las células DC maduras (mDC) *Inhα* +/+ (azul) con respecto a las células DC inmaduras (iDC) *Inhα* +/+ (rojo) mientras que, en la parte de abajo, se observa que las células mDC deficientes de Inhibina α no incrementan apropiadamente la expresión de los marcadores.

En la Figura 6B se muestra la cuantificación de la expresión de los marcadores CD80, CD86 y MHCII expresado como incremento relativo respecto a la expresión detectada en iDCs. Se puede observar que la expresión de los marcadores se incrementa en las mDC *Inhα* +/+ con respecto a las células inmaduras, siendo estadísticamente significativo, lo que coincide con lo reportado en la literatura en donde la expresión de MHCII, CD80 y CD86 se incrementa después de la activación de las células dendríticas. Por otro lado, se puede observar que en las células deficientes de Inhibina no se presenta el mismo incremento en la expresión de los marcadores, siendo significativamente menor en comparación con las mDC silvestres.

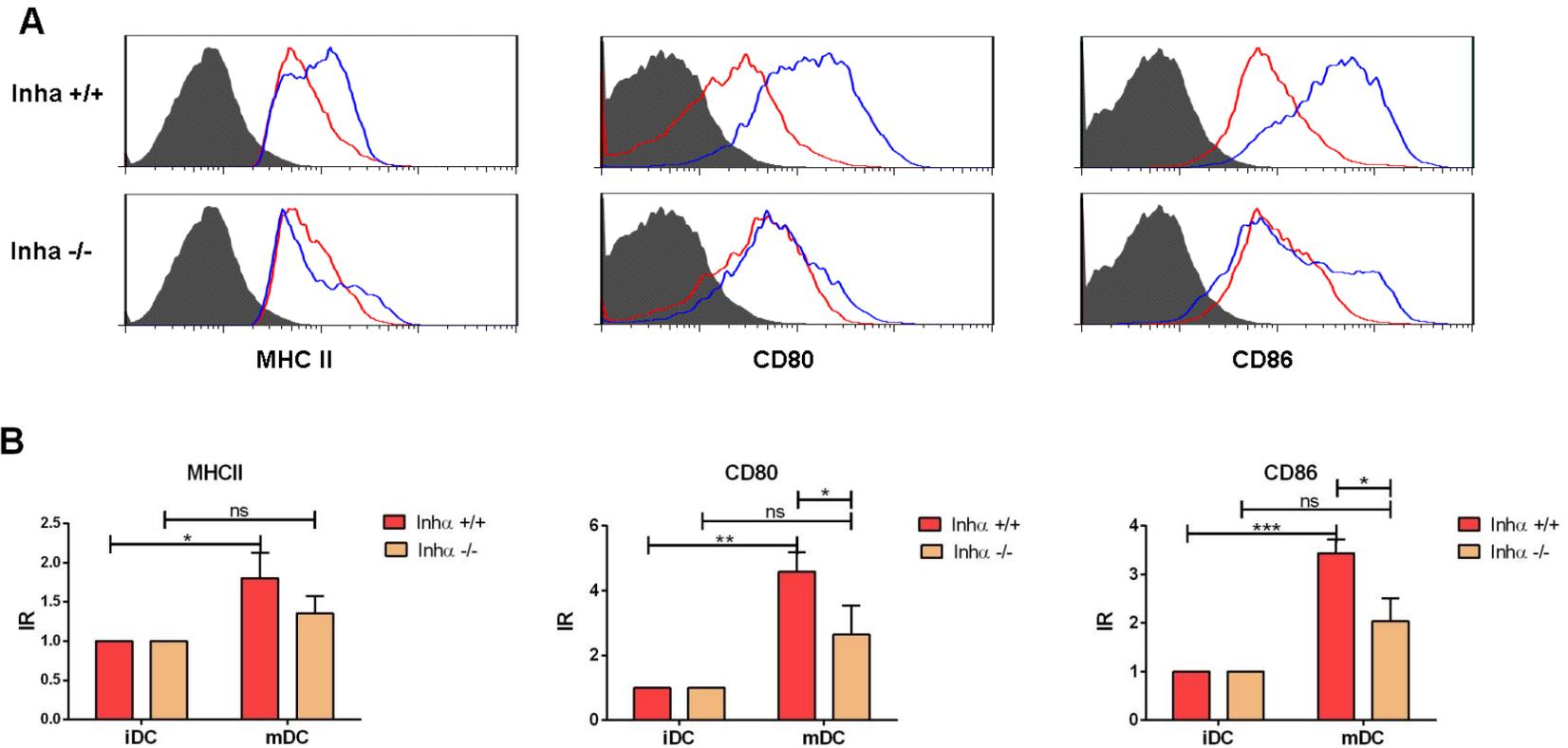


Figura 6. BMDC $Inha^{-/-}$ de hembras son incapaces de incrementar la expresión CD80 y CD86 tras el estímulo con LPS. Se muestran los histogramas (A) y gráficas de barras (B) de la expresión de MHCII, CD80 y CD86 en DCs ($CD11c^{+}MHCII^{+}$) $Inha^{+/+}$ e $Inha^{-/-}$ de ratones hembras. En rojo: DC inmaduras; en azul: DC maduras; en gris: Control de tinción. Promedio de 3 experimentos, WT (n = 6) KO (n = 4). Análisis estadístico: Prueba T student (p < 0.05).

En la Figura 7 se muestra el análisis realizado para las DCs derivadas de médula ósea de machos de 9 semanas, en donde se observa que las DCs de $\text{Inh}\alpha$ $^{-/-}$, contrariamente a lo observado por las células derivadas de ratones hembras, incrementan la expresión de MHCII, CD80 y CD86 después del estímulo de LPS de la misma forma con que lo incrementan las DCs silvestres.

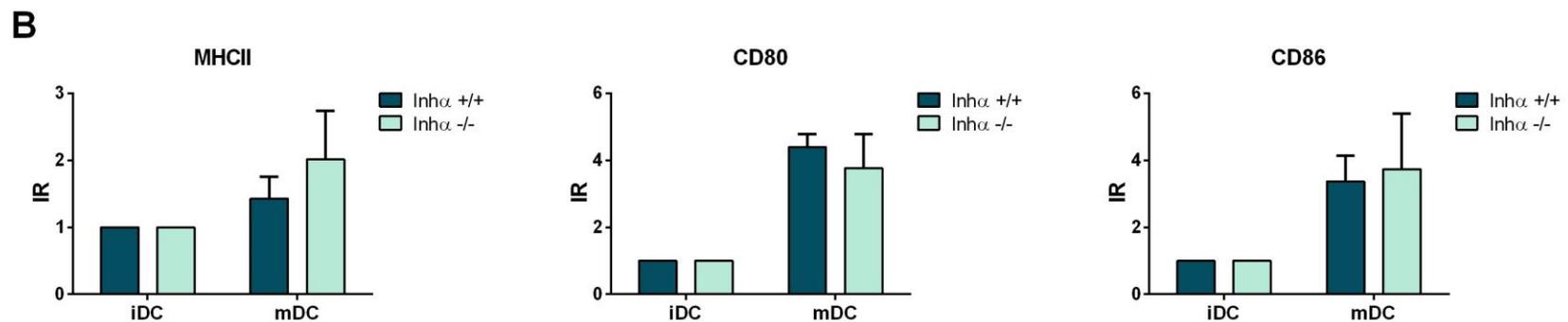
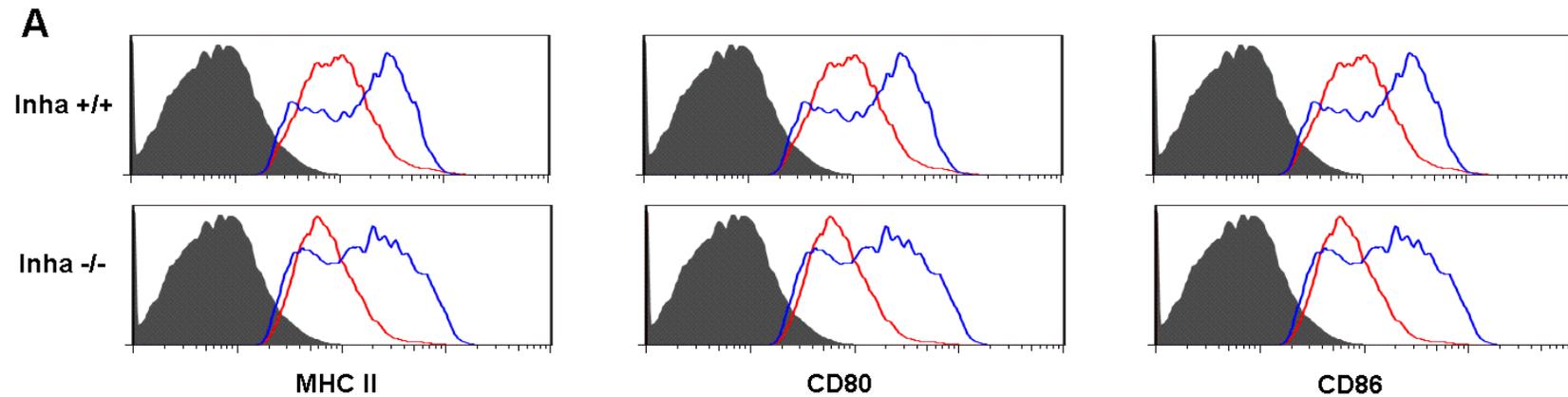


Figura 7. BMDC Inh α -/- de machos incrementan la expresión de CD80 y CD86 tras el estímulo con LPS. Se muestran los histogramas (A) y gráficas de barras (B) de la expresión de MHCII, CD80 y CD86 en DCs (CD11c⁺MHCII⁺) Inh α +/+ e Inh α -/- de ratones machos. En rojo: DC inmaduras; en azul: DC maduras; en gris: Control de tinción. Promedio de 2 experimentos, WT (n = 2) KO (n = 2).

IX.III. Migración *in vitro* de las células dendríticas

Se realizaron ensayos de quimiotaxis en respuesta a CCL19 ya que las células dendríticas inmaduras expresan niveles bajos de CCR7, mientras que las DCs maduras incrementan la expresión de este receptor de quimiocinas.

Se utilizaron las BMDCs inmaduras y maduras de ratones silvestres y deficientes de *Inhina* α . En la Figura 8 se muestran las curvas obtenidas en respuesta a CCL19 representadas como el índice de quimiotaxis, en donde se puede observar una deficiencia de las células mBMDC KO de ratones hembras para responder ante la quimiocina CCL19 en comparación con sus similares silvestres (Fig. 8A). Por el contrario, se observa que la quimiotaxis de células mBMDC KO provenientes de ratones machos no se encuentra alterada en comparación con las células mBMDC silvestres (Fig. 8B), lo cual se relaciona con el incremento en la expresión de moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86) sugiriendo que las células dendríticas derivadas de médula ósea provenientes de machos pueden madurar.

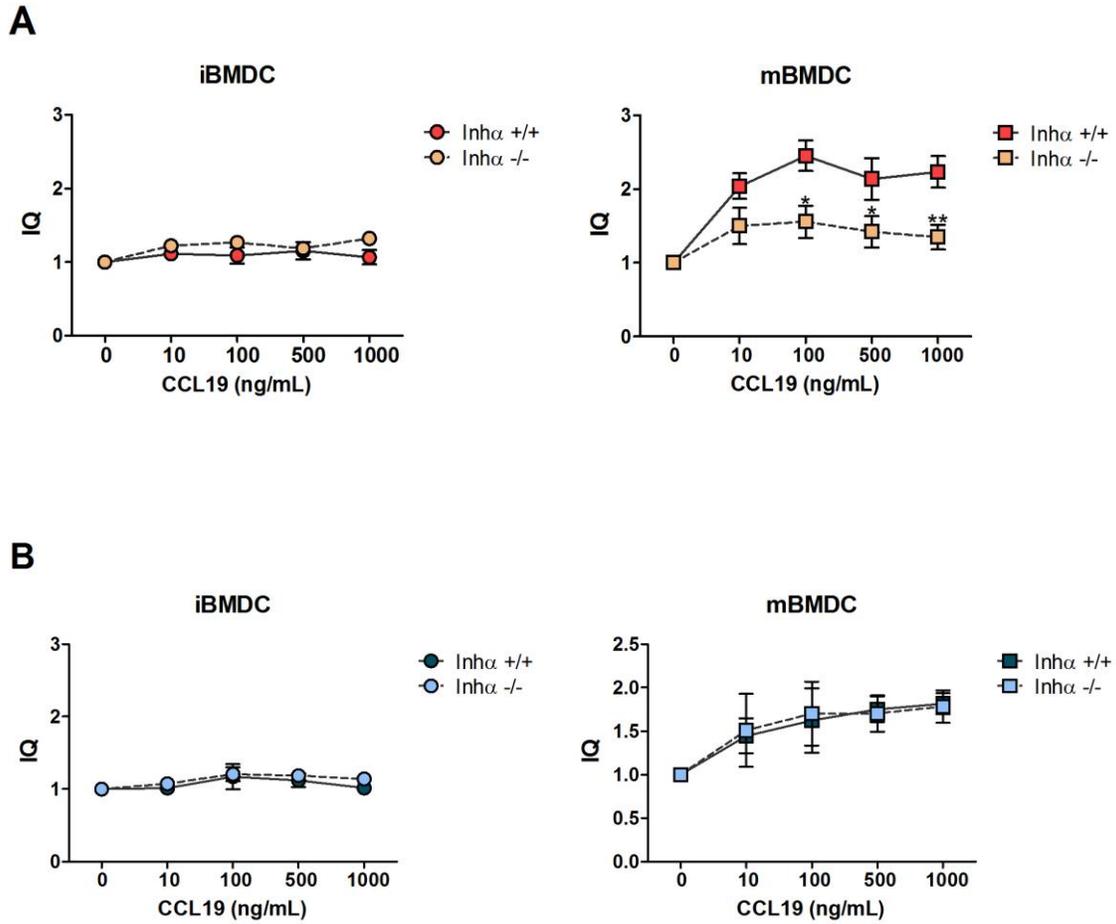


Figura 8. Quimiotaxis en respuesta a CCL19 es deficiente en BMDC maduras deficientes de Inhibina de hembras. Curva de quimiotaxis, representada como índice de quimiotaxis, en respuesta a diferentes concentraciones de CCL19 de mBMDC de hembras (A) y machos (B). Se muestra el promedio de ratones hembras $Inh\alpha +/+$ (n=7), ratones hembras $Inh\alpha -/-$ (n=6), ratones machos $Inh\alpha +/+$ (n=2), ratones machos $Inh\alpha -/-$ (n=2). Análisis estadístico: Prueba T student ($p < 0.05$).

IX.IV. **Morfología de las células dendríticas**

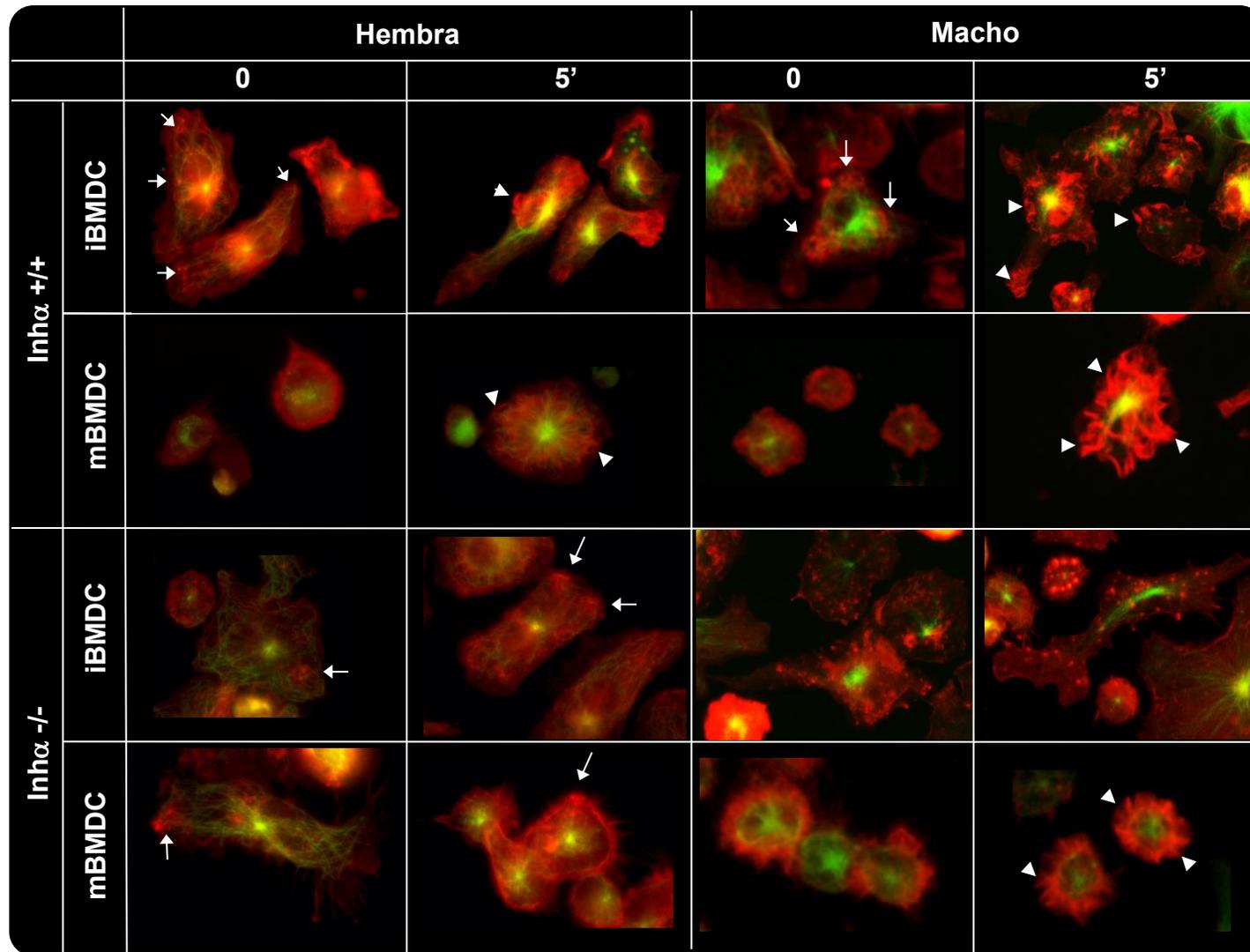
Una de las consecuencias del proceso de maduración de las DCs es el cambio de morfología. Este cambio es fundamental para permitir el proceso de migración de las células dendríticas hacia los ganglios linfáticos donde tendrán un papel crucial en activar a los linfocitos T vírgenes para iniciar la respuesta adaptativa. Por otro lado, la respuesta a quimiocinas, también induce vías de señalización que lleva a remodelamiento del citoesqueleto para poder sensar el ligando y migrar en dirección al gradiente a través de la adquisición de formas migratorias. Para analizar la morfología que presentan las DC, tanto maduras como inmaduras, silvestres y deficientes de Inhibina, se realizó un análisis microscópico para observar la morfología basal y las estructuras migratorias de las células.

Las células fueron adheridas a una superficie cubierta con poli-L-lisina para después ser estimuladas con la quimiocina CCL19 durante 5 minutos. Posteriormente, se tiñeron con faloidina-TRITC para observar F-actina (actina polimerizada) y con anti-Tubulina-FITC para observar el citoesqueleto de tubulina. Como se muestra en la figura 9, la morfología de las BMDC inmaduras deficientes de Inhibinas, tanto machos como hembras, se encuentra alterada ya que no se observan los podosomas, caracterizada por la formación de focos de adhesión ricos en F-actina (Figura 9, flechas). Además, las mBMDC $\text{Inh}\alpha^{-/-}$ de hembras mantienen la morfología extendida y sitios de adhesión.

Por el contrario, las mBMDC $\text{Inh}\alpha^{-/-}$ de machos adquieren la morfología redonda y con grandes dendritas característica de las DC maduras silvestres. Estas células muestran respuesta cuando son estimuladas con CCL19 ya que presentan la formación de lamelipodias (Figura 9, punta de flecha).

Figura 9. BMDC inmaduras deficientes de Inhibina no forma podosomas.

BMDC de ratones hembras (izquierda) y machos (derecha), ambos silvestres (arriba) y deficientes de Inhibina (abajo) fueron estimuladas con CCL19 (300ng/mL) durante 5 minutos en una superficie con poli-L-lisina y teñidas para actina con faloidina-Tritc (rojo) y tubulina con anti-tubulina FITC (verde) para microscopía de epifluorescencia. Flecha: podosomas, Punta de flecha: lamelas.



XI. DISCUSIÓN

Hasta el momento no se ha descrito la participación de las Inhibinas en la diferenciación de las DCs; sin embargo, se sabe de la expresión de Activina por parte de las células estromales en médula ósea [34, 35] la cual puede estar influenciando a los progenitores de tal manera que participara en la hematopoyesis, tal es el caso de la eritropoyesis [36]. Considerando que las Pre-DCs salen de la médula ósea para poblar tejidos periféricos, el microambiente específico de dichos tejidos influencía el término de la diferenciación de las DCs, lo cual sugiere que en tejidos en donde se expresan tanto las Inhibinas como las Activinas, como en el caso del Timo [28], éstas puedan participar en la diferenciación de las DCs.

En los resultados obtenidos en la derivación de DCs *in vitro*, se observa que, en ausencia de la Inhibina, la población DCs (CD11c+ MHCII+) se encuentra disminuida. Además, se observa un incremento en la población CD11c-; sin embargo, dicha población se refiere a cualquier progenitor presente en cultivo (CMP, MDP, CDP) por lo cual, resulta imposible dilucidar qué progenitor pudiera estar incrementado. Para evaluar si existe una falta de diferenciación a nivel de progenitores que pudiera explicar la menor proporción de DCs *in vitro*, se puede evaluar la proporción de progenitores presentes en el cultivo mediante los siguientes marcadores: c-Kit^{Hi} Flt3+ CX₃CR1- para identificar al CMP, c-Kit^{Hi} Flt3+ CX₃CR1+ para MDP y c-Kit^{Lo} Flt3+ CX₃CR1+ CD115+ para CDP [9]. Por otro lado, la población Pre-DCs (CD11c+ MHCII-) no se encuentra incrementada, sugiriendo

que la diferenciación de DCs hasta dicho estadio no se encuentra alterada en ausencia de Inhibinas; sin embargo, la población DC (CD11c+ MHCII+) se encuentra disminuida, indicando que hay un defecto en el paso Pre-DC a DC, sugiriendo que la diferenciación *in vivo* puede estar alterada en tejidos específicos. Para evaluar lo anterior, es necesario analizar tanto los progenitores en médula ósea (CMP, MDP y CDP) como las subpoblaciones de DCs en diferentes tejidos (bazo, ganglios linfáticos y piel) del ratón deficiente de Inhibinas.

Durante la realización de los ensayos *in vitro* se pudo observar que existe una diferencia clara en el proceso de maduración entre células derivadas de médula ósea de ratones suficientes y deficientes de Inhibina α .

Por un lado, la maduración de las BMDCs deficientes de Inhibina α de ratones hembras se encuentra alterada en comparación con la maduración observada para las BMDCs silvestres ya que, después del estímulo con LPS, son incapaces de incrementar la expresión de MHCII y moléculas coestimuladoras (CD80, CD86) al mismo nivel que las células silvestres. Además, la quimiotaxis en respuesta a la quimiocina CCL19 en las células mBMDC $\text{Inh}\alpha^{-/-}$ se encuentra abatida, lo cual sugiere que no se incrementa la expresión del receptor de quimiocina CCR7 como se espera cuando la célula dendrítica es madurada en respuesta a un antígeno, aunque los niveles de CCR7 en superficie no fueron evaluados.

Como se ha descrito que el ensamblaje de las Inhibinas ($\alpha\beta$) y Activinas ($\beta\beta$) depende de la disponibilidad de las subunidades [37], y debido a que la línea

del ratón utilizada es deficiente de la subunidad α , hay mayor disponibilidad de subunidades β , provocando mayor ensamblaje de subunidades β y, por tanto, generando más Activinas. De hecho, se ha reportado que los ratones deficientes de Inhibina α incrementan los niveles de Activina en suero después de las 4 semanas de edad [33]. Puesto que nuestros estudios se realizaron en ratones de 9 semanas de edad, siendo esta la edad convencional (de 8-10 semanas) para los ensayos de derivación de médula ósea, una posible explicación para la deficiencia en la maduración de BMDC $\text{Inh}\alpha^{-/-}$ es que las Activinas en suero hayan afectado a dichas células.

La falta de maduración en las BMDC $\text{Inh}\alpha^{-/-}$ de hembras correlaciona con datos reportados en donde la Activina A impide la maduración de DC derivadas de monocitos humanos en respuesta al estímulo con CD40L, provocando una disminución en citocinas proinflamatorias (TNF α , IL-6, IL-12, IL-10, IL-8, IP-10, RANTES, MCP-1) [31, 32]; además, la Activina A puede actuar como regulador negativo de la señal mediada por NF κ B, y así, generar una disminución de los mediadores proinflamatorios en respuesta a LPS (revisado en [38]).

De manera interesante, la maduración de las BMDCs deficientes de Inhibina α provenientes de ratones machos no se encuentra alterada en comparación con las células silvestres ya que, después de inducir la maduración con LPS, estas células son capaces de incrementar la expresión de MHCII, CD80 y CD86 al mismo nivel que las mBMDCs silvestres. Los ensayos de quimiotaxis

concuerdan con los resultados obtenidos por citometría de flujo porque, en dichas células, la respuesta quimiotáctica hacia CCL19 no se encuentra alterada.

Si las Activinas se encuentran incrementadas tanto en machos como en hembras $Inh\alpha^{-/-}$ entonces, ¿por qué, en machos, la maduración de BMDC con LPS no está afectada? Se sabe que la expresión de los subtipos de Inhibinas es diferente entre machos y hembras murinos [39], expresándose en las hembras la Inhibina A y B y en los machos la Inhibina B; por lo que, en ausencia de la subunidad α , se incrementarán tanto la Activina A como la B en hembras mientras que en machos habrá un incremento importante de Activina B y por tanto, la diferencia de maduración entre BMDC deficientes de Inhibina α en machos y hembras pudiera deberse a un efecto de la Activina A sobre las BMDC de hembras $Inh\alpha^{-/-}$ puesto que se ha reportado que la Activina A tiene una potencia mayor a nivel de transducción de la señal que la Activina B [40].

Con los datos mostrados hasta el momento, no podemos descartar la participación de las Activinas en la derivación de células dendríticas ni en la maduración ya que es necesario realizar ensayos utilizando folistatina, la cual se une a la Activina bloqueando la unión al receptor, y así poder discernir el efecto de las Inhibinas en ausencia de la posible influencia dada por el incremento de las Activinas. Además, sería interesante evaluar la participación de Inhibinas en ensayos con otros sistemas de maduración distintos al LPS como con anticuerpo contra CD40 o con citocinas proinflamatorias ya que la respuesta de las DCs depende del estímulo de maduración.

El cambio morfológico que se da en la transición de las DCs inmaduras al estadio maduro es muy importante para llevar a cabo eficientemente la presentación de antígeno [41]. Mientras que las células dendríticas inmaduras se encuentran extendidas (“*spreading*”) y presentan estructuras características denominadas podosomas, las DCs maduras pierden dichas estructuras volviéndose redondas y con dendritas largas y numerosas. En el análisis microscópico se puede observar que las BMDC inmaduras $Inh\alpha^{-/-}$, tanto de hembras como de machos, presentan deficiencias en la formación de los podosomas, ya que una característica distintiva de los podosomas es la organización de los focos de adhesión casi geométrico, mientras que las células derivadas de los ratones deficientes de Inhibina α presentan los contactos de adhesión sin estructuración y más bien dispersos en toda la célula, lo cual sugiere que las Inhibinas pueden estar involucradas en la diferenciación apropiada de las células dendríticas.

Los podosomas son estructuras importantes para las DCs inmaduras, ya que puede formar extensiones que se introduzcan entre las células de los tejidos y degraden la matriz extracelular para abrirse paso [15]. El hecho que las BMDC $Inh\alpha^{-/-}$ no formen adecuadamente los podosomas puede derivar a que, *in vivo*, las DCs no puedan acceder fácilmente a los diferentes tejidos y que la distribución no sea la adecuada. Para demostrar lo anterior, podrían visualizarse por inmunohistofluorescencia, marcando DCs y evaluar la distribución *in situ*. Además, se podrían hacer ensayos de migración cutánea inducida por FITC, para

cuantificar el número de DC cutáneas que migraron a los ganglios linfáticos drenantes por citometría de flujo.

En el caso de las mBMDC $\text{Inh}\alpha^{-/-}$ de hembras, éstas mantienen la morfología extendida característica de una célula dendrítica inmadura, apoyando la idea que la maduración de estas células se encuentra disminuida; sin embargo, como se mencionó anteriormente, se tiene que descartar la posible participación de las Activinas. Por el contrario, las BMDC deficientes de Inhibina de machos sí son capaces de modificar su morfología igual a las mBMDC silvestres, lo que podría indicar que en presencia de señales inflamatorias las BMDC de machos podrían madurar normalmente y tendrían la capacidad de estimular a linfocitos T vírgenes.

XII. CONCLUSIÓN

Las Inhibinas participan en la diferenciación y en la maduración de las células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón hembra.

XIII. PERSPECTIVAS

1. Realizar ensayos de migración in vivo, tanto para las células silvestres y deficientes de Inhibina de machos y hembras.
2. Evaluar la inducción de proliferación de linfocitos T por medio de cultivos con BMDC WT y KO.
3. Analizar la frecuencia de células dendríticas del ratón deficiente de Inhibina en órganos linfáticos.
4. Analizar la población células de Langerhans en secciones de epidérmis.
5. Evaluar la participación de Activina en la maduración de las DCs mediante bloqueo con Folistatina en cultivos de BMDCs estimulados con LPS.

XIV. BIBLIOGRAFÍA

1. Ueno H, Klechevsky E, Morita R, Aspord C, Cao T, Matsui T, Di Pucchio T, Connolly J, Fay JW, Pascual V *et al*: **Dendritic cell subsets in health and disease.** *Immunol Rev* 2007, **219**:118-142.
2. Steinman RM, Cohn ZA: **Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution.** *J Exp Med* 1973, **137**(5):1142-1162.
3. Gregori S: **Dendritic cells in networks of immunological tolerance.** *Tissue Antigens* 2011, **77**(2):89-99.
4. Kushwah R, Hu J: **Complexity of dendritic cell subsets and their function in the host immune system.** *Immunology* 2011, **133**(4):409-419.
5. Liu K, Nussenzweig MC: **Origin and development of dendritic cells.** *Immunological reviews* 2010, **234**(1):45-54.
6. Fogg DK, Sibon C, Miled C, Jung S, Aucouturier P, Littman DR, Cumano A, Geissmann F: **A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells.** *Science* 2006, **311**(5757):83-87.
7. Naik SH, Metcalf D, van Nieuwenhuijze A, Wicks I, Wu L, O'Keeffe M, Shortman K: **Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes.** *Nature immunology* 2006, **7**(6):663-671.
8. Bogunovic M, Ginhoux F, Helft J, Shang L, Hashimoto D, Greter M, Liu K, Jakubzick C, Ingersoll MA, Leboeuf M *et al*: **Origin of the lamina propria dendritic cell network.** *Immunity* 2009, **31**(3):513-525.

9. Liu K, Victora GD, Schwickert TA, Guermonprez P, Meredith MM, Yao K, Chu FF, Randolph GJ, Rudensky AY, Nussenzweig M: **In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis.** *Science* 2009, **324**(5925):392-397.
10. Onai N, Obata-Onai A, Schmid MA, Ohteki T, Jarrossay D, Manz MG: **Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow.** *Nature immunology* 2007, **8**(11):1207-1216.
11. Lutz MB, Schuler G: **Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?** *Trends Immunol* 2002, **23**(9):445-449.
12. Villadangos JA, Heath WR: **Life cycle, migration and antigen presenting functions of spleen and lymph node dendritic cells: limitations of the Langerhans cells paradigm.** *Semin Immunol* 2005, **17**(4):262-272.
13. Kanchanawong P, Shtengel G, Pasapera AM, Ramko EB, Davidson MW, Hess HF, Waterman CM: **Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions.** *Nature* 2010, **468**(7323):580-584.
14. Murphy DA, Courtneidge SA: **The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011, **12**(7):413-426.
15. Gawden-Bone C, Zhou Z, King E, Prescott A, Watts C, Lucocq J: **Dendritic cell podosomes are protrusive and invade the extracellular matrix using metalloproteinase MMP-14.** *J Cell Sci* 2010, **123**(Pt 9):1427-1437.

16. van den Dries K, van Helden SF, te Riet J, Diez-Ahedo R, Manzo C, Oud MM, van Leeuwen FN, Brock R, Garcia-Parajo MF, Cambi A *et al*: **Geometry sensing by dendritic cells dictates spatial organization and PGE(2)-induced dissolution of podosomes.** *Cell Mol Life Sci* 2012, **69**(11):1889-1901.
17. Saei A, Hadjati J: **Tolerogenic dendritic cells: key regulators of peripheral tolerance in health and disease.** *Int Arch Allergy Immunol* 2013, **161**(4):293-303.
18. Licona-Limon P, Soldevila G: **The role of TGF-beta superfamily during T cell development: new insights.** *Immunol Lett* 2007, **109**(1):1-12.
19. Cook RW, Thompson TB, Jardetzky TS, Woodruff TK: **Molecular biology of inhibin action.** *Semin Reprod Med* 2004, **22**(3):269-276.
20. Phillips DJ, Jones KL, Clarke IJ, Scheerlinck JP, de Kretser DM: **Activin A: from sometime reproductive factor to genuine cytokine.** *Vet Immunol Immunopathol* 2005, **108**(1-2):23-27.
21. Aleman-Muench GR, Soldevila G: **When versatility matters: activins/inhibins as key regulators of immunity.** *Immunol Cell Biol* 2011.
22. Stenvers KL, Findlay JK: **Inhibins: from reproductive hormones to tumor suppressors.** *Trends Endocrinol Metab* 2010, **21**(3):174-180.
23. Suresh PS, Rajan T, Tsutsumi R: **New targets for old hormones: inhibins clinical role revisited.** *Endocr J* 2011, **58**(4):223-235.
24. Bilandzic M, Stenvers KL: **Betaglycan: a multifunctional accessory.** *Mol Cell Endocrinol* 2011, **339**(1-2):180-189.

25. Lewis KA, Gray PC, Blount AL, MacConell LA, Wiater E, Bilezikjian LM, Vale W: **Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling.** *Nature* 2000, **404**(6776):411-414.
26. Licona-Limon P, Aleman-Muench G, Chimal-Monroy J, Macias-Silva M, Garcia-Zepeda EA, Matzuk MM, Fortoul TI, Soldevila G: **Activins and inhibins: novel regulators of thymocyte development.** *Biochem Biophys Res Commun* 2009, **381**(2):229-235.
27. Licona P: **Participación de las activinas en el desarrollo del linfocito T.** Mexico: UNAM; 2008.
28. Licona P, Chimal-Monroy J, Soldevila G: **Inhibins are the major activin ligands expressed during early thymocyte development.** *Dev Dyn* 2006, **235**(4):1124-1132.
29. Musso T, Scutera S, Vermi W, Daniele R, Fornaro M, Castagnoli C, Alotto D, Ravanini M, Cambieri I, Salogni L *et al*: **Activin A induces Langerhans cell differentiation in vitro and in human skin explants.** *PLoS One* 2008, **3**(9):e3271.
30. Stoitzner P, Stossel H, Wankell M, Hofer S, Heufler C, Werner S, Romani N: **Langerhans cells are strongly reduced in the skin of transgenic mice overexpressing follistatin in the epidermis.** *Eur J Cell Biol* 2005, **84**(8):733-741.
31. Robson NC, Phillips DJ, McAlpine T, Shin A, Svobodova S, Toy T, Pillay V, Kirkpatrick N, Zanker D, Wilson K *et al*: **Activin-A: a novel dendritic cell-derived cytokine that potently attenuates CD40 ligand-specific cytokine and chemokine production.** *Blood* 2008, **111**(5):2733-2743.

32. Segerer SE, Muller N, Brandt J, Kapp M, Dietl J, Reichardt HM, Rieger L, Kammerer U: **The glycoprotein-hormones activin A and inhibin A interfere with dendritic cell maturation.** *Reprod Biol Endocrinol* 2008, **6**:17.
33. Matzuk MM, Finegold MJ, Mather JP, Krummen L, Lu H, Bradley A: **Development of cancer cachexia-like syndrome and adrenal tumors in inhibin-deficient mice.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**(19):8817-8821.
34. Yamashita T, Takahashi S, Ogata E: **Expression of activin A/erythroid differentiation factor in murine bone marrow stromal cells.** *Blood* 1992, **79**(2):304-307.
35. Yu AW, Shao LE, Frigon NL, Jr., Yu J: **Detection of functional and dimeric activin A in human marrow microenvironment. Implications for the modulation of erythropoiesis.** *Ann N Y Acad Sci* 1994, **718**:285-298; discussion 298-289.
36. Schwall RH, Lai C: **Erythroid differentiation bioassays for activin.** *Methods Enzymol* 1991, **198**:340-346.
37. Woodruff TK, D'Agostino J, Schwartz NB, Mayo KE: **Dynamic changes in inhibin messenger RNAs in rat ovarian follicles during the reproductive cycle.** *Science* 1988, **239**(4845):1296-1299.
38. Aleman-Muench GR, Soldevila G: **When versatility matters: activins/inhibins as key regulators of immunity.** *Immunol Cell Biol* 2012, **90**(2):137-148.
39. Woodruff TK, Besecke LM, Groome N, Draper LB, Schwartz NB, Weiss J: **Inhibin A and inhibin B are inversely correlated to follicle-stimulating**

hormone, yet are discordant during the follicular phase of the rat estrous cycle, and inhibin A is expressed in a sexually dimorphic manner. *Endocrinology* 1996, **137**(12):5463-5467.

40. Tsuchida K, Nakatani M, Yamakawa N, Hashimoto O, Hasegawa Y, Sugino H: **Activin isoforms signal through type I receptor serine/threonine kinase ALK7**. *Mol Cell Endocrinol* 2004, **220**(1-2):59-65.
41. Schuurhuis DH, Fu N, Ossendorp F, Melief CJ: **Ins and outs of dendritic cells**. *Int Arch Allergy Immunol* 2006, **140**(1):53-72.