



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DIMÓRFICO DEL BISFENOL A (BPA) SOBRE
MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MONOCITOS DE SANGRE
HUMANA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

PAULINA AMAIRANI GARCÍA MARTÍNEZ



Ciudad Universitaria, Ciudad de México, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Enrique Ortega Soto

VOCAL: Profesor: Aliesha Araceli González Arenas

SECRETARIO: Profesor: Karen Elizabeth Nava Castro

1er. SUPLENTE: Profesor: Octavio Castro Escamilla

2° SUPLENTE: Profesor: Alberto García Lozano

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

CIRCUITO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA, S/N, CIUDAD UNIVERSITARIA, UNAM. CENTRO DE CIENCIAS DE LA ATMÓSFERA

ASESOR DEL TEMA: **DRA. KAREN ELIZABETH NAVA CASTRO**

SUPERVISOR TÉCNICO: **DRA. KAREN BOBADILLA LOZOYA**

SUSTENTANTE: **PAULINA AMAIRANI GARCÍA MARTÍNEZ**

RESUMEN

Los compuestos disruptores endócrinos (CDEs), como el bisfenol A (BPA) son sustancias capaces de alterar el estado de equilibrio hormonal, ya sea mimetizando o antagonizando su acción, provocando un desbalance. Éste no es sólo hormonal, sino también inmunológico, ya que es bien conocido que las células del sistema inmune poseen diferentes receptores hormonales, por lo que al ser expuestas a CDEs también se pueden ver afectadas sus funciones. En el presente proyecto se evaluó la capacidad de fagocitosis y presentación antigénica de macrófagos, que fueron expuestos a BPA 0.1 μ M durante su diferenciación de monocitos a macrófagos, en hembras y machos por separado. Se determinó la capacidad fagocítica tanto por microscopía confocal como por citometría de flujo, sin encontrar diferencias significativas en ambos casos. También se evaluó, indirectamente, la presentación antigénica mediante la producción de IFN- γ por linfocitos T CD4, encontrando un aumento que sólo es significativo en hombres ($P < 0.05\%$). Finalmente, se determinaron los niveles de ER- α en macrófagos, sin encontrar diferencias en su expresión. En conclusión, al diferenciar monocitos a macrófagos en presencia de BPA 0.1 μ M, no se encuentran diferencias en su capacidad fagocítica ni en la expresión de ER- α tanto en hombres como en mujeres, pero aumenta ligeramente su capacidad de presentación antigénica, particularmente en hombres.

Índice

INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	3
HORMONAS ESTEROIDES SEXUALES.....	3
RECEPTORES HORMONALES.....	4
RECEPTOR A ESTRÓGENOS.....	6
RECEPTOR A PROGESTERONA.....	7
RECEPTOR A ANDRÓGENOS.....	8
COMUNICACIÓN INMUNO-ENDÓCRINA.....	8
DIMORFISMO SEXUAL.....	9
DIMORFISMO SEXUAL INMUNITARIO.....	10
COMPUESTOS DISRUPTORES ENDÓCRINOS.....	11
BISFENOL A.....	13
EFECTOS DEL BPA EN LA SALUD.....	14
MACRÓFAGOS: PRIMER LÍNEA DE DEFENSA DEL SISTEMA INMUNE INNATO.....	16
FUNCIONES E IMPORTANCIA DE LOS MACRÓFAGOS.....	18
FAGOCITOSIS.....	18
PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN ANTIGÉNICA.....	19
EXPRESIÓN DE RECEPTORES HORMONALES EN MACRÓFAGOS Y SU FUNCIÓN.....	22
MACRÓFAGOS Y BPA.....	22
RETO ANTIGÉNICO: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	23
TUBERCULOSIS A NIVEL MUNDIAL.....	23
RESPUESTA INMUNE HACIA LA TUBERCULOSIS.....	24
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	26
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	27
HIPÓTESIS.....	27
OBJETIVOS.....	27
Objetivo General.....	27
Objetivos Particulares.....	28
MÉTODOS.....	28

RESULTADOS.....	32
DISCUSIÓN.....	39
CONCLUSIONES.....	41
PERSPECTIVAS.....	42
REFERENCIAS.....	42

ABREVIATURAS

AR	receptor a andrógenos
BCG	Bacilo de Calmette-Guerin
BPA	bisfenol A
CDE	compuesto disruptor endócrino
CFU-GM	unidades formadoras de colonias granulo-monocíticas
CFU-M	unidades formadoras de colonias monocíticas
CPA	célula presentadora de antígeno
DBD	dominio de unión al DNA
DHT	dihidrotestosterona
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPA	Agencia de Protección Ambiental
ER- α	receptor a estrógenos alfa
ER- β	receptor a estrógenos beta
EtOH	etanol
E2	estradiol
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
FHS	Hormona folículo estimulante
GM-CSF	factor estimulante de colonias ganulocito-macrófago
HIV	virus de inmunodeficiencia humana

LBD	dominio de unión a ligando
MDM	macrófagos derivados de monocitos
MHC II	complejo mayor de histocompatibilidad clase II
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
M-CSF	factor estimulante de colonias de macrófagos
NR	receptor nuclear
NO	óxido nítrico
NOAEL	nivel sin efecto adverso observable
PBMCs	células mononucleares de sangre periférica
PBS	buffer de fosfatos salino
PR	receptor a progesterona
rpm	revoluciones por minuto
SFB	suero fetal bovino
UFC	unidades formadoras de colonia
WHO	Organización Mundial de la Salud

INTRODUCCIÓN.

Originalmente, se creía que los sistemas endócrino, inmunológico y neuronal eran entidades aisladas que se regían por sí solas, sin embargo, en los últimos años las investigaciones han comprobado que en realidad estos tres sistemas son capaces de comunicarse y regularse entre sí (Besedovsky & Del-Rey, 1996). Dentro de esta red, el eje inmuno-endócrino se comunica por medio de citocinas (sistema inmunológico) y hormonas (sistema endócrino) (Haddad *et al.*, 2002).

Por un lado, dentro del sistema endócrino, las hormonas esteroides sexuales son sustancias producidas principalmente en las gónadas (ovarios y testículos), las cuales llevan a cabo diferentes roles fisiológicos, tanto en la proliferación celular, diferenciación, homeostasis y función cerebral, entre otros (Camacho-Arroyo, 2002; García-Gómez *et al.*, 2013). Se sabe que un fenotipo hembra está caracterizado por elevaciones cíclicas de estrógenos y progesterona, mientras que un fenotipo macho está caracterizado por altas concentraciones de andrógenos (De León-Nava *et al.*, 2006; Hernández-Cervantes *et al.*, 2010). Además, se conoce que las mujeres son más susceptibles a sufrir enfermedades autoinmunes (De León-Nava *et al.*, 2006; Mor *et al.*, 2003), mientras que los hombres son más susceptibles a infecciones bacterianas y virales (García-Gómez *et al.*, 2013; Klein, 2000). Por lo tanto, se han identificado a las hormonas como una de las causas del dimorfismo sexual inmunitario

Además de las hormonas, existen los llamados compuestos disruptores endócrinos, que son sustancias capaces de alterar el estado de equilibrio hormonal. El disruptor endócrino más conocido es el bisfenol A, el cual se utiliza para la fabricación de numerosos artículos plásticos, el cual

entra al organismo al liberarse de su matriz plástica y entrar en contacto con los alimentos y/o bebidas que ingerimos.

Por otra parte, los macrófagos son células del sistema inmune innato, los cuales derivan de los monocitos circulantes en sangre que migran hacia los tejidos y en donde llevan a cabo diferentes roles para mantener la homeostasis del tejido (Duque-Correa & Rojas-López, 2007). Dentro de sus principales funciones se encuentran la fagocitosis, la producción de citocinas y el procesamiento y presentación antigénica, por lo que se vuelven uno de los principales comunicadores entre la inmunidad innata y la adaptativa.

Es bien conocido que las células del sistema inmune poseen receptores hormonales (Muñoz-Cruz *et al.*, 2011), por lo tanto, las hormonas sexuales pueden ejercer efectos sobre sus funciones. Así, por ejemplo, se conoce que bajas concentraciones de estradiol promueven la producción de citocinas pro-inflamatorias por parte de los macrófagos (Marriot & Huet-Hudson, 2006; Chao *et al.*, 1995).

De esta forma, al ser el bisfenol A un disruptor endócrino de carácter estrogénico, puede también ejercer efectos sobre la función del macrófago. Couleau y colaboradores descubrieron que el BPA disminuía la capacidad fagocítica *in vitro* de macrófagos derivados de monocitos de una línea celular de manera concentración-dependiente (Couleau *et al.*, 2015). Pero poco se sabe de los efectos que tiene sobre su capacidad de procesamiento y presentación antigénica, además de que no se han hecho investigaciones desde un enfoque dimórfico.

ANTECEDENTES.

HORMONAS ESTEROIDES SEXUALES.

Las hormonas esteroides sexuales son sustancias químicas lipídicas formadas a partir del colesterol, producidas principalmente en las gónadas (ovarios y testículos), la glándula adrenal, la placenta y el sistema nervioso (Camacho-Arroyo, 2002; Gómez-Chang *et al.*, 2012). Estas hormonas llevan a cabo diferentes roles fisiológicos, tanto en la diferenciación, el desarrollo, la proliferación celular, apoptosis, homeostasis y la función cerebral, entre otros (García-Gómez *et al.*, 2013).

Dentro de estas sustancias, las más importantes son el 17 β -estradiol (estrógeno), la progesterona (progestágeno) y la testosterona (andrógeno) (Figura 1).

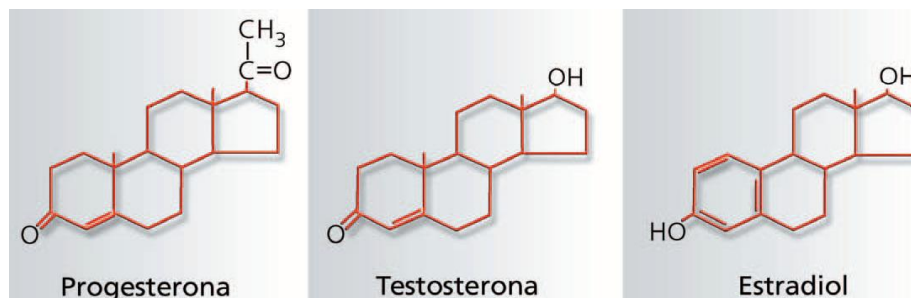


Figura 1. Estructura química de la testosterona, progesterona y estradiol. Tomado de Camacho-Arroyo, 2002.

El 17 β -estradiol (E2) es el estrógeno más potente y la forma más común en el organismo (De León-Nava *et al.*, 2006), seguido de la estrona y, en menor cantidad, el estriol (Serrano *et al.*, 2001) (Figura 2). El estradiol es un regulador del crecimiento, diferenciación y función de una amplia variedad de tejidos, incluyendo los órganos reproductivos de machos y hembras (Hall *et al.*, 2001).

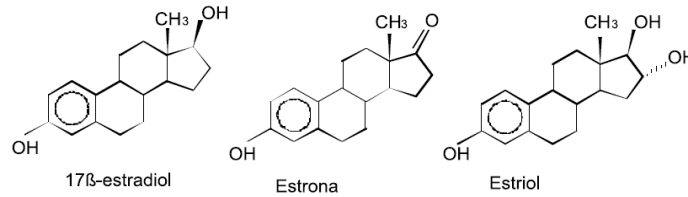


Figura 2. Estructura de los estrógenos más importantes en mamíferos. Tomada de *Serrano et al., 2001.*

Dentro del grupo de las progestinas, la más importante es la progesterona, ya que esta hormona es esencial para el establecimiento y mantenimiento del embarazo (De León-Nava *et al.*, 2006).

Por otro lado, los dos andrógenos más importantes son la testosterona y su metabolito, la dihidrotestosterona (DHT), los cuales son los responsables del desarrollo del fenotipo macho durante la embriogénesis y ayuda a la maduración de órganos sexuales masculinos durante la pubertad (Marcos-Becerro, 2008; Keller *et al.*, 1996; De León-Nava *et al.*, 2006) así como el mantenimiento de la espermatogénesis (Heinlein & Chang, 2002).

RECEPTORES HORMONALES.

Para que una hormona pueda ejercer algún efecto sobre su célula o tejido blanco, éstos deben poseer receptores para estas hormonas. Dentro de los receptores hormonales a esteroides sexuales se encuentran los receptores a estrógenos (ER, por sus siglas en inglés), progesterona (PR) y andrógenos (AR). Estos receptores pertenecen a la familia de receptores nucleares (NRs), los cuales son factores de transcripción ligando-dependientes, es decir, sólo pueden ejercer su acción sobre el DNA cuando se encuentran unidos a su ligando.

Estos receptores poseen tres dominios importantes (Figura 3):

- Dominio de unión al DNA (DBD): comprende la región C del receptor y como su nombre lo dice, es el dominio que se une a secuencias específicas del DNA. Este dominio es el más conservado entre los diferentes NRs.
- Dominio de unión a ligando (LBD): se localiza en el extremo carboxilo terminal (región E/F) del receptor. Es aquí donde se une la hormona, por lo que es altamente específico.
- Dominios de transactivación (AF-1 y AF-2): son esenciales para la activación de la transcripción. El AF-1 se encuentra en la región A/B (extremo amino terminal), es independiente de ligando y es la región menos conservada entre los NRs. El AF-2 se encuentra en la zona E/F y es dependiente de ligando.

La región D o "bisagra" participa en la unión a proteínas inhibitorias, como es el caso de la proteína chaperona de golpe de calor Hsp90.

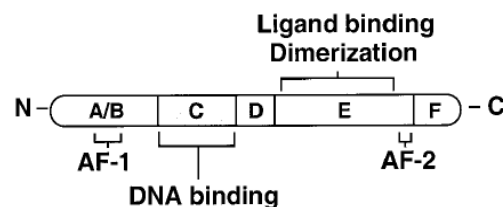


Figura 3. Estructura de los receptores nucleares. Tomado de *Aranda & Pascual, 2001*.

Una vez que se une a su ligando, el receptor se activa y se generan cambios conformacionales, con lo que se libera de las proteínas inhibitorias y se une a sus elementos de respuesta en el DNA, en las

regiones reguladoras de genes blanco (Aranda & Pascual, 2001; Ortega-Domínguez *et al.*, 2015; Sanhueza & Valenzuela, 2006).

RECEPTOR A ESTRÓGENOS.

Existen dos isoformas del receptor a estrógenos, que son codificadas por diferentes genes y en distintos cromosomas y cuya expresión depende del tipo de tejido: el ER- α , el cual se expresa predominantemente en útero, glándulas mamarias y hueso, y el ER- β que tiene acciones predominantes en el sistema nervioso central (SNC) y el sistema inmune. La internalización de ER al núcleo, al igual que PR y AR, tiene dos mecanismos de acción (Figura 4). El mecanismo clásico o genómico, en el que, mediante una proteína chaperona, el estrógeno entra a la célula blanco y tras unirse al ER que se encuentra en el citosol logra entrar al núcleo y unirse a los genes blanco, promoviendo su transcripción. El mecanismo no genómico involucra el receptor membranal de ER (mER) o las proteínas GPR30, los cuales desencadenan una cascada de señalización dentro de la célula, que de igual manera culminan en su internalización en el núcleo de la célula, unión a genes blanco e inducción de la transcripción (Coyoy *et al.*, 2016; Noriega-Reyes & Langley, 2008).

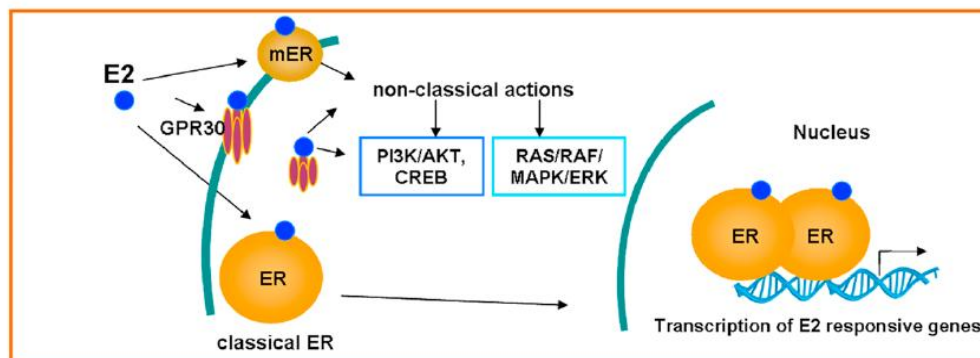


Figura 4. Estradiol y receptor a estrógenos. Tomado de Coyoy *et al.*, 2016.

Los estrógenos juegan un importante rol en el desarrollo y mantenimiento de funciones sexuales y reproductivas (Heldring *et al.*, 2007). Sin embargo, diversos estudios han demostrado que los estrógenos promueven el crecimiento de tumores mamarios en animales e incrementan la proliferación de células cancerosas humanas *in vitro* (Cóppola *et al.*, 2005).

RECEPTOR A PROGESTERONA.

El receptor a progesterona fue el primero de los receptores nucleares en el que se descubrió que existían dos isoformas: PR-A y PR-B. Estas isoformas derivan de un mismo gen y se transcriben mediante splicing alternativo, es decir, están reguladas por regiones independientes dentro del mismo promotor génico (Ellman *et al.*, 2009), por lo que poseen diferentes funciones (Yen *et al.*, 2001; Mendoza, 2008; Tanos *et al.*, 2012). El PR-A es un represor dominante del PR-B, de una manera específica de célula y promotor (Cork *et al.*, 2008) y se sabe que es la isoforma necesaria para que se lleve a cabo la ovulación (Marcos-Becerro, 2008).

La progesterona, junto con los estrógenos, produce un endometrio secretor para que se pueda llevar a cabo la gestación. En las glándulas mamarias actúa induciendo el desarrollo alveolar, preparándola para la lactancia (Mendoza-Patiño, 2008). Pero se ha demostrado que, a pesar de que la progesterona es importante para el desarrollo de la glándula mamaria, es también una vía de riesgo para el desarrollo de cáncer de mama (Hilton *et al.*, 2015).

RECEPTOR A ANDRÓGENOS.

El receptor a andrógenos (AR, por sus siglas en inglés) es un elemento regulador y esencial en la función y desarrollo reproductivo en machos, incluyendo la espermatogénesis (Krüger *et al.*, 2008). Las dos isoformas más comunes son el AR-A y el AR-B, siendo la isoforma A (87 kDa) la forma truncada de la forma B (110 kDa). Ambas isoformas se expresan a lo largo de todo el organismo en gran variedad de tejidos, pero en mayor concentración en órganos sexuales accesorios masculinos (vesículas seminales y próstata) (Liegibel *et al.*, 2003; Marcos-Becerro, 2008).

COMUNICACIÓN INMUNO-ENDÓCRINA.

Después de largos años de investigación, hoy en día se sabe que el sistema inmune, endócrino y neuronal no son entidades aisladas, sino que son capaces de comunicarse y regularse entre ellas. Así, las células del sistema inmune, endócrino y neuronal poseen receptores para citocinas, hormonas, neurotransmisores y neuropéptidos, creando una red de comunicación en todo el organismo (Besedovsky & Del-Rey, 1996).

Dentro de esta red, el eje inmuno-endócrino ha ido cobrando mayor importancia, sobre todo en enfermedades autoinmunes. En este eje, la comunicación se da por medio de sus mediadores solubles: las citocinas por parte del sistema inmune y las hormonas por el sistema endócrino,

creando así una comunicación que es tanto directa como bidireccional (Figura 5) (Besedovsky & Del-Rey, 1996; Haddad *et al.*, 2002).

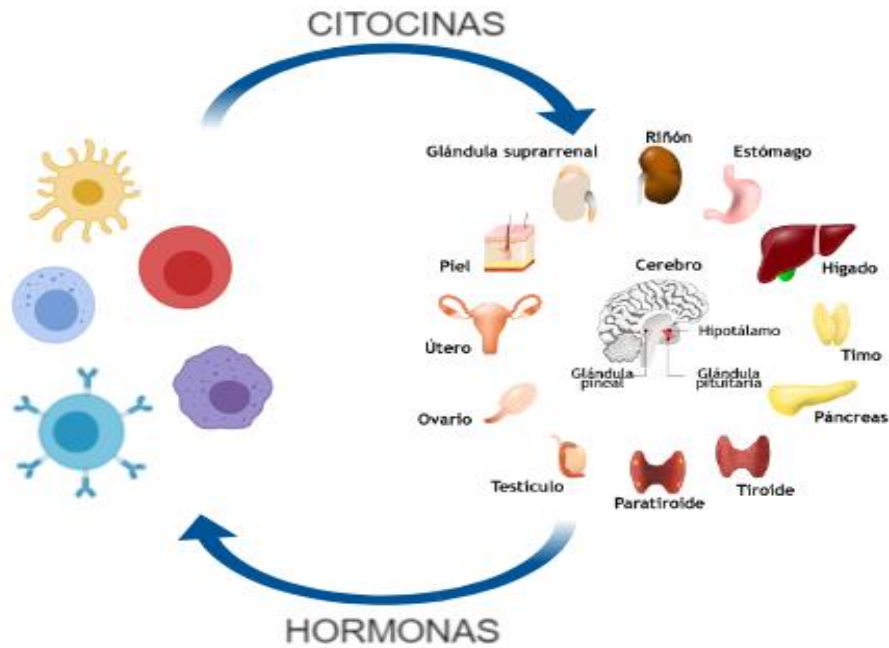


Figura 5. Comunicación inmuno-endócrina.

De esta forma, los productos de la respuesta inmune pueden afectar el funcionamiento del sistema endócrino, mientras que las hormonas esteroides pueden modificar directamente la actividad de las células del sistema inmune (D'Attilio *et al.*, 2018).

DIMORFISMO SEXUAL.

Gracias a los largos años de investigación enfocados en el papel que desempeñan las hormonas sexuales en el organismo, en la actualidad es una herramienta clave en las investigaciones de ciertas enfermedades. Está establecido que, generalmente, el fenotipo hembra está

caracterizado por elevaciones cíclicas de estrógenos y progesterona, mientras que un fenotipo macho se caracteriza por altos niveles de andrógenos (De León-Nava *et al.*, 2006; Hernández-Cervantes *et al.*, 2010).

Por estas variaciones hormonales es cada vez más común encontrar ciertas enfermedades que se presentan mayoritariamente en un género que en otro. Por ejemplo, el cáncer de mama encabeza la lista de tipos de cáncer más frecuentes alrededor del mundo entre el sexo femenino, mientras que el cáncer de pulmón es el de mayor incidencia en el sexo masculino (GCO, 2018).

DIMORFISMO SEXUAL INMUNITARIO.

Como se mencionó anteriormente, las hormonas desempeñan un rol fundamental en la homeostasis del sistema endócrino. Pero, además, las hormonas tienen un papel importante dentro del sistema inmune, ya que influyen en el tránsito celular, la proliferación de linfocitos, la expresión de receptores del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC II) y la producción de citocinas (De León-Nava *et al.*, 2006).

También se sabe que las mujeres tienen la capacidad de montar mejores respuestas inmunes humorales y mediadas por células (Ruggieri *et al.*, 2016; Bhatia *et al.*, 2014) que los hombres, esto debido, en parte, a que los estrógenos estimulan la producción de inmunoglobulinas por células plasmáticas (Mirandola *et al.*, 2015).

Las hormonas esteroideas tienen la capacidad de alterar genes y comportamientos que influyen en la susceptibilidad a las infecciones

(Klein, 2000). De este modo, se sabe que los humanos y animales con fenotipo macho son más susceptibles a infecciones parasitarias, bacterianas y virales (García-Gómez *et al.*, 2013; Klein, 2000), mientras que las hembras son más susceptibles a sufrir enfermedades autoinmunes, sobre todo en la edad reproductiva (De León-Nava *et al.*, 2006; Mor *et al.*, 2003), tales como artritis reumatoide, esclerosis múltiple y lupus eritematoso sistémico (Jansson & Holmdahl, 1998; Verthelyi *et al.*, 2001).

A causa de estas diferencias es que las investigaciones actuales deben basarse en el estudio de mujeres y hombres por separado, para determinar si la respuesta hacia un mismo estímulo es igual entre ambos sexos o se muestran diferencias que puedan ser de ayuda para entender el desarrollo de ciertas enfermedades y poder desarrollar inmunoterapias adecuadas a cada individuo (Capone *et al.*, 2018).

COMPUESTOS DISRUPTORES ENDÓCRINOS.

En los últimos años, se han ido asociando cada vez más ciertas enfermedades, sobre todo aquellas que incluyen alteraciones endócrinas, a la exposición a compuestos disruptores endócrinos. Estos compuestos son capaces de alterar la homeostasis del sistema endócrino, al provocar un desequilibrio hormonal mediante diferentes mecanismos de acción (Serrano *et al.*, 2001).

Los compuestos disruptores endócrinos (CDEs) son sustancias exógenas (naturales o sintéticas) que interrumpen las propiedades endócrinas habituales, ya sea imitando o bloqueando la acción de diferentes hormonas, alterando el patrón de síntesis y metabolismo hormonal y/o

modificando los niveles de expresión de los receptores hormonales (Rattan *et al.*, 2017; Rogers *et al.*, 2013; Serrano *et al.*, 2001).

Estudios en animales han mostrado que los CDEs pueden afectar el desarrollo sexual y la fertilidad, sobre todo cuando se está expuesto en etapas tempranas del desarrollo, como la etapa prenatal y neonatal (Zawatski & Lee, 2013).

En la Tabla 1, Diamanti-Kandarakis y cols. enlistan algunos desórdenes reproductivos en mujeres y hombres, en diferentes etapas del desarrollo, que se asocian a la exposición a compuestos disruptores endócrinos, tales como el bisfenol A, ftalatos y el dietilestilbestrol. Estos desórdenes van desde el desencadenamiento de una pubertad prematura, hasta el desarrollo de cáncer en una etapa adulta.

	Fetal/neonatal	Prepubertal	Pubertal	Adult
Processes	Intrauterine growth Sexual differentiation	Adrenarche	Gonadarche	Spermatogenesis Ovulation Hormonal control of prostate, breast, uterus, and lactation
Male disorders	IUGR (15) Cryptorchidism (14, 20) ^a Hypospadias (14, 20) ^a	Premature pubarche	Small testes and high FSH (18) Early puberty (25) Delayed puberty (25)	Oligospermia (14, 20) ^a Testicular cancer (14, 20) ^a Prostate hyperplasia (24)
Female disorders	IUGR	Premature thelarche (25) Peripheral precocious puberty (17) Premature pubarche (18)	Secondary central precocious puberty (17, 27) PCOS (18, 25) Delayed ovulatory cycles (17, 18)	Vaginal adenocarcinoma (19, 28) Disorders of ovulation (29) Benign breast disease (29, 31) Breast cancer (30, 31) Uterine fibroids (29) Disturbed lactation (29)

^a Cryptorchidism, hypospadias, oligospermia and testicular cancer are four components of the "testicular dysgenesis syndrome" as a common entity.

Tabla 1. Dimorfismo sexual de los desórdenes del sistema reproductivo humano en diferentes etapas del desarrollo en donde intervienen los CDEs. Tomado de *Diamanti-Kandarakis et al.*, 2009.

Además, se sabe que los CDEs pueden interferir con la respuesta de defensa del sistema inmune contra patógenos externos (Yeh *et al.*, 2010) y diferentes estudios han mostrado que estos químicos afectan directamente el sistema inmune innato (Couleau *et al.*, 2015).

BISFENOL A.

El bisfenol A (BPA por sus siglas en inglés) es un compuesto orgánico que contiene dos grupos hidroxilo en su estructura (Figura 6), lo que lo hace similar al dietilelbestrol, el cual es un estrógeno sintético muy potente (Mlynarčíková *et al.*, 2005; Dodds & Lawson, 1936), así como al estradiol. El BPA es un disruptor endócrino, con actividad estrogénica (Roberts, 2012): tiene la capacidad de unirse al ER- β y actuar como agonista y puede actuar como agonista o antagonista del ER- α *in vitro* (Rogers *et al.*, 2013), pero en ambos casos se une con poca afinidad (comparado con el estradiol).

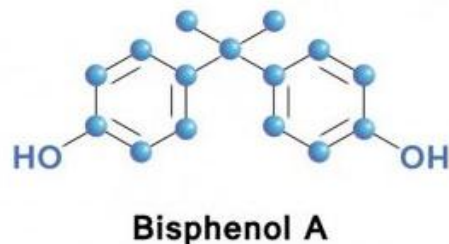


Figura 6. Estructura química del bisfenol A (BPA)

El BPA es ampliamente usado en la industria manufacturera para la producción de plásticos de policarbonato y resinas epóxicas, por lo que se encuentra en muchos productos de uso cotidiano, tales como recipientes y botellas de plástico, en el recubrimiento de latas con

alimentos, en papel térmico (usado para los tickets en supermercados), biberones, juguetes e incluso selladores dentales. Este compuesto puede liberarse de estos materiales cuando son expuestos a altas temperaturas o condiciones ácidas, provocando así la exposición a este compuesto (Palacios-Arreola *et al.*, 2017; Qlong *et al.*, 2017; Yeh *et al.*, 2010). Además, se sabe que el BPA puede absorberse por la piel, respirarse en aire contaminado o ingiriéndolo en agua o comida contaminada (Yeh *et al.*, 2010; Neri *et al.*, 2015).

De acuerdo con el Comité Científico de Alimentos (SCF por sus siglas en inglés) de la Comisión Europea, el consumo diario tolerable de BPA es de 10 µg/kg/día, mientras que la EPA (Agencia de Protección Ambiental) y la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos) en Estados Unidos establecen un máximo aceptable o "dosis de referencia" de 50 µg/kg/día como NOAEL (nivel sin efecto adverso observable) (BPA, 2019).

Diversos estudios han determinado la presencia de BPA en fluido amniótico humano, fluido folicular, semen, tejido placentario, sangre del cordón umbilical y leche materna (Teixeira *et al.*, 2016; Schonfelder *et al.*, 2002; Kuruto-Niwa *et al.*, 2007; Ikezuki *et al.*, 2002). Es decir, un organismo puede entrar en contacto con esta sustancia desde etapas críticas de su desarrollo, lo que puede afectarlo no sólo a corto plazo, sino que los efectos negativos pueden hacerse notorios hasta la etapa adulta.

EFFECTOS DEL BPA EN LA SALUD.

Al ser un disruptor endócrino, el BPA ha sido asociado con desórdenes reproductivos en ambos sexos. Por nombrar algunos ejemplos, en las

mujeres se ha asociado con el desarrollo de la enfermedad de ovario poliquístico y abortos espontáneos, mientras que en los hombres se ha observado un conteo de espermatozoides bajo y anomalías en los genitales (Fenichel *et al.*, 2013; Rochester, 2013). Mlynarčíková y cols demostraron que el BPA en rangos de concentración de 10^{-4} a 10^{-8} M inhibe la producción de estradiol inducida por la hormona folículo estimulante (FSH) e incrementa la producción de progesterona en células porcinas de la granulosa ovárica después de 72 h de incubación (Mlynarčíková *et al.*, 2005).

Pero, además, se ha vinculado al BPA con otras enfermedades tales como la diabetes, la obesidad, enfermedades vasculares y respiratorias e incluso con cáncer de seno, enfermedades que son principales causas de muerte a nivel mundial (Eladak *et al.*, 2015; WHO, 2016).

En efecto, en los últimos años el BPA se ha asociado con enfermedades tales como la obesidad y el cáncer. En un estudio *in vivo*, Palacios-Arreola y cols. demostraron que la exposición a una sola dosis de BPA en ratones en etapa neonatal favorecía el desarrollo de tumores mamarios en etapa adulta, inducidos con la línea celular 4T1, de mayor peso y tamaño, cuando se comparaba con los ratones no expuestos (Palacios-Arreola *et al.*, 2017).

Al ser una sustancia lipofílica, se ha demostrado que el BPA tiene la capacidad de acumularse en el tejido adiposo. La exposición al BPA en ratones en etapa fetal o perinatal ocasiona un incremento de peso en el adulto, asociado a síndrome metabólico (Fenichel *et al.*, 2013). Además, Hugo y cols. demostraron que a concentraciones de 0.1 y 1 nM el BPA inhibía la liberación de adiponectina por adipocitos, la cual es una hormona necesaria para aumentar la sensibilidad a la insulina y reducir la inflamación (Hugo *et al.*, 2008).

MACRÓFAGOS: PRIMER LÍNEA DE DEFENSA DEL SISTEMA INMUNE INNATO.

Los macrófagos tisulares residen en casi todos los tejidos y son la forma madura de los monocitos, los cuales circulan en la sangre y migran continuamente hacia los tejidos, en donde se lleva a cabo su diferenciación. Son células que producen un gran número de sustancias, entre ellas: citocinas, hormonas polipeptídicas, componentes del complemento, factores de coagulación, enzimas, inhibidores de enzimas, proteínas de la matriz extracelular, proteínas acarreadoras y hormonas de tipo esteroide (Nathan, 1987).

Esta estirpe celular pertenece al sistema fagocito mononuclear, los cuales se generan en médula ósea a partir de células hematopoyéticas pluripotenciales. Estas células pluripotenciales dan origen a los progenitores mieloides comunes, que incluyen las unidades formadoras de colonias granulo-monocíticas (CFU-GM) y las unidades formadoras de colonias monocíticas (CFU-M) y después a monoblastos, promonocitos y luego monocitos, los cuales salen de médula ósea y pasan a torrente sanguíneo, donde circulan continuamente hasta migrar a los tejidos, donde ocurre la diferenciación a macrófagos.

Toda esta ruta de diferenciación está influenciada por interleucina 3 (IL-3), el factor estimulante de colonias de granulocito-macrófago (GM-CSF) y el factor estimulante de colonias de macrófago (M-CSF) (Duque-Correa & Rojas-López, 2007; Mayani *et al.*, 2007).

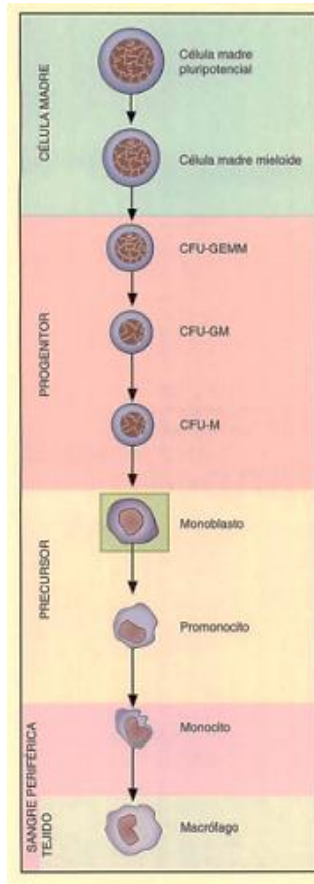


Figura 7. Sistema fagocito mononuclear. Tomado de *Carr & Rodak, 2010*.

La presencia de diferentes estímulos en el ambiente del tejido es el que determinará la activación o polarización de los macrófagos, influenciando así su fenotipo y función (Tabatabaei-Zayareh *et al.*, 2017). De este modo, dependiendo del ambiente en el que se encuentren, los macrófagos pueden asumir una polarización ya sea de tipo M1 (activados clásicamente) o M2 (activados alternativamente).

Los macrófagos M1 son activados por IL-12 e IFN- γ y son generalmente pro-inflamatorios, en función de la producción de citocinas tales como IL-1, IL-6, TNF- α e iNOS, así como mostrar un aumento en la expresión de MHC-II, CD86 (molécula coestimuladora) y en la presentación antigénica (asociada con células Th1), por lo que se ve aumentada su

capacidad de matar microorganismos intracelulares. En contraste, los macrófagos M2 son estimulados por IL-4, IL-13, IL-21 e IL-33 y se asocian a respuestas anti-inflamatorias al producir sustancias como IL-10 y TGF- β e inhibir la producción de IFN- γ (Kou *et al.*, 2015; Duque-Correa & Rojas-López, 2007; Mosser & Edwards, 2008; Solís-Martínez *et al.*, 2015).

Una vez diferenciados, los macrófagos llevan a cabo funciones especializadas en el tejido donde se encuentran. Su principal función incluye el mantenimiento de la homeostasis tisular (eliminan células muertas y restos celulares y secretan factores de crecimiento, proteínas de la matriz extracelular, etc.) y la respuesta hacia microorganismos, ya que median la respuesta inmune innata y contribuyen a la inmunidad adaptativa a través del procesamiento y presentación de antígeno (células presentadoras de antígeno o CPA), expresión de moléculas coestimuladoras y producción de citocinas (Duque-Correa & Rojas-López, 2007).

FUNCIONES E IMPORTANCIA DE LOS MACRÓFAGOS.

FAGOCITOSIS.

La fagocitosis es un proceso mediante el cual algunas células pueden reconocer e internalizar partículas de 1 μm de diámetro o mayores (Greenberg & Grinstein, 2002; Jutras & Desjardins, 2005) y de este modo degradan células muertas y agentes infecciosos tales como bacterias (Aderem & Underhill, 1999).

En este proceso, los patógenos son rodeados por la membrana de fagocitos, como los macrófagos, y luego internalizados en una vesícula conocida como fagosoma. A continuación, el fagosoma se acidifica y se fusiona con el lisosoma, formando así el fagolisosoma, liberando el contenido lisosómico, con el cual se puede atacar al patógeno.

Este proceso de fagocitosis puede incluir inicialmente el proceso conocido como opsonización, en el cual los patógenos son reconocidos y rodeados por proteínas, como el factor C3b del complemento o anticuerpos IgG, con lo cual se favorece y potencia la fagocitosis (Figura 8) (Rojas-Espinoza, 2001; Murray & Wynn, 2011).

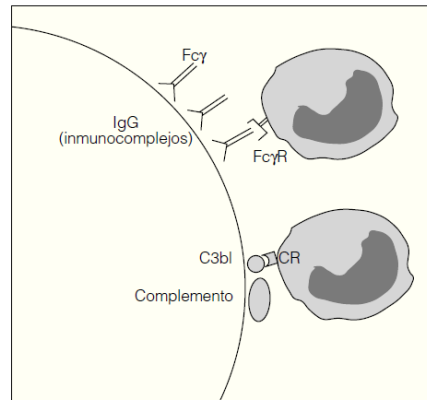


Figura 8. Unión de macrófagos a patógenos mediante reconocimiento de C3b y Fcy.

Tomado de *González-Lara & Marín-Jiménez, 2006.*

PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN ANTIGÉNICA.

Una vez que los macrófagos han fagocitado a su blanco, es momento de llevar a cabo el procesamiento y su posterior presentación de antígenos.

Existen algunas clases de agentes patógenos, como *Mycobacterium tuberculosis*, que se replican dentro de vesículas intracelulares. Una vez que los macrófagos se han activado, dentro de estas vesículas las

proteínas de los patógenos son reducidas y degradadas por proteasas, produciendo fragmentos peptídicos, los cuales se unen a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC II, por sus siglas en inglés).

Las moléculas del MHC II se encuentran ancladas al retículo endoplásmico de las células presentadoras de antígeno, unidos a la molécula llamada cadena invariable o cadena Ii (generalmente se encuentran como complejos formados por tres moléculas de MHCII con su respectiva cadena Ii). Esta última molécula bloquea el sitio de interacción del MHCII con el péptido microbiano. Los complejos MHC II-cadena Ii son empacados en el aparato de Golgi en vesículas que posteriormente se fusionarán con el fagolisosoma que contiene los péptidos microbianos. Las proteasas presentes en el fagolisosoma remueven la cadena Ii, dejando un pequeño fragmento peptídico en el sitio de unión del MHC con el péptido microbiano, llamado CLIP. Este CLIP es removido por la molécula HLA-DM, por la que tiene mayor afinidad. Así, el péptido microbiano puede unirse al MHC II (Figura 9) (Rojas-Espinoza, 2001; Murphy *et al.*, 2009; Hiltbold & Roche, 2002).

De esta forma los fragmentos peptídicos son llevados a la superficie celular, donde son reconocidos por los linfocitos T cooperadores, mediante el receptor de células T (TCR).

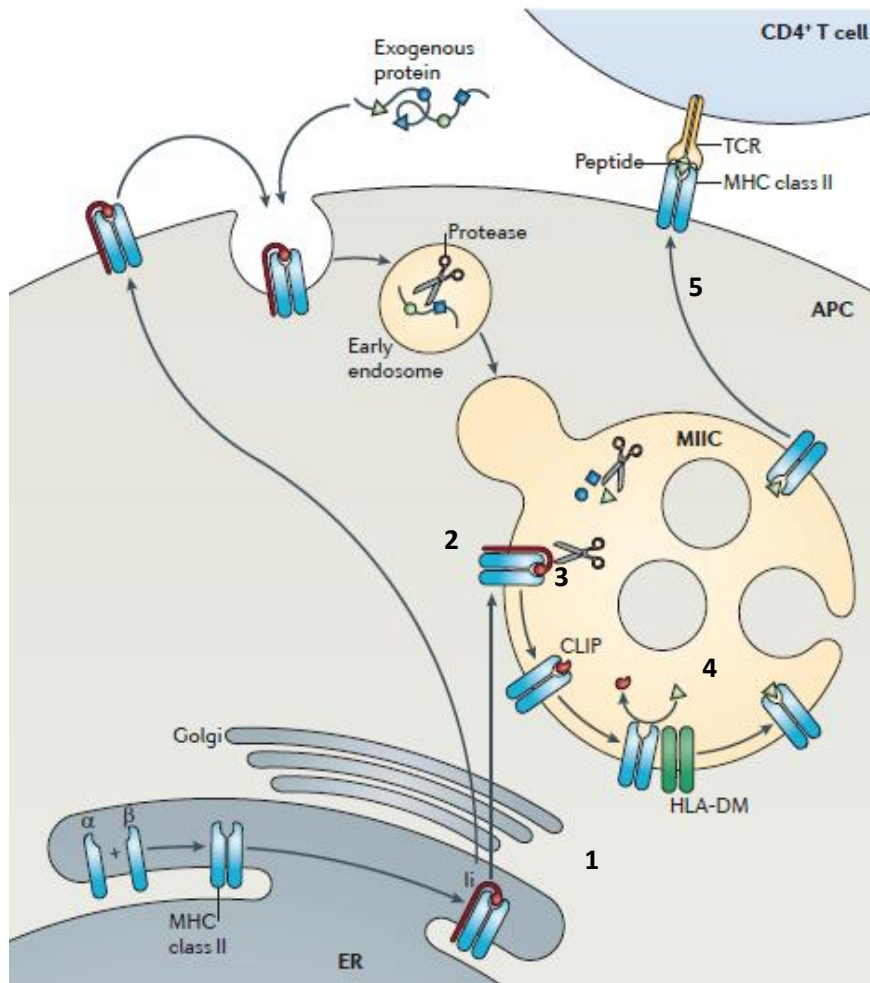


Figura 9. Procesamiento y presentación antigénica por medio del MHC clase II. 1) Las cadenas α y β del MHC II se ensamblan en el retículo endoplásmico (ER) junto con la cadena invariable (Ii) y se empaquetan en vesículas en el aparato de Golgi. 2) El complejo MHC II-Ii se fusiona con el fagolisosoma. 3) Las proteasas degradan tanto a la proteína fagocitada como a la cadena Ii, dejando al péptido CLIP. 4) El CLIP es removido gracias a que tiene mayor afinidad por la molécula HLA-DM. 5) El complejo MHC II-péptido microbiano sale a la superficie celular para presentar el antígeno a las células T. Tomado de Neefjes *et. al.*, 2011.

EXPRESIÓN DE RECEPTORES HORMONALES EN MACRÓFAGOS Y SU FUNCIÓN.

Está establecido que los macrófagos son capaces de expresar ER (α y β), PR y AR. El efecto que los esteroides sexuales puedan tener sobre los macrófagos depende de la concentración, el tipo de esteroides y el contexto en el que los macrófagos sean estudiados (Muñoz-Cruz *et al.*, 2011; Klein *et al.*, 2015).

Ya que los macrófagos expresan receptores a estrógenos, existe evidencia que sugiere que los estrógenos pueden alterar sus funciones de una manera dosis-dependiente (Marriott & Huet-Hudson, 2006). Así, por ejemplo, se ha reportado que dosis bajas de estrógenos aumentan la producción de TNF- α e IL-6 por esta estirpe celular, citocinas que son pro-inflamatorias (Marriot & Huet-Hudson, 2006; Chao *et al.*, 1995), estimulan la secreción de óxido nítrico (Chao *et al.*, 2000) y favorecen la polarización de linfocitos T hacia un fenotipo Th1, asociado con un incremento en la producción de IFN- γ (Capone *et al.*, 2018).

MACRÓFAGOS Y BPA.

En lo referente a la relación entre el BPA y los macrófagos, existe basta literatura acerca de cómo el BPA puede afectar las funciones de los macrófagos de manera concentración-dependiente.

Por un lado, Byun y colaboradores demostraron que el BPA disminuía la actividad de los macrófagos murinos tanto *in vitro* como *ex vivo* (Byun *et al.*, 2005). Couleau y colaboradores demostraron que el BPA disminuía la capacidad fagocítica de macrófagos derivados de monocitos

de la línea celular THP-1, de manera concentración-dependiente (Couleau *et al.*, 2015). Yoshitake y colaboradores demostraron que a una concentración de 25 μ M, el BPA suprime la producción de óxido nítrico (NO) inducida por LPS (Yoshitake *et al.*, 2008)

Por otro lado, en un estudio *in vitro* con una línea celular de macrófagos de ratón, se obtuvo que el análogo bisfenol A-glicidil-metacrilato era capaz de regular positivamente los niveles de moléculas de superficie tales como CD40, CD80 y MHC-II, que son muy importantes para la coestimulación y la presentación antigénica (Kuan *et al.*, 2012).

Pero poco se sabe acerca de cómo el BPA puede afectar la capacidad de presentación antigénica de los macrófagos, ni tampoco se han hecho estudios comparando la respuesta entre hombres y mujeres.

RETO ANTIGÉNICO: *Mycobacterium tuberculosis*.

TUBERCULOSIS A NIVEL MUNDIAL.

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa, principalmente pulmonar, aunque existe la posibilidad de afectar otros órganos (Casanova & Abel, 2002) y es una de las 10 principales causas de muerte alrededor del mundo.

Se estima que, en 2017, alrededor de 10 millones de personas en todo el mundo desarrollaron la enfermedad; de los cuales 5.8 millones fueron hombres, 3.2 millones mujeres y 1 millón niños (Figura 10) (WHO, 2018).

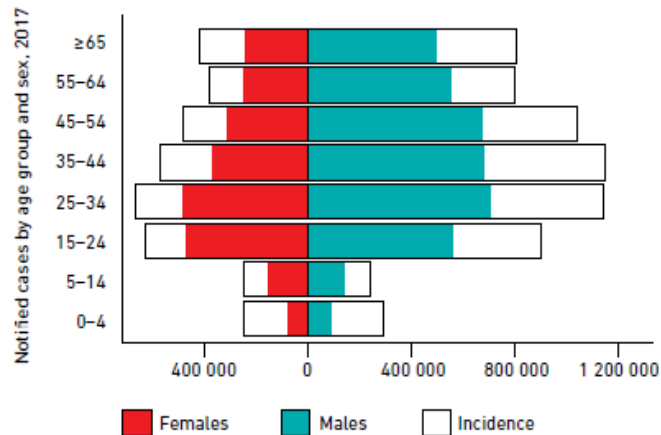


Figura 10. Número de casos de TB notificados en 2017 a nivel mundial, agrupados por edad y sexo. WHO, 2018.

Por lo tanto, se hace evidente que los casos notificados de tuberculosis son mayores en hombres que en mujeres, en todas las regiones del mundo (Klein, 2000; García-Gómez *et al.*, 2013). Además, se han mostrado evidencias que sugieren que el efecto protector de la vacuna BCG (Bacillus Calmette-Guerin) a largo plazo es mayor en mujeres que en hombres (Klein *et al.*, 2015).

RESPUESTA INMUNE HACIA LA TUBERCULOSIS.

Los macrófagos son la primer línea de defensa con la que *M. tuberculosis* se enfrenta al ingresar a un organismo. Como se ha mencionado anteriormente, los macrófagos reconocen un microorganismo, en este caso a *M. tuberculosis*, lo fagocitan, degradan sus proteínas, las procesan para poder anclarlas al MHC II y de esta forma presentar sus antígenos a los linfocitos T.

Los linfocitos T CD4+, al igual que los macrófagos, son importantes para el control de la infección por *M. tuberculosis* (Bozzano *et al.*, 2014). Estos linfocitos son activados cuando las células presentadoras de antígeno procesan y presentan el antígeno micobacteriano en moléculas MHC clase II (Pai *et al.*, 2003; Torres *et al.*, 2006). Una vez activados, gracias a los antígenos presentados por los macrófagos, los linfocitos T CD4 producen interferón gamma (IFN- γ) el cual a su vez activará al macrófago para perfeccionar sus capacidades microbicidas (Figura 11), aumentar su expresión de MHC II y por ende aumentar la presentación antigénica (Duque-Correa & Rojas-López, 2007). Cabe mencionar que se ha demostrado que la tuberculosis se agrava en personas portadoras del virus de inmunodeficiencia humana (HIV) (WHO, 2018). Esto se debe a que las personas con HIV disminuyen su concentración de linfocitos T CD4+, los cuales se ha dicho que son importantes para contener la infección por *Mycobacterium tuberculosis* (Strickland *et al.*, 2017).

Así, los macrófagos activados por IFN- γ ven incrementada su capacidad para matar microorganismos, sobre todo los de vida intracelular, tales como *M. tuberculosis* (Rojas-Espinoza, 2001), por lo que es una citocina clave en la inmunidad contra micobacterias (Casanova & Abel, 2002). Estudios recientes han demostrado que ratones deficientes en la señalización del IFN- γ son altamente susceptibles a infecciones por *M. tuberculosis* (Sakai *et al.*, 2014).

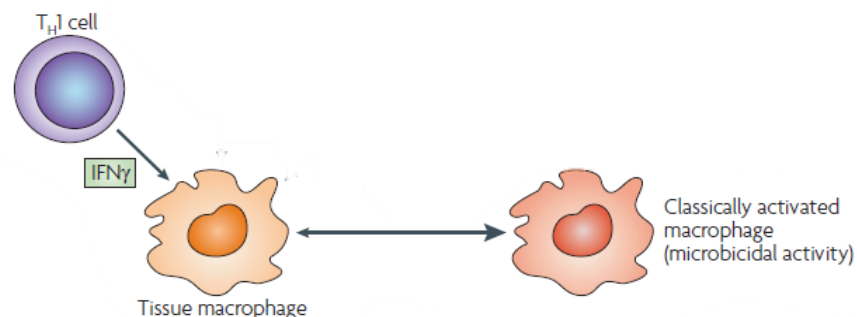


Figura 11. Activación del macrófago mediante el IFN- γ producido por células Th1.
Tomado de *Mosser & Edwards, 2008.*

Debido a que los macrófagos juegan un rol clave en el control de infecciones, por ser ellos los primeros en estar en contacto con los patógenos y ser el link entre la inmunidad innata y la adaptativa, es de gran importancia conocer el efecto que podría tener un potente disruptor endócrino, como lo es el bisfenol A, sobre esta estirpe celular.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Dado el gran impacto que tienen los compuestos disruptores endócrinos (CDEs) sobre la salud, así como el dimorfismo sexual en la susceptibilidad a enfermedades; y el importante papel que desempeñan los macrófagos tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa, es de gran relevancia el estudio de los efectos que tiene el bisfenol A (BPA)

sobre esta estirpe celular del sistema inmune, tanto en mujeres como en hombres.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿Qué efecto tendrá la presencia de BPA durante la diferenciación de monocitos a macrófagos, sobre su capacidad fagocítica y de procesamiento y presentación de antígenos micobacterianos, en un contexto dimórfico?

HIPÓTESIS.

El tratamiento con bisfenol A disminuirá la capacidad fagocítica y de presentación antigénica del macrófago.

OBJETIVOS.

Objetivo General.

Evaluar la capacidad fagocítica y de procesamiento y presentación antigénica de macrófagos derivados de monocitos humanos que han sido expuestos a BPA durante su diferenciación.

Objetivos Particulares.

- Calcular el porcentaje de células fagocíticas, de hombres y mujeres, expuestas a medio o BPA, mediante la observación de micobacterias fluorescentes por microscopía confocal.
- Evaluar la capacidad fagocítica de macrófagos derivados de monocitos de hombres y mujeres, expuestos a medio o BPA, mediante la intensidad media de fluorescencia de micobacterias fluorescentes, por citometría de flujo.
- Determinar, indirectamente, la capacidad de presentación antigénica de macrófagos derivados de monocitos de hombres y mujeres, expuestos a medio o BPA, mediante la cuantificación de IFN- γ secretado por linfocitos T CD4+ autólogos, por el método ELISA.
- Analizar la expresión relativa del receptor a estrógenos alfa (ER- α) en macrófagos de hombres y mujeres, expuestos a medio o BPA, mediante citometría de flujo.

MÉTODOS.

Obtención de células mononucleares de sangre periférica humana.

Para la obtención de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMCs) se diluyeron 20 ml de sangre heparinizada 1:1 con medio de cultivo RPMI. Las células se centrifugaron sobre un gradiente de densidad generado por 10 ml de Ficoll a 1500 rpm por 45 minutos a

temperatura ambiente. Se recuperaron las células mononucleares de la interfase con ayuda de una pipeta pasteur. Se lavaron con 50 ml de RPMI, centrifugando a 1200 rpm por 10 minutos. Se dejaron 5 minutos a temperatura ambiente con 5 ml de buffer de lisis de eritrocitos (150 mM NH_4Cl , 10 mM $KHCO_3$, 0.1 mM EDTA). Se lavaron con 50 ml de PBS 1X, centrifugando a 1200 rpm por 10 minutos. Se contaron las células en cámara de Neubauer en azul tripano (dilución 1:4).

Cultivo celular y diferenciación.

Células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) fueron aisladas de sangre total donada por voluntarios sanos, por centrifugación de densidad utilizando el kit de Ficoll. Para diferenciar las PBMC en macrófagos derivados de monocitos (MDM), las células fueron incubadas en medio RPMI en placa de 24 pozos. Después de 1 hora de incubación a 37° C, las células no adheridas fueron removidas y las células adheridas fueron cultivadas en medio RPMI con suero fetal bovino al 10%, con o sin BPA (0.1 μM) o vehículo (EtOH 1%), durante 7 días a 37° C. Durante este tiempo, los monocitos se diferencian a macrófagos derivados de monocitos (Dodd *et al.*, 2016; Bobadilla *et al.*, 2012).

Infección con M. tuberculosis H37Ra.

M. tuberculosis se transformó con el plásmido pCherry8 mediante electroporación. La concentración de bacterias fue determinada mediante unidades formadoras de colonias (UFC) en placas Middlebrook 7H9 agar, suplementado con OADC, Tween-80 al 0.05% y 50 $\mu g/mL$ de

higromicina B. Se obtuvo un lote "stock" de bacterias a 2.8×10^8 bacterias/mL.

Antes de infectar a las células, la suspensión patrón de micobacterias se centrifugó para eliminar el medio y se resuspendió el botón bacteriano en medio RPMI suplementado con 10% de SFB para promover la fagocitosis. Se pasó la suspensión 10 veces a través de una aguja del número 27 (0.44 mm diámetro) para disgregar las bacterias y se centrifugaron a 1200 rpm por 5 minutos.

El sobrenadante se utilizó para infectar a las células a un MOI 1:10 (Macrófago-bacteria) durante 1 hora a 37° C. Posterior a la hora de infección, se detuvo el proceso colocando la placa sobre hielo y se eliminaron las bacterias no fagocitadas con lavados de PBS frío. Se dejaron 1 h a 37°C en medio completo y se fijaron con paraformaldehído al 1% durante 15 min a temperatura ambiente. Se hizo un lavado con PBS y se dejó en medio completo a -20°C.

Microscopía confocal.

Se obtuvieron PBMCs de donadores sanos y se aislaron monocitos mediante adherencia a placas de 24 pozos con cubreobjetos, previamente tratados con L-Lisina. Los monocitos se diferenciaron a macrófagos mediante adherencia durante 7 días a 37° C, en presencia de medio, etanol (1%) o BPA (0.1 μ M). Una vez pasado el tiempo de diferenciación, se hizo la infección con *M. tuberculosis* H37Ra expresando la proteína fluorescente mCherry, como se describió anteriormente. Posteriormente, se retiró el medio a las células y se dejaron en PBS durante 10 min. Se retiró el PBS, se sacaron los cubreobjetos de las placas y se colocaron sobre parafilm. Después, se

colocaron los cubreobjetos "boca abajo" portaobjetos que previamente se lavaron, se marcaron y se les colocó aprox. 4 μ L de líquido de montaje (por cada cubreobjeto). Se dejaron 24 horas a temperatura ambiente y posteriormente se leyeron en el microscopio confocal.

Obtención de linfocitos T CD4+ autólogos específicos para M. tuberculosis.

Se generaron a partir de sangre periférica de donadores sanos. Las PBMCs se estimularon en placa de 24 pozos con *M. tuberculosis* H37Ra con un índice de multiplicidad de infección (MOI) 1:10. El cultivo se suplementó con 50 U/ml de IL-2 los días 3, 5 y 7. Después de este tiempo, las células T CD4+ se seleccionaron positivamente con perlas inmunomagnéticas.

Se resuspendieron en 80 μ L de buffer de Miltenyi (PBS pH 7.2, 0.5% de BSA, 2 mM de EDTA) por cada 10^7 células y se agregaron 20 μ L de CD4 microbeads por cada 10^7 células, se mezclaron y se incubaron por 15 minutos a 4° C. Al terminar la incubación se lavaron añadiendo 1-2 mL de buffer de Miltenyi por cada 10^7 PBMC, centrifugando a 300 g por 10 minutos y se resuspendieron en 500 μ L de buffer de Miltenyi.

La separación magnética se hizo en la columna MACS MS, se colocó en el separador y se agregó 1 ml de buffer de Miltenyi. Se agregaron los 500 μ L de la suspensión celular a la columna, se colectaron las células no marcadas, se lavó con buffer de Miltenyi (500 μ L por tres veces), se retiró la columna del separador magnético y se colocó en un tubo falcon de 15 ml. Se agregó 1 ml de buffer de Miltenyi y se empujó el émbolo en la columna para obtener los linfocitos T CD4+. Se dejaron 48 horas en cultivo con medio completo suplementado con 25 U/ml de IL-2.

Ensayo de presentación antigénica.

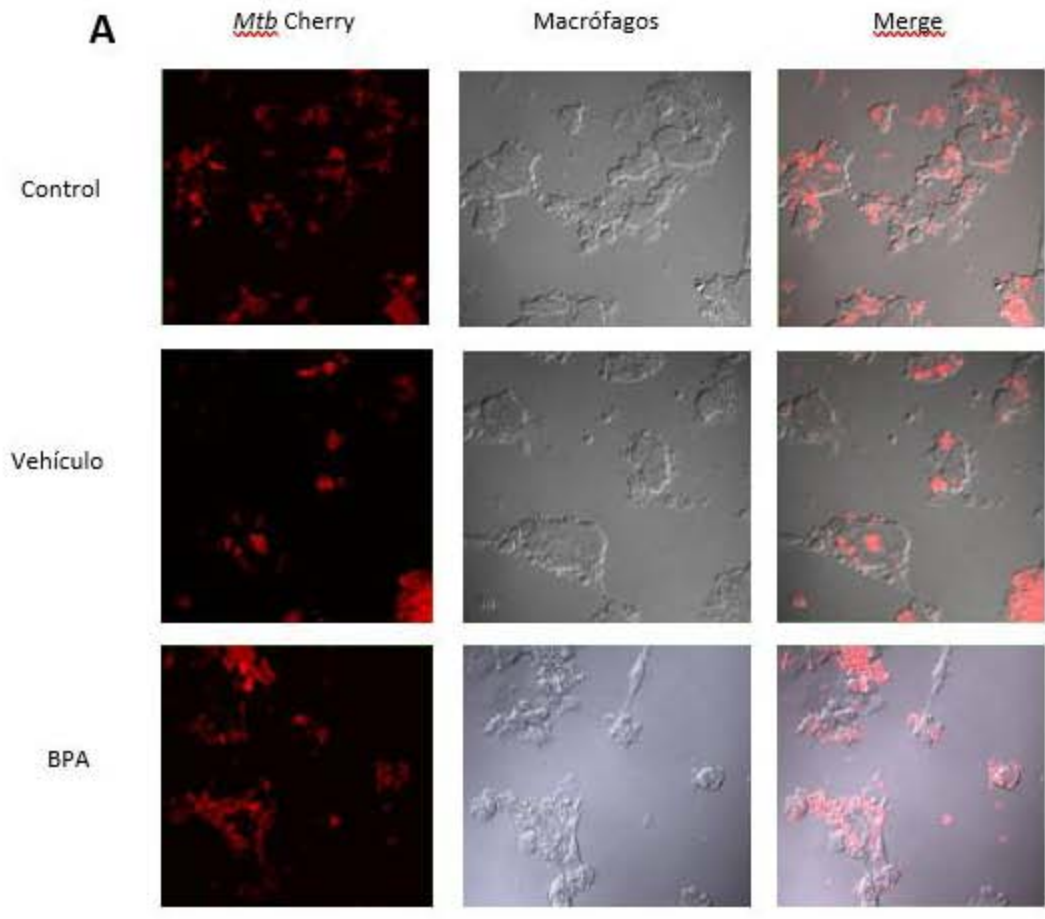
Se cultivaron 1.5×10^5 macrófagos con 5×10^4 linfocitos T CD4+ por pozo durante 48 horas. Producto del procesamiento antigénico se formaron los complejos péptidos bacterianos-MHC-II y se determinó la producción de IFN- γ por parte de los linfocitos T CD4+ como medida indirecta de presentación antigénica, mediante el método ELISA MAX Standard Set (Biolegend, San Diego CA).

Expresión de ER- α .

Se recuperaron los macrófagos en tubos para citometría y se fijaron en paraformaldehído al 2%. Se incubaron 30 minutos en metanol frío, se realizaron 3 lavados con buffer de FACS y se resuspendieron en 50 μ L de anticuerpo primario. Después de 20 minutos de incubación, se lavaron y se resuspendieron en la misma cantidad de anticuerpo secundario. Se resuspendieron en 400 μ L de buffer de FACS para su lectura en el citómetro de flujo.

RESULTADOS.

Fagocitosis por microscopía confocal.



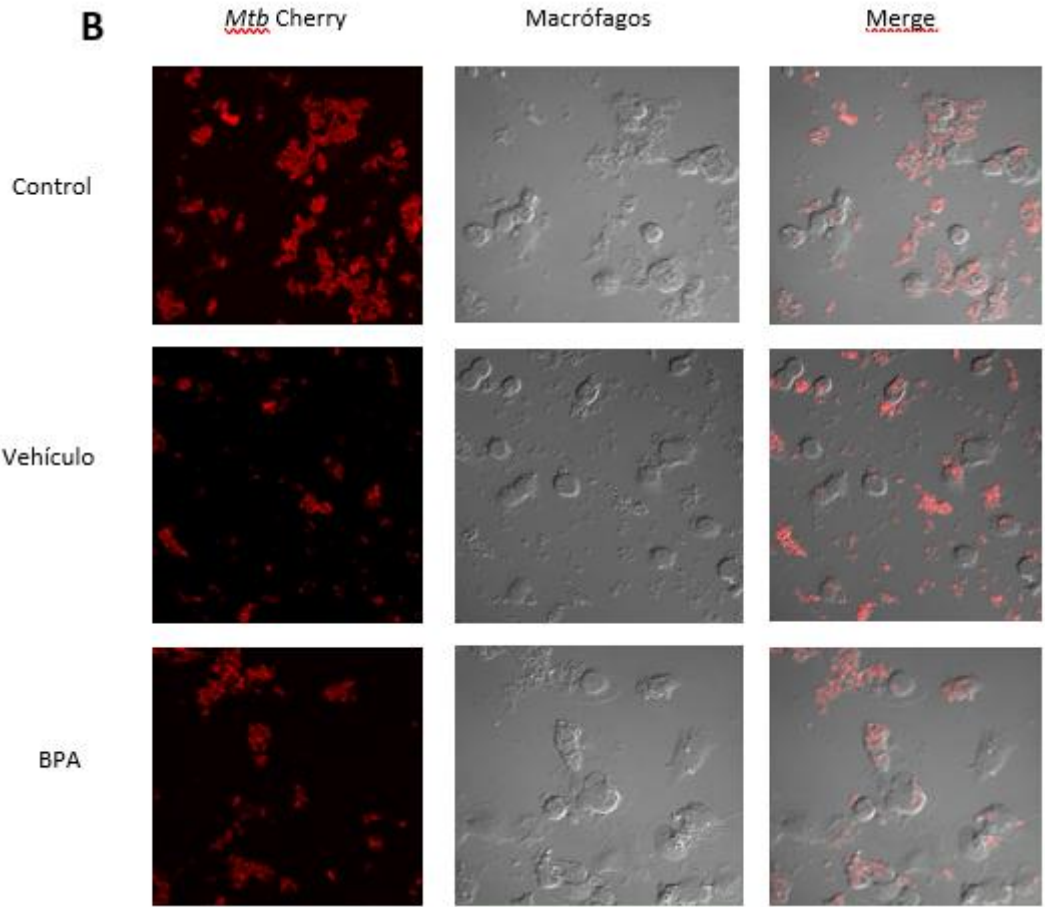


Figura 1. Macrófagos fagocitando micobacterias, observado por microscopio confocal. Macrófagos infectados con micobacterias fluorescentes, observados por microscopio confocal. En **A** se observan las muestras pertenecientes a donadores hombres y en **B** a donadoras mujeres. Las figuras son representativas de al menos cuatro experimentos independientes.

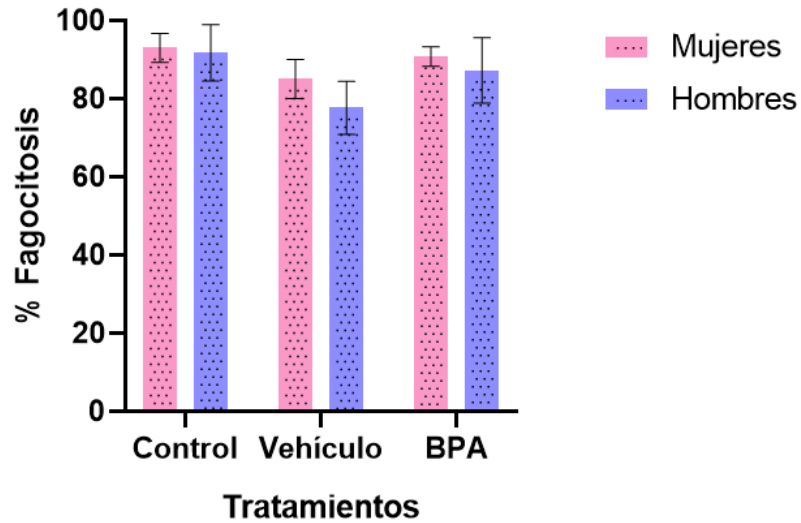


Figura 2. Porcentaje de fagocitosis por microscopía confocal. Porcentaje de macrófagos, expuestos a medio o BPA (0.1 μ M), que fagocitan micobacterias fluorescentes, observadas mediante microscopía confocal, calculado mediante el total de células con bacteria/total de células observadas por campo (n=4 para hombres y n=5 para mujeres). Los datos representan la media de al menos cuatro experimentos independientes y las barras de error la desviación estándar.

Para evaluar la capacidad fagocítica de los macrófagos expuestos o no a BPA, se determinó semi-cuantitativamente el porcentaje de fagocitosis, mediante el conteo de macrófagos que contenían micobacterias fluorescentes con respecto a los que no presentaban micobacteria. En la Figura 1 se pueden observar imágenes representativas de la microscopía confocal, haciendo la co-localización de la bacteria dentro de los macrófagos. En la Figura 2 se encuentra el porcentaje basado en el conteo de macrófagos sin bacterias contra los macrófagos con bacteria. Los resultados no muestran diferencias significativas en el porcentaje de fagocitosis de células expuestas a BPA con respecto a las no expuestas, ni entre sexos.

Fagocitosis por citometría de flujo.

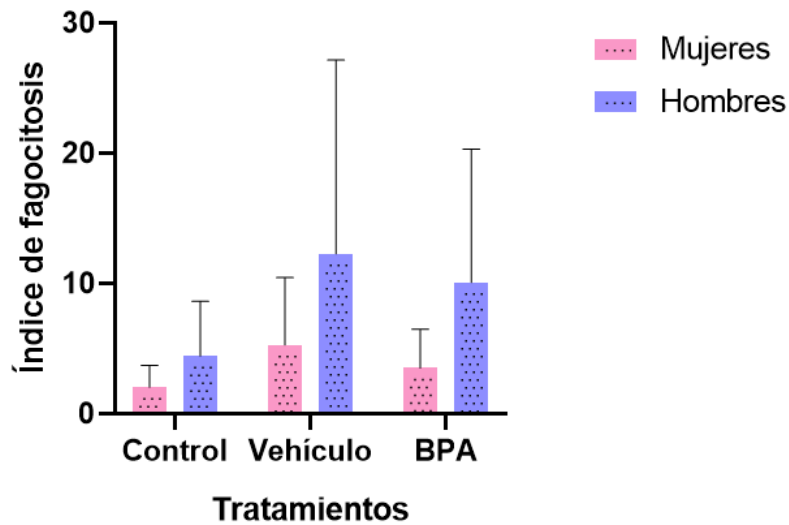


Figura 4. Fagocitosis por citometría de flujo. Índice de fagocitosis por citometría de flujo de macrófagos infectados con micobacteria fluorescente, expuestos a medio o BPA 0.1 μ M, calculado por la intensidad media de fluorescencia del control sin teñir. $IndFag = \text{Mediana de } F_{\text{Medio o BPA}} / \text{Mediana de } F_{\text{SinBacteria}}$ (n=4 para hombres y n=5 para mujeres). Los datos representan la media de al menos cuatro experimentos independientes y las barras de error la desviación estándar.

Continuando con la determinación de la capacidad fagocítica de los macrófagos, se realizó también el análisis de bacterias fluorescentes fagocitadas, mediante citometría de flujo. Como lo muestran los resultados de la Figura 4, no hay diferencias significativas entre tratamientos ni entre sexos, en la capacidad fagocítica de los macrófagos expuestos a BPA.

Medición de IFN- γ por el método ELISA.

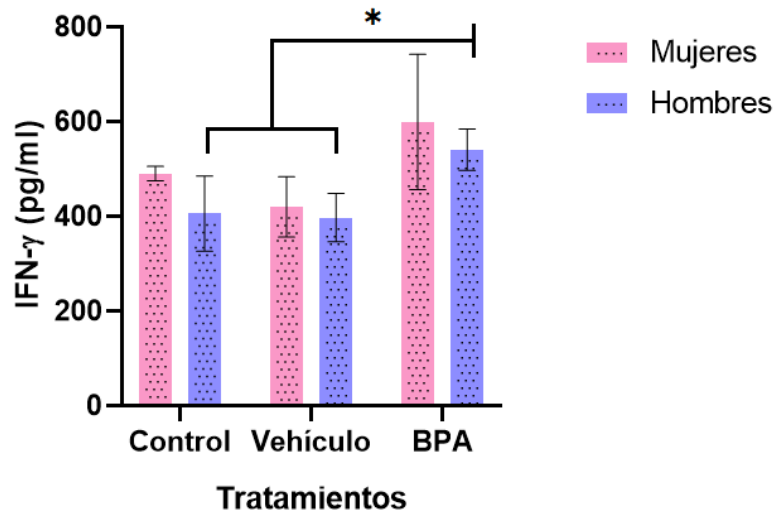


Figura 5. Concentración del IFN- γ producido por linfocitos T CD4 autólogos específicos para *M. tuberculosis*. IFN- γ producido por linfocitos T CD4 autólogos específicos para *M. tuberculosis*, separados por sexo, en presencia de macrófagos derivados de monocitos expuestos a medio (intactas) o al vehículo (EtOH) o BPA (0.1 μ M). Los datos representan la media de tres experimentos independientes y las barras de error la desviación estándar. * $p < 0.05$ (n=3).

Con el propósito de determinar la capacidad de procesamiento y presentación antigénica de los macrófagos, se midió la concentración de IFN- γ producido por linfocitos T CD4+ específicos para *M. tuberculosis*, los cuales estuvieron en co-cultivo con los macrófagos derivados de monocitos que estuvieron expuestos al BPA, y esto se asoció como una medida indirecta de la presentación antigénica. Tal como se muestran los resultados de la Figura 5, en este experimento sí podemos observar un aumento en la producción de IFN- γ en el tratamiento con BPA

comparado con las células intactas, aunque este aumento sólo es significativo en el caso de los hombres.

Expresión de ER- α

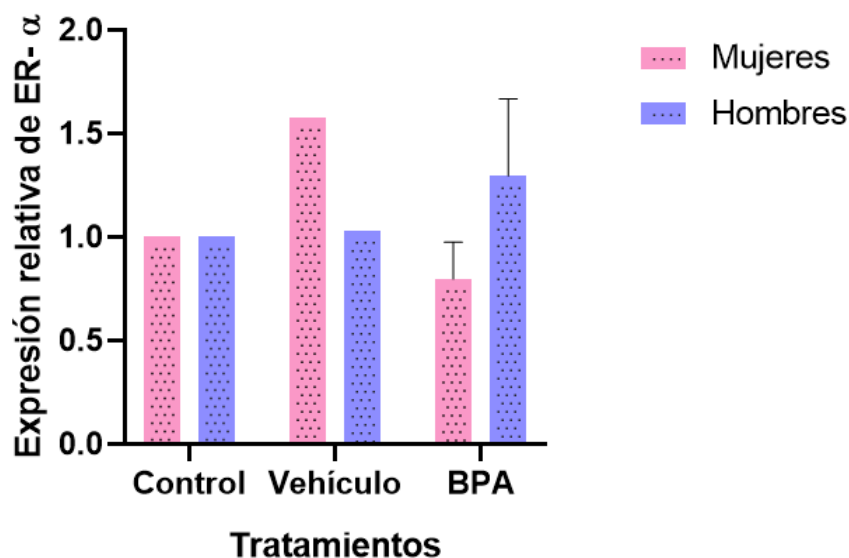


Figura 6. Expresión de ER- α en macrófagos expuestos a BPA. Expresión relativa del receptor a estrógenos (ER- α) en macrófagos diferenciados, separados por sexo, en presencia de medio o BPA (0.1 μ M) calculada por el cambio de intensidad media de fluorescencia del control secundario. $ExpRel = \text{Mediana de } F_{\text{Medio o BPA}} / \text{Mediana de } F_{\text{ControlSec.}}$ (n=3 para hombres y n=4 para mujeres). Los datos representan la media de al menos tres experimentos independientes y las barras de error la desviación estándar.

Finalmente, con el objetivo de evaluar si el BPA afecta la expresión de receptores a estrógenos en los macrófagos, se midió la expresión relativa del ER- α . En este caso, podemos notar que no se observan diferencias significativas entre tratamientos, tanto en hombres como en mujeres, en la expresión relativa del ER- α de MDM expuestos a BPA.

DISCUSIÓN.

En el presente trabajo se buscó evaluar algunas funciones de macrófagos derivados de monocitos que han sido expuestos a BPA durante su diferenciación, todo esto bajo un contexto dimórfico, es decir, tanto de hombres y mujeres.

Para evaluar la capacidad fagocítica, se realizaron observaciones y cuantificaciones por microscopía confocal (Fig. 1 y 2) y por citometría de flujo (Fig. 3), utilizando la primera técnica como medida semi-cuantitativa y la segunda técnica completamente cuantitativa. Mediante la microscopía confocal se logró obtener, semi-cuantitativamente, el porcentaje de macrófagos que fagocitaban a las bacterias fluorescentes, sin obtener diferencias en la capacidad fagocítica de macrófagos expuestos a BPA. Mediante la citometría de flujo se logró conocer de manera cuantitativa el porcentaje de macrófagos que fagocitaban y qué tanto fagocitaban estos macrófagos. En ambos casos, no se observaron diferencias significativas en cuanto a la capacidad fagocítica de los macrófagos derivados de monocitos expuestos a BPA 0.1 μM . Estos resultados no concuerdan, por ejemplo, con los obtenidos por Couleau y cols. los cuales observan una disminución en la capacidad de fagocitosis hasta de 20% a la misma concentración de BPA (Couleau *et al.*, 2015). Estas diferencias se pueden atribuir a que el contexto en que las células son tratadas no es el mismo. Por ejemplo, en este caso se utilizó un cultivo primario de células humanas y se colocó el compuesto durante el periodo de diferenciación de monocitos a macrófagos. Mientras que, en el ensayo citado, los autores utilizan una línea celular de monocitos derivados de una leucemia monocítica aguda (THP-1) y colocan el BPA

durante un periodo de 24 hrs., una vez que ya diferenciaron los monocitos a macrófagos mediante la estimulación con PMA (48 hrs).

Además, como se mencionó anteriormente, el IFN- γ producido por los linfocitos T CD4 en respuesta al antígeno presentado por los macrófagos es crucial para combatir la infección por *M. tuberculosis*. Su importancia radica en que tiene la capacidad de potenciar la actividad microbicida de los macrófagos. En el presente trabajo se determinó la concentración de IFN- γ producido por linfocitos T CD4+ específicos para *M. tuberculosis*, como medida indirecta de la presentación antigénica (a mayor producción de esta citocina, mayor presentación antigénica) y se observó un ligero aumento en la producción de esta citocina por células expuestas a BPA en comparación con las células no expuestas, aunque estadísticamente este aumento sólo es significativo en el caso de los hombres (Fig. 4).

Esto podría significar que el tratamiento con BPA 0.1 μ M durante la diferenciación de monocitos a macrófagos aumenta la producción de IFN- γ por parte de los linfocitos T CD4+ específicos para *M. tuberculosis* y de esta forma podría potenciar la actividad microbicida de los macrófagos *in vitro*, aunque esto último debe corroborarse en ensayos posteriores. Para saber si el IFN- γ está actuando correctamente en los macrófagos, puede medirse los niveles de iNOS, la cual produce óxido nítrico (NO), sustancia que está relacionada con el aumento de actividad bactericida en macrófagos (Braverman & Stanley, 2017).

Por otra parte, los esteroides sexuales y, por ende, los compuestos disruptores endócrinos pueden alterar los niveles de expresión de los receptores hormonales. Mor y cols. determinaron que en macrófagos se expresa mayoritariamente ER- α (Mor et al., 2003), por lo que nos propusimos determinar el nivel de expresión de esta isoforma.

Los resultados obtenidos nos indican que, al ser expuestos al BPA durante el proceso de maduración de monocitos a macrófagos, estos últimos no presentan una alteración en los niveles de expresión relativa del ER- α *in vitro*, comparándose con las células no expuestas, tanto en hombres como en mujeres (Fig. 5). Esto concuerda con los datos mostrados por Couleau y colaboradores, los cuales muestran que el tratamiento con BPA no modifica los niveles de expresión de ER, aunque es cierto que, como se mencionó anteriormente, el contexto en que las células fueron tratadas es diferente. Algo que se plantea hacer en experimentos posteriores es comparar qué tanto se expresa el ER en los monocitos al momento de comenzar los experimentos y como difiere con la expresión en los macrófagos al momento de terminar el periodo de exposición al BPA.

CONCLUSIONES.

- La exposición a BPA 0.1 μ M durante la diferenciación de monocitos a macrófagos no disminuye la capacidad fagocítica de estos últimos.
- La exposición a BPA 0.1 μ M durante la diferenciación de monocitos a macrófagos aumenta la capacidad de presentación antigénica del macrófago en hombres.
- La exposición a BPA 0.1 μ M durante la diferenciación de monocitos a macrófagos no disminuye la expresión de ER- α en macrófagos.

PERSPECTIVAS.

- Hacer ensayos con criterios de inclusión más específicos, como acortar el rango de edades y, en el caso de las mujeres, tener un control sobre la etapa del ciclo ovulatorio en que se encuentra.
- Determinar la producción de iNOs, para corroborar que el IFN- γ producido está actuando adecuadamente en los macrófagos.
- Evaluar la expresión de ER en monocitos y compararla con la expresión en los macrófagos expuestos al BPA.

REFERENCIAS.

Aderem, A., & Underhill, D. M. (1999). **Mechanisms of phagocytosis in macrophages.** *Annual Reviews Immunology*, 17, 593-623.

Aranda, A., & Pascual, A. (2001). **Nuclear hormone receptors and gene expression.** *Physiological Reviews*, 81(3), 1269-1304.

Besedovsky, H. O., & Del Rey, A. (1996). **Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses**. *Endocrine Reviews*, 17(1), 64-102.

Bhatia, A., Sekhon, H. K., Kaur, G. (2014). **Sex hormones and immune dimorphism**. *Scientific World Journal*, 1-8.

Bisphenol A (2019). **Bisphenol A and consumer safety**. Obtenido de <http://www.bisphenol-a.org/human/consafety.html>

Bobadilla, K., Sada, E., Jaime, M. E., González, Y., Ramachandra, L., Rojas, R. E., Pedraza-Sánchez, S., Michalak, C., Gónzalez-Noriega, A., Torres, M. (2012). **Human phagosome precessing of Mycobacterium tuberculosis antigens is modulated by interferon- γ and interleukin-10**. *Immunology*, 138, 34-46.

Bozzano, F., Marras, F., De María, A. (2014). **Immunology of tuberculosis**. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 6(1).

Braverman, J., & Stanley, S. A. (2017). **Nitric Oxide modulates macrophage responses to Mycobacterium tuberculosis infection through activation of HIF-1 α and repression of NF- κ B**. *Journal Immunology*, 199, 1805-1816.

Byun, J. A., Heo, Y., Kim, Y. O., Pyo, M. Y. (2005). **Bisphenol A-induced downregulation of murine macrophage activities in vitro and ex vivo**. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19, 19-24.

Camacho-Arroyo, I. (2002). **Las hormonas sexuales y el cerebro**. *Revista ¿Cómo ves?*, 4(43), 10-14.

Capone, I., Marchetti, P., Ascierio, P. A., Malorni, W., Gabriele, L. (2018). **Sexual dimorphism of immune responses: a new**

perspective in cancer immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 9(552).

Carr, J. H., & Rodak, F. B. (2010). **Atlas de hematología clínica.** (3^a ed.) Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, Pp 42.

Casanova, J. L., & Abel, L. (2002). **Genetic dissection of immunity to micobacteria: the human model.** *Annual Reviews Immunology*, 20, 581-620.

Chao, T. C., Chao, H. H., Chen, M. F., Greager, J. A., Walter, R. J. (2000). **Female sex hormones modulate the function of LPS-treated macrophages.** *American Journal of Reproductive Immunology*, 44, 310-318.

Chao, T. C., Van Alten, P. J., Greager, J. A., Walter, R. J. (1995). **Steroid sex hormones regulate the release of tumor necrosis factor by macrophages.** *Cellular Immunology*, 160, 43-49.

Cóppola, F., Nader, J., Aguirre, R. (2005). **Metabolismo de los estrógenos endógenos y cáncer de mama.** *Revista Médica del Uruguay*, 21(1), 15-22.

Cork, D., Lennard, T., Tyson-Capper, A. L. (2008). **Alternative splicing and the progesterone receptor in breast cancer.** *Breast Cancer Research*, 10(207).

Couleau, N., Falla, J., Beillerot, A., Battaglia, E., D'Innocenzo, M., Plancon, S., Laval-Gilly, P., Bennasroune, A. (2015). **Effects of endocrine disruptor compounds alone or in combination, on human macrophage-like THP-1 cell response.** *PLoS ONE*, 10(7).

Coyoy, A., Guerra-Araiza, C., Camacho-Arroyo, I. (2016). **Metabolism regulation by estrogens and their receptors in the central**

nervous system before and after menopause. *Hormone and Metabolic Research*, 48(08), 489-496.

D'Attilio, L., Santucci, N., Bongiovanni, B., Bay, M. L., Bottasso, O. (2018). **Tuberculosis, the disrupter immune-endocrine response and the potential thymic repercussion as a contributing factor to disease physiopathology.** *Frontiers Endocrinology*, 9(214).

De León-Nava, M. A., & Morales-Montor, J. (2006). **Dimorfismo sexual inmunitario: ¿pueden los esteroides sexuales polarizar el perfil de citocinas Th1/Th2?** *Revista de Investigación Clínica*, 58(2), 161-169.

Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J. P., Giudice, L., Hauser, R., Prins, G., Soto, A., Zoeller, R. T., Gore, A. (2009). **Endocrine-disrupting chemicals: an endocrine society scientific statement.** *Endocrine Reviews*, 30(4), 293-342.

Dodd, C. E., Pyle, C. J., Glowinski, R., Rajaram, M. V. S., Schlesinger, L. S. (2016). **CD36-mediated uptake of surfactant lipids by human macrophages promotes intracellular growth of *Mycobacterium tuberculosis*.** *Journal Immunology*, 197, 4727-4735.

Dodds, E. C., & Lawson, W. (1936). **Synthetic estrogenic agents without the phenanthrene nucleus.** *Nature*, 137, 996.

Duque-Correa, M. A., & Rojas-López, M. (2007). **Activación alternativa del macrófago: la diversidad en las respuestas de una célula en la inmunidad innata ante la complejidad de los eventos de su ambiente.** *Immunology*, 26(2), 73-86.

Eladak, S., Grisin, T., Moison, D., Guerquin, M. J., N'Tumba-Byn, T., Pozzi-Gaudin, S., Benachi, A., Livera, G., Rouiller-Fabre, V., Habert, R.

(2015). **A new chapter in the bisphenol A story: bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound.** *Fertility and Sterility*, 103(1), 11-21.

Ellman, S., Sticht, H., Thiel, F., Beckmann, M. W., Strick, R., Strissel, P. L. (2009). **Estrogen and progesterone receptors: from molecular structures to clinical targets.** *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66, 2405-2424.

Fenichel, P., Chevalier, N., Brucker-Davis, F. (2013). **Bisphenol A: an endocrine and metabolic disruptor.** *Annual Endocrinology*, 74, 211-220.

García-Gómez, E., González-Pedrajo, B., Camacho-Arroyo, I. (2013). **Role of sex steroid hormones in bacterial-host interactions.** *BioMed Research International*.

Gómez-Chang, E., Larrea, F., Martínez-Montes, F. (2012). **Vías de señalización asociadas a la esteroidogénesis.** *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 15(1), 24-36.

González-Lara, V., & Marín-Jiménez, I. (2006). **Nuevas perspectivas en aféresis terapéutica en la enfermedad inflamatoria intestinal crónica.** *Diálisis y Trasplante*, 27(2), 46-58.

Greenberg, S., & Grinstein, S. (2002). **Phagocytosis and innate immunity.** *Current Opinion in Immunology*, 14, 136-145.

Haddad, J. J., Saadé, N. E., Safieh-Garabedian, B. (2002). **Cytokines and neuro-immune-endocrine interactions: a role for the hypothalamic-pituitary-adrenal revolving axis.** *Journal Neuroimmunology*, 133, 1-19.

Hall, J. M., Couse, J. F., Korach, K. S. (2001). **The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling.** *Journal of Biological Chemistry*, 276(40), 36869-36872.

Heinlein, C. A., & Chang, C. (2002). **Androgen receptor (AR) coregulators: an overview.** *Endocrine Reviews*, 23(2), 175-200.

Heldring, N., Pike, A., Andersson, S., Matthews, J., Cheng, G., Hartman, J., Tujague, M., Strom, A., Treuter, E., Warner, M., Gustafsson, J. A. (2007). **Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets.** *Physiological Reviews*, 87, 905-931.

Hernández-Cervantes, R., Sánchez-Acosta, A. G., Ramírez-Nieto, R., Morales-Montor, J. (2010). **Regulación neuroendocrinológica de la función inmunitaria: el papel de la hipófisis y los esteroides sexuales.** *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 13(2), 103-112.

Hiltbold, E., & Roche, P. (2002). **Trafficking of MCH class II molecules in the late secretory pathway.** *Current Opinion in Immunology*, 14, 30-35.

Hilton, H. N., Graham, D., Clarke, C. L. (2015). **Minireview: progesterone regulation of proliferation in the normal human breast and in breast cancer: a tale of two scenarios?** *Molecular Endocrinology*, 29(9), 1230-1242.

Hugo, E. R., Brandebourg, T. D., Woo, J. G., Loftus, J., Alexander, J. W., Ben-Jonathan, N. (2008). **Bisphenol A at environmentally relevant doses inhibits adiponectin release from human adipose tissue explants and adipocytes.** *Environmental Health Perspectives*, 116(12), 1642-1647.

Ikezuki, Y., Tsutsumi, O., Takai, Y., Kamei, Y., Taketani, Y. (2002). **Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant earlyprenatal exposure.** *Human Reproduction*, 17, 2839–2841.

Jansson, L., & Holmdahl, R. (1998). **Estrogen-mediated immunosuppression in autoimmune diseases.** *Inflammation Research*, 47, 290-301.

Jutras, I., & Desjardins, M. (2005). **Phagocytosis: at the crossroads of innate and adaptive immunity.** *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21, 511-527.

Keller, E. T., Ershler, W. B., Chang, C. (1996). **The androgen receptor: a mediator of diverse responses.** *Frontiers in Bioscience*, 1, 59-71.

Klein, S. L. (2000). **The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior.** *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 24, 627-638.

Klein, S. L., Marriott, I., Fish, E. N. (2015). **Sex-based differences in immune function and responses to vaccination.** *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 109, 9-15.

Kou, X., Li, C., He, D., Wang, X., Hao, T., Meng, Z., Zhou, Y., Gan, Y. (2015). **Estradiol promotes M1-like macrophage activation through Cadherin-11 to aggravate temporomandibular joint inflammation in rats.** *Journal Immunology*, 194, 2810-2818.

Krüger, T., Long, M., Bonfeld-Jorgensen, E. C. (2008). **Plastic components affect the activation of the aryl hydrocarbon and the androgen receptor.** *Toxicology*, 246, 112-123.

Kuan, Y. H., Li, Y. C., Huang, F. M., Chang, Y. C. (2012). **The upregulation of tumour necrosis factor-alpha and surface antigens expression on macrophages by bisphenol A-glycidyl-methacrylate.** *International Endodontic Journal*, 45, 619-626.

Kuruto-Niwa, R., Tateoka, Y., Usuki, Y., Nozawa, R. (2007). **Measurement of bisphenol A concentrations in human colostrum.** *Chemosphere*, 66, 1160-1164.

Liegibel, U. M., Sommer, U., Boercsoek, I., Hilscher, U., Bierhaus, A., Schweikert, H. U., Nawroth, P., Kasperk, C. (2003). **Androgen receptor isoforms AR-A and AR-B display functional differences in cultured human bone cells and genital skin fibroblasts.** *Steroids*, 68, 1179-1187.

Marcos-Becerro, J. F. (2008). **Las hormonas esteroideas sexuales, el envejecimiento y el ejercicio.** *Revista Andaluza de Medicina y Deporte*, 1, 22-36.

Marriott, I., & Huet-Hudson, Y. M. (2006). **Sexual dimorphism in innate immune responses to infectious organisms.** *Immunology Research*, 34(3), 177-192.

Mayani, H., Flores-Figueroa, E., Pelayo, R., Montesinos, J. J., Flores-Guzmán, P., Chávez-González, A. (2007). **Hematopoyesis.** *Cancerología*, 2, 95-107.

Mendoza-Patiño, N. (2008). **Farmacología Médica.** México: Editorial Médica Panamericana.

Mirandola, L., Wade, R., Verma, R., Pena, C., Hosiriluck, N., Figueroa, J. A., Cobos, E., Jenkins, M. R., Chiriva-Internati, M. (2015). **Sex-driven differences in immunological responses: challenges and**

opportunities for the immunotherapies of the third millennium. *International Reviews of Immunology*, 34, 134-142.

Mlynarčíková, A., Kolena, J., Ficková, M., Scsuková, S. (2005). **Alterations in steroid hormone production by porcine ovarian granulosa cells caused by bisphenol A and bisphenol A dimethacrylate.** *Molecular and Cellular Endocrinology*, 244, 57-62.

Mor, G., Sapi, E., Abrahams, V. M., Rutherford, T., Song, J., Hao, X., Muzaffar, S., Kohen, F. (2003). **Interaction of the receptors with the Fas ligand promoter in human monocytes.** *Journal of Immunology*, 170, 114-122.

Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). **Exploring the full spectrum of macrophage activation.** *Nature Reviews of Immunology*, 8, 958-969.

Muñoz-Cruz, S., Togno-Pierce, C., Morales-Montor, J. (2011). **Non-reproductive effects of sex steroids: their immunoregulatory role.** *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 11, 1714-1727.

Murray, P. J., & Wynn, T. A. (2011). **Protective and pathogenic functions of macrophage subsets.** *Nature Reviews of Immunology*, 11, 723-737.

Murphy, K., Travers, P., Walpot, M. (2009). **Inmunología de Janeway.** (7a ed.) México: McGraw Hill, Pp 48, 190-193.

Nathan, C. F. (1987). **Secretory products of macrophages.** *Journal Clinical Investigation*, 319-326.

Neefjes, J., Jongasma, M., Paul, P., Bakke, O. (2011). **Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation.** *Nature Reviews of Immunology*, 11, 823-836.

Neri, M., Virzi G. M., Brocca, A., Garzotto, F., Kim, J. C., Ramponi, F., de Cal, M., Lorenzin, A., Ronco, C. (2015). **In vitro cytotoxicity of bisphenol A in monocytes cell line.** *Blood Purification*, 40, 180-186.

Noriega-Reyes, M., & Langley, E. (2008). **Correguladores del receptor de estrógenos y su implicación en el cáncer mamario.** *Cancerología*, 3, 29-40.

Ortega-Domínguez, B., Herrera-Ramírez, M., Tecalco-Cruz, A. C. (2015). **Receptores nucleares: del núcleo al citoplasma.** *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 18(2), 131-143.

Pai, R. K., Convery, M., Hamilton, T. A., Boom, W. H., Harding, C. V. (2003). **Inhibition of IFN- γ -induced class II transactivator expression by a 19-kDa lipoprotein from *Mycobacterium tuberculosis*: a potential mechanism for immune evasion.** *Journal of Immunology*, 171, 175-184.

Palacios-Arreola, M. I., Nava-Castro, K., Del Río-Araiza, V., Pérez-Sánchez, N., Morales-Montor, J. (2017). **A single neonatal administration of bisphenol A induces higher tumour weight associated to changes in tumour microenvironment in the adulthood.** *Scientific Reports*, 7, 1-11.

Qlong, L. V., Gao, R., Peng, C., Yi, J., Liu, L., Yang, S., Li, D., Hu, J., Luo, T., Mei, M., Song, Y., Wu, C., Xiao, X., Li, Q. (2017). **Bisphenol A promotes hepatic lipid deposition involving Kupffer cells M1 polarization in male mice.** *Journal of Endocrinology*, 234, 143-154.

Rattan, S., Zhou, C., Chiang, C., Mahalingam, S., Brehm, E., Flaws, J. A. (2017). **Exposure to endocrine disruptors during adulthood: consequences for female fertility.** *Journal of Endocrinology*, 233, 109-129.

Roberts, R. (2012). **BPA exposure and health effects: educating physicians and patients.** *American Family Physician*, 85(11), 1043-1044.

Rochester, J. R. (2013). **Bisphenol A and human health: a review of the literature.** *Reproductive Toxicology*, 42, 132-155.

Rogers, J. A., Metz, L., Yong, V. (2013). **Endocrine disrupting chemicals and immune responses: a focus on bisphenol-A and its potential mechanisms.** *Molecular Immunology*, 53, 421-430.

Rojas-Espinoza, O. (2001). **Inmunología.** (2ª ed.) México: Editorial Médica Panamericana, pp. 79, 80, 102.

Ruggieri, A., Anticoli, S., D´Ambrosio, A., Giodani, L., Viora, M. (2016). **The influence of sex and gender on immunity, infection and vaccination.** *Annual Istituto Superiore Sanità*, 52(2), 198-204.

Sakai, S., Kauffman, K. D., Schenkel, J. M., McBerry, C. C., Mayer-Barber, K. D., Masopust, D., Barber, D. L. (2014). **Control of *Mycobacterium tuberculosis* infection by a subset of lung parenchyma homing CD4 T cells.** *Journal of Immunology*, 192(7), 2965-2969.

Sanhueza, J., & Valenzuela, A. (2006). **Receptores nucleares y regulación de la expresión génica por ácidos grasos poliinsaturados: algo más que producción de energía y esencialidad.** *Revista Chilena de Nutrición*, 33(2).

Schonfelder, G., Wittfoht, W., Hopp, H., Talsness, C. E., Paul, M., Chahoud, I. (2002). **Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit.** *Environmental Health Perspectives*, 110, A703-A707.

Serrano, N. O., Fernández-Cabrera, M. F., Olmedo, P. M. (2001). **Disruptores endócrinos. El caso particular de los xenobióticos estrogénicos.** *Revista de Salud Ambiental*, 1(1), 6-11.

Solís-Martínez, R., Hernández-Flores, G., Ochoa-Carrillo, F. J., Ortiz-Lazareno, P., Bravo-Cuellar, A. (2015). **Macrófagos asociados a tumores contribuyen a la progresión de cáncer de próstata.** *Gaceta Mexicana de Oncología*, 14(2), 97-102.

Strickland, N., Müller, T. L., Berkowitz, N., Goliath, R., Carrington, M. N., Wilkinson, R. J., Burgers, W. A., Riou, C. (2017). **Characterization of Mycobacterium tuberculosis-specific cell using MHC class II tetramers reveals phenotypic differences related to HIV infection and tuberculosis disease.** *Journal of Immunology*, 199, 2440-2450.

Tabatabaei-Zayareh, N., Wang, T., Fawcett, K., Khan, F., Karas, E., Le Fevre, T., Szilvassy, S., Thomas, T., Eaves, A., Wognum, A. (2017). **A serum-free medium for differentiation of monocytes to macrophages.** *Journal of Immunology*, 198 (1).

Tanos, T., Rojo, L., Echeverria, P., Brisken, C. (2012). **ER and PR signaling nodes during mammary gland development.** *Breast Cancer Reserch*, 14(4).

Teixeira, D., Marques, C., Pestana, D., Faria, A., Norberto, S., Calhau, C., Monteiro, R. (2016). **Effects of xenoestrogens in human M1 and M2 macrophage migration, cytokine release and estrogen-related signaling pathways.** *Environmental Toxicology*, 31(11), 1496-1509.

Torres, M., Ramachandra, L., Rojas, R. E., Bobadilla, K., Thomas, J., Canaday, D. H., Harding, C. V., Boom, W. H. (2006). **Role of phagosomes and major histocompatibility complex class II**

(MHC-II) compartment in MHC-II antigen processing of Mycobacterium tuberculosis in human macrophages. *Infection and Immunity*, 74(3), 1621-1630.

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

World Health Organization (2016). **Disease burden and mortality estimates, 2000-2016.** Obtenido de https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/index1.html

Global Cancer Observatory (2018). **Cancer today.** Obtenido de <https://gco.iarc.fr/>

World Health Organization (2018). **Global tuberculosis report 2018.** Obtenido de https://www.who.int/tb/publications/global_report/en/

Yeh, CH., Wu, HC., Kuo, TH., Kuo, CH., Yang, SN., Wang, WL., Chen, HN., Wei, WJ., Hung, CH. (2010). **Suppressive effect on MDC and IP-10 expression in monocytes by endocrine disruptor chemicals.** *Inflammation*, 33, 10-17.

Yen, S., Jaffe, R., Barbieri, R. (2001). **Endocrinología de la reproducción: fisiología, fisiopatología y manejo clínico.** (4ª ed.) Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.

Yoshitake, J., Kato, K., Yoshioka, D., Sueishi, Y., Sawa, T., Akaike, T., Yoshimura, T. (2008). **Suppression of NO production and 8-nitroguanosine formation by phenol-containing endocrine-disrupting chemicals in LPS-stimulated macrophages:**

involvement of estrogen receptor-dependent or -independent pathways. *Journal of the Nitric Oxide Society*,18, 223-228.

Zawatski, W., & Lee, M. (2013). **Male pubertal development: are endocrine-disrupting compounds shifting the norms?** *Journal of Endocrinology*, 218, R1-R12.