



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE  
LA SALUD ANIMAL**

Determinación del efecto *in vitro* del disruptor endócrino Bisfenol A (BPA)  
sobre la función de los linfocitos T y B murinos.

# **TESIS**

**QUE POR OPTAR POR EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD  
ANIMAL**

## **PRESENTA:**

**BIOL. NASHLA YAZMÍN PÉREZ SÁNCHEZ**

**TUTOR PRINCIPAL**

**DR. JORGE MORALES MONTOR, IIB-UNAM**

**COMITÉ TUTORAL**

**DR. FERNANDO ALBA HURTADO, FESC-UNAM**

**DRA. INGEBORG DOROTHEA BECKER FAUSER, FM-UNAM**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

AGOSTO, 2018



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.

**“El universo no solo tiene una historia, sino cualquier historia posible”  
Stephen Hawking.**



## DEDICATORIA

Con cariño y respeto a mis padres Marisela Sánchez López y German Pérez Gómez, por darme un gran apoyo incondicional, por su amor y cariño, porque a pesar de momentos difíciles me han enseñado a salir adelante y porque siempre han sido y serán una parte importante en mi vida. Los amo, gracias por todo.

A mi hermana, Jessica Pérez, por siempre echarme porras y estar ahí cuando te necesito, por las charlas y momentos de diversión, así como también a mi cuñado. Gracias por darme a dos maravillosos sobrinos Gigio y Fano, a los cuales adoro con todo mi corazón y dejarme ser parte de sus vidas. Los adoro.

A todos mis tíos(as) por siempre estar al pendiente, en especial a mi tío Nacho y mi Tía Ana, porque por segunda vez en momentos especiales como este han estado ahí para apoyarme, les doy gracias por el cariño que me han dado en todos estos años. Y a mi tío Saúl, por las enseñanzas que a lo largo de su vida me enseñó y por el amor y cariño que siempre le tuvo a la UNAM.

A mi novio amor-oso, Víctor del Río, te agradezco por todo el amor y apoyo, que me has dado en el transcurso de estos años, por esos momentos en los que has estado ahí para ayudarme a salir adelante, enseñarme nuevas cosas y amarme tal cual soy. Te amo.

A mi gran amiga Katya (mi Duetto), por ser una estupenda amiga, y estar conmigo en todo momento, porque nunca me has dejado sola y siempre estar al pendiente. Te quiero muchísimo. A todos mis queridos amigos(as), Pipo, Vero, Leo, Dani, Jaque, Mario, Mony, Adri, Mari, Homs, Luis, Donis, Mateo, Espantosisimo, Silverio, Armando, Ariel, David, gracias por brindarme su amistad y cariño, porque sé que siempre podré contar con ustedes.

A todas mis compañeras de laboratorio Tania, Chio, Lía, por el apoyo brindado durante la realización de este proyecto y por la amistad que hemos formado.

Por último, a mi maravillosa estrella la cual estará conmigo por siempre y nunca la he dejado de pensar mi abuelita Tina, porque eres la más especial que he tenido en mi vida y siempre creíste en mí.



## AGRADECIMIENTOS

A mi tutor principal, Dr. Jorge Morales Montor, por incorporarme a la realización y guía de este proyecto, así como proporcionar material y equipo necesario para su elaboración y el apoyo con la revisión del mismo.

A los miembros de mi comité tutorial, Dr. Fernando Alba Hurtado y Dra. Ingeborg Becker Fauser, por su apoyo con sus comentarios, sugerencias y enseñanzas a lo largo de la trayectoria del proyecto.

Este proyecto de investigación se realizó en el laboratorio de Interacciones Neuro-Inmuno-Endócrinas, dirigido por el Dr. Jorge Morales Montor con el apoyo del proyecto IN209719 del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo de una beca con número de registro 712020, que me fue otorgada para llevar a cabo mis estudios de Maestría.

Al Posgrado de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, de la Facultad de Veterinaria de la UNAM, por la guía y formación para realizar este proyecto de maestría.

A la Dra. Margarita Isabel Palacios Arreola, por todo su apoyo, consejos y asesoría desde el inicio de la maestría, por compartirme sus conocimientos, darme pequeñas clases y sobre todo por apoyarme en la realización del proyecto.

Al c.Dr. Víctor Hugo del Río Araiza, por su apoyo incondicional de principio a fin, en la elaboración de este proyecto, por las palabras de apoyo, así como consejos experimentales y teóricos.

A mi maravillosa UNAM la máxima casa de estudios, por abrirme una vez más sus puertas y con ello poder cursar mis estudios de posgrado y con ello continuar siendo parte de la comunidad universitaria, gracias por esta otra etapa de mi vida. **POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU.**

## RESUMEN

La interacción que existe entre el sistema endócrino y el sistema inmunológico, se lleva a cabo de forma directa y bidireccional, a través de sus principales factores solubles (hormonas y citocinas). Se sabe que los esteroides sexuales, pueden influenciar la respuesta inmunológica, afectando de manera diversa muchas de las funciones de las células inmunitarias, como son: la proliferación, la expresión de receptores y la producción de citocinas, entre otras. Esto debido a que se ha demostrado que existe la presencia de receptores hormonales las células del sistema inmunológico.

Por otra parte, la actividad humana, particularmente la agrícola y la industrial, han traído consigo el incremento de una gran variedad de compuestos contaminantes en el ambiente, entre dichos contaminantes, se encuentran los denominados Compuestos Disruptores Endócrinos (CDEs). Estos compuestos pueden estar imitando, intensificando o inhibiendo la acción de las hormonas endógenas. Además, son compuestos altamente lipofílicos y se pueden almacenar por periodos prolongados de tiempo en el tejido adiposo.

En particular, el Bisfenol- A (BPA), es un CDE de carácter estrogénico, el cual es ampliamente utilizado en la industria para la fabricación de plásticos de policarbonato y resinas epóxicas. Si bien se ha reportado que la afinidad del BPA a los receptores a estrógenos es baja (alrededor de 1/100 con respecto al ligando natural, por ejemplo, el 17 $\beta$ -Estradiol), la exposición constante a este compuesto puede tener repercusiones en la salud. Cabe mencionar que tanto los animales y los humanos pueden estar expuestos al BPA desde la etapa fetal, ya que este compuesto puede atravesar la barrera placentaria, y en los recién nacidos a través de la leche materna.

Debido a que estamos ampliamente expuestos al BPA, y a que existen pocos estudios acerca de los efectos directos sobre diversas células del sistema inmunológico, además de las repercusiones que estos tengan sobre la salud, en

este estudio evaluamos los efectos *in vitro*, que el BPA pueda ejercer sobre la funcionalidad de los linfocitos T cooperadores, T citotóxicos y linfocitos B de ratones prepúberes (3 semanas de edad) de la cepa singénica BALB/c.

En este trabajo se decidió investigar las diferentes subpoblaciones celulares de la respuesta inmunológica adaptativa y las alteraciones que estas subpoblaciones pueden tener ante el esquema de exposición al BPA. EL esquema de exposición que se manejó fueron cinco concentraciones; 1nM, 10nM, 100nM, 1µM y 10µM. Estas concentraciones se colocaron al inicio del cultivo y se dejaron en incubación por 72 horas. Los resultados muestran que existe un porcentaje mayor de proliferación en los esplenocitos provenientes de hembras en todas las subpoblaciones celulares en todos los tratamientos, en comparación con los esplenocitos provenientes de machos. Lo anterior nos permite sugerir que los efectos observados en cuanto a los diferentes tratamientos presentan un carácter dimórfico. Sin embargo, en los linfocitos T citotóxicos, se observó un efecto inhibitorio en 2 concentraciones de BPA (100nM y 1µM), tanto en hembras como en machos, lo cual nos indica que el BPA, a ciertas concentraciones, es capaz de inhibir el efecto citotóxico de estas células. Por otra parte, en la mayoría de las subpoblaciones celulares, tanto en el porcentaje de células positivas, como en el nivel de expresión, los esplenocitos provenientes de las hembras son los que expresan mayor cantidad del receptor de progesterona. Sin embargo, en los Linfocitos T citotóxicos provenientes de machos se observó un incremento en el porcentaje de células que expresan el receptor a progesterona, así como en el nivel de expresión de este receptor en los tratamientos con BPA. Por lo anterior, el cambio del nivel de expresión de un receptor puede ser capaz de modificar la función de las hormonas. En cuanto a la expresión del principal receptor de estrógenos ERα, en las mismas subpoblaciones celulares anteriormente mencionadas, se observó que la expresión que presentó el ERα es dimórfica en todas las subpoblaciones celulares analizadas, lo cual es un hallazgo relevante en este estudio.

En los machos, la producción de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  se vio disminuida en los grupos expuestos al BPA. En el caso de la citocina inmunomoduladora IL-10 se observó este mismo efecto.

Este trabajo muestra que los estudios *in vitro* de las distintas subpoblaciones celulares del sistema inmunológico, son de suma importancia para conocer de manera más específica el comportamiento de estas células en presencia de disruptores endócrinos.

## ABSTRACT

The interaction between the endocrine and the immune systems, is carried out in a direct and bidirectional manner, through out their major soluble factors (hormones and cytokines). It is well known that sex steroids influence the immune function, such as proliferation, differentiation and the production of cytokines, among others. Furthermore, it is also known the presence of functional hormone receptors (both membrane and nuclear) on the immune system cells.

Moreover, human activity, particularly the agricultural and industrial, have brought with them the rise of a variety of pollutants in the atmosphere, these pollutants, are known as Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs). These compounds may be imitating, enhancing or inhibiting the action of endogenous hormones. In addition, these compounds are highly lipophilic and can be stored for long periods of time in the adipose tissue.

In particular, Bisphenol A (BPA), is a EDC of estrogenic character, which is widely used in industry for manufacture of polycarbonate plastic and epoxy resins. Even though it has been reported that the affinity of the BPA by such receptors is low (around 1/100 with regard to the natural compound, for instance 17 $\beta$ -estradiol), the continuous exposure to this compound may have repercussions on health. It should be mentioned that both animals, and humans, are exposed to BPA, as early as the fetal stage, since this compound can cross the placental barrier, and in the newborns through breast milk.

Because we are widely exposed to BPA, and since there are few studies about the direct effects of BPA on diverse cells of immune system and the repercussions that these have on health, in this study we evaluated the effects *in vitro*, that BPA can exert on the function of T helper cells, T cytotoxic cells and B lymphocytes of prepuberal mice (3 weeks old) of the syngeneic strain BALB/c.

In this work, it was investigated the different cellular subpopulations of the adaptive immune response and the alterations that these subpopulations can have

on a BPA exposure scheme. The exposure that was chosen were five concentrations; 1nM, 10nM, 100nM, 1 $\mu$ M and 10 $\mu$ M. These concentrations were added at the beginning of the culture and were left in incubation for 72 hours. The results showed that there is a higher percentage of proliferation in splenocytes from females in all cell subpopulations in all treatments, compared to splenocytes from males. This allows us to suggest that the effects observed in relation to the different treatments have a dimorphic fashion. However, in cytotoxic T lymphocytes, an inhibitory effect was observed in 2 concentrations of BPA (100nM and 1 $\mu$ M), both in females and males, which indicates that BPA at certain concentrations is able to inhibit the cytotoxic effect of these cells. In most of the cell subpopulations, both in the percentage of positive cells and in the level of receptor expression, the splenocytes from females are those that express the highest amount of progesterone receptor. However, in the cytotoxic T lymphocytes from males increased in the percentage of cell expressing the progesterone receptor, as well as in the level of this receptor in the treatments with BPA. Therefore, changing the level of expression of a receptor may be able to modify the function of hormones. Regarding the expression of the main estrogen receptor ER $\alpha$ , in the same cell subpopulations mentioned above, it was observed that the expression of the ER $\alpha$  was dimorphic in all the analyzed cell subpopulations, which is a very relevant finding in this study.

In males, the production of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  was decreased in the groups exposed to BPA. In the case of the immunomodulatory cytokine IL-10, this same effect was observed.

This work shows that the *in vitro* studies of the different cellular subpopulations of the immune system are of great importance to know more specifically the behavior of these cells in the presence of endocrine disruptors.

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN .....	1
1. Sistema inmunológico .....	1
1.1 Linfocitos .....	4
2. Sistema endócrino .....	6
2.1 Hormonas esteroideas .....	7
3. Interacciones inmunoendócrinas .....	7
3.1 Mecanismos de acción de los esteroides sexuales en las células del sistema inmune .....	8
3.1.1 Mecanismo genómico .....	8
3.1.2 Mecanismo no genómico .....	9
3.2 Efecto de los esteroides sexuales sobre las células de la inmunidad adaptativa .....	9
3.2.1 Efecto sobre los linfocitos T cooperadores .....	10
3.2.2 Efecto sobre los linfocitos T citotóxicos .....	11
3.2.3 Efecto sobre los linfocitos B .....	11
4. Compuestos Disruptores Endócrinos (CDEs) .....	12
4.1 Bisfenol A (BPA) .....	14
4.1.1 BPA y trastornos reproductivos .....	16
4.1.2 BPA y efectos en el sistema inmune .....	17
JUSTIFICACIÓN .....	19
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	20

HIPÓTESIS .....	20
OBJETIVOS .....	21
1. Objetivo general .....	21
2. Objetivos particulares .....	21
MATERIALES Y MÉTODOS .....	22
1. Material biológico .....	22
2. Anticuerpos .....	22
3. Cultivo primario .....	22
4. Proliferación .....	23
5. Citometría de flujo .....	23
6. ELISAS .....	24
7. Análisis estadístico .....	25
RESULTADOS .....	26
1. Porcentajes de proliferación de linfocitos en diferentes subpoblaciones celulares [linfocitos T totales (CD3+), linfocitos T cooperadores (CD4+), linfocitos T citotóxicos (CD8+) y linfocitos B (CD19+)] con diferentes concentraciones de BPA en cultivos primarios .....	26
1.1 Porcentaje de proliferación de los linfocitos T totales (CD3+) .....	27
1.2 Porcentaje de proliferación de los linfocitos T cooperadores (CD4*) .....	28
1.3 Porcentaje de proliferación de los linfocitos T citotóxicos (CD8+) .....	29
1.4 porcentaje de proliferación de los linfocitos B (CD19+) .....	30
2. Expresión del receptor a Progesterona (PR) en cultivos primarios de esplenocitos con diferentes tratamientos .....	31

2.1 Expresión del receptor a Progesterona (PR) en LT (CD3+) .....	31
2.2 Expresión del receptor a Progesterona (PR) en LTh (CD4+) .....	33
2.3 Expresión del receptor a Progesterona (PR) en LTc (CD8+) .....	35
2.4 Expresión del receptor a Progesterona (PR) en LB (CD19+) .....	37
3. Expresión del receptor a estrógenos-alfa (ER $\alpha$ ) en cultivos primarios de esplenocitos con diferentes tratamientos .....	39
3.1 Expresión del receptor a estrógenos (ER $\alpha$ ) en LT (CD3+) .....	39
3.2 Expresión del receptor a estrógenos (ER $\alpha$ ) en LTh (CD4+) .....	41
3.3 Expresión del receptor a estrógenos (ER $\alpha$ ) en LTc (CD8+) .....	43
3.4 Expresión del receptor a estrógenos (ER $\alpha$ ) en LB (CD19+) .....	45
4. Producción de citocinas proinflamatorias (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), y reguladoras (IL-10) en sobrenadantes provenientes de cultivos de esplenocitos murinos .....	47
DISCUSIÓN .....	52
CONCLUSIONES .....	57
REFERENCIAS .....	58

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Características generales de la respuesta inmune innata .....	2
<b>Cuadro 2.</b> Características generales de la respuesta inmune adaptativa .....	3

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Modelo del linaje del PLC .....	4
<b>Figura 2.</b> Estructura química tridimensional del BPA .....	14
<b>Figura 3.</b> Productos de uso cotidiano que contienen BPA .....	15
<b>Figura 4.</b> Dot plots representativos de la selección de la región de linfocitos ...	26
<b>Figura 5.</b> Porcentaje de proliferación de LT totales (CD3+) en cultivos de esplenocitos provenientes de machos y hembras prepúberes .....	27
<b>Figura 6.</b> Porcentaje de proliferación de LTh (CD4+) en cultivos de esplenocitos provenientes de machos y hembras prepúberes .....	28
<b>Figura 7.</b> Porcentaje de proliferación de LTc (CD8+) en cultivos de esplenocitos provenientes de machos y hembras prepúberes .....	29
<b>Figura 8.</b> Porcentaje de proliferación de LB (CD19+) en cultivos de esplenocitos provenientes de machos y hembras prepúberes .....	30
<b>Figura 9.</b> Evaluación del porcentaje de células que expresan PR, en la subpoblación celular LT (CD3+) en cultivos de esplenocitos provenientes de machos y hembras prepúberes .....	32
<b>Figura 10.</b> Evaluación del porcentaje de células que expresan PR, en la subpoblación celular LTh (CD4+) en cultivos de esplenocitos provenientes de machos y hembras prepúberes .....	34
<b>Figura 11.</b> Evaluación del porcentaje de células que expresan PR, en la	

subpoblación celular LTc (CD8+) en cultivos de esplenocitos provenientes de machos y hembras prepúberes .....	36
<b>Figura 12.</b> Evaluación del porcentaje de células que expresan PR, en la subpoblación celular LB (CD19+) en cultivos de esplenocitos provenientes de machos y hembras prepúberes .....	38
<b>Figura 13.</b> Evaluación del porcentaje de células que expresan ER $\alpha$ , en la subpoblación celular LT totales (CD3+) en cultivos de esplenocitos provenientes de machos y hembras prepúberes .....	40
<b>Figura 14.</b> Evaluación del porcentaje de células que expresan ER $\alpha$ , en la subpoblación celular LTh (CD4+) en cultivos de esplenocitos provenientes de machos y hembras prepúberes .....	42
<b>Figura 15.</b> Evaluación del porcentaje de células que expresan ER $\alpha$ , en la subpoblación celular LTc (CD8+) en cultivos de esplenocitos provenientes de machos y hembras prepúberes .....	44
<b>Figura 16.</b> Evaluación del porcentaje de células que expresan ER $\alpha$ , en la subpoblación celular LB (CD19+) en cultivos de esplenocitos provenientes de machos y hembras prepúberes .....	46
<b>Figura 17.</b> Determinación por ELISA de la citocina proinflamatoria TNF- $\alpha$ .....	47
<b>Figura 18.</b> Determinación por ELISA de la citocina proinflamatoria IFN- $\gamma$ .....	49
<b>Figura 19.</b> Determinación por ELISA de la citocina inmunomoduladora IL-10 .	51

## LISTA DE ABREVIATURAS

1. Ac's.....Anticuerpos
2. ABTS.....3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico
3. BSA..... albúmina de suero bovino
4. BPA.....Bisfenol A
5. CDE.....Compuesto Disruptor Endócrino
6. CPA.....Células presentadoras de antígenos
7. CFSE.....Carboxyfluorescein succinimidyl ester
8. Con-A.....Concanavalina A
9. DDT.....Dicloro difenil tricloroetano
10. E $\alpha$ .....Receptor a Estrógenos-alfa
11. E<sub>2</sub>.....Estradiol
12. IFN- $\gamma$ .....Interferón gamma
13. IL-10.....Interleucina-10
14. LPS.....Lipopolisacáridos
15. MHC.....Complejo Mayor de Histocompatibilidad
16.  $\mu$ M.....microMolar
17. nM.....nanoMolar
18. PR.....Receptor a Progesterona
19. PBS.....Solución de fosfato salina
20. P<sub>4</sub>.....Progesterona
21. P<sub>4</sub>F.....Paraformaldehído
22. SFB.....Suero Fetal Bovino
23. TNF- $\alpha$ .....Factor de necrosis tumoral  $\alpha$
24. LB.....Linfocitos B
25. LTh.....Linfocitos T cooperadores
26. LTc.....Linfocitos T citotóxicos

# INTRODUCCIÓN

## 1. Sistema inmunológico

El sistema inmunológico es el encargado de proteger al organismo de agentes externos, ya sean de origen biológico (bacterias, virus y parásitos), así como de naturaleza química (contaminantes y radiaciones). También defiende al organismo contra células propias transformadas (células cancerosas). Además, tiene la capacidad de reconocer un número ilimitado de invasores extraños y sustancias no propias y así distinguirlos de las moléculas propias del organismo. Existen dos tipos de respuesta inmunitaria, la respuesta innata y la respuesta adaptativa.

La respuesta inmunitaria innata, es con la cual un individuo nace y es una respuesta que se produce a través de mecanismo y barreras no selectivas, tanto físicos, químicos y celulares. Actúa de forma inespecífica ante cualquier agente agresor y no modula la intensidad de su respuesta, aunque la agresión se repita más de una vez (Cuadro 1) (De León-Nava et al, 2006). Por otra parte, la respuesta inmune adaptativa es específica y provoca la formación de un mecanismo efector contra un patógeno en particular (Cuadro 2). Esta respuesta tiene la capacidad de reconocer antígenos particulares de un patógeno y reconocer a los mismos antígenos ante un contacto posterior (es decir, tiene memoria). Además, se desarrolla cuando agentes infecciosos evaden los mecanismos innatos de defensa y con ellos se genera una primera dosis de antígenos. Este tipo de respuesta ocurre durante el tiempo de vida de un individuo como una adaptación a las infecciones por patógenos, y va a garantizar un largo periodo de protección a la reinfección por el mismo agente.

<b>Características</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Respuesta rápida</li> <li>- “Sin memoria inmunológica”</li> <li>- “Inespecífica”</li> <li>- No clonal</li> </ul>
<b>Factores solubles</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Citocinas</li> <li>- Complemento</li> <li>- Quimiocinas</li> </ul>
<b>Células implicadas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fagocitos y Células presentadoras de antígeno (Macrófagos y células dendríticas).</li> <li>- Granulocitos (Neutrófilos, Eosinófilos, Basófilos)</li> <li>- Células NK</li> <li>- Células cebadas</li> </ul>

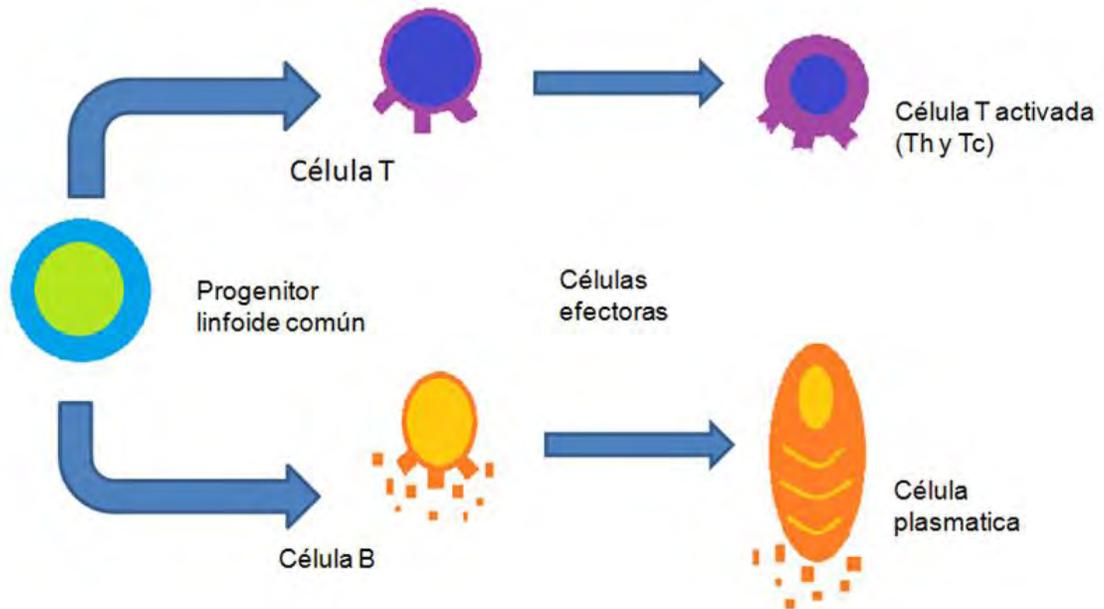
**Cuadro 1.** Características generales de la respuesta inmune innata.

<b>Características</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Resistencia que mejora tras una infección repetida</li> <li>- Memoria inmunológica</li> <li>- Acción específica contra agentes patógenos</li> <li>- Clonal</li> </ul>
<b>Factores solubles</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Anticuerpos</li> <li>- Citocinas</li> </ul>
<b>Células implicadas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Linfocitos T (LTh y LTc)</li> <li>- Linfocitos B</li> </ul>

**Cuadro 2.** Características generales de la respuesta inmune adaptativa.

## 1.1 Linfocitos

En la respuesta inmunológica adaptativa, existen dos tipos de linfocitos: los linfocitos T (LT) y los linfocitos B (LB), ambos tipos de linfocitos se originan de un progenitor linfoide común (PLC) (Figura 1). Estas células son capaces de reconocer a un antígeno de manera específica y generar una respuesta que permita la eliminación del mismo. Los linfocitos son células de 6-10µm de diámetro, con un núcleo denso muy poco citoplasma y organelos. Los linfocitos se pueden encontrar en estado de reposo en individuos sanos, esto quiere decir que no sintetizan DNA y sintetizan cantidades mínimas de RNA y proteínas. Cuando los linfocitos reconocen al antígeno, las células en reposo entran en un estado de activación, en donde se presenta un aumento de tamaño, la síntesis de RNA en mayores cantidades que les va a permitir prepararse para la síntesis de DNA y la división celular (Campell KS et al, 1994).



**Figura 1.** Modelo del linaje del PLC. El progenitor linfoide común se divide y diferencia para producir linfocitos T y linfocitos B. Al ser activadas por la infección las células T se diferencian en diversos tipos de linfocitos T efectoras activados, en tanto las células B se dividen y diferencian en células plasmáticas.

Los LT salen de la médula ósea en un estadio inmaduro y migran por la sangre hasta el timo, donde alcanzan su maduración. Dichos linfocitos reconocen al antígeno con restricción genética, esto quiere decir, que sólo van a ser activados si el péptido antigénico le es presentado por las moléculas codificadas por el complejo de histocompatibilidad mayor (MHC por sus siglas en inglés). Cuando los LT reconocen a un antígeno presentado por alguna célula presentadora de antígeno (APC, por sus siglas en inglés), comienza la secreción de citocinas que estimulan la proliferación y especialización de otros linfocitos, además de la respuesta inflamatoria. Existen dos subtipos de linfocitos: los linfocitos T cooperadores [linfocitos T helper (LTh, por sus siglas en inglés)] y los linfocitos T citotóxicos (LTc) esto va a depender de la expresión de los co-receptores CD4 o CD8. Los LTc median la respuesta en contra de patógenos intracelulares y los LTh actúan indirectamente regulando la función de otras células del sistema inmunológico.

Los LTh están especializados en la producción de citocinas que coordinan el desarrollo de la respuesta inmunitaria, entre sus funciones están la de estimular a los linfocitos B para producir anticuerpos. De acuerdo con el patrón de citocinas producido por estos linfocitos se favorece la activación de una respuesta de tipo Th1, Th2, Th9, Th17, entre otras. (Abbas AK et al, 1997). Los LTh1 se caracterizan por secretar IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , los Th2 secretan principalmente IL-4, IL-5 e IL-13. Y los Th17 secretan IL-17A, IL-17F, IL-6, IL-22 y TNF- $\alpha$ . Dichas subclases originalmente se describieron con base en el patrón de producción de citocinas por parte de las células T de ratón (Mosmann TR et al, 1986).

Los LTc, están caracterizados por la expresión del correceptor CD8, son activados por las células presentadoras de antígeno (APC, por sus siglas en inglés), en los ganglios linfáticos, tras lo cual experimentan una expansión clonal, adquieren su fenotipo efector y migran hacia el sitio en el que ha ocurrido el evento que activó a las APCs. Una vez que los LTc encuentran alguna célula que expresa el antígeno contra el cual están dirigidos inducen la muerte de la misma por contacto, mediante

la secreción de perforina y granzimas. Además, los LTc son capaces de secretar citocinas como el IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (Egilmez NK et al, 2010).

En el caso de los LB, su maduración se lleva a cabo en la médula ósea antes de entrar en el torrente sanguíneo. Estos van a reconocer directamente al antígeno mediante receptores de membrana formados por cadenas de inmunoglobulinas (BCR). Los LB a su vez, se diferencian a células plasmáticas que producen anticuerpos como resultado del reconocimiento de un antígeno determinado. Estos anticuerpos son proteínas que reconocen al agente extraño, lo inactivan y facilitan su destrucción. Asimismo, son capaces de reconocer antígenos como proteínas intactas o polisacáridos tanto en circulación como en tejidos. Los LB activados que no se transforman en células plasmáticas quedan como linfocitos B de memoria, para que en un segundo contacto con ese mismo antígeno la respuesta sea más rápida y más intensa (Abbas AK et al, 1997).

## **2. Sistema endócrino**

El sistema endócrino está conformado por un conjunto de glándulas y tejidos que secretan mensajeros químicos denominados hormonas. Estas sustancias son las encargadas de comunicar, controlar y coordinar el correcto funcionamiento del organismo para el mantenimiento de la homeostasis (Besedovsky HO, et al. 1996).

Las hormonas son los mensajeros químicos del organismo. Poseen una naturaleza molecular variable que puede ser peptídica o lipídica. Son producidas por las glándulas endócrinas como la hipófisis, las glándulas suprarrenales, el timo, la tiroides, el páncreas, los ovarios y los testículos. Estas sustancias son transportadas y distribuidas por el torrente sanguíneo en concentraciones muy bajas, con la finalidad de llegar hasta su célula blanco, las cuales poseen receptores específicos para distintas hormonas. En ellas llevan a cabo funciones reguladoras, fisiológicas y bioquímicas; modificando, estimulando o inhibiendo muchas de sus acciones (Curtis H et al, 20008 y Koolman et al 2004).

Algunas de las principales características de las hormonas son:

- Actúan de manera específica en determinados órganos y células.
- Se producen en glándulas especializadas.
- Tienen tres mecanismos de acción: autocrina, paracrina y endocrina.

Las hormonas tienen la capacidad de alcanzar todos los tejidos de un organismo y con ello coordinar las respuestas de diversos tejidos y órganos, de esta manera se hace posible que la comunicación hormonal sea más rápida y directa (Curtis et al 2008).

### **2.1 Hormonas esteroideas**

Las hormonas esteroideas, a diferencia de las hormonas proteicas, no se encuentran dentro de vesículas secretoras. Sin embargo, están presentes moléculas precursoras, como es el colesterol (Gal-Iglesias B et al 2006 y Wilmore & Costill 2007). Estas hormonas, son sintetizadas y secretadas por células de los ovarios, testículos y de la corteza suprarrenal. Además, son liposolubles, con lo cual pueden atravesar las membranas celulares, y así localizar al receptor que se encuentra dentro de las células blanco (Hill R.W et al 2006 y Ross MH et al 2008).

Los esteroides sexuales y la inmunidad están conectados y su mutua regulación, permite un mantenimiento y balance inmunológico adecuado. Cuando se producen alteraciones en esta red, se desencadenan patologías que involucran a los diferentes componentes de la misma (De León-Nava MA et al 2006).

### **3. Interacciones inmunoendócrinas**

Las primeras observaciones de la comunicación existente entre el sistema inmune y el sistema endócrino se realizaron en el año 1898, en donde el científico italiano Calzolari publicó que el timo de conejos castrados antes de la madurez sexual, era más grande que el de los animales controles (Calzolari 1898). Sin embargo, esta observación despertó poco interés y pasó casi inadvertida.

Posteriormente en 1940, Chiodi realizó una observación similar con respecto a los efectos de la castración sobre el peso del timo. Adicionalmente reporto que el reemplazo con andrógenos revirtió la hipertrofia tímica inducida por la castración, lo cual sugirió que los esteroides sexuales fueron los mediadores de este efecto (Chiodi 1940). Finalmente, en 1989 Groosman, publico por primera vez la presencia de receptores para esteroides sexuales en las células del timo, lo cual es un indicador de que estas hormonas pueden estar ejerciendo su efecto en estas células (Groosman 1989).

Los esteroides sexuales pueden estar modulando aspectos relacionados con la respuesta inmunológica como son: maduración y selección de timocitos, la proliferación y el tránsito celular, la expresión de receptores y la producción de citocinas (Da Silva, 1999; Grossman and Roselle, 1983). Estos efectos están mediados por la presencia de receptores específicos para estas hormonas en las células del sistema inmunológico, siendo los receptores de estrógenos clásicos  $\alpha$  y  $\beta$  (ER $\alpha$  y ER $\beta$ , por sus siglas en inglés), el receptor de progesterona (PR, por sus siglas en inglés) y el receptor a andrógenos (AR, por sus siglas en inglés) los más importantes (Muñoz-Cruz et al., 2011).

### **3.1 Mecanismos de acción de los esteroides sexuales en las células del sistema inmune**

Los posibles mecanismos de acción de los esteroides sexuales en el sistema inmunológico, pueden ser llevados a cabo por acción de la vía genómica o por la vía no genómica.

#### **3.1.1 Mecanismo genómico**

El mecanismo genómico, se produce por la unión de un esteroide sexual con su receptor intracelular, provocando así un cambio estructural en el receptor, que le permite la disociación de las proteínas de choque térmico y su fosforilación, dando como resultado una estructura de alta afinidad por secuencias específicas en el DNA, llamados elementos de respuesta a hormonas, los cuales van a estar

ubicados en los promotores de los genes blanco para regular su transcripción (Camacho-Arroyo et al, 2006). Los efectos de los mecanismos genómicos generalmente no son rápidos, dado el tiempo requerido para inducir la transcripción de genes y la traducción de esos genes a proteínas (Lange et al, 2009).

### **3.1.2 Mecanismo no genómico**

Por otro lado, las hormonas esteroideas pueden ejercer sus efectos a través de mecanismos de acción alternativos como es la vía no genómica. Este mecanismo, involucra la interacción de la hormona, por ejemplo, la P<sub>4</sub> con receptores específicos en la membrana plasmática y la activación de cascadas de señalización, como la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y la modificación de la conductancia de iones que induce la formación de segundos mensajeros como el adenosín monofosfato cíclico (AMPc), así como la activación de la fosforilación de proteínas (Camacho-Arroyo et al, 2006). Los mecanismos de acción ocurren en varios tejidos e inician en la superficie celular activando rutas de señalización intracelular a través de canales iónicos y de segundos mensajeros.

### **3.2 Efecto de los esteroides sexuales sobre las células de la inmunidad adaptativa**

Se sabe que, en los mamíferos, el sexo se determina desde la concepción, tras la cual ocurre el desarrollo fisiológico, endócrino e inmunológico, generando múltiples diferencias entre machos y hembras. Previo al periodo de la pubertad hasta la edad reproductiva, dichas diferencias se basan en la producción, secreción y concentraciones circulantes de estrógenos, progesterona y testosterona, así como en la función y desarrollo del eje hipotálamo-pituitario-gonadal (Besedovsky HO et al, 1996 y Groosman CJ et al, 1983). Existen distintos experimentos en donde se ha observado el papel de los esteroides sexuales sobre las células de la inmunidad adaptativa.

### 3.2.1 Efecto sobre los linfocitos T cooperadores

La respuesta Th1 y Th2 es importante para la regulación inmune. Las alteraciones en dicha respuesta son causa de diversas enfermedades inmunes, aunque este balance no está solo modulado por las células Th1 y Th2, sino también están regulados por otros factores como son las hormonas sexuales.

Se conoce que los estrógenos son capaces de regular la respuesta inflamatoria mediada por LT, así como la reducción en la cantidad de células reclutadas en el sitio de inflamación (Salem et al 2000). Diversos estudios, demuestran que los estrógenos incrementan la producción de citocinas Th2 y por otro lado disminuyen las citocinas Th1 (Ansar Ahmed et al 1985). En un estudio realizado por Maret y cols en el 2003, reportaron que ratonas gonadectomizadas bajo tratamiento con E<sub>2</sub>, generaron una respuesta Th1 mediada por células productoras de IFN- $\gamma$ , por lo cual se propuso que, bajo ciertas circunstancias, los estrógenos pueden favorecer la respuesta Th1 (Maret et al 2003).

Los estrógenos tienen un efecto bifásico en la polarización de los LTh, debido a que algunos estudios sugieren que el E<sub>2</sub> puede potenciar tanto la respuesta Th1 como la Th2, ya que altas concentraciones de dicha hormona (>5000pg/ml) favorecen la producción de IL-10, mientras que bajas concentraciones estimulan la producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (Gilmore et al 1997 y Correale et al 1998).

En un experimento *in vivo* realizado con LTh aislados de pacientes con esclerosis múltiple se observó que en presencia de estradiol la mayor parte de las clonas mostraban un aumento en la secreción de IL-10 e IFN- $\gamma$ . Por otra parte, el estradiol no tiene efecto en la secreción de IL-4 o TGF- $\beta$ , esto es un indicativo de que el estradiol es un importante regulador del balance entre las condiciones pro y anti-inflamatorias de una manera dosis-respuesta (Gilmore et al 1997).

Otro esteroide sexual capaz de regular la respuesta inmune adaptativa es la Progesterona (P<sub>4</sub>), la cual se ha reportado que en estudios *in vitro* favorece la diferenciación al fenotipo Th2. Con lo cual se propone que la P<sub>4</sub> posee un efecto

anti-inflamatorio, inhibiendo con ello la respuesta Th1 (Piccinni et al 2000). Por lo anterior beneficia el establecimiento y mantenimiento del embarazo, ya que el desarrollo de una respuesta Th1 podría ser perjudicial en el inicio del embarazo (Ragusa et al 2004).

### **3.2.2 Efecto sobre los linfocitos T citotóxicos**

La respuesta de los LTc juega un papel importante en la inmunidad celular. Son los encargados de eliminar las células infectadas por organismos intracelulares mediante la inducción de apoptosis y la secreción de perforina y granzima. En distintos estudios se ha observado que el funcionamiento estos linfocitos pueden ser influenciado por hormonas esteroideas. Se ha reportado en distintos estudios a lo largo del mundo, que el número de LTc es igual tanto en hombres como en mujeres antes de alcanzar la pubertad, pero, después de la pubertad el número de LTc es mayor en hombres que en mujeres, esto en individuos sanos, sin embargo, la actividad citotóxica es mayor en las mujeres que en los hombres (Klein and Flanagan, 2016). Además, en modelos animales utilizando ratones macho castrados, se ha observado que existe un mayor número de estas células (Roden et al., 2004). Estas observaciones nos indican que el género y los esteroides sexuales están participando activamente en la proliferación y función de los LTc.

### **3.2.3 Efecto sobre los linfocitos B**

La inmunidad mediada por LB en hembras es más fuerte que la de los machos. Este fenómeno dependiente del sexo se atribuye en gran medida al efecto de los esteroides sexuales (Ansar Ahmed et al 1985; Homo-Delarche et al 1991). Los estrógenos se han visto implicados en la regulación de los niveles séricos de inmunoglobulinas (Ig) como la IgM, IgA e IgG, así como en el incremento de la producción de anticuerpos contra antígenos propios y extraños (Wira y Sandoe 1997). Además, se ha observado que el tratamiento con estrógenos en ratones disminuye la linfopoyesis de LB en la médula ósea, sin embargo, aumenta la

producción de Ig. Los efectos de los LB están mediados por la unión específica de los estrógenos a sus receptores ER $\alpha$  y ER $\beta$  (Erlandsson et al 2003).

El tratamiento con E<sub>2</sub> promueve la activación y sobrevivencia de los LB. Por otro lado, se ha propuesto que el E<sub>2</sub> contribuye al incremento en la frecuencia de los desórdenes autoinmunes en hembras (Grimaldi et al 2002,2006).

Los LB también pueden ser afectados por otro esteroide sexual como es la P<sub>4</sub>. En reportes *in vitro* se ha observado que la P<sub>4</sub> tiene un efecto inhibitor dependiente de la concentración sobre las células plasmáticas. La regulación de la inmunidad en las hembras es compleja debido a que los linfocitos responden a cambios en la concentración de esteroide sexuales, un ejemplo, es durante la gestación del ratón, ya que el número de LB activados se reducen en la médula ósea y se cree que esto es debido a la producción de esteroides sexuales (Lu et al 2002).

#### **4. Compuestos Disruptores Endócrinos (CDEs)**

Existen ciertos productos químicos presentes en el ambiente, que son producidos como consecuencia de la actividad agrícola e industrial. Estos compuestos tienen la capacidad de interrumpir el funcionamiento del sistema endócrino de los seres vivos, causando efectos adversos para la salud. Estudios en seres humanos y en la fauna sugieren que la exposición a estos productos tiene el potencial de afectar al sistema reproductivo, así como otros sistemas biológicos vitales para la salud. Entre estos compuestos se encuentran los pesticidas, plastificantes, algunos metales pesados, resinas epóxicas, retardantes de flama, entre otros. Existen productos químicos sintéticos y compuestos vegetales naturales, que se usan comúnmente, que son capaces de interferir con el sistema endocrino y alterarlo. Los disruptores endocrinos son capaces de interferir en el sistema endocrino bloqueando o neutralizando acciones hormonales (Andrade-Ribero A et al, 2006).

El término de compuestos disruptores endocrinos (CDEs) se utiliza para definir un conjunto de compuestos químicos y contaminantes ambientales, que interaccionan con el sistema endócrino. Los CDEs alteran el mensaje de varias formas, ya que pueden mimetizar la hormona ocupando su lugar, también puede bloquear su acción compitiendo por el receptor hormonal o puede modificar la síntesis de la hormona o del receptor correspondiente (Olea Nicolas, 2003).

Los CDEs son moléculas exógenas que funcionan como agonistas o antagonistas de receptores a hormonas, son compuestos altamente lipofílicos, por lo que se va a permitir su almacenamiento por periodos de tiempo prolongados en el tejido adiposo. Dichos compuestos pueden interferir con: la síntesis, transporte, secreción, metabolismo, acción y eliminación de hormonas endógenas. Los efectos más documentados de los CDEs son a nivel reproductivo, estos compuestos tienen una alta capacidad de unión a los receptores de estrógenos y andrógenos. La importancia de los CDEs es muy amplia y crece día con día, incluyendo desde productos químicos sintetizados por el hombre hasta sustancias que se encuentran de manera natural en los alimentos.

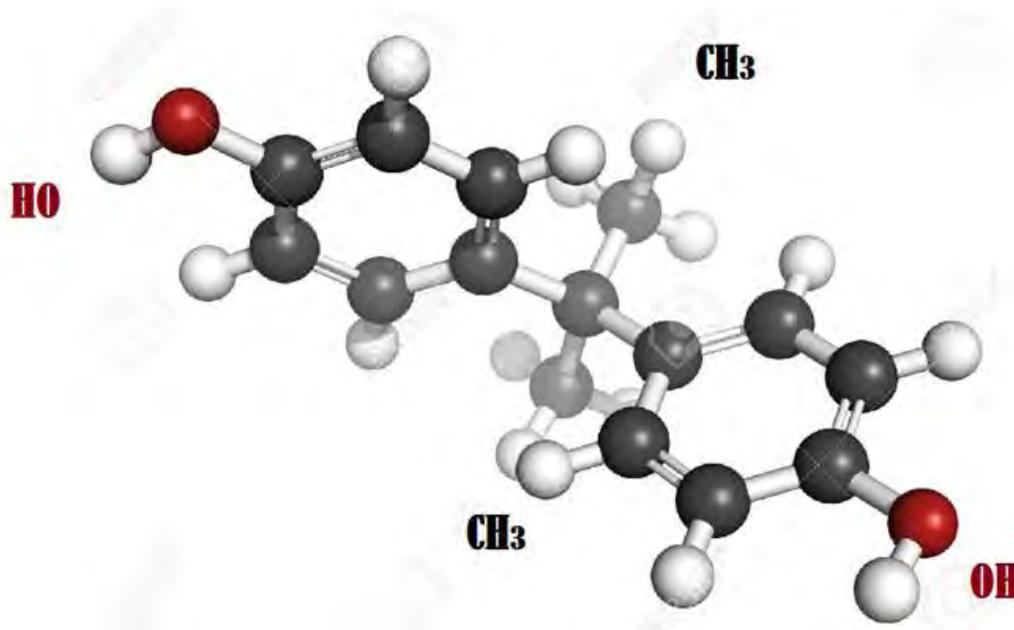
Los CDEs van a tener diferentes orígenes, ya que pueden ser de origen natural como son los fitoestrógenos (daídzeína, cumestrol y genisteína), o están los de origen industrial (sintéticos) como son algunos plaguicidas, plastificantes, retardantes de flama y agentes farmacéuticos entre otros. Los efectos de los CDEs van a depender de la especie, el sexo, la dosis, el tiempo de exposición y la etapa del desarrollo en que se presenta la exposición.

Estos compuestos presentan una gama de actividades que van desde estrogénica, anti-estrogénica, anti-androgénica, tiroidea, así como inmunológica y obesogénica. La exposición a estos compuestos se puede presentar desde etapas muy tempranas del desarrollo. En el embarazo, el feto se encuentra expuesto por vía placentaria y durante la lactancia, la exposición se da a través de la leche materna, en esta etapa se presenta una gran movilización de las reservas lipídicas maternas, por lo que los CDEs almacenados son liberados. En etapas más tardías

del desarrollo la exposición a CDEs se puede presentar vía la ingesta de alimentos contaminados, el contacto con diferentes productos de uso cotidiano, principalmente plásticos e incluso la exposición puede darse de manera ocupacional (Main Km et al, 2006). Un ejemplo de CDE con actividad estrogénica, que tiene las características anteriormente mencionadas es el Bisfenol A (BPA).

#### 4.1 Bisfenol A (BPA)

El BPA (4,4-dihidroxi- 2,2) es un CDE, que se obtiene por la condensación de dos moléculas de fenol con una molécula de acetona en presencia de ácido clorhídrico. (Figura 2). Es un compuesto de carácter estrogénico, el cual se puede unir tanto a los receptores de estrógenos nucleares (ER $\alpha$  y ER $\beta$ ); así como a los receptores membranales. El BPA tiene una afinidad 1000 veces menor que su ligando natural que es el 17 $\beta$ -estradiol. Este compuesto fue sintetizado por primera vez en 1891 por el químico ruso Aleksandr Dianin, pero hasta principios de 1930 no se conocieron sus propiedades y actividad estrogénica (Dodds Ec et al., 1996).



**Figura 2.** Estructura química tridimensional del BPA.

Este CDE es un monómero que es ampliamente utilizado en la fabricación de policarbonatos, resinas epóxicas, selladores dentales, retardantes de flama, vajillas, papel térmico, muchos de estos productos de uso cotidiano (Figura 3). Se ha demostrado la detección de este compuesto en alimentos, agua y otros productos de contacto directo, los seres humanos están expuestos de manera habitual. La manera más común de exposición al BPA es por la dieta. El BPA puede liberarse de su matriz y filtrarse en los alimentos, debido a la exposición a altas temperaturas (con fines de esterilización o de cocción en hornos de microondas) o cambios de pH (acelera la hidrólisis del enlace éster). Este compuesto es conocido por muchos efectos negativos en la salud humana, un ejemplo es que actúa como un xenoestrógeno e influye en la fertilidad y la gestación, también podría tener efectos cancerígenos, causando cáncer de mama y próstata (Gutman A. Shoenfeld, 2015).



**Figura 3.** Productos de uso cotidiano que contienen BPA

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA por sus siglas en inglés) realizó un estudio de alimentos envasados como: cereales, legumbres, carnes, pescados, condimentos, snacks, helados y comida preparada, observaron concentraciones relevantes de BPA al alcanzar valores superiores a los 30µg/Kg de BPA. En el 2008, se llevó a cabo una revisión, en donde indican que los fetos y los recién nacidos pueden no ser capaces de metabolizar el BPA tan eficientemente como los adultos.

El BPA es tiene la capacidad de alterar funciones de las células del sistema inmunológico. Los niveles de producción de BPA a mundial alcanzan cifras elevadas y en el año de 2006 se registró una producción de 3.8 millones de toneladas (FitzGerald RE et al, 2014) El BPA es capaz de interferir con la biosíntesis de las hormonas, el metabolismo y en las acciones resultantes de estas, provocando una alteración en la homeostasis del individuo expuesto o en la de sus descendientes (Juan- García A et al, 2015).

#### **4.1.1 BPA y trastornos reproductivos**

Existen estudios toxicológicos que han demostrado que los roedores expuestos a BPA durante el periodo pre o perinatal muestran una gran variedad de alteraciones reproductivas, incluyendo una producción espermática reducida (Vvom Saal et al, 1998). Algunos de los efectos que ha demostrado causar el BPA es infertilidad y malformaciones en la descendencia, en el 2012 Martínez Laura, realizó estudios con mujeres que llegaron a presentar abortos espontáneos recurrentes (Martínez Laura et al, 2012) y en el 2009 Carlos Chichizola observó que las hijas de mujeres con altos niveles de BPA, presentaron problemas oncológicos y malformaciones de los órganos reproductivos, así como pubertad precoz (Chichizola et al, 2010).

En general, se han estudiado poblaciones con un tipo de exposición ambiental al BPA y se ha observado una relación inversa débil con la calidad seminal o los niveles hormonales. Sin embargo, en poblaciones ocupacionalmente

expuestas al BPA se demostró un mayor daño en cuanto a las características reproductivas (Li DK et al, 2011). En ratas hembra en particular, se ha observado que la exposición al BPA provoca adelantamiento de la edad, apertura vaginal, irregularidades en el ciclo estral e incremento del peso uterino.

#### **4.1.2 BPA y efectos en el sistema inmune**

La disrupción endocrina no solo afecta al sistema reproductivo, sino que también al sistema inmune. Se han reportado diversos efectos del BPA sobre el sistema inmunológico, sin embargo, dichos estudios varían dependiendo si son realizados *in vivo* o *in vitro*, de la especie animal utilizada, de la dosis, de la vía de administración y de la etapa del desarrollo en que se presenta la exposición. En los trabajos existentes se han reportado efectos muy diversos sobre componentes del sistema inmune, lo cual hace a estos estudios muy variados ya que no se centran en el estudio de una misma población celular.

En el caso de los LT, que poseen receptores para hormonas esteroides, el BPA puede ser capaz de ejercer su efecto a través de ellos como se ha reportado en diversos estudios, en los cuales sus resultados son muy variables ya que difieren en cuanto a la polarización de la respuesta de los LT (Labib Salem Mohammad Sohrab Hossain Kikuo Nomoto and Labib Salem, 2000).

En el 2002 Youn y cols. cultivaron esplenocitos, los cuales fueron estimulados con Concanavalina A (Con-A) de ratones expuestos a BPA por 4 semanas en el agua de bebida, donde indican que la exposición a BPA aumenta la proliferación de esplenocitos, sin que existe diferencia en los porcentajes de las diferentes subpoblaciones celulares LTh y LTc. Sin embargo, hubo un aumento en la expresión de IFN- $\gamma$ , lo cual indica una polarización de la respuesta inmune hacia Th1 (Youn et al, 2002). Holladay y cols, reportan que en esplenocitos estimulados con Con-A hay aumento de TNF- $\alpha$ , además que en los sobrenadantes de esplenocitos estimulados con lipopolisacáridos (LPS) hay aumento de IFN- $\gamma$ , con lo cual concuerdan que existe un aumento en las citocinas Th1 (Holladay et al, 2010).

En estudios donde se reporta que el BPA induce polarización hacia una respuesta Th2, Lee y cols en el 2010, realizaron un experimento *in vitro*, utilizando BPA a una concentración 50µM, indicando que los linfocitos aumentan la expresión de IL-10, lo que indica que se genera una polarización hacia una respuesta Th2 (Lee &Lim, 2010). Miao y cols en el 2008, utilizaron un esquema de exposición gestacional, en el cual reportan que la exposición a BPA a dosis de 40 y 400 µg/Kg/día y donde se evaluó posteriormente la respuesta inmune en esplenocitos, género que la expresión de ERα se encuentre disminuida en machos e incrementada en hembras. Mientras que por otra parte la expresión de citocinas Th1 (IL-2, IL-12, IFN-γ y TNF-α) se va a encontrar disminuida tanto en machos como en hembras (Miao et al, 2008).

## **JUSTIFICACIÓN**

Debido a que estamos ampliamente expuestos al BPA, y a que existen pocos estudios acerca de los efectos directos del BPA sobre diversas células del sistema inmunológico y las repercusiones que estos tengan en la salud; en este proyecto nos propusimos estudiar los efectos que el BPA pueda ejercer sobre la función de los linfocitos T cooperadores, T citotóxicos y linfocitos B.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Qué efectos ejerce el BPA *in vitro* sobre el funcionamiento de los linfocitos T cooperadores, T citotóxicos y linfocitos B?

## **HIPÓTESIS**

La exposición *in vitro* de BPA incrementará la proliferación de linfocitos T y B, favorecerá la producción de citocinas pro-inflamatorias y disminuirá la citotoxicidad de los linfocitos T citotóxicos.

## **OBJETIVOS**

### **1. Objetivo general**

Estudiar la función de los linfocitos T cooperadores, T citotóxicos y linfocitos B, expuestos *in vitro* al compuesto disruptor endócrino Bisfenol A.

### **2. Objetivos particulares**

I. Evaluar *in vitro* mediante curvas concentración-respuesta el efecto del BPA sobre la proliferación de los linfocitos.

II. Analizar por citometría de flujo la expresión del receptor a estrógenos ( $\alpha$ ) y receptor a progesterona (PR) en respuesta al BPA en linfocitos T cooperadores, T citotóxicos y linfocitos B.

III. Determinar en el sobrenadante de cultivos de esplenocitos mediante ELISA la producción de las citocinas proinflamatorias TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en respuesta al BPA.

IV. Estudiar en el sobrenadante de cultivos de esplenocitos mediante ELISA la producción de la citocina inmunomoduladora IL-10 en respuesta al BPA.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. Material biológico**

Se utilizaron ratones (*Mus musculus*) machos y hembras de la cepa BALB/c de 4 semanas de edad. En todos los experimentos, (proliferación, expresión de receptores ER $\alpha$  y PR y medición de citocinas) se utilizaron seis animales ( $n=6$ ) por grupo y se hicieron por triplicado en los diferentes tratamientos con BPA. Los ratones fueron alimentados con Purina Diet 5015 y agua *ad libitum*. Se mantuvieron en ciclos de horas luz/obscuridad 12/12. El protocolo para el uso de animales de experimentación está aprobado por el comité de ética de la FMVZ (CICUA) y del Instituto de Investigaciones Biomédicas (CICUAL) de la UNAM.

### **2. Anticuerpos**

Para la tinción de LT, se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: Alexa Fluor®488 anti-ratón CD3- Biogened (linfocitos T totales), CD4 PE anti-ratón clona GK 1.5 – Pharmigen (LTh), PerCP anti-ratón CD8a BioLegend (LTc). En el caso de la tinción de los linfocitos B se utilizó el anticuerpo PE anti-ratón CD19 BioLegend (LB). Se realizó un mix con todos los anticuerpos y a cada mix se le añadió: ER $\alpha$  (H-184) conejo policlonal IgG y PR (c-20) conejo policlonal IgG (Santa Cruz Biotechnology). Como anticuerpo secundario, se utilizó el siguiente anticuerpo: donkey anti-conejo IgG Dylight TM649 BioLegend.

### **3. Cultivo primario**

Los esplenocitos obtenidos se cultivaron en medio RPMI 1640 sin rojo fenol. Se colocan  $1 \times 10^6$  células por pozo en placas de 12 pozos, y se añadió 1mL de medio de cultivo, con los diferentes tratamientos. A las células controles se les agregó únicamente 1mL de medio y las células que recibieron tratamiento quedaron en concentraciones finales de E<sub>2</sub> (50nM) y 5 concentraciones de BPA; 1nM, 10nM, 100nM, 1 $\mu$ M y 10 $\mu$ M. Dichas placas se incubaron a 37°C en una atmosfera con CO<sub>2</sub>, al 5% durante 72 horas.

#### **4. Proliferación**

Los esplenocitos se cultivaron en medio RPMI 1640 sin rojo fenol, el cual se suplementó con 5% de L-glutamina, 1% aminoácidos no esenciales – solución acida 100x, 1% piruvato de sodio-100mM (Sigma-Aldrich), 10% SFB (BYproductos) y 1% de antibiótico (GIBCO). Se realizó un conteo celular, para la tinción de células con Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) y se separaron para tinción un total de  $1 \times 10^6$  células, se resuspendieron en 1mL de dilución 2.5 $\mu$ M de CFSE, después del proceso de incubación se realizó un segundo conteo celular.

Se agregaron 100 $\mu$ L de suspensión celular que contienen 300,000 células por pozo en una placa de 96 pozos con fondo plano y se añadieron otros 100 $\mu$ L de medio por pozo con o sin estimulante y con los diferentes tratamientos (E2 (50nM) y 5 concentraciones de BPA 1nM, 10nM, 100nM, 1 $\mu$ M y 10 $\mu$ M.). Dichas placas se incubaron a 37°C en una atmosfera con 5% de CO<sup>2</sup> durante 72 horas. Posteriormente se recuperaron las células en tubos eppendorf y se prosiguió con la lectura en el citómetro de flujo.

#### **5. Citometría de flujo**

Los esplenocitos fueron resuspendidos en 1mL de PBS, se centrifugaron a 1,500 rpm durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante y el pellet celular se resuspendió en 500 $\mu$ L de buffer de FACS (PBS pH 7.4, 2% SFB y 0.02% de Azida de Sodio). Se añadieron 25 $\mu$ L de células en cada pozo de una palca de 96 pozos, y en seguida se colocaron 25 $\mu$ L de P4F para fijar las células, dejándose incubar por 10 minutos a 37°C. En seguida se añadieron 150 $\mu$ L de MetOH frío y se incubó durante 30 minutos a 4°C. A continuación, las células se centrifugaron a 1,500 rpm durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se realizó un lavado. Después se añadieron 25 $\mu$ L del anticuerpo primario y se incubaron por 15 minutos (hasta 2 horas) en hielo. Posteriormente se añadieron 150 $\mu$ L de buffer de FACS, se centrifugo y se eliminó el sobrenadante. Después las células se incubaron con 25 $\mu$ L del anticuerpo secundario durante 20 minutos en hielo, se realizó un lavado y

finalmente se resuspendieron en 200µL de buffer de FACS y se almacenaron en oscuridad a 4°C hasta su análisis en el citómetro de flujo Attune azul/rojo (Applied Biosystems/ Thermo Fisher Scientific), utilizando el programa Cell Quest® (Becton).

## 6. ELISAS

Se utilizaron los sobrenadantes de los cultivos celulares de esplenocitos, la técnica de ELISA que se utilizó fue la técnica de ELISA sándwich, el primer día se sensibilizó la placa, utilizando PBS 1X a un pH 7.4. para los anticuerpos de captura se tuvieron alícuotas de 20µl y se diluyeron en 980µl, teniendo un volumen final de 1mL (2µg/mL). Cada pozo se carga con 100µl de anticuerpo, dejándose incubar toda la noche a 4°C. Al segundo día se realizaron 4 lavados con PBS/ tween a al 0.05% (wash buffer), se decantó y seco la placa, para continuar con el buffer de bloqueo 1%PBS / 1% BSA, se agregan 300µl a cada pozo y se dejó incubar 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente se realizan dos lavados para quitar el exceso de BSA y se colocaron 100µl a los pozos PBS-BSA a partir del segundo pozo. Al primer pozo se le colocaron 150µl de PBS-BSA y 50µl de la citocina correspondiente. Se colocan las diluciones de las muestras y se dejaron incubar toda la noche a 4°C. Al tercer día se realizan 4 lavados con wash buffer y se comienzan a preparar los anticuerpos de detección (biotinilados). Después de los lavados, se coloca el anticuerpo de detección 100µl en cada pozo y se dejan en incubación 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Se realizó la preparación de la avidina-peroxidasa, de volumen final se colocan 10mL PBS/BSA y 5µl de avidina y se colocaron 100µl a cada pozo, se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. Pasados los 30 minutos, se realizaron 5 lavados con wash buffer, y se colocaron 100µl en cada pozo de ABTS, una vez que comienza la reacción se realizó la lectura a 405nm.

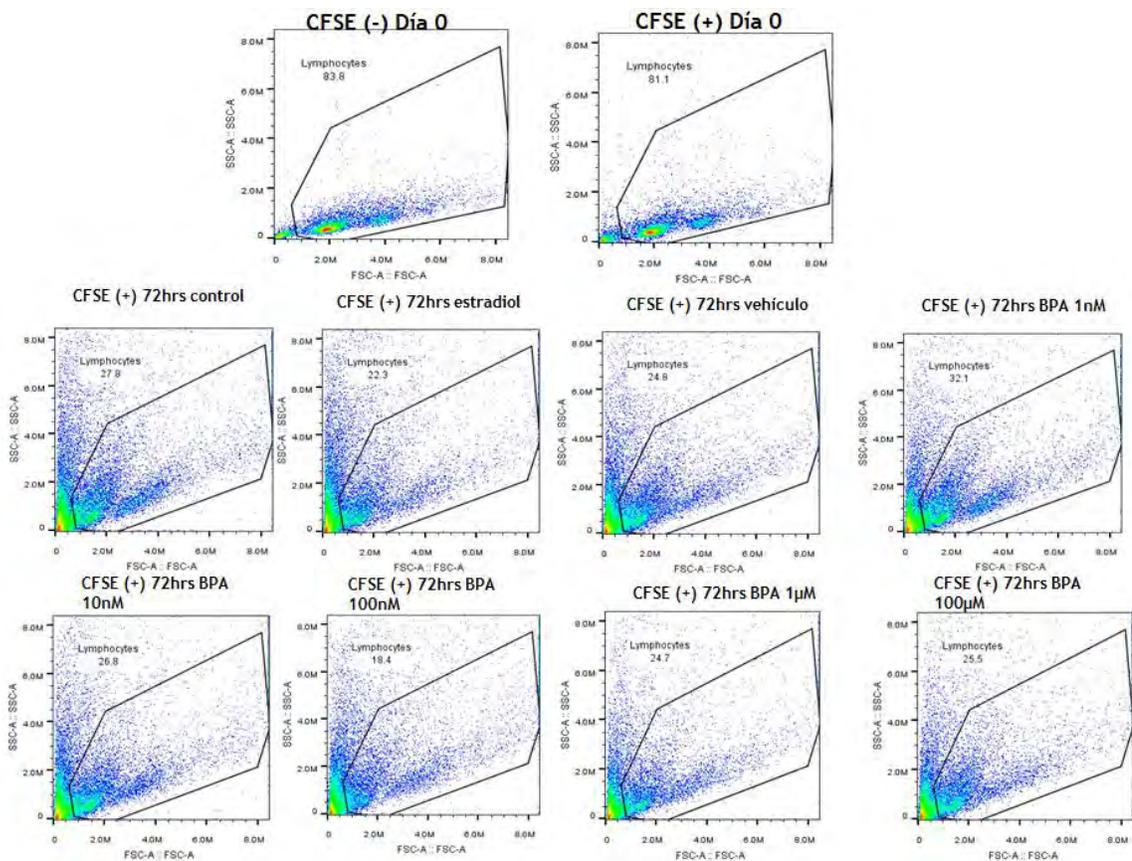
## 7. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos del porcentaje de proliferación, el nivel de expresión, intensidad media de fluorescencia del receptor a Progesterona como el receptor a estrógenos de las subpoblaciones celulares del sistema inmunológico, así como la producción de citocinas, se muestran en gráficas de columnas de barras, señalando la media y la desviación estándar. Se evaluaron estadísticamente mediante un análisis de varianza de dos factores (2-way ANOVA) y una comparación múltiple de Bonferroni entre todos los grupos y los diferentes tratamientos. Los datos se muestran como la media + la desviación estándar. Se consideró diferencia significativa cuando  $P < 0.05$ ; se utilizó el programa GraphPad Prism versión 6.0.

## RESULTADOS

1. Porcentajes de proliferación de linfocitos en diferentes subpoblaciones celulares [linfocitos T totales (CD3+), linfocitos T cooperadores (CD4+), linfocitos T citotóxicos (CD8+) y linfocitos B (CD19+)] con diferentes concentraciones de BPA en cultivos primarios.

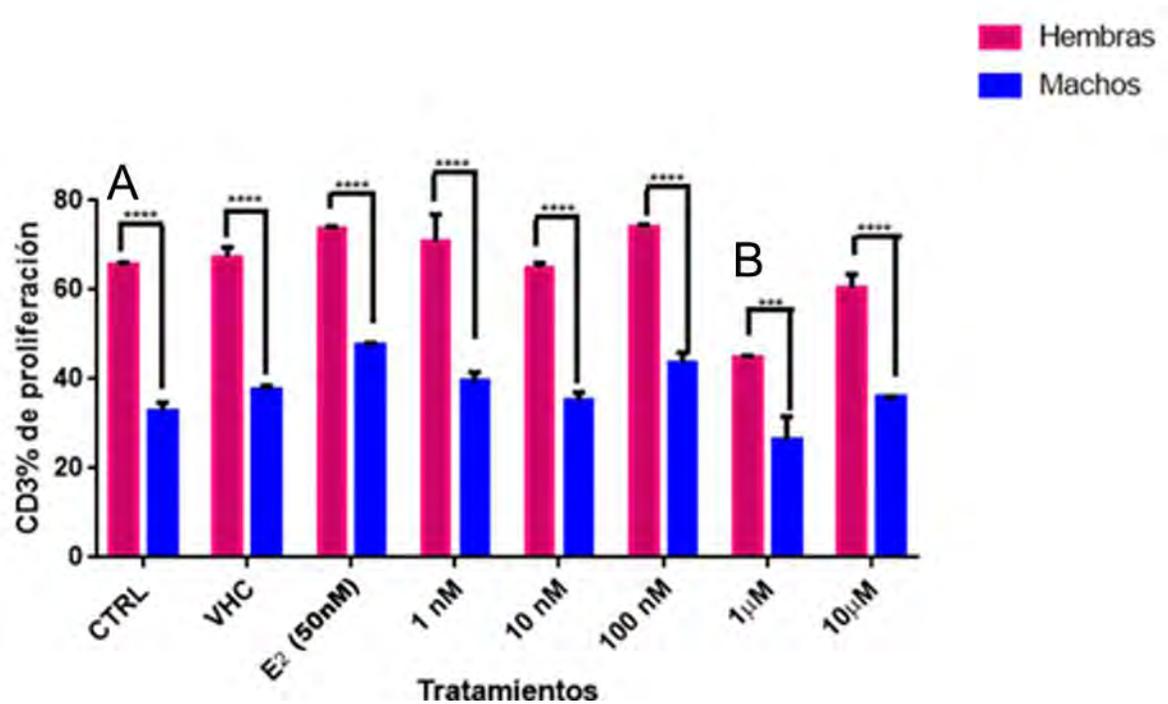
En la Figura 4, se observan los Dot Plots representativos, en los cuales se seleccionaron las regiones de linfocitos con diferentes concentraciones de BPA en el cultivo primario.



**Figura 4.** Dot Plots representativos de la selección de la región de linfocitos. Los datos fueron analizados con el software Flow Jo.

### 1.1 Porcentaje de proliferación de los linfocitos T totales (CD3+)

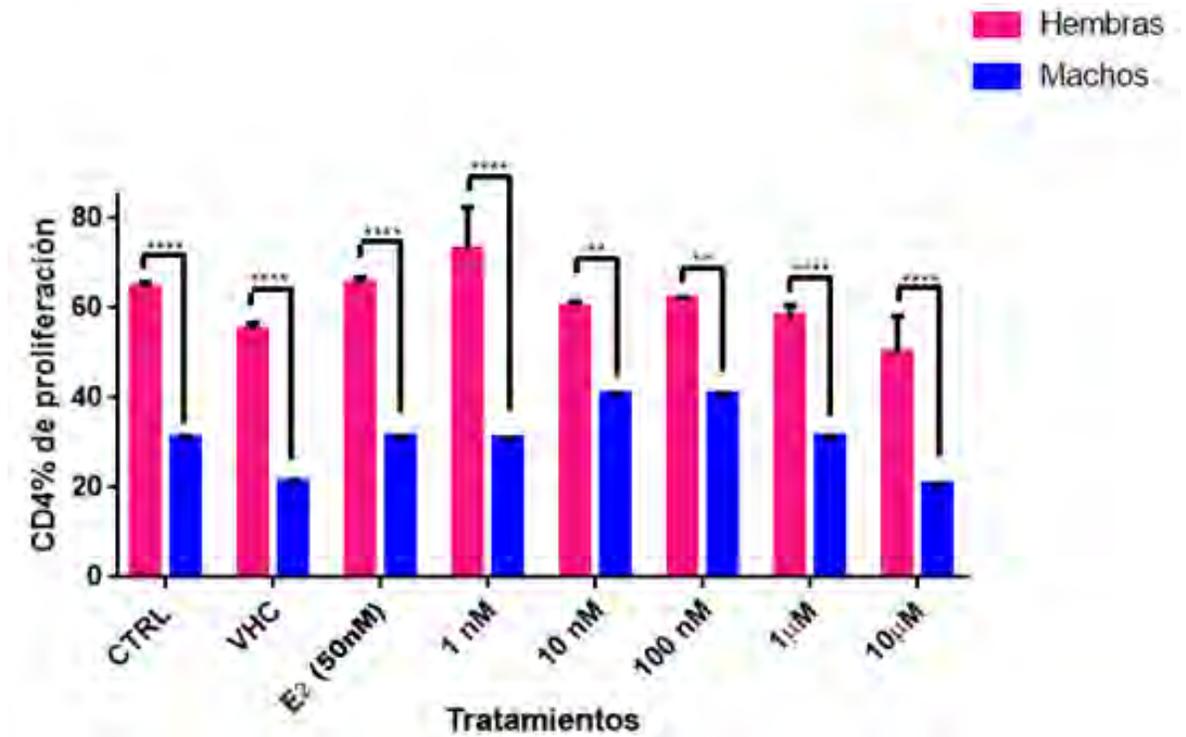
En la figura 5 podemos observar que existe un aspecto dimórfico en la proliferación de los LT totales, siendo mayor la proliferación en las hembras que en los machos. Además de esto, existe una disminución en la proliferación en los LT totales de hembras tratadas con la concentración de BPA 1  $\mu$ M en comparación con las hembras control (figura 5).



**Figura 5. Porcentaje de proliferación de LT totales (CD3+) en cultivos de esplenocitos provenientes de machos y hembras prepúberes.** Los datos representan la media  $\pm$  la desviación estándar. Los \* muestran diferencias significativas (\*\*p=0.001, \*\*\*\*p=0.0001) debidas a la diferencia entre sexos y las letras (A, B) muestran las diferencias significativas debidas a los distintos tratamientos en comparación con el CTRL. CTRL (control), VHC (vehículo), E2 (estradiol) y 5 concentraciones de BPA (1nM, 10nM, 100nM, 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M). Datos de 3 experimentos independientes,  $n=6$  animales por grupo.

## 1.2 Porcentaje de proliferación de los linfocitos T cooperadores (CD4+)

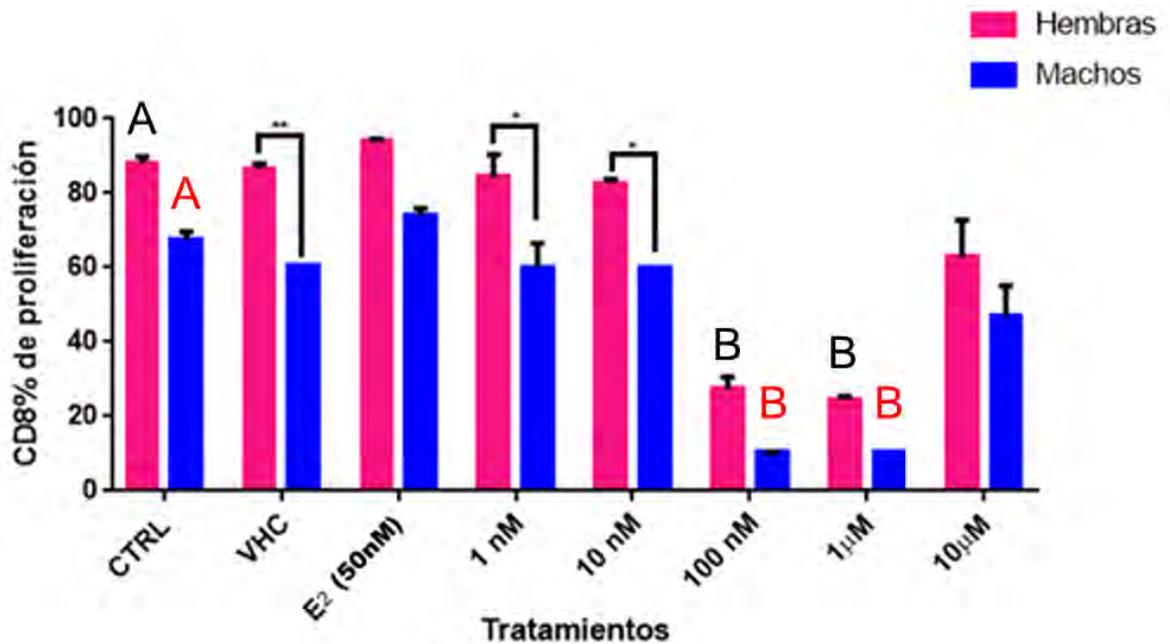
La figura 6 muestra la subpoblación de LTh analizada, en donde se observa el mismo patrón dimórfico en donde la proliferación es mayor en hembras en comparación con los machos en todos los tratamientos, sin que se observen diferencias debidas al tratamiento (figura 7).



**Figura 6. Porcentaje de proliferación de LTh (CD4+) en cultivos de esplenocitos provenientes de machos y hembras prepúberes.** Los datos representan la media  $\pm$  la desviación estándar. Los \* muestran diferencias significativas (\*\* $p=0.01$ , \*\*\*\* $p=0.0001$ ) debidas a la diferencia entre sexos. CTRL (control), VHC (vehículo), E<sub>2</sub> (estradiol) y 5 concentraciones de BPA (1nM, 10nM, 100nM, 1μM y10μM). Datos de 3 experimentos independientes,  $n=6$  animales por grupo.

### 1.3 Porcentaje de proliferación de los LTc (CD8+)

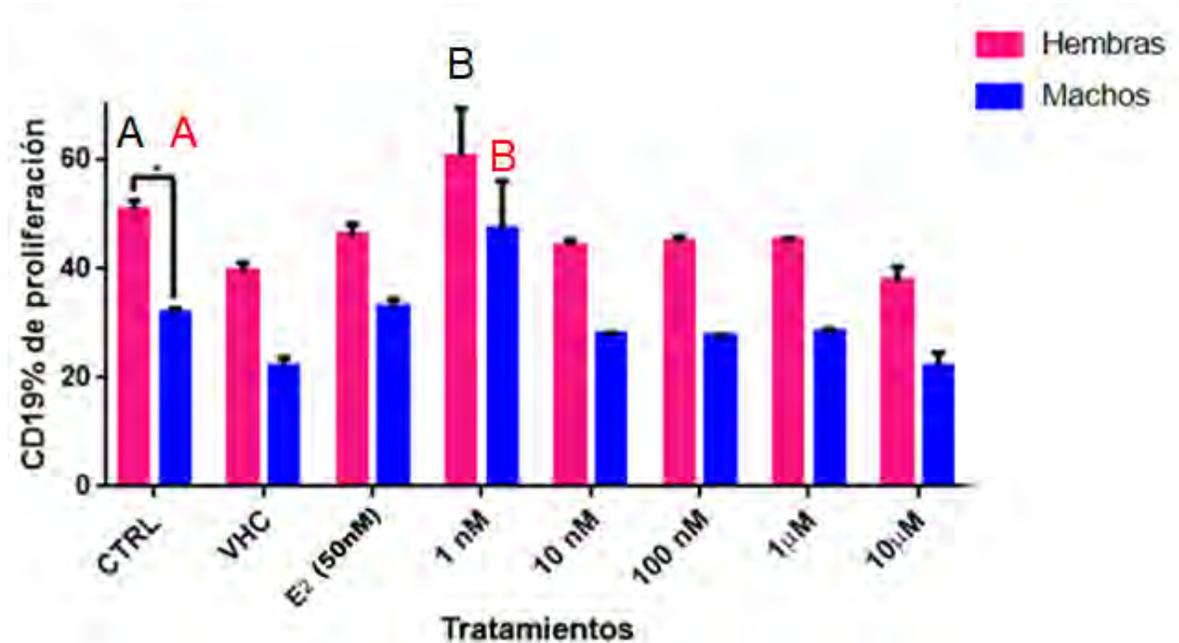
Como se puede observar en la figura 8, el porcentaje de proliferación de LTc muestra una disminución en las concentraciones de BPA 100nM y 1µM tanto en machos como en hembras. En las diferencias entre sexos las hembras muestran mayor porcentaje de proliferación en los tratamientos VHC y BPA 1nM y 10nM, en comparación con los machos figura 7.



**Figura 7. Porcentaje de proliferación de LTc (CD8+) en cultivos de esplenocitos provenientes de machos y hembras prepúberes.** Los datos representan la media  $\pm$  la desviación estándar. Los \* muestran diferencias significativas (\* $p=0.05$ , \*\* $p=0.01$ ) debidas a la diferencia entre sexos y las letras (A, B) muestran las diferencias significativas debidas a los distintos tratamientos en comparación con el CTRL. CTRL (control), VHC (vehículo), E2 (estradiol) y 5 concentraciones de BPA (1nM, 10nM, 100nM, 1µM y 10µM). Datos de 3 experimentos independientes,  $n=6$  animales por grupo.

#### 1.4 Porcentaje de proliferación de los LB (CD19+)

En la figura 8 se observa el análisis del porcentaje de proliferación en la subpoblación de LB, en el cual, aunque no hay diferencias estadísticas se muestra un patrón dimórfico, en donde las hembras tienen mayor porcentaje de proliferación en comparación con los machos.



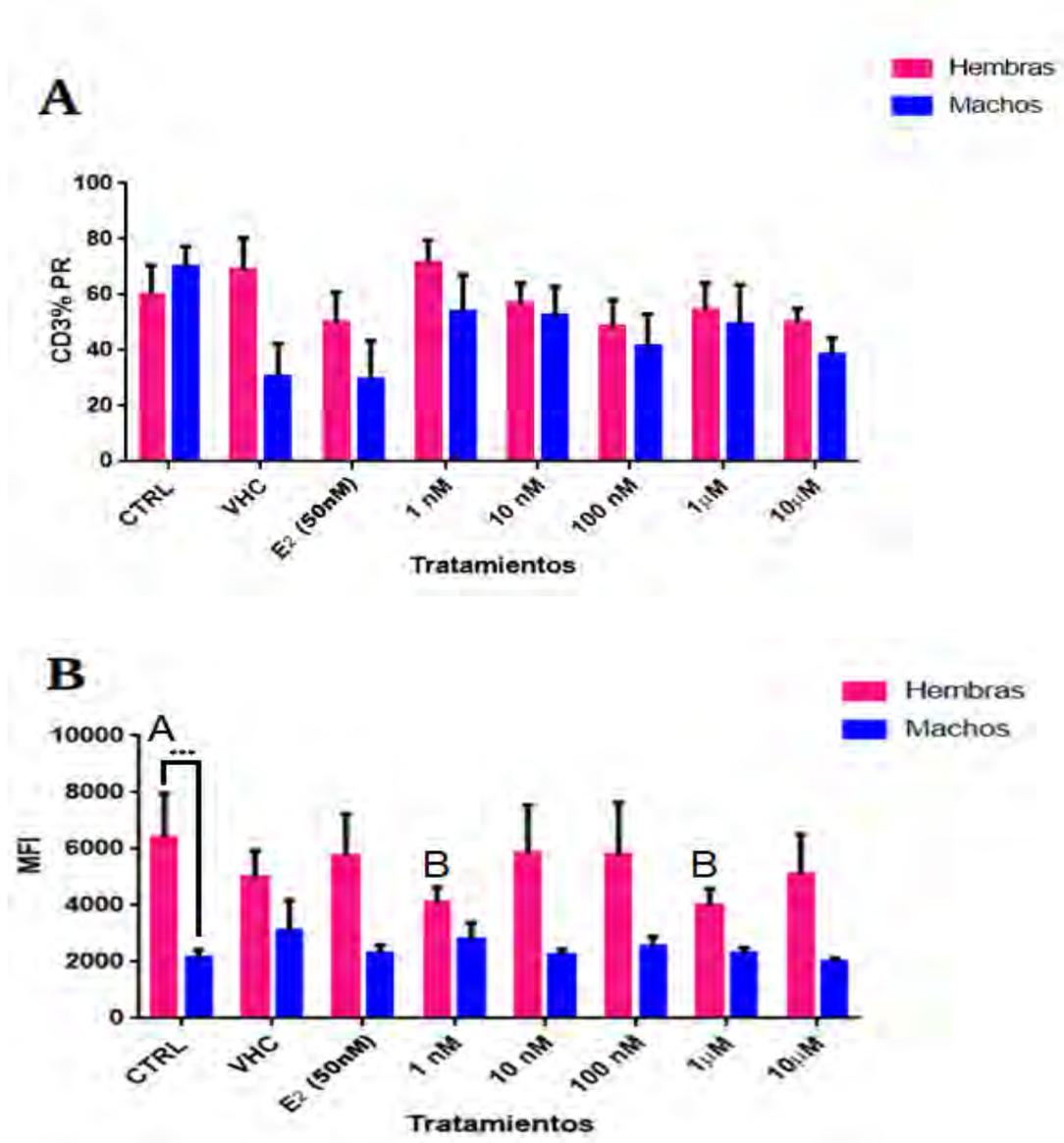
**Figura 8. Porcentaje de proliferación de LB (CD19+) en cultivos de esplenocitos provenientes de machos y hembras prepúberes.** Los datos representan la media  $\pm$  la desviación estándar. El \* muestra diferencias significativas (\* $p=0.05$ ) debidas a la diferencia entre sexos y las letras (A, B) muestran las diferencias significativas debidas a los distintos tratamientos en comparación con el CTRL. CTRL (control), VHC (vehículo), E<sub>2</sub> (estradiol) y 5 concentraciones de BPA (1nM, 10nM, 100nM, 1µM y10µM). Datos de 3 experimentos independientes,  $n=6$  animales por grupo.

**2. Analizar por citometría de flujo la expresión del receptor a progesterona (PR) y receptor a estrógenos alfa (ER $\alpha$ ) en respuesta al BPA en diferentes subpoblaciones celulares [linfocitos T totales (CD3+), linfocitos T cooperadores (CD4+), linfocitos T citotóxicos (CD8+) y linfocitos B (CD19+)].**

### **2.1 Expresión del receptor a progesterona (PR) en LT (CD3+)**

En la figura 9 se muestra el porcentaje de células que expresan PR en la subpoblación de los linfocitos T totales CD3+. En dichos análisis el porcentaje de células que expresa PR permaneció constante en todos los tratamientos, sin presentar diferencias estadísticas entre machos y hembras **figura 9 A**.

En la **figura 9 B**, se observa la intensidad medida de fluorescencia (MFI, por sus siglas en inglés) de los linfocitos T totales CD3+. En las diferencias entre sexos las hembras ctrl muestran mayor nivel de expresión en comparación con los machos. Mientras que, en las diferencias entre tratamientos, en las hembras se observa una disminución en el nivel de expresión, en las concentraciones de BPA 1nM y 1 $\mu$ M con respecto al control.

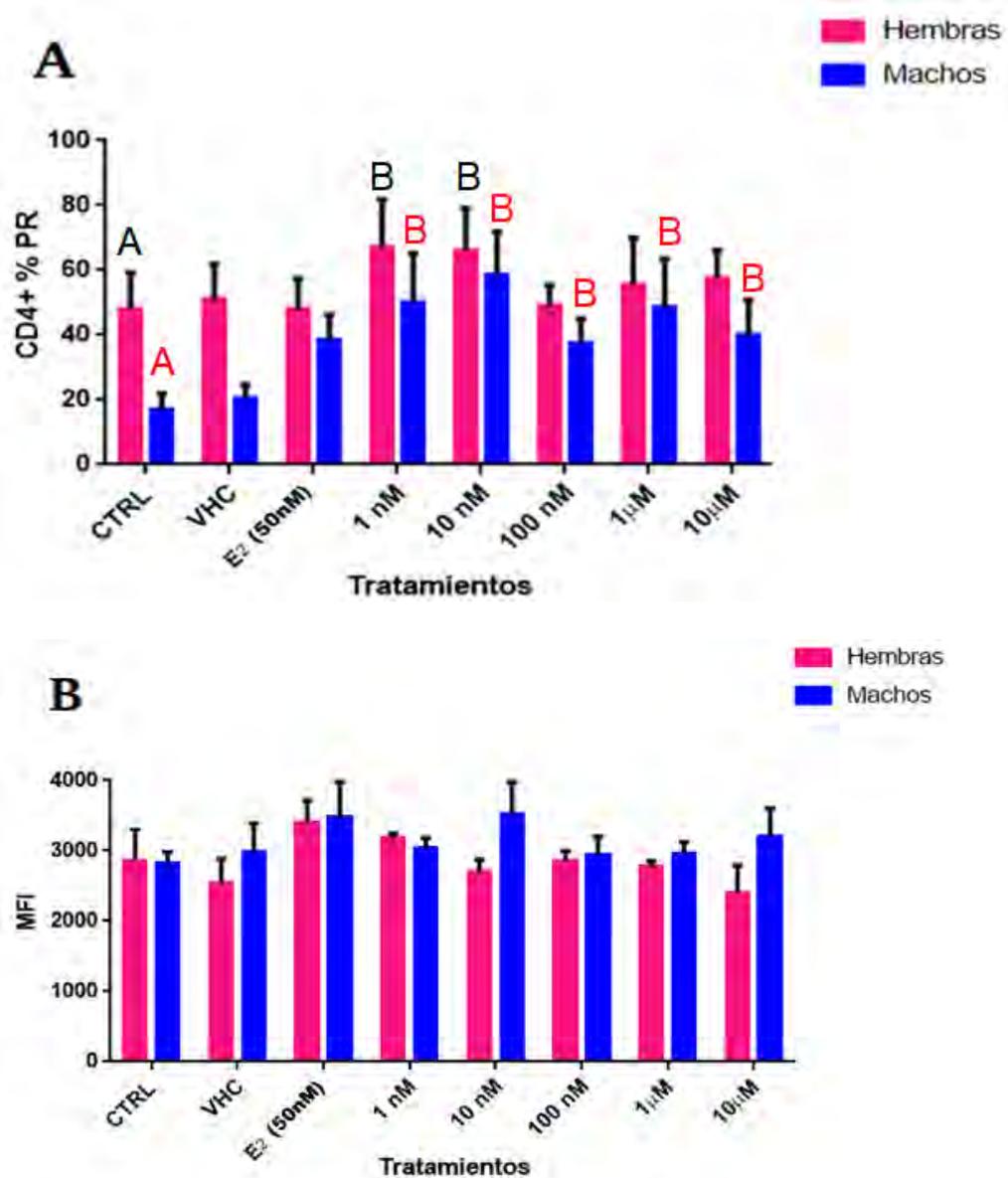


**Figura 9. Evaluación del porcentaje de células que expresan PR, en la subpoblación celular LT (CD3+) en cultivos de esplenocitos provenientes de machos y hembras prepúberes.** Los datos representan la media  $\pm$  la desviación estándar. El \* muestra diferencias significativas ( $***p=0.001$ ) debidas a la diferencia entre sexos y las letras (A, B) muestran las diferencias significativas debidas a los distintos tratamientos en comparación con el CTRL. CTRL (control), VHC (vehículo), E<sub>2</sub> (estradiol) y 5 concentraciones de BPA (1nM, 10nM, 100nM, 1μM y10μM). Datos de 3 experimentos independientes,  $n=6$  animales por grupo.

## 2.2 Expresión del receptor a progesterona (PR) en LTh (CD4+)

En la figura 10, se muestra el porcentaje de expresión de PR en los linfocitos T cooperadores CD4+. En las diferencias entre sexos **figura 10 A**, no se observan diferencias estadísticas significativas, sin embargo, en las diferencias entre tratamientos las hembras muestran aumento del porcentaje de expresión de PR en las concentraciones de BPA 1nM y 10nM con respecto al control. Mientras que en los machos se muestra aumento de dicho porcentaje en todas las concentraciones de BPA con respecto al control.

Por otro lado, el nivel de expresión de PR en los LTCD4+ **figura 10 B** se mantuvo constante en todos los tratamientos, tanto en machos como en hembras.



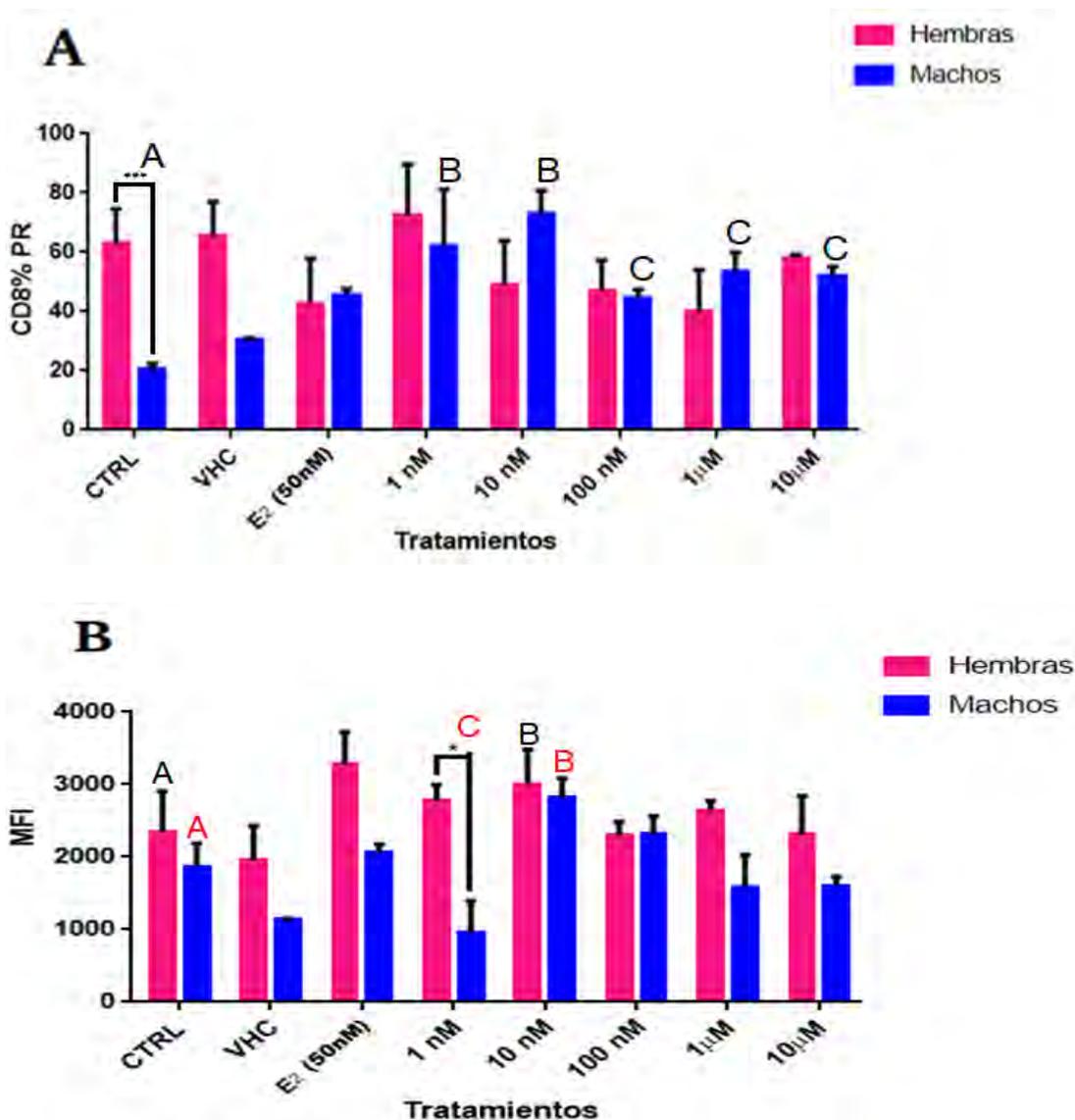
**Figura 10. Evaluación del porcentaje de células que expresan PR, en la subpoblación celular LTh (CD4+) en cultivos de esplenocitos provenientes de machos y hembras prepúberes.** Los datos representan la media  $\pm$  la desviación estándar. Las letras (A, B) muestran las diferencias significativas debidas a los distintos tratamientos en comparación con el CTRL. CTRL (control), VHC (vehículo), E<sub>2</sub> (estradiol) y 5 concentraciones de BPA (1nM, 10nM, 100nM, 1µM y 10µM). Datos de 3 experimentos independientes,  $n=6$  animales por grupo.

### 2.3 Expresión del receptor a progesterona (PR) en LTc (CD8+)

En el análisis del porcentaje de expresión de PR en LTc CD8+ **figura 11 A**.

Sin embargo, en las diferencias entre tratamientos en los machos, se puede observar que en los grupos tratados con BPA aumenta el porcentaje de expresión de PR con respecto al control.

En la **figura 11 B**, se muestra el análisis del nivel de expresión de PR en los LTCD8+. En las diferencias en el nivel de expresión de PR entre sexos, se observa que en la concentración de BPA 1nM las hembras presentan mayor nivel de expresión de PR a diferencia de los machos, en comparación con las demás concentraciones de BPA. Por otro lado, en la diferencia entre tratamientos en la concentración de BPA 10nM hay aumento en el nivel de expresión de PR en ambos sexos, con respecto al control.

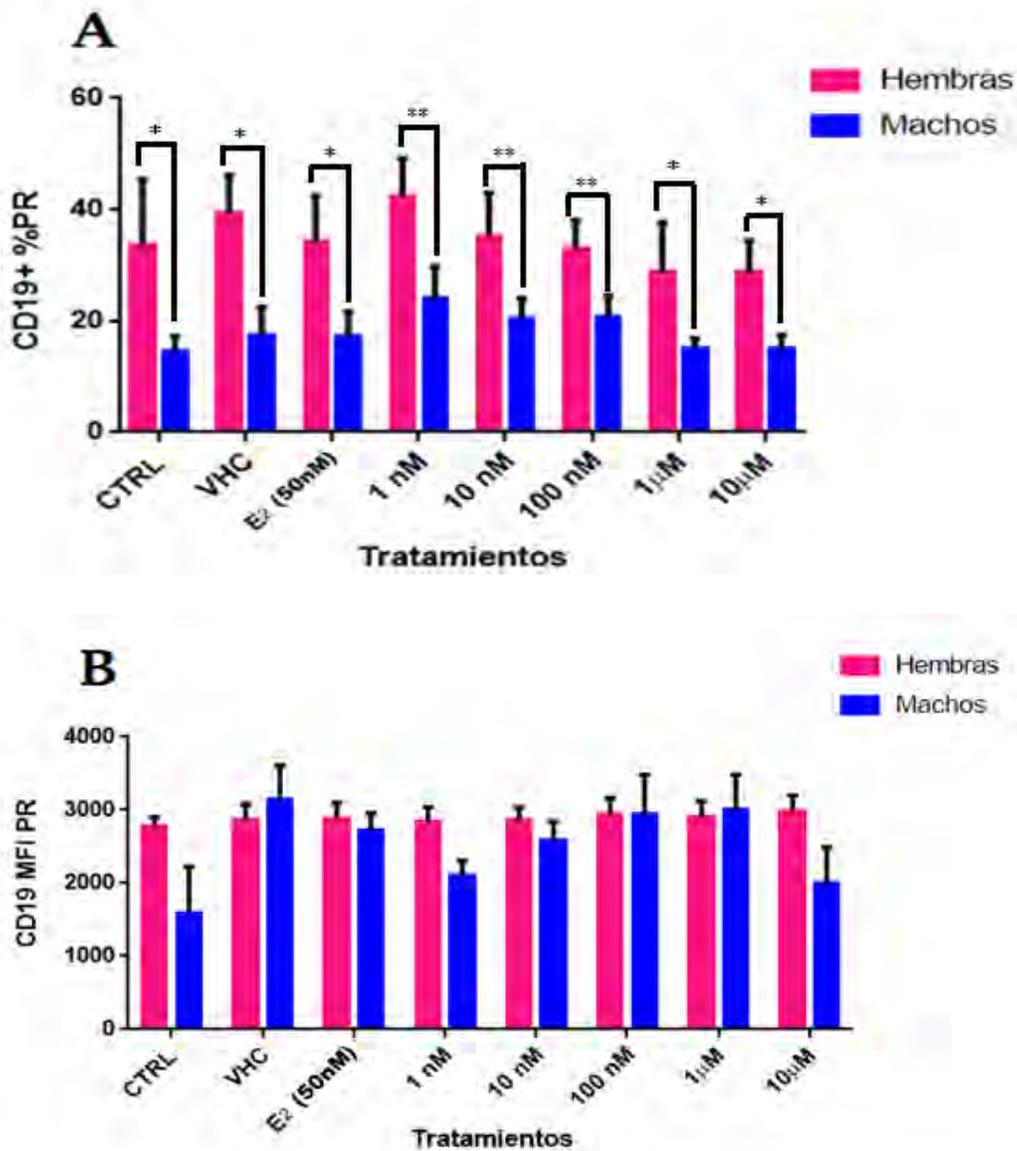


**Figura 11. Evaluación del porcentaje de células que expresan PR, en la subpoblación celular LTc (CD8+) en cultivos de esplenocitos provenientes de machos y hembras prepúberes.** Los datos representan la media  $\pm$  la desviación estándar. El \* muestra diferencias significativas (\* $p=0.05$ , \*\*\* $p=0.001$ ) debidas a la diferencia entre sexos y las letras (A, B, C) muestran las diferencias significativas debidas a los distintos tratamientos en comparación con el CTRL. CTRL (control), VHC (vehículo), E2 (estradiol) y 5 concentraciones de BPA (1nM, 10nM, 100nM, 1µM y 10µM). Datos de 3 experimentos independientes,  $n=6$  animales por grupo.

## 2.4 Expresión del receptor a progesterona (PR) en LB (CD19+)

La última subpoblación analizada en cuanto al porcentaje de expresión de PR son los LB CD19+ figura 12, en donde las diferencias estadísticas, nos muestran un patrón dimórfico, en el cual en todas las hembras presentan mayor porcentaje de expresión de PR a diferencia de los machos **figura 12 A**.

En el nivel de expresión de PR en los LB CD19+ **figura 12 B**, no se encuentran diferencias estadísticas significativas entre sexos, así también como entre los diferentes tratamientos.



**Figura 12. Evaluación del porcentaje de células que expresan PR, en la subpoblación celular LB (CD19+) en cultivos de esplenocitos provenientes de machos y hembras prepúberes.** Los datos representan la media  $\pm$  la desviación estándar. Los \* muestran diferencias significativas (\* $p=0.05$ , \*\* $p=0.01$ ) debidas a la diferencia entre sexos. CTRL (control), VHC (vehículo), E<sub>2</sub> (estradiol) y 5 concentraciones de BPA (1nM, 10nM, 100nM, 1 $\mu$ M y10 $\mu$ M). Datos de 3 experimentos independientes,  $n=6$  animales por grupo.

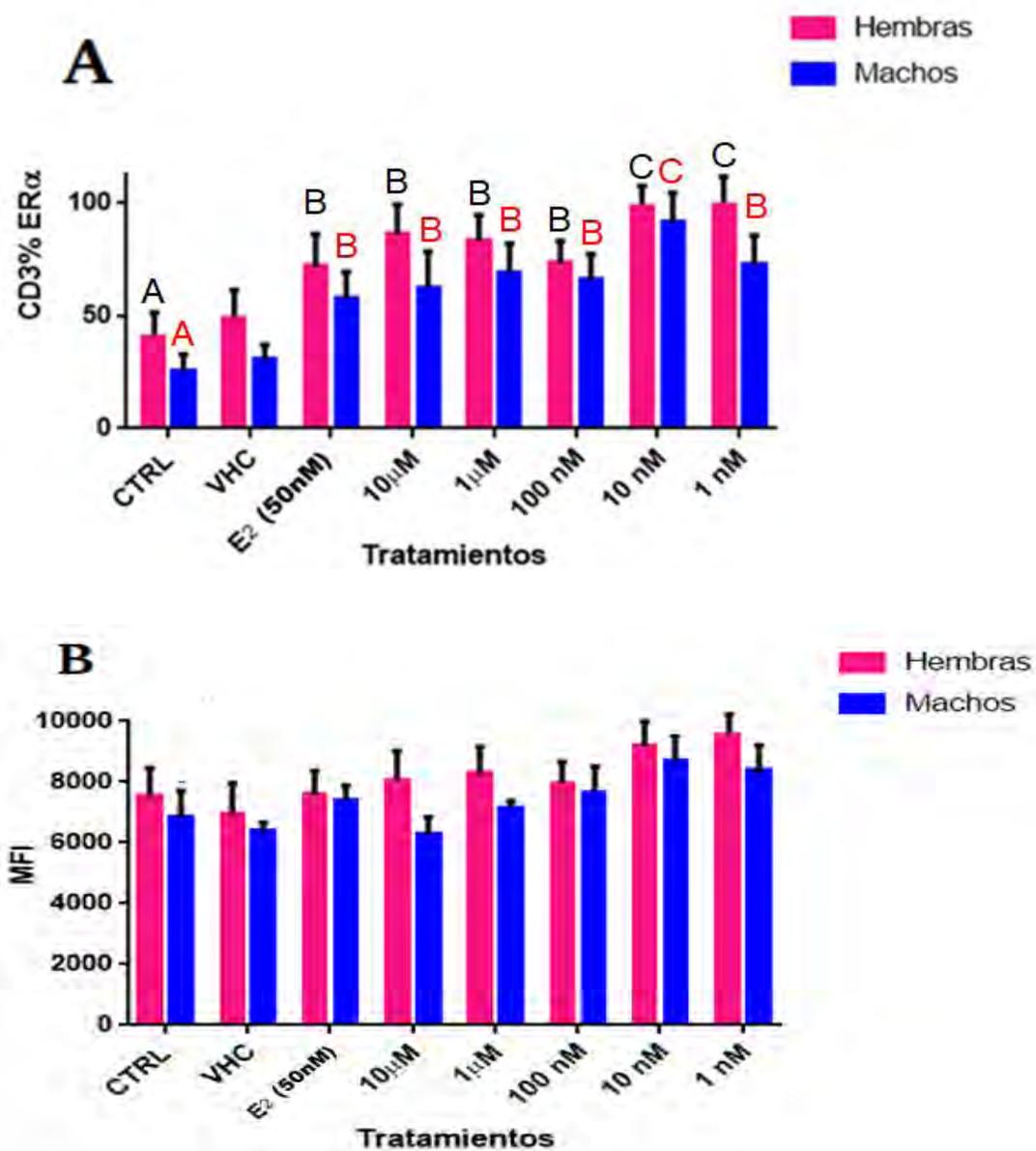
### **3. Expresión del receptor a estrógenos-alfa (ER $\alpha$ ) en cultivos primarios de esplenocitos.**

#### **3.1 Expresión del receptor a estrógenos alfa (ER $\alpha$ ) en LT totales (CD3+)**

Se realizó el análisis del porcentaje de células positivas que expresan ER $\alpha$ , en la subpoblación celular de LT totales CD3+, como se presenta en la figura 13. En ambos sexos, se muestra un aumento en el porcentaje de expresión de ER $\alpha$  en la comparación entre tratamientos, en todas las concentraciones de BPA con respecto al control. En la comparación entre sexos, no hay diferencia estadística significativa, sin embargo, se puede observar mayor tendencia en las hembras en cuanto a su porcentaje de expresión del ER $\alpha$ , en comparación con los machos **figura13 A**.

Esto nos indica que la presencia de BPA produce un aumento en el porcentaje de células positivas que expresan ER $\alpha$ .

En la **figura 13 B**, se muestra el nivel de expresión del ER $\alpha$  en los LTCD3+, en el cual no existen diferencias estadísticas significativas entre sexos, así como tampoco entre tratamientos.

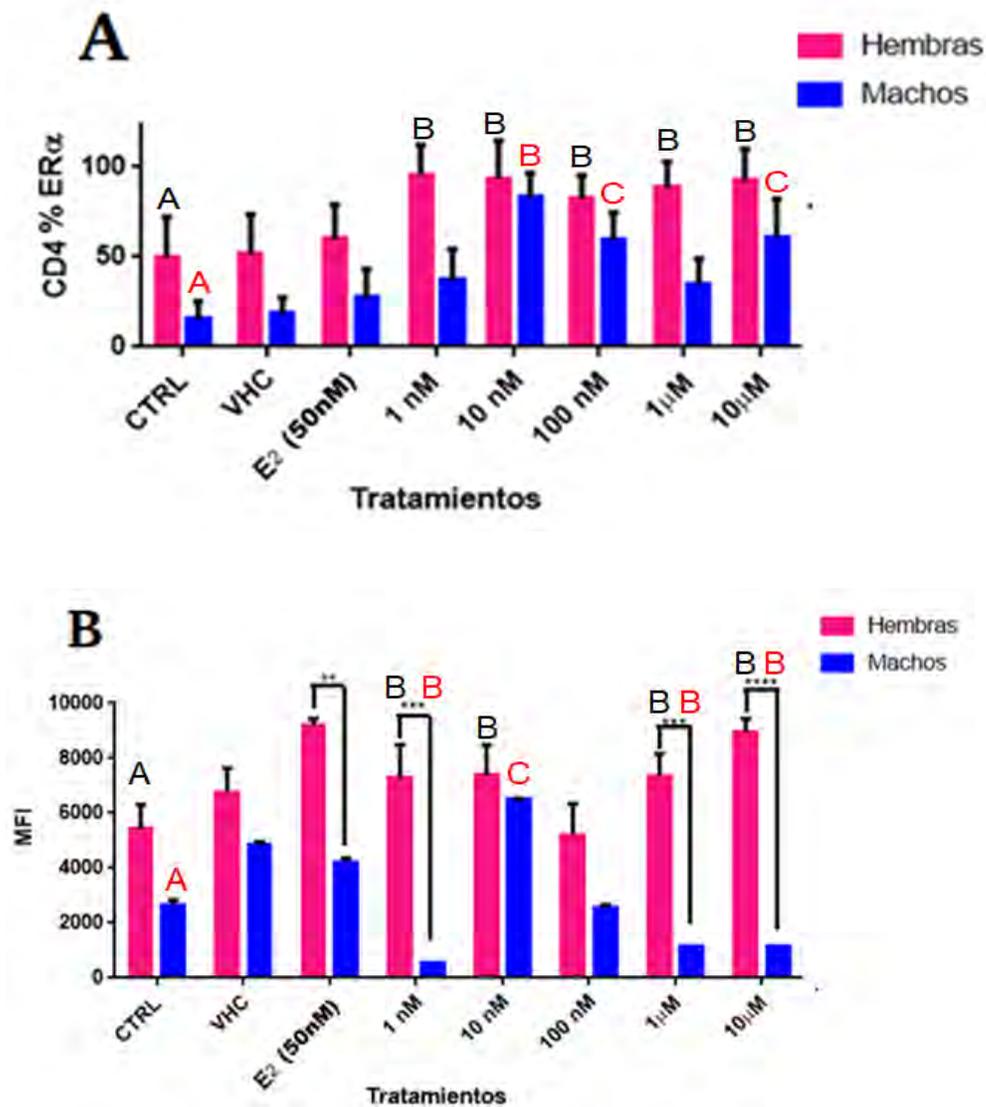


**Figura 13. Evaluación del porcentaje de células que expresan ER $\alpha$ , en la subpoblación celular LT totales (CD3+) en cultivos de esplenocitos provenientes de machos y hembras prepúberes. Los datos representan la media  $\pm$  la desviación estándar. Las letras (A, B, C) muestran las diferencias significativas debidas a los distintos tratamientos en comparación con el CTRL. CTRL (control), VHC (vehículo), E<sub>2</sub> (estradiol) y 5 concentraciones de BPA (1nM, 10nM, 100nM, 1 $\mu$ M y10 $\mu$ M). Datos de 3 experimentos independientes,  $n=6$  animales por grupo.**

### 3.2 Expresión del receptor a estrógenos alfa (ER $\alpha$ ) en LTh (CD4+)

En la figura 14 se muestra el análisis del porcentaje de células que expresan ER $\alpha$ , en los LTc CD4+. Como se puede observar en la **figura 14 A**, hay un patrón dimórfico debido a que las hembras presentan mayor porcentaje de células positivas de ER $\alpha$  en comparación con los machos, sin embargo, no se tienen diferencias estadísticas significativas entre sexos. Pero en la comparación entre tratamientos en las hembras se muestra aumento en el porcentaje de células positivas para ER $\alpha$  en todas las concentraciones de BPA con respecto al control. Por otro lado, en los machos se observa también este aumento, pero únicamente en las concentraciones de BPA 10nM, 100nM y 10 $\mu$ M con respecto al control.

El nivel de expresión del ER $\alpha$  en LT CD4+ se presenta en la **figura 14 B**. En la cual se presenta aumento estadístico, en el nivel de expresión de dicho receptor en hembras en comparación con los machos, en las concentraciones de BPA 1nM, 1 $\mu$ M y 10 $\mu$ M. En la comparación entre tratamientos los machos, presentan disminución en el nivel de expresión de ER $\alpha$  en las concentraciones de BPA 1nM, 1 $\mu$ M y 10 $\mu$ M, sin embargo, en la concentración 10nM, aumenta el nivel de expresión de ER $\alpha$  con respecto al control. Mientras que, en las hembras, aumenta el nivel de expresión de ER $\alpha$  en las concentraciones de BPA 1nM, 10nM, 1 $\mu$ M y 10 $\mu$ M.

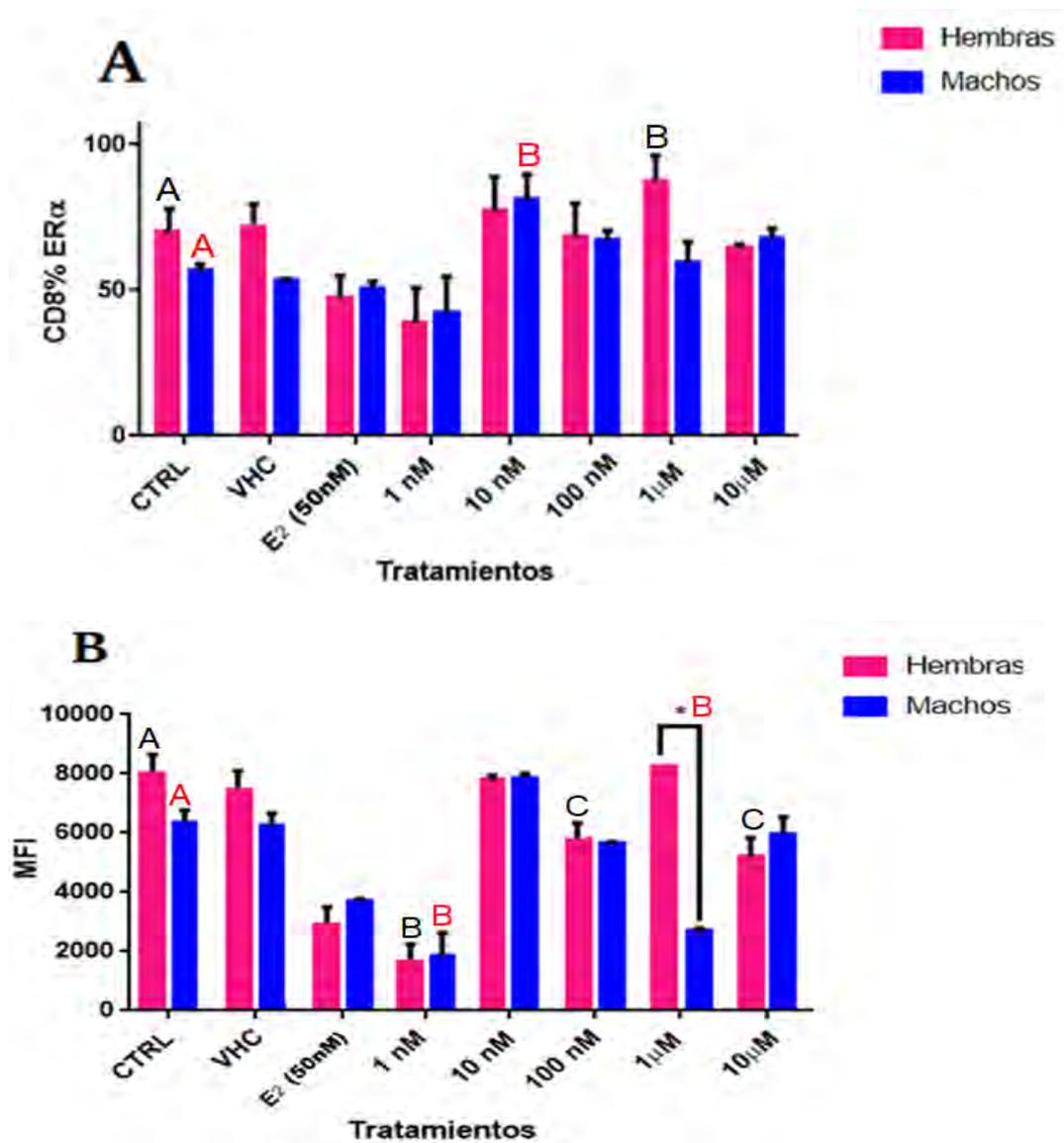


**Figura 14. Evaluación del porcentaje de células que expresan ER $\alpha$ , en la subpoblación celular LTh (CD4+) en cultivos de esplenocitos provenientes de machos y hembras prepúberes.** Los datos representan la media  $\pm$  la desviación estándar. Los \* muestran diferencias significativas (\*\* $p=0.01$ , \*\*\* $p=0.001$ , \*\*\*\* $p=0.0001$ ) debidas a la diferencia entre sexos y las letras (A, B, C) muestran las diferencias significativas debidas a los distintos tratamientos en comparación con el CTRL. CTRL (control), VHC (vehículo), E<sub>2</sub> (estradiol) y 5 concentraciones de BPA (1nM, 10nM, 100nM, 1 $\mu$ M y10 $\mu$ M). Datos de 3 experimentos independientes,  $n=6$  animales por grupo.

### 3.3 Expresión del receptor a estrógenos alfa (ER $\alpha$ ) en LTc (CD8+)

En la **figura 15 A** se presenta el porcentaje de células positivas al ER $\alpha$ , en los LTc CD8+, en dichos análisis tanto machos como hembras, no presentan diferencias estadísticas significativas entre sexos. Sin embargo, en la comparación entre los tratamientos, en las hembras aumenta este porcentaje en la concentración de BPA 1 $\mu$ M, mientras que en los machos también se presenta aumento, pero este en la concentración de 10nM con respecto al control.

El nivel de expresión del ER $\alpha$  en LTCD8+ se muestra en la **figura 15 B**, en el análisis entre sexos, se presenta mayor nivel de expresión del ER $\alpha$  en hembras en comparación con los machos en la concentración de BPA 1 $\mu$ M. Por otro lado, en la comparación entre tratamientos, tanto en hembras como en machos hay disminución en el nivel de expresión, en algunas concentraciones de BPA con respecto al control. En las hembras se observa esta disminución en las concentraciones de BPA 1nM, 100nM y 10 $\mu$ M, mientras que en los machos en las concentraciones de 1nM y 1 $\mu$ M.



**Figura 15. Evaluación del porcentaje de células que expresan ERα, en la subpoblación celular LTc (CD8+) en cultivos de esplenocitos provenientes de machos y hembras prepúberes.** Los datos representan la media ± la desviación estándar. Los \* muestran diferencias significativas (\*p=0.05) debidas a la diferencia entre sexos y las letras (A, B, C) muestran las diferencias significativas debidas a los distintos tratamientos en comparación con el CTRL. CTRL (control), VHC (vehículo), E2 (estradiol) y 5 concentraciones de BPA (1nM, 10nM, 100nM, 1μM y10μM). Datos de 3 experimentos independientes, n=6 animales por grupo.

### 3.4 Expresión del receptor a estrógenos alfa (ER $\alpha$ ) en LB (CD19+)

El porcentaje de expresión del ER $\alpha$  en B CD19+ se presenta en la figura 16, la gráfica nos muestra la comparación entre sexos en la cual se puede observar como las hembras presentan mayor porcentaje de expresión comparadas con los machos **figura16 A**. Sin embargo, no se presentan diferencias estadísticas significativas. Mientras que, en la comparación entre tratamientos, en los machos se observa disminución en el porcentaje de expresión del ER $\alpha$ , en todas las concentraciones de BPA con respecto al control.

El nivel de expresión del ER $\alpha$ , se muestra en la **figura 16 B**, en la cual no se observan diferencias estadísticas entre sexos. Sin embargo, en las diferencias entre tratamientos, únicamente las hembras en las concentraciones de BPA 10nM, 100nM, 1 $\mu$ M y 10 $\mu$ M con respecto al control.

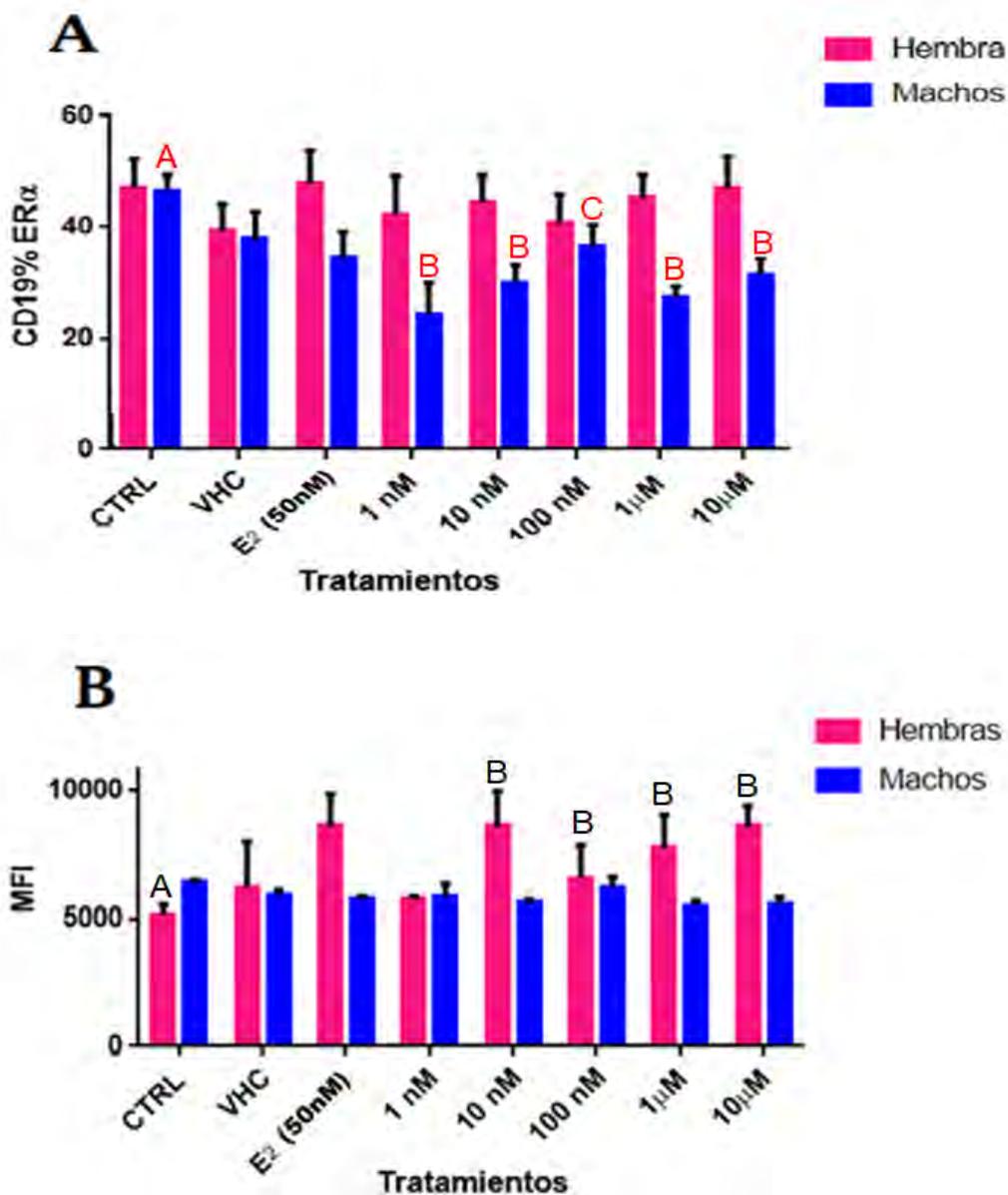
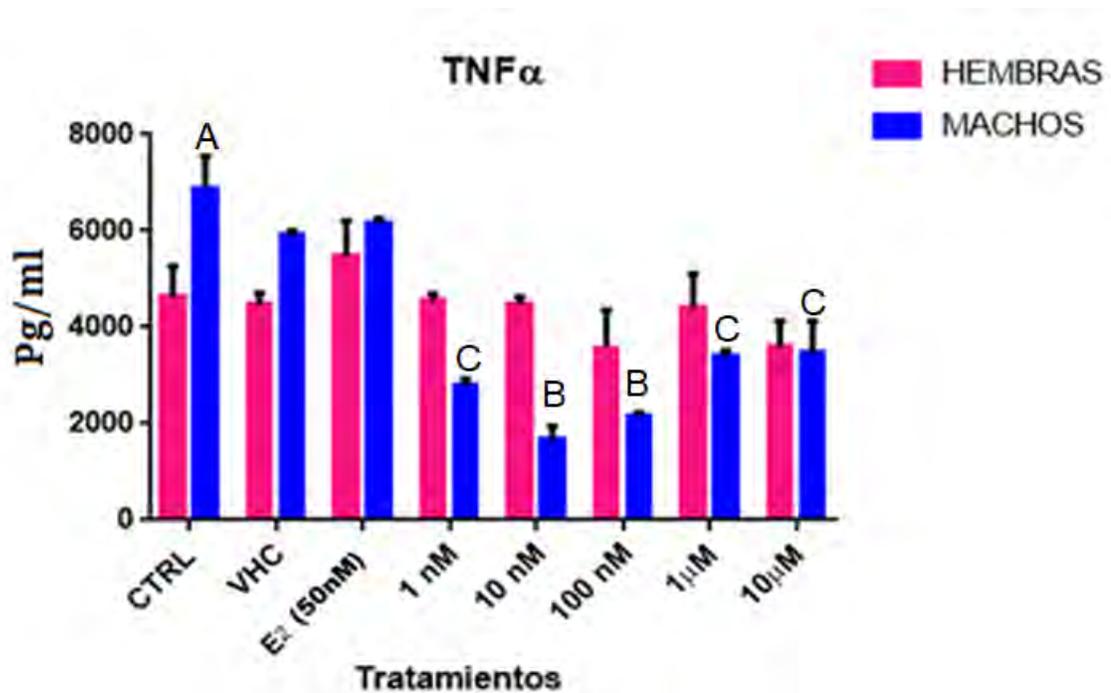


Figura 16. Evaluación del porcentaje de células que expresan ER $\alpha$ , en la subpoblación celular LB (CD19+) en cultivos de esplenocitos provenientes de machos y hembras prepúberes. Los datos representan la media  $\pm$  la desviación estándar. Las letras (A, B) muestran las diferencias significativas debidas a los distintos tratamientos en comparación con el CTRL. CTRL (control), VHC (vehículo), E<sub>2</sub> (estradiol) y 5 concentraciones de BPA (1nM, 10nM, 100nM, 1 $\mu$ M y10 $\mu$ M). Datos de 3 experimentos independientes,  $n=6$  animales por grupo.

4. Determinar en el sobrenadante de los cultivos mediante ELISA la producción de las citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ).

TNF- $\alpha$

En la citocina proinflamatoria TNF- $\alpha$ , se observa en la comparación entre sexos, como en los machos tratados con BPA disminuye la producción de TNF- $\alpha$  con respecto al control. En las hembras no se presentan diferencias estadísticas en los diferentes tratamientos **figura 17**.

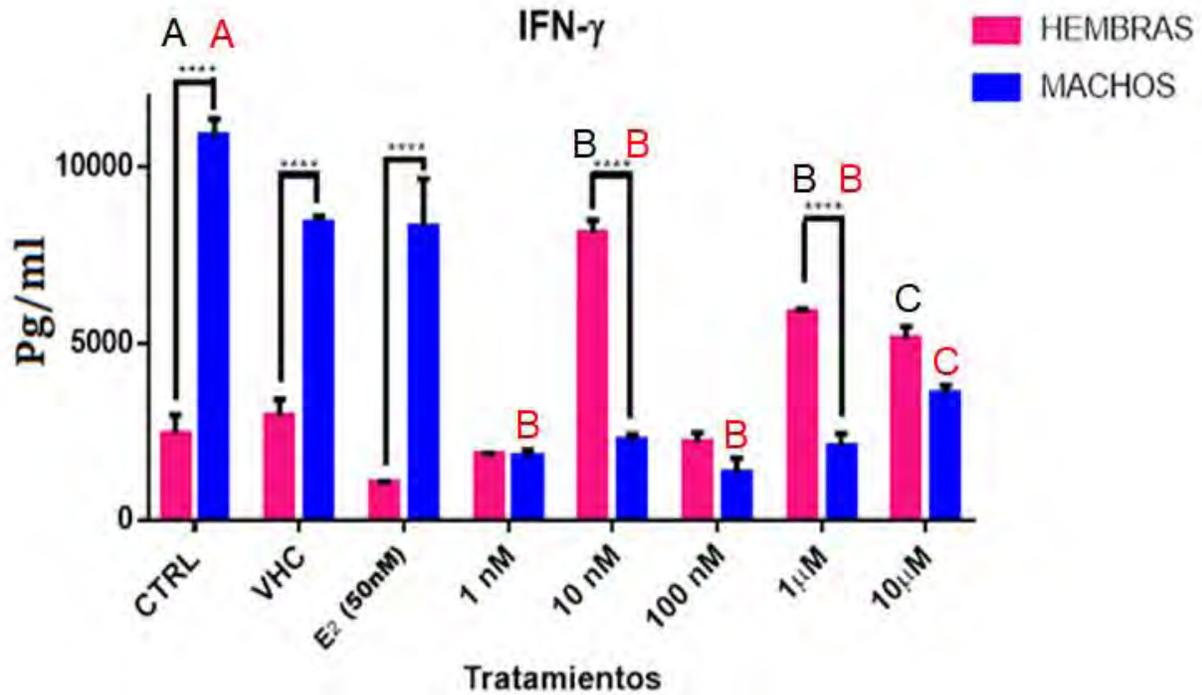


**Figura 17. Determinación por ELISA de la citocina proinflamatoria TNF- $\alpha$ .** Los datos representan la media  $\pm$  la desviación estándar. Las letras (A, B, C) muestran las diferencias significativas debidas a los distintos tratamientos en comparación con el CTRL. CTRL (control), VHC (vehículo), E<sub>2</sub> (estradiol) y 5 concentraciones de BPA (1nM, 10nM, 100nM, 1 $\mu$ M y10 $\mu$ M). Datos de 3 experimentos independientes,  $n=6$  animales por grupo.

## **IFN- $\gamma$**

La citocina IFN- $\gamma$  se presenta en la figura 18, en hembras el IFN- $\gamma$  aumenta significativamente en los grupos de BPA 10nM, 1 $\mu$ M y 10 $\mu$ M con respecto al control, en los machos esta citocina presenta disminución significativa en todos los grupos tratados con BPA. En las diferencias entre sexos, se observa como los machos en los tratamientos de CTRL, VHC y E<sub>2</sub>, tienen mayor producción de IFN- $\gamma$  en comparación con las hembras. Sin embargo, este efecto se encuentra revertido en los tratamientos con las concentraciones de BPA, las más notorias, son en las concentraciones de 10nM y 1 $\mu$ .

Los resultados obtenidos nos indican que el BPA favorece una respuesta proinflamatoria en hembras, sin embargo, en machos esta se puede observar disminuida de forma significativa.

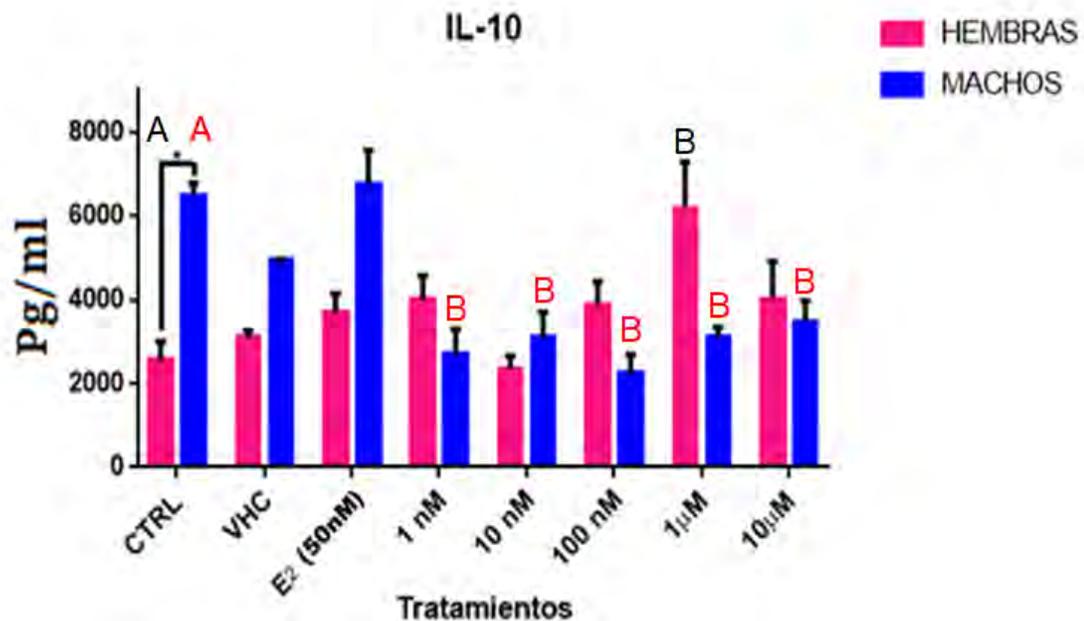


**Figura 18. Determinación por ELISA de la citocina proinflamatoria IFN- $\gamma$ .** Los datos representan la media  $\pm$  la desviación estándar. Los \* muestran diferencias significativas ( $****p=0.0001$ ) debidas a la diferencia entre sexos y las letras (A, B, C) muestran las diferencias significativas debidas a los distintos tratamientos en comparación con el CTRL. CTRL (control), VHC (vehículo), E<sub>2</sub> (estradiol) y 5 concentraciones de BPA (1nM, 10nM, 100nM, 1 $\mu$ M y 10 $\mu$ M). Datos de 3 experimentos independientes,  $n=6$  animales por grupo.

#### **4.1 Estudiar en el sobrenadante de los cultivos mediante ELISA la producción de la citocina inmunomoduladora IL-10, en respuesta al BPA.**

##### **IL-10**

En la figura 19 se presenta la citocina inmunoreguladora IL-10, en la cual, la comparación entre sexos nos indica que los machos controles tienen mayor nivel de producción de IL-10 a diferencia de las hembras. Mientras que, en las diferencias entre tratamientos, en machos se observa la disminución de dicha citocina en todas las concentraciones de BPA con respecto al control. Por otra parte, en las hembras se muestra el aumento de dicha citocina en la concentración de BPA 1 $\mu$ M con respecto al control. Con estos resultados mostrados podemos decir que el BPA disminuye la producción de la citocina IL-10.



**Figura 19. Determinación por ELISA de la citocina inmunomoduladora IL-10.** Los datos representan la media  $\pm$  la desviación estándar. Los \* muestran diferencias significativas ( $*p=0.05$ ) debidas a la diferencia entre sexos y las letras (A, B) muestran las diferencias significativas debidas a los distintos tratamientos en comparación con el CTRL. CTRL (control), VHC (vehículo), E<sub>2</sub> (estradiol) y 5 concentraciones de BPA (1nM, 10nM, 100nM, 1µM y10µM). Datos de 3 experimentos independientes,  $n=6$  animales por grupo.

## Discusión

El objetivo principal de este proyecto fue evaluar *in vitro* la funcionalidad de las células del sistema inmunológico, particularmente los linfocitos T (LT) y linfocitos B (LB), expuestas a un compuesto disruptor endócrino, en específico, el Bisfenol A (BPA).

Se conoce que los esteroides sexuales pueden afectar de manera diversa muchas de las funciones de las células del sistema inmune (Besedovsky HO et al 1996). Lo anterior es relevante, dado que, también hay compuestos en el ambiente, que pueden actuar como hormonas endógenas, particularmente imitando, bloqueando o influyendo la actividad de las hormonas endógenas. Tales contaminantes, se han denominado compuestos disruptores endocrinos (CDEs).

Existen evidencias actuales que demuestran que la actividad humana, particularmente la industrial, ha traído un incremento de compuestos altamente contaminantes, como es el caso de los compuestos disruptores endocrinos (Andrade-Ribero A et al, 2006). Estos compuestos, se caracterizan por presentar actividad estrogénica y son capaces de almacenarse durante periodos prolongados en el tejido adiposo (Olea N, 2003), como es el caso del bisfenol A (BPA).

La exposición al BPA puede presentarse desde la etapa fetal, ya que este disruptor endócrino es capaz de atravesar la placenta, y en los recién nacidos la exposición se presenta a través de la leche materna. Con respecto a los efectos que el BPA ejerce sobre las células del sistema inmunológico, en la bibliografía se manejan diferentes parámetros, ya que los efectos observados dependen en gran medida de las dosis, la etapa de exposición y el modelo animal que se utiliza (Yurino H et al, 2004).

Sin embargo, no se ha realizado una caracterización precisa sobre una misma población celular del sistema inmunológico, en concentraciones específicas del BPA, lo cual hace que la mayoría de los estudios sean muy variables.

Nuestros experimentos se realizaron con roedores en la etapa prepúber, debido a que en esta etapa aún no se presenta la maduración sexual y así poder descartar que los efectos observados son debido a la presencia de esteroides sexuales. Se conoce que la maduración del sistema inmune va a tener lugar entre el nacimiento y el día 30 postnatal (Sakaguchi S et al, 1982). Se decidió investigar diferentes subpoblaciones celulares de la respuesta inmunológica adaptativa y las alteraciones que estas subpoblaciones pueden tener ante el esquema de exposición al BPA, al inicio del cultivo e incubándolo por 72 horas.

Se encuentra documentado que el efecto que ejerce el BPA en roedores tiene gran influencia sobre el sistema endócrino, particularmente en el eje reproductivo, ya que dicho compuesto tiene efectos adversos como es el inicio de la pubertad temprana, es capaz de alterar el ciclo estral y alterar el desarrollo de las glándulas mamarias, esto en el caso de las hembras, por otra parte, en los machos puede provocar infertilidad y/o disminución en el conteo espermático (Chichizola, 2012).

Se analizó el porcentaje de proliferación de diferentes subpoblaciones celulares como son los linfocitos T totales CD3+, LT cooperadores CD4+, LT citotóxicos CD8+ y linfocitos B CD19+. Existen reportes acerca de la proliferación celular en esplenocitos totales, pero muy pocos estudios se han basado en las investigaciones de subpoblaciones celulares específicas, (Neri et al. 2015). En este estudio, se observó un mayor porcentaje de proliferación en las hembras en todas las subpoblaciones celulares a diferencia de los machos en todos los tratamientos, lo que nos indica que los efectos observados en cuanto a los diferentes tratamientos presentan un carácter dimórfico. En los linfocitos T citotóxicos (CD8+), se observó un efecto inhibitorio en 2 concentraciones de BPA (100nM y 1µM), tanto en hembras como en machos, lo cual nos indica que el BPA a ciertas concentraciones es capaz de inhibir el efecto citotóxico de los LTCD8+. Estos resultados se pueden comparar con lo realizado por Neri en el 2015, en donde observó únicamente la disminución de la viabilidad de los LTCD8+, sin embargo, en este estudio no se menciona el sexo de los ratones utilizados y su edad (Neri et al 2015).

El segundo objetivo importante de este trabajo, fue evaluar la expresión del receptor a progesterona (PR), así como también del principal receptor a estrógenos (ER $\alpha$ ), en las células del sistema inmunológico. Como bien se sabe, las hormonas esteroideas son capaces de modular la respuesta del sistema inmunológico a través de sus receptores, y dichos efectos van a depender de la concentración de cada hormona en particular, así como del tipo celular y las isoformas de los receptores que se llegan a expresar en un determinado periodo (Nilsson S et al, 2001. Diel P, 2002).

Considerando lo anterior, se prosiguió con el análisis del porcentaje y nivel de expresión del receptor a progesterona (PR), así como el receptor a estrógenos (ER $\alpha$ ) en las diferentes subpoblaciones celulares de los linfocitos T y B expuestas a BPA *in vitro*. En la mayoría de las subpoblaciones celulares, tanto en el porcentaje de células positivas como en el nivel de expresión de PR, las hembras son las que expresan este receptor en mayor cantidad, sin embargo, en los LTCD8+ de machos, se observó incremento en el porcentaje de células que expresan PR, así como en su nivel de expresión en todas concentraciones de BPA. Por lo anterior, el cambio en el nivel de expresión de un receptor puede ser capaz de modificar la sensibilidad de una célula o de alguna hormona en particular. En el 2016, Gutierrez-Rodriguez realizo un estudio en diferentes células de alta proliferación, que incluyeron desde células embrionarias hasta células tumorales, y observó que la progesterona ejerce varios efectos inmunológicos, en el caso de los linfocitos B, reduce su actividad proliferativa, así como la disminución en la producción de anticuerpos.

El siguiente experimento que se realizó, fue el de analizar la expresión del principal receptor de estrógenos, el ER $\alpha$ , en las mismas subpoblaciones celulares anteriormente mencionadas. Se observó que la expresión del ER $\alpha$  es dimórfica en todas las subpoblaciones celulares analizadas, lo cual es un efecto relevante. Otro aspecto muy importante en este estudio, fue que en la mayoría de los grupos tratados con BPA, el tratamiento indujo un incremento en la expresión del ER $\alpha$ . Se sabe que altas concentraciones del 17 $\beta$ -estradiol, están asociadas a una menor

citotoxicidad de las células NK. Por lo cual, el aumento de la expresión del ER $\alpha$  en esta subpoblación, podría resultar en una mayor sensibilidad de dichas células. En los LTCD8+, se observó el mismo efecto que para las NK, lo cual nos podría indicar que en individuos expuestos a ciertas concentraciones de BPA, por ciertos periodos de tiempo, puede dar como resultado menor citotoxicidad de este tipo de células. Lo observado en este experimento, concuerda con lo reportado con Miao y colaboradores, quienes utilizaron un esquema de exposición gestacional, y reportan que la exposición a BPA en dosis de 40 y 400  $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$  disminuye la expresión del ER $\alpha$  en machos y se incrementa en hembras (Miao et al 2008).

Por otra parte, en este trabajo, se determinó la expresión de citocinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) y reguladoras (IL-10) en el sobrenadante de cultivos de esplenocitos, cada uno con su diferente tratamiento. Se encuentra reportado que el estradiol en concentraciones altas promueve una respuesta tipo Th2 (anti-inflamatoria), mientras que ha concentraciones bajas promueve una respuesta tipo Th1 (pro-inflamatorias), favoreciendo la producción de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Guzman et al 2011).

Dicho lo anterior, en la expresión de TNF- $\alpha$  en machos, se encontró una menor producción de dicha citocina en los grupos expuestos al BPA. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Byun y Kim en el 2005, quienes observaron una disminución en la producción de TNF- $\alpha$ . Sin embargo, ellos realizaron sus experimentos en la etapa adulta de los ratones y las dosis utilizadas difieren a las utilizadas en nuestro estudio (Byun et al 2005; Kim et al 2005). Este mismo efecto se observó en el caso del IFN- $\gamma$ , en donde también en los machos se observó la disminución de la producción de dicha citocina, sin embargo, estos resultados difieren con lo dicho por Yoshino y Youn, ya que ellos mencionan que la producción del IFN- $\gamma$  aumenta, pero este resultado puede ser debido a que su estudio se realizó en ratones adultos y el tratamiento del BPA fue por medio del agua de bebida (Yoshino et al 2003) y Youn activo los esplenocitos con Con-A (Youn et al 2002)

Con estos resultados obtenidos se puede especular que los machos en presencia de diversas concentraciones de BPA, si presentan un carácter menos proinflamatorio. Mientras que las hembras, en presencia del BPA aumenta su carácter pro-inflamatorio.

Por otra parte, la citocina inmunomoduladora IL-10, muestra el mismo comportamiento ya que los esplenocitos de hembras expuestas al BPA incrementan la producción de dicha citocina, mientras que en los machos la disminuyen a ciertas concentraciones de BPA. Los resultados de las hembras concuerdan con lo dicho por Lee et al quienes reportaron que los linfocitos T totales y B aumentaron la expresión de IL-10 (Lee et al 2010), sin embargo, la concentración utilizada por los autores, está por arriba de las utilizadas en este proyecto.

Los experimentos realizados en este proyecto son de gran ayuda para esclarecer la funcionalidad de las principales subpoblaciones celulares de los linfocitos T y B en roedores machos y hembras, expuestos a un disruptor endócrino como es el BPA y con ello poder saber que concentraciones de BPA pueden favorecer o inhibir funciones de las células inmunológicas, así como la expresión de receptores y producción de citocinas. Con los resultados obtenidos se tiene un gran avance en el conocimiento de la funcionalidad de las células inmunológicas, como son los linfocitos y con ello, poder seguir llevando a cabo experimentos que nos ayuden a evaluar más sobre el riesgo del uso de este compuesto y otros de su tipo como es el BPS y con ello poder seguir estudiando de forma más clara y específica la funcionalidad de otras células que conforman el sistema inmunológico.

## Conclusiones

Primeramente, la respuesta que presentan todos los subtipos celulares es dimórfica, así como también lo es el efecto del BPA.

En la evaluación de la proliferación de los LTc (CD8+), se observa una menor proliferación en hembras, lo cual muestra que la disrupción endócrina al BPA aumenta la sensibilidad de dichas células, disminuyendo con ello su citotoxicidad.

Dado que la exposición a BPA modificó los patrones de expresión del ER $\alpha$  en los subtipos celulares y considerando que el ER $\alpha$  es uno de los principales mecanismos de regulación de dichas células dentro de la red inmunoendócrina, probablemente sea causa de las alteraciones observadas.

La exposición al BPA incremento el porcentaje de expresión de PR en los LTh CD4+ y LTc CD8+ en machos.

Dado que la exposición a bajas concentraciones de 17 $\beta$ -estradiol, promueve una respuesta proinflamatoria Th1, es posible esta sea una causa por la cual en machos la producción de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , así como IL.10 se ve disminuida en las diferentes concentraciones de BPA.

## Referencias

1. Abbas AK., Lichtman AH. Pober J. S. 1997. Cellular and Molecular Immunology. 3ra edición. Edit Saunders pp 4,100.
2. Andrade-Ribeiro A, Pacheco-Ferreira A, Nóbrega da Cunha C, Mendes-Kling A. 2006. Disruptores endocrinos: potencial problema para la salud pública y medio ambiente. *Revista Biomédica*. 17: 146-150.
3. Ansar Ahmed S, Penhale WJ, Talal N. 1985. Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. Mechanisms of sex hormone action. *Am J Pathol*; 121(3):531-51.
4. Besedovsky HO, Rey A DEL. 1996. Immune-Neuro-Endocrine Interactions: Facts and Hypotheses. *Endocrine Reviews*.17(1):64-102. doi:10. 1210/edrv-17-1-64.
5. Camacho-Arroyo I, Hernandez Molina VI, Rivas-Suarez M, Guerra-Araiza C and Gonzalez-Moran MG. 2006. Changes in progesterone receptor isoforms content in the brain of immature, mature and aged male and female chickens. *General and comparative Endocrinology*. 150(3):381-385.
6. Campell KS, Backstrom G. Tiefenthaler and Palmer. 1994. CART: a conserved antigen receptor transmembrane motif. *Seminars in Immunology* 6:393.
7. Chichizola C. 2003. Disruptores endocrinos. Efectos en la reproducción. *Revista Argentina de endocrinología y Metabolismo*. 40, 172-188.
8. Correarle J, Arias M, Gilmore W.1998. Steroid hormone regulation of cytokine secretion by proteolipid protein-specific CD4+ T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects. *The Journal of Immunology*. 161: 3365-3374.
9. Curtis H, Schnek A and Massarini A. 2008. *Biología*. 7ª edición Buenos Aires. Medica Panamericana. 670-671.
10. Da Silva JA. 1999. Sex hormones and glucocorticoids: interactions with the immune system. *Annals of the New York Academy of Science*. 876(1):102-117.

11. De León-Nava M.A, Morales-Montor J. 2006. Dimorfismo sexual inmunitario: ¿pueden los esteroides sexuales polarizar de citocinas Th1/Th2. *Revista de Investigación Clínica*. 58(2):161-169.
12. Dodds E.C. & Lawson W. 1996. Synthetic estrogenic agents without the phenanthrene nucleus. *Nature*. 137:996.
13. Egilmez NK, Kilinc MO. 2010. Tumor-Resident CD8+ T-cell: The Critical Catalyst in IL-12- Mediated Reversal of Tumor Immune Suppression, *Archivum Immunologic et Therapiae Experimentalis (Warsz)*.58(6):399-405. Doi:10. 1007/s00005-010-0097-7.
14. Erlandsson MC, Jonsson CA, Islander U, Ohlsson C, Carlsten H. 2003. Oestrogen receptor specificity in oestradiol- mediated effects on B lymphopoiesis and immunoglobulin production in male mice. *Immunology*. 108(3):346-51.
15. FitzGerald R.E. & Wilks M.F. 2014. Bisphenol A- why an adverse outcome pathway framework needs to be applied. *Toxicology letters*. 230: 368-374.
16. Gal-Iglesias B, López-Gallardo M, Martín-Velasco AI, Pristo-Montalvo J. 2007. *Bases de la fisiología*. 2ª edición. Tébar. 378.
17. Gilmore W, Weiner LP, Correale J. 1997. Effect of estradiol on cytokine secretion by proteolipid protein-specific Tcell clones isolated from multiple t sclerosis patients and normal control subjects. *The Journal of Immunology*. 158:446-451.
18. Grimaldi CM, Cleary J, Dagtas AS, Moussai D, Diamond B.2002. Estrogen alters thresholds for B cell apoptosis and activation. *The Journal of Clinical Investigation*. June. 109(12):1625-33.
19. Grimaldi CM. 2006. Sex and systemic lupus erythematosus: the role of the sex hormones estrogen and prolactin on the regulation of autoreactive B cells. *Current Opinion in Rheumatology*. 18(5):456-61.
20. Groosman CJ. 1989. Possible underlying mechanism of sexual dimorphism in the immune response, fact and hypothesis. *Journal of steroid biochemistry*. 34(1-6):241-251.

21. Grossman CJ, Roselle GA. 1983. The interrelationship of the HPG-thymic axis and immune system regulation. *Journal of steroid biochemistry*. 19 (1B):461-467. <http://www.ncbi.nlm.gov/pubmed/6887881>. Accessed July 31, 2017.
22. Gutman A. Shoenfeld Y. 2015. Bisphenol A- an infamous molecule. *Harefuah*. 154(11): 708-10, 742,741.
23. Hill RW, Wyse GA. 2006. *Fisiología animal*. España. Medica Panamericana. 461.
24. Holladay SD, Xiao S, Diao H, Barber J, Nagy T, Ye X, Gogal RM Jr. 2010. Perinatal bisphenol A exposure in C57B6/129 male mice: potential altered cytokine/chemokine production in adulthood. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. July:7(7):2845-52.
25. Homo-Delarche F, Fitzpatrick F, Christeff N, Nunez EA, Bach J.F, Dardenne M. 1991. Sex steroids, glucocorticoids, stress and autoimmunity. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 40 (4-6):619-637.
26. Juan-García A. Gallego C. Font G. 2015. Toxicidad del Bisfenol A: Revisión. *Critical Reviews in Toxicology*. 32: 144-160.
27. Klein SL, Flanagan KL, 2016. Sex differences in immune responses. *Nature Reviews Immunology*. Advance on. Doi:10. 1038/nri2016.90.
28. Koolman J, Röhm K.H. 2004. *Bioquímica: texto y atlas*. 3ª ed Madrid: Medica Panamericana. 370-376.
- 0Labib Salem Mohammad Sohrab Hossain Kikuo Nomoto M, Labib Salem, M. 2000. 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- $\gamma$ . *International Archives of Allergy and Immunology* 121:121.
29. Lange CA, Yee D. 2009. Progesterona y cáncer de mama. *Revista del climaterio*. 12 (71):153-65.
30. Lee J, Lim KT. 2010. Plant originated glycoprotein (36kDa) suppresses interleukin-4 and 10 in bisphenol A stimulated primary cultured mouse lymphocytes. *Drug and Chemical Toxicology*. October;33(4):421-9.

31. Li DK, Zhou Z, Miao M, et al. 2011. Urine bisphenol A (BPA) level in relation to semen quality. *Fertility and Sterility*. 95: 625-30.
32. Lu SH, Canon TW, Chancellor MB. 2002. Antibiotic prophylaxis for urodynamics and estrogen therapy for urinary incontinence. *Reviews in Urology*. Summer;4(3):159-60.
33. Main KM, Mortensen GK, Kaleva MM, Boisen KA, Damgaard IN, Chellakooty M, Schmidt IM, Suomi AM, Virtanen HE, Petersen DV, Andersson AM, Toppari J, Skakkebaek, NE. 2006. Human breast milk contamination with phthalates and alterations of endogenous reproductive hormones in infants three months of age. *Environmental Health Perspectives*. 114(2): 270-276.
34. Maret A, Coudert JD, Garidou L, Foucras G, Goudry P, Krust A, Dupont S, Chambon P, Druet P, Bayard F, Guery JC. 2003. Estradiol enhances primary antigen-specific CD4 T cell responses and Th1 development *in vivo*. Essential role of estrogen receptor alpha expression in hematopoietic cells. *European Journal of Immunology*; 33:512-521.
35. Martinez Sitges L. <https://www.change.org/p/bpa-y-problemas-de-salud>
36. Miao S, Gao Z, Kau Z, Xu G, Su C, Liu N. 2008. Influence of bisphenol a on developing rat estrogen receptors and some cytokines in rats: a two generational study. *Journal of toxicology and environmental health*. 71(15):1000-8.
37. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Coffman RL. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of Immunology* 136:2348-2357.
38. Muñoz-Cruz S, Togno-Pierce C, Morales-Montor J. 2011. Non-reproductive effects of sex steroids: their immunoregulatory role.
39. Olea Nicolás. 2003. La exposición a disruptores endocrinos. Laboratorio de Investigaciones Médicas. Hospital Clínico. Universidad de Granada.
40. Piccini MP, Scaletti C, Maggi E, Romagnani S. 2000. Role of hormone-controlled Th1 and Th2- type cytokines in successful pregnancy. *J Neuroimmunol*; 109:30-33.

41. Ragusa A, de Carolis C, dal Lago A, Mirello D, Ruggiero G, Brucato A, Pisoni MP, Muscara M, Merati R, Maccario L, Nobili M. 2004. Progesterone supplement in pregnancy: an immunologic therapy *Lupus*;13:639-642.
42. Ross MH, Pawling W. 2008. *Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular*. 5ª edición, 2ª reimpresión. Buenos Aires. Medica Panamericana. 739-740.
43. Roden AC, Moser MT, Tri SD, Mercader M, Kuntz SM, Dong H, Hurwuitz AA, McKean DJ, Celis E, Leibovich BC, Allison JP, Kwon ED. 2004. Augmentation of T cell levels and responses induced by androgen deprivation. *The Journal of Immunology*. November 15;173(10):6098-108.
44. Salem ML, Matsuzaki G, Kishihara K, Madkour GA, Nomoto K. 2000. Beta-estradiol suppresses T cell-mediated delayed-type hypersensitivity through suppression of antigen-presenting cell function and Th1 induction. *International archives of Allergy and Immunology*. February;121(2):161-9.
45. Vom Saal FS, Cooke PS, Buchanan DL, et al. 1998. A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicology and Industrial Health*. 14:239-60.
46. Wilmore & Costill. 2007. *Fisiología del esfuerzo y del deporte*. 6ª edición. Editorial Paidotribo. 173-178.
47. Wira CR, Sandoe CP. 1997. Sex steroid hormone regulation of IgA and IgG in rat uterine secretions. *Nature*; 268:534-6.
48. Youn JY, Park HY, Lee JW, Jung IO, Choi KH, Kim K, Cho KH. 2002. Evaluation of the immune response following exposure of mice to bisphenol A: Induction of Th1 cytokine and prolactin by BPA exposure in the mouse spleen cells. *Archives of pharmacal research*. 25(6):946-953.
49. Yurino H, Ishikawa S, Sato T, Akadegawa K, Ito T, Ueha S, Inadera H, Matsushima K. 2004. Endocrine Disruptors (Environmental Estrogens) Enhance Autoantibody Production by B1 Cells. *Toxicological Sciences*; 81: 139-47.

