



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Dimorfismo sexual inmune en timo  
durante la ontogenia en un modelo murino**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**P R E S E N T A:**

**Esteban Santacruz Martínez**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**Dr. Jorge Morales Montor**

**Investigador Titular C Definitivo de T.C.**



**Ciudad Universitaria, Ciudad de México a, mayo de 2016**



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.

## **Agradecimientos**

A la UNAM cuyas puertas abrí a través del examen de admisión y proporcionarme educación de calidad así como un sinfín de oportunidades de crecimiento.

A mi familia, a mis hermanos, especialmente a mis padres, Amalio Santacruz Varela y Josefa Martínez Hernández, por la beca de 24 años que llevo recibiendo de ellos de la mano de la íntegra formación que me han proporcionado. Especialmente por su apoyo en mi decisión de vida que es dedicarme a las ciencias (no agronómicas), así como al resto de mi familia extendida, tanto a mis tíos como a mis primos.

A mi tutor, el Dr. Jorge Morales Montor, director de la orquesta del Laboratorio de Interacciones Neuroinmunoendócrinas, a la Dra. Karen Nava Castro por su apoyo enseñanza y asesoría en los análisis de citometría de flujo. Al M. en C. José Alejandro Marmolejo Valenciava por su participación activa en la determinación sexual de los fetos.

A los compañeros de laboratorio, la cDra. Rosalía Cervántes Hernandez y la cDra. Margarita Isabel Palacios Arreola por su apoyo en la eutanasia de animales de laboratorio, extracción de RNA, cálculos para la preparación de reactivos y el apoyo estandarizando los programas para PCR.

A compañeros de generación, Fer (Zarigüeya) por las tardes de debates y el cariño mutuo, a Edday, MaFer (Metalera) y Paco por los consejos y la retroalimentación en mi formación de biólogo desde un punto de vista siempre muy creativo. Espero que las tardes de paleodiversión continúen por mucho tiempo. A la amiga desde primer semestre MariFer (Fresa) por siempre ser muy ella misma.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo recibido de Ayudante de Investigador del SNI con expediente # 12453, al igual que por el apoyo financiero del donativo # 176803 obtenido del Programa de Fondos Sectoriales Ciencia Básica (CB-SEP). También al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico,

Universidad Nacional Autónoma de México por el el donativo IN-208715. Ambos donativos otorgados al Dr. Jorge Morales-Montor, Tutor principal de la presente Tesis.

**‘All extremes are bad,’ the Professor said, very gravely. ‘For instance, Sobriety is a very good thing when practiced *in moderation*: but even Sobriety, when carried to an *extreme*, has its disadvantages. When a Man’s tipsy, he sees one thing as two. But, when he’s *extremely* sober, he sees two things as one. It’s equally inconvenient, whatsoever happens’**

**Lewis Carroll**

## Índice

<b>Abreviaturas</b>	<b>1</b>
<b>Resumen</b>	<b>3</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>4</b>
<b>1.1. Dimorfismo sexual</b>	<b>4</b>
<b>1.1.1. Ontogenia del dimorfismo sexual</b>	<b>5</b>
<b>1.2. Timo</b>	<b>8</b>
<b>1.3. Dimorfismo sexual inmune</b>	<b>11</b>
<b>1.3.1. Influencia de las hormonas sexuales</b>	<b>12</b>
<b>1.3.2. Dimorfismo sexual no determinada por hormonas esteroideas</b>	<b>13</b>
<b>2. Objetivos</b>	<b>15</b>
<b>2.1. Objetivo general</b>	<b>15</b>
<b>2.2. Objetivos específicos</b>	<b>15</b>
<b>3. Justificación</b>	<b>16</b>
<b>4. Hipótesis</b>	<b>17</b>
<b>5. Métodos</b>	<b>18</b>
<b>6. Resultados</b>	<b>24</b>
<b>7. Discusión</b>	<b>33</b>
<b>8. Conclusiones</b>	<b>41</b>
<b>9. Perspectivas</b>	<b>42</b>
<b>10. Bibliografía</b>	<b>43</b>
<b>11. Anexos</b>	<b>49</b>
<b>11.1. Gónadas Fetales</b>	<b>49</b>
<b>11.2. Expresión relativa de receptores esteroideos</b>	<b>50</b>
<b>11.3. Controles de carga del gen ribosomal 18s</b>	<b>52</b>

## **Abreviaturas**

**AR** Receptor de andrógenos

**CFSE** Carboxifluoresceína succinimidil éster

**DHT** Dihidrotestosterona

**DNA** Ácido desoxirribonucleico

**dNTP** Desoxirribonucleótidos trifosfatados

**Dpc** Días postcoito

**ELISA** Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

**GnRH** Hormona liberadora de gonadotropina

**hCG** Gonadotropina coriónica humana

**HPG** Hipotálamo-pituitaria-gónada

**IgG** Inmunoglobulina G

**E<sub>2</sub>** Estradiol

**ER** Receptor de estradiol

**FACS** Clasificación celular activado por fluorescencia

**FSC-A** Área de dispersión frontal de luz

**FSC-H** Altura de dispersión frontal de luz

**FSH** Hormona folículo estimulante

**LH** Hormona luteinizante

**mPR** Receptor de progesterona membranar

**mRNA** Ácido ribonucleico mensajero

**NK** Natural Killer

**P<sub>4</sub>** Progesterona

**PCR** Reacción en cadena de polimeraza

**PR** Receptor de progesterona

**RNA** Ácido ribonucleico

**RPMI** Instituto Roswell Park Memorial

**RT-PCR** PCR con retrotranscripción

**SFB** Suero fetal bovino

**SRY** Región determinante del sexo del cromosoma Y

**SSC-A** Área de dispersión lateral de luz

**T<sub>4</sub>** Testosterona

**TCR** Receptor de linfocitos T

**TDF** Factor determinante testicular

**Th1/2** T cooperativo de tipo 1 ó 2

**Treg** Linfocito T regulador



## Resumen

El dimorfismo sexual inmunológico es la diferencia en el sistema y la respuesta inmunológica que existe entre machos y hembras. Este ha sido ampliamente documentado en mamíferos, tanto en enfermedades con distintos agentes etiológicos como en ausencia de enfermedad. Este fenómeno biológico se atribuye principalmente a las diferencias endócrinas existentes entre machos y hembras, y en segundo término a la carga genética de algunos genes relevantes para el sistema inmunológico contenidos en el cromosoma X. A pesar de lo anterior, existe evidencia de que el dimorfismo sexual inmunológico existe previo a la pubertad, etapa en donde inicia el dimorfismo endócrino. Se sabe que existe dimorfismo sexual en el sistema inmunológico adaptativo, y en éste, particularmente en los linfocitos T, los cuales son generados en el timo. Para determinar en qué etapa de la ontogenia se establece el dimorfismo sexual inmunológico, en el presente trabajo se estudiaron las diferencias en las subpoblaciones de timocitos, la expresión de receptores a hormonas sexuales esteroideas en los timocitos, así como la expresión de interleucinas y receptores a hormonas esteroideas en timo total en ratones fetales, prepúberes y adultos. Nuestros resultados muestran que tanto los porcentajes de subpoblaciones de timocitos (medidos por citometría de flujo) como la presencia de receptores intracelulares son diferentes sólo en adultos, sin diferencia en los ratones fetales y prepuberes, mientras que existen diferencias en la expresión de IL-10 en timo total a lo largo de la ontogenia, incluso previo a la pubertad. Lo anterior nos indica que el timo juega un papel importante en el establecimiento del dimorfismo sexual inmunológico durante la ontogenia y sugiere que debe investigarse más a fondo el dimorfismo de linfocitos T reguladores en timo.

# 1. Introducción

## 1.1 Dimorfismo sexual

Dentro de los eucariontes, existen incontables ejemplos de organismos con reproducción sexual, como algunos hongos, plantas y un gran número de animales. Se ha propuesto que esta clase de reproducción ampliamente distribuida en la naturaleza, proporciona ventajas a las poblaciones de organismos que la poseen acelerando el proceso de adaptación. Lo anterior se debe a la recombinación cromosómica durante la meiosis, con lo que se adquieren alelos ventajosos, así como la eliminación de mutaciones deletéreas (Keightley & Otto, 2006). Lo anterior no sólo en escenarios teóricos sino también en condiciones experimentales (Allen & Lynch, 2008). Se ha propuesto que una presión selectiva fuerte para esto es aumentar el polimorfismo de defensas contra patógenos, especialmente contra parásitos (Hamilton *et al*, 1990).

Las especies con reproducción sexual se pueden clasificar de acuerdo a cómo se distribuyen los sexos entre los ejemplares que la conforman, siendo monoicas (aquellas en las cuales el mismo organismo posee estructuras sexuales funcionales tanto masculinas como femeninas) y dioicas (en las cuales existen algunos organismos exclusivamente masculinos y otros exclusivamente femeninos). Entre los vertebrados, la mayoría puede ser clasificada en el segundo grupo.

Dentro de los vertebrados, el sexo de los organismos puede ser determinado genéticamente en organismos como peces, serpientes, algunos lagartos, aves y mamíferos; así como por la temperatura de incubación de los huevos en tortugas, cocodrilos y algunos otros reptiles. En el caso de los mamíferos de la subclase *Theria* (mamíferos en los cuales el embrión se desarrolla al interior del útero materno), todos poseen un sistema de cromosoma sexual de machos XY/ hembras XX (Livernois *et al*, 2012).

A pesar de que los organismos de la misma especie, pero de diferente sexo, comparten todos los pares de cromosomas somáticos y uno sexual (diferiendo sólo en algunas ocasiones en un solo cromosoma), llegan a existir grandes diferencias anatómicas y fisiológicas entre ellos. A la presencia de diferencias entre individuos de distinto sexo, pertenecientes a la misma especie, se le conoce como dimorfismo sexual.

Existen varias hipótesis que explican el dimorfismo sexual en animales. La primera, propuesta por Charles Darwin, sugiere que todo dimorfismo sexual, específicamente morfológico, es producto de la mera selección sexual proporcionando

ventaja ya sea en la elección de machos o competencia entre machos (Darwin, 1871); sin embargo, esta hipótesis sólo puede explicar una pequeña proporción del dimorfismo. Posteriormente, han surgido otras hipótesis, entre las que destaca la de los nichos dimórficos, en la cual el dimorfismo sexual se explica por la contribución diferencial de recursos energéticos entre machos y hembras en la reproducción, pues en general las hembras realizan un gasto energético mayor al proporcionar el vitelo del huevo en organismos ovíparos, proporcionando los nutrientes durante el desarrollo del embrión en vivíparos, o incluso invirtiendo esfuerzo en el cuidado de las crías (Hedrick & Temeles, 1989). Este segundo modelo proporciona además de una mayor explicación al dimorfismo no sólo morfológico, sino que también permite explicar dimorfismo fisiológico y conductual.

El dimorfismo sexual, además de comprender diferencias a nivel de órganos reproductores primarios y secundarios, también comprende diferencias morfológicas y fisiológicas. Algunas de las diferencias morfológicas más evidentes en mamíferos son, en general, el peso y tamaño mayor de machos que de hembras.

A nivel fisiológico estas diferencias son más sutiles e involucran a cada parte del sistema neuroinmunoendócrino. Como característica endócrina principal, existe una diferencia en cuanto a hormonas esteroideas entre machos y hembras. Otra diferencia notable, es en el sistema nervioso, donde se observan cambios tanto a nivel de conectoma (Ingallhalikar et al., 2014) como en el transcriptoma (Dewing *et al*, 2003). Otra diferencia entre machos y hembras, es aquella a nivel del sistema inmunológico en la que se profundizará más adelante.

### **1.1.1. Ontogenia del dimorfismo sexual**

El proceso de diferenciación sexual prenatal en mamíferos, para facilitar su estudio, se ha dividido en 3 etapas: la genética, la gonadal y la fenotípica. En la primera de estas etapas, la etapa genética, se inicia en el momento en que un espermatozoide con un juego completo de cromosomas autosómicos y ya sea un cromosoma sexual X o Y, fertiliza a un óvulo que siempre aporta un cromosoma sexual X, además del resto del juego de cromosomas autosómicos. De esta manera al ocurrir la fecundación se establece el dimorfismo cromosómico XX en la hembra y XY en el macho (Kofman-Alfaro & Queipo, 2005).

En la segunda etapa, la gonadal, el dimorfismo comienza con la expresión del gen *SRY* especialmente en las crestas gonadales. La proteína para la cual codifica *SRY*, el factor determinante testicular (TDF), es capaz de formar un complejo con la proteína SF1, los cuales en conjunto actúan como factor de transcripción para muchas secuencias. Entre estas secuencias destaca SOX9, el cual es también un factor de transcripción que induce la diferenciación de las células de Sertoli que a su vez estimulan la diferenciación de las células de Leydig. Además de lo anterior, las células de Sertoli secretan hormona antimülleriana la cual se encarga de desfeminizar al organismo atrofiando estructuras femeninas. Por otro lado, las células de Leydig se encargan de secretar testosterona ( $T_4$ ) y convertir ésta en dihidrotestosterona (DHT) ante un estímulo de gonadotropinas provenientes de la hipófisis (Kofman-Alfaro & Queipo, 2005) (Figura 1).

Lo anterior da como resultado la diferenciación de las gónadas fetales en testículos. Por otro lado, la ausencia de *SRY* y de hormona antimülleriana, resulta en el desarrollo de células de la granulosa y de la teca, que secretan progesterona ( $P_4$ ) y estradiol ( $E_2$ ), que a su vez promueven el desarrollo de las gónadas fetales a ovarios. En los ratones, la determinación sexual comienza a los 10.5 días *post coitum* (dpc) llegando en machos *SRY* a su pico al día 11.5 dpc, momento en que comienza a expresarse SOX9 y para el día 12.5 dpc la expresión de *SRY* vuelve a bajar y SOX9 se mantiene elevado durante todo el desarrollo testicular. En el caso de las hembras, WNT4 es el principal gen encargado de dirigir el desarrollo ovárico (Kashimada & Koopman, 2010).

Posteriormente comienza la fase de diferenciación fenotípica, en la cual dados los altos niveles de hormonas esteroideas sexuales masculinas circulantes, se da el desarrollo del resto de órganos accesorios de los aparatos reproductores (Kofman-Alfaro & Queipo, 2005). Esto ocurre a los 18.5 dpc, que es cuando hay un pico en los niveles de  $T_4$  y DHT en los machos (O'Shaughnessy et al., 1998).

Además de los cambios generadores de dimorfismo a nivel de gónadas, a partir del desarrollo embrionario también existe dimorfismo en otros sistemas tales como el sistema nervioso, endócrino e inmunológico.

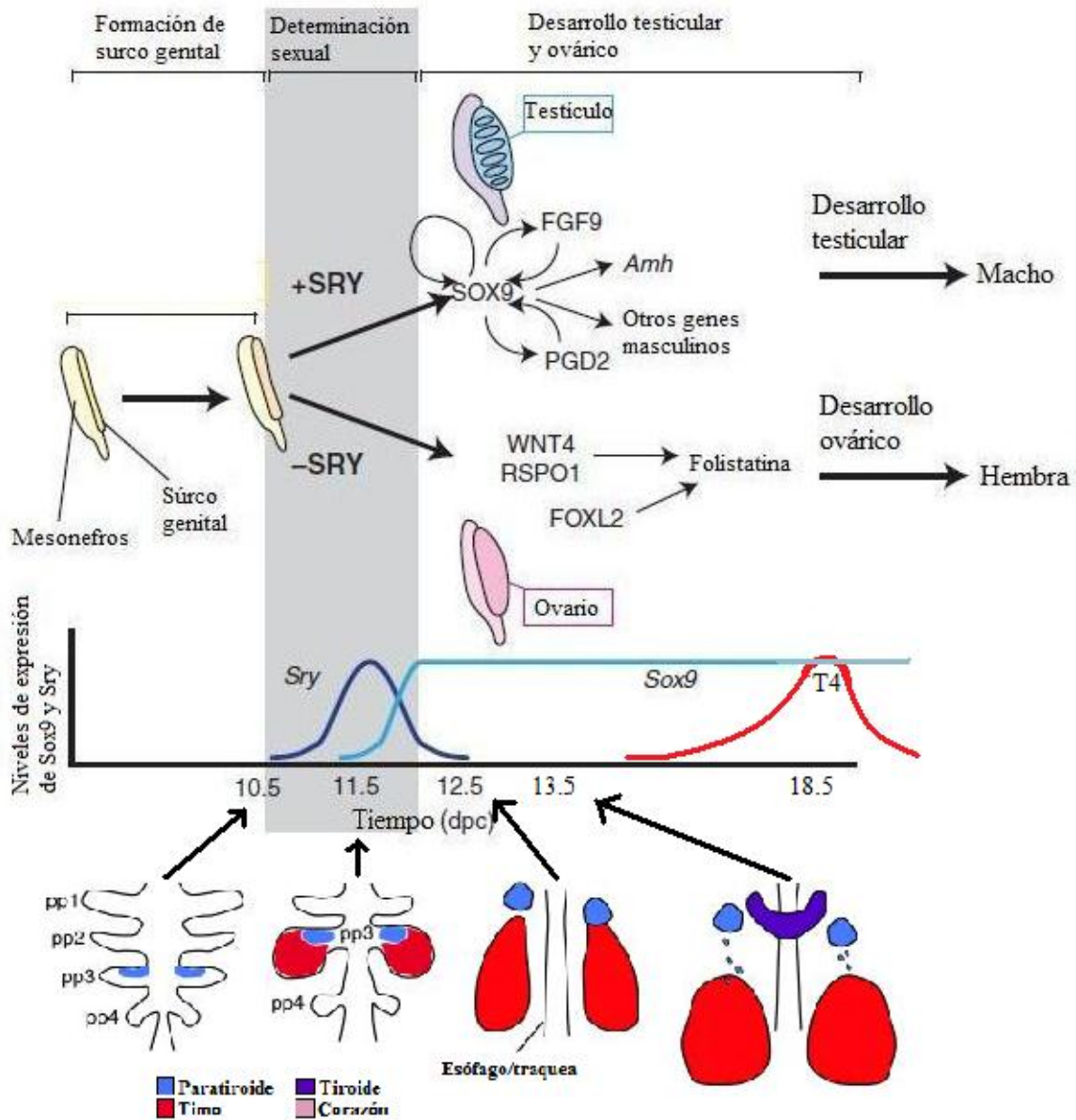


Figura 1. Expresión de genes involucrados en la diferenciación de gónadas masculinas y femeninas. Aunque la expresión de *Sry* es fundamental, *SOX9* es el responsable de la diferenciación de estos órganos. Figura modificada de Kashimada & Koopman (2010) y Gordon & Manley (2011).

Dichos cambios, pueden deberse a los cambios hormonales mencionados anteriormente, pues se ha descrito la presencia de dimorfismo sexual en el transcriptoma de cerebro a partir del 10.5 dpc; previo al desarrollo testicular u ovárico (Dewing et al., 2003). Por tanto, dicho dimorfismo debe ser producto de un mecanismo genético. Con respecto a lo anterior, también el RNA mensajero (mRNA) del gen *SRY* ha sido detectado en el cerebro por reacción en cadena de polimerasa de transcripción reversa (RT-PCR) a partir del día 11.5 dpc (Mayer et al, 2010).

El conjunto de dimorfismos que se han mencionado anteriormente, dan lugar a grandes rasgos a los caracteres sexuales primarios, es decir, a los caracteres sexuales presentes al nacimiento del organismo. Posteriormente, durante la ontogenia, previo a que los organismos alcancen la edad reproductora, se da el proceso de pubertad durante el cual maduran sus órganos reproductores y adquieren otros caracteres sexuales secundarios.

Para que esto suceda, es necesario que los niveles de hormonas sexuales esteroideas se eleven a través de señales del eje hipotálamo-hipófisis-gónada (HPG). Esto comienza con la liberación de GnRH (Hormona liberadora de gonadotropina) por parte del hipotálamo que estimula la liberación de las gonadotropinas LH (Hormona luteinizante) y FSH (Hormona folículo estimulante) por parte de la hipófisis. En hembras, estas hormonas inducen la síntesis cíclica de E<sub>2</sub>, la cual a su vez induce maduración del sistema reproductor y el crecimiento de las glándulas mamarias. Por otro lado, en machos, la LH induce la síntesis de T<sub>4</sub> y DHT por las células de Leydig y la FSH induce la maduración de los túbulos seminíferos. El proceso de pubertad culmina en hembras con el comienzo de la ovulación y en machos con la espermatogénesis (Molina, 2009).

## 1.2 El Timo

El timo es un órgano bilobulado plano situado arriba del corazón, originado a partir de tejido del endodermo. Debido a su papel como órgano en donde se lleva a cabo el desarrollo y maduración de los linfocitos, en su caso particular de los linfocitos T, es considerado como un órgano linfoide primario al igual que la médula ósea y el hígado fetal (Murphy, 2008)

Morfológicamente, cada lóbulo que lo compone está a su vez subdividido en lobulillos, los cuales están delimitados por cordones de tejido conectivo llamados trabéculas. Cada lóbulo también está compuesto por dos compartimentos: uno externo conocido como corteza, en el cual se encuentra una gran densidad de linfocitos T inmaduros y células epiteliales; y uno interno en el cual se encuentran linfocitos T maduros asociados a otras células que contribuyen a la maduración de los linfocitos T inmaduros, tales como dendríticas, macrófagos y más células epiteliales (Kindt *et al*, 2007) (Figura 2).

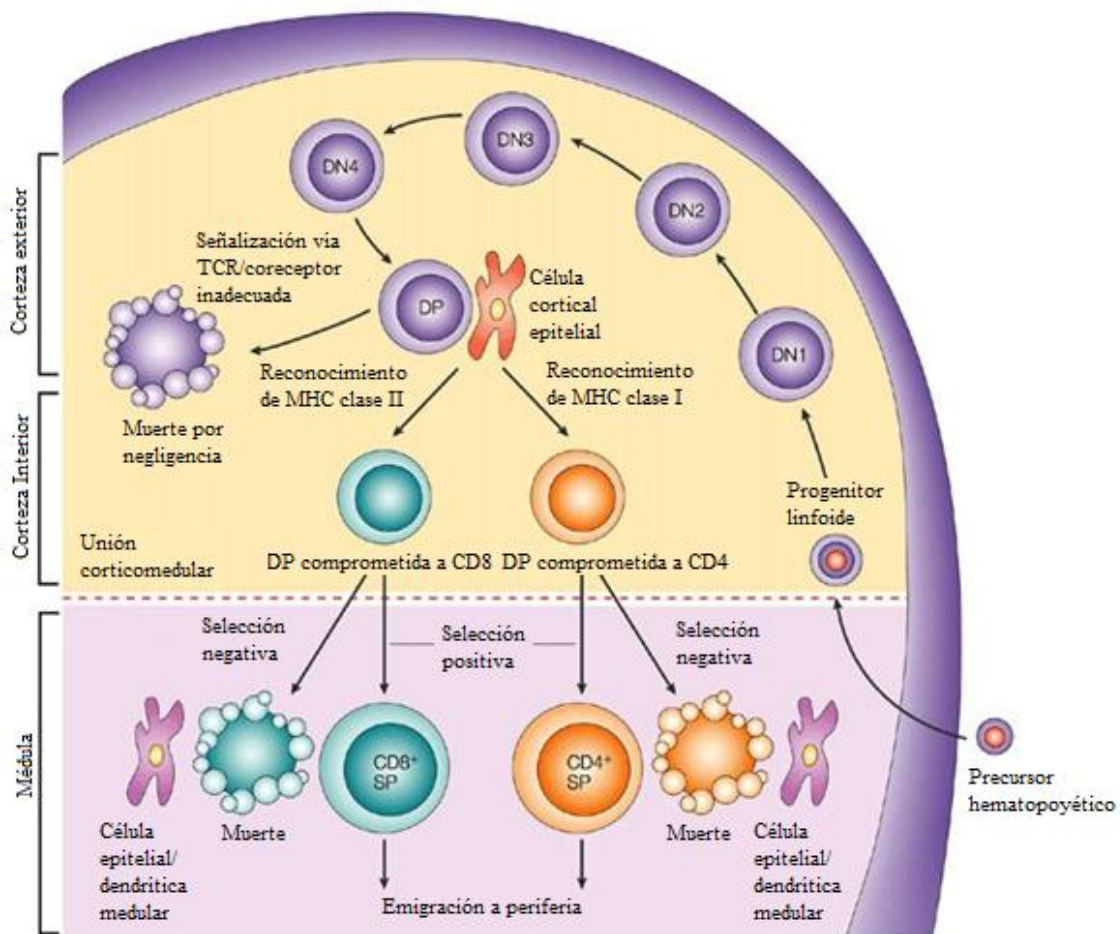


Figura 2. Esquema de maduración de linfocitos T a partir de precursor hematopoyético en timo. Tomado y traducido de Germain (Germain, 2002).

El timo, por un lado da origen a los linfocitos T cooperadores, a los cuales me referiré en adelante como linfocitos CD4 debido a que poseen a la proteína CD4 (cluster differentiation antigen 4, por sus siglas en inglés), en su superficie que ayuda al reconocimiento del complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC clase II), los cuales son en general los encargados de dirigir la respuesta inmunológica a través de la secreción de citocinas, tras activarse a través de hacer una sinapsis inmunológica con una célula profesional presentadora de antígeno. Por otro lado, también da lugar a los linfocitos citotóxicos, a los cuales me referiré en adelante como CD8 (cluster differentiation antigen 8, por sus siglas en inglés) debido a que poseen esta proteína de superficie que le permite activarse tras hacer sinapsis inmunológica con cualquier célula que presente un péptido para el cual tengan un receptor de células T, o TCR (T cell receptor, por sus siglas en inglés) que sea afín en contexto del MHC clase II (Kindt *et al*, 2007).

Tanto los linfocitos T CD4 como los CD8, se originan a partir de un progenitor común, el cual carece de ambos receptores, tanto CD4 y CD8, denominado como doble negativo. Éste progenitor migra de la médula ósea al timo entrando por la vénula de endotelio alto. Una vez en el timo, estas células migran hacia su corteza donde adquieren tanto el marcador CD4 como el CD8, las cuales son doble positivas. Dependiendo de estímulos recibidos por la célula dendrítica de timo, que le presenta antígenos propios se da la selección positiva de aquellos TCR capaces de reconocer las moléculas de MHC propias, y la selección negativa de los TCR que reconocen con alta afinidad a las moléculas de MHC que presentan antígenos propios (Germain, 2002). Como excepción a la regla de la selección negativa, está la generación de linfocitos T reguladores, los cuales son linfocitos CD4, que a pesar de que reconocen antígenos propios, no desencadenan una respuesta de destrucción hacia elementos propios. Tras esto estos linfocitos denominados *vírgenes*, debido a que no han recibido estímulos de antígenos, viajan por el organismo, a donde pueden ser estimulados por células dendríticas maduras en nódulos linfáticos periféricos o bazo, que presentan antígenos en un contexto de MHC, moléculas co-estimuladores como CD80 y CD86, además de secretar citocinas. De esta estimulación, se produce la proliferación clonal de linfocitos específicos en nódulos linfáticos, dando origen tanto a linfocitos T CD4 y CD8 efectores, como de memoria (Kouzine *et al*, 2013).

Todas las etapas mencionadas anteriormente, son esenciales en el desarrollo del sistema inmunológico adaptativo. Esto se ve reflejado, en que individuos con infecciones con VIH, en los cuales el número de linfocitos T CD4 disminuye, se vuelven susceptibles a enfermedades. Además, individuos con defectos en el desarrollo del timo, como son los ratones desnudos atímicos, así como aquellos deficientes KO (knock out por sus siglas en inglés) para genes de desarrollo de linfocitos T, como lo es la IL-7 son los causantes de inmunodeficiencias graves que resultan en inmunosupresión.

La organogénesis del timo se da entre los días 10.5 y 13.5 dpc en ratones (Gordon & Manley, 2011), y coincide con la etapa en la que se diferencia la gónada fetal. Como se mencionó anteriormente, en estas etapas aún no hay influencia de las hormonas sexuales esteroideas, y dado que en esta etapa el gen *Sry* influye en el dimorfismo tanto a nivel endócrino (Kashimada & Koopman, 2010) como nervioso (Mayer *et al.*, 2010), no resulta raro que se pregunte si también se llega a expresar este gen en órganos o células que formen parte del sistema inmune (Figura 1).



### 1.3 Dimorfismo sexual inmunológico

Como se mencionó anteriormente una de las teorías del dimorfismo sexual inmunológico, se explica por la “contribución diferencial entre machos y hembras en la reproducción, pues en general las hembras realizan un gasto energético mayor al proporcionar el vitelo del huevo en organismos ovíparos, proporcionando los nutrientes durante el desarrollo del embrión en vivíparos, o incluso invirtiendo esfuerzo en el cuidado de las crías” (Hedrick & Temeles, 1989). Entre estos esfuerzos de inversión energética, se encuentra la inversión en el sistema inmunológico, pues en mamíferos, existe la transferencia de anticuerpos por la lactancia (Hanson & Söderström, 1981), y en humanos, además existe la transferencia de inmunoglobulina G (IgG) por vía transplacentaria (van den Berg, *et al*, 2011).

Existe el paradigma de que en la mayoría de las especies, los machos son más susceptibles a infecciones causadas por distintos patógenos. Sin embargo, se puede argumentar que existen, además de factores inmunológicos, factores conductuales que aumentan la susceptibilidad de los machos (Klein, 2000). Esta teoría tampoco considera el tipo de respuesta inmunológica que se genera en ambos sexos, y por lo cual, las hembras, por ejemplo, son más susceptibles a las respuestas dependientes de una respuesta de linfocitos cooperadores tipo 1 (Th1, por sus siglas en inglés), y son más resistentes a las infecciones dependientes de anticuerpos, o Th2 (Morales-Montor *et al*, 2004)

En diversos mamíferos, el dimorfismo sexual inmunológico es un fenómeno ampliamente reportado. Este fenómeno se ha observado en patologías que involucran infecciones por parásitos (Morales-Montor *et al*, 2004), enfermedades autoinmunes (Nussinovitch & Shoenfeld, 2012), enfermedades virales (Klein, *et al*, 2012), entre otras.

Se atribuye al dimorfismo sexual inmune diferentes causas. Una de ellas es la diferencia en dosis de ploidía de algunos genes relacionados con el sistema inmune, debido a que estos genes se encuentran en el cromosoma X; por tanto para estos genes las hembras tendrán el doble de copias que los machos. Entre estos genes, destacan algunos como el receptor  $\alpha$  de factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos 2, los receptores a las interleucinas 1, 2, 9, 13, la cinasa asociada al

receptor de interleucina 1, los receptores tipo toll 7 y 8, CD40 ligando, y el factor de transcripción FOXP3 el cual es fundamental para linfocitos T reguladores (Fish, 2008).

### 1.3.1. Influencia de las hormonas sexuales

Desde la década de los 50s, existía amplia evidencia que sugiere que la condición endócrina, tenía una fuerte influencia sobre los tejidos linfoides de los individuos. Entre las observaciones destacan aquellas que afirman que la administración de testosterona (T<sub>4</sub>) o estradiol (E<sub>2</sub>) induce la atrofia del timo. También se observó, que la castración puede revertir la atrofia del timo en animales envejecidos (Dougherty, 1952).

Pese a las observaciones anteriores, existieron por mucho tiempo argumentos en contra del análisis de parámetros en individuos tratados con esteroides sexuales, debido a que los efectos observados pueden ser consecuencia indirecta de dicha administración.

En respuesta a lo anterior, se ha identificado *in silico*, que varios genes relacionados con el sistema inmunológico contienen en su región promotora elementos de respuesta a andrógeno, estrógenos y progesterona, los cuales podrían modificar la tasa de transcripción de estos genes (Hannah *et al*, 2008).

Para dilucidar el efecto de los esteroides sexuales, también se han realizado experimentos que demuestran la influencia de las hormonas esteroideas en células aisladas, es decir en experimentos *ex vivo*, de elementos celulares tanto del sistema inmunológico innato como adaptativo.

Entre las células del sistema inmune innato, que estimulan la respuesta inmune adaptativa (y por tanto la modulan), en las que se han encontrado receptores para hormonas esteroideas, se encuentran los macrófagos, en los cuales se han encontrado receptores para andrógenos (RA) (Ashcroft & Mills, 2002), progesterona (RP) y estrógenos (RE) (Khan *et al*, 2005); así como en las células dendríticas también se ha encontrado RE (Sapino *et al*, 2003) y RP (Butts *et al*, 2007).

Lo anterior, también se observa directamente tanto en linfocitos B, los cuales poseen RE (Erlandsson *et al*, 2003); mientras que en linfocitos T se han identificado receptores membranales para progesterona (mRP) (Chien *et al*, 2009) y ER (Stimson, 1988). También se observa un efecto de linfocitos T a estrógenos en la cual influye fuertemente la concentración de estrógeno con que es estimulada (Pernis, 2007).

En el caso de las enfermedades autoinmunes, se pueden apreciar efectos adversos en el progreso de la enfermedad como consecuencia de la estimulación de las células del sistema inmune adaptativo. Por un lado, se ha observado que la estimulación de linfocitos T con estrógenos en pacientes con lupus eritematoso sistémico disminuye su sensibilidad a entrar en apoptosis; (Kim *et al*, 2010) mientras que en linfocitos B, además de insensibilizarlos a entrar en apoptosis, disminuye su umbral de activación (Grimaldi *et al*, 2002).

Otros análisis extensivos realizados durante la pubertad, indican además, que estas diferencias en factores inmunológicos que predisponen a hembras a poseer mayor susceptibilidad a enfermedades autoinmunes, son consecuencia exclusivamente de la secreción de hormonas esteroideas durante la pubertad (Lamason *et al*, 2006).

### **1.3.2 Dimorfismo sexual no determinado por hormonas esteroideas**

Aunque las evidencias experimentales apuntan a que el dimorfismo sexual inmunológico es un fenómeno consecuente de la diferencia de hormonas esteroideas presentes en el torrente sanguíneo, hay más factores que deben ser tomados en cuenta previamente antes de llegar a la conclusión anterior.

En el caso de las enfermedades causadas por parásitos, se plantea que las diferencias en enfermedades parasitarias entre machos y hembras se deben a las diferencias que existe en su respuesta inmunológica influenciada por los esteroides sexuales. Sin embargo, también debe ser tomado en cuenta que dichas diferencias pueden ser consecuencia del efecto directo de los esteroides sexuales sobre dichos parásitos (Morales-Montor *et al*, 2004). Con respecto a lo anterior ya ha sido reportada la existencia tanto de receptores de hormonas esteroideas y/o la síntesis de las mismas tanto por parásitos metazoarios (Ibarra-Coronado *et al*, 2011) (Hernández-Bello *et al*, 2011) como protozoarios (Vacchina *et al*, 2008).

Un primer ejemplo es la tasa de muerte de neonatos. En este grupo se puede observar, a nivel nacional, una diferencia entre la muerte de hombres y mujeres a causa de enfermedades infecciosas intestinales, respiratorias y a causa de tuberculosis (Figura 3). Esto es relevante, porque se considera que entre el nacimiento y la pubertad no existen diferencias en los niveles de hormonas esteroideas entre hombres y mujeres, y por tanto se puede considerar que estas diferencias son enteramente debidas a diferencias en la respuesta inmunológica propia del sexo del individuo contra los

patógenos responsables de estas enfermedades. Incluso, este hecho contrasta con la teoría del dimorfismo como consecuencia de un aporte energético diferente entre machos y hembras (Hedrick & Temeles, 1989), lo anterior debido a que en etapas del desarrollo previas a la edad reproductiva no deberían existir diferencias en inversión de energía en aspectos sexuales y dicha energía se invierte solamente en el desarrollo del “soma”.

Otro ejemplo de dimorfismo sexual inmunológico, independiente de los esteroides sexuales, es el que se ha observado en sobrenadantes de cultivo de linfocitos de bazo estimulados con acetato de forbolmiristato e ionomicina, de ratones macho y hembra gonadectomizados previo a la pubertad (De León-Nava *et al*, 2009). A pesar de que se esperaría que entre dichos grupos no deberían existir diferencias en el microambiente hormonal, existen entre ellos diferencia en la expresión de citocinas interferón gama y de interleucina 2 (De León-Nava *et al*, 2009).

Por lo tanto es de suponer que el dimorfismo sexual inmunológico es un fenómeno que se establece previo a la pubertad y probablemente previo al alumbramiento en los mamíferos.

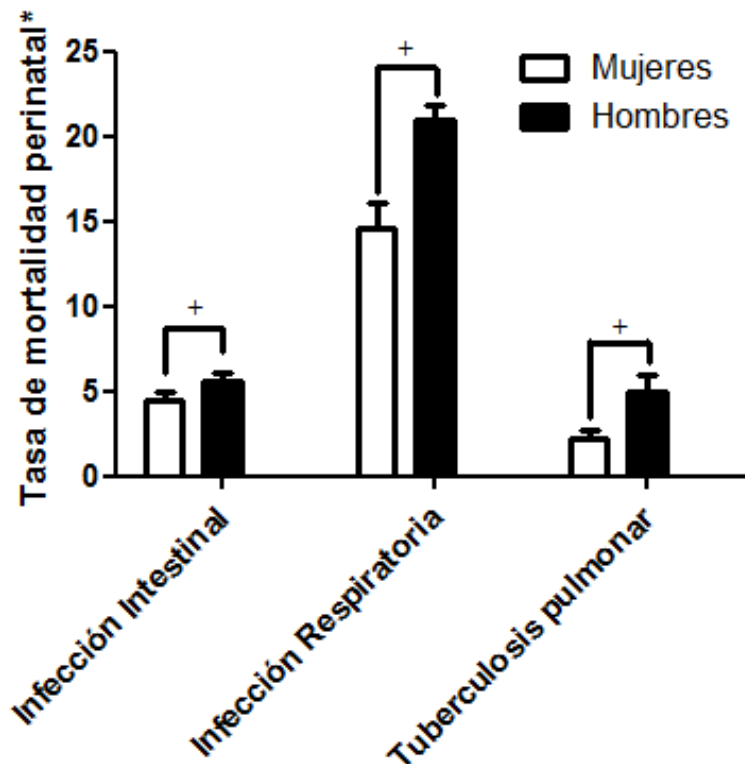


Figura 3. Tasas de natalidad perinatal en México, \*Tasa por 100,000 habitantes estandarizada por el método directo usando la población mundial estándar Word Health Organization 2000. Age Standarization of rates: A new WHO standard, +  $p < 0.001$  prueba t. Datos obtenidos del Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS) promedios de los años 2000-2005  $\pm$  SD EN <http://sinais.salud.gob.mx/mortalidad/> Consultado el 20 de abril de 2014.

### **3. Justificación**

El dimorfismo sexual en el sistema inmunológico es un fenómeno ampliamente documentado y se desconoce en qué etapa se establece.

Se plantea que los esteroides sexuales son los responsables de éste dimorfismo y además se ha encontrado la influencia de estas hormonas a nivel molecular en el sistema inmunológico.

Existe evidencia que indica que estas hormonas, por si solas, no explican totalmente el dimorfismo.

El documentar a fondo el dimorfismo sexual en la respuesta inmune es un primer paso para indagar el mecanismo por el cual sucede éste.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo general

- Determinar la diferencia en parámetros inmunológicos y endocrinológicos entre machos y hembras de ratones de la cepa CD1 durante su ontogenia.

### 2.2 Objetivos específicos

- ⊙ Analizar los porcentajes de subpoblaciones celulares de linfocitos T CD3, CD4, CD8 en timos de fetos de 13.5 y 18.5 días *post coitum* (dpc).
- ⊙ Determinar los porcentajes de subpoblaciones celulares de linfocitos T CD3, CD4, CD8 en timos de ratones machos y hembras de 4, 8 y 20 semanas de edad.
- ⊙ Cuantificar por citometría de flujo la presencia de ER $\alpha$ , PRA y AR en las subpoblaciones de linfocitos CD3, CD4, CD8 en timos de fetos 13.5 y 18.5 dpc.
- ⊙ Evaluar por RT-PCR la presencia de mRNA de ER $\alpha$ , PRA, AR, IL10 y TGF $\beta$  en timo de individuos de 4, 8 y 20 semanas.

#### **4. Hipótesis**

El dimorfismo sexual inmunológico es independiente de los esteroides sexuales y por tanto se establece previo a la pubertad de los individuos.



## 5. Métodos

### *Ratones*

Para este estudio se utilizaron ratones (*Mus musculus*) de ambos sexos de la cepa CD1 de 4, 8 y 20 semanas de edad, así como los embriones provenientes de hembras gestantes a los 13.5 y 18.5 dpc. Fueron alimentados con Purina Diet 5015 y agua esterilizada en botellas de plástico *ad libitum*, mantenidos bajo condiciones constantes de 25°C de temperatura y ciclos de 12/12 luz/obscuridad. Los animales fueron sacrificados mediante cámara letal de CO<sub>2</sub>, a la cual le siguió el método de dislocación cervical para asegurar la eutanasia y se extrajo el timo. En el caso de los fetos, también se obtuvo la gónada para realizar un sexado morfológico del individuo (Figura Anexo 1). Las hembras adultas fueron sacrificadas durante la fase de estro de su ciclo estral.

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

### *Citometría y tinción de células de timo*

Los timos de los animales prepúberes y postpúberes sacrificados fueron disgregados, lavados en 1ml de PBS centrifugando a 2,000 rpm durante 3 minutos y resuspendidos en 200µl de buffer de clasificación celular activado por fluorescencia (FACS) y 200µl de paraformaldehído al 4% e incubados durante 10 minutos a 37°C. Para realizar la tinción intracelular de timocitos se agregó 1ml de metanol y se incubó 30 minutos a 4°C. Posteriormente, las células fueron lavadas con buffer de FACS, centrifugadas y resuspendidas en 200µl de buffer de FACS de los cuales 25µl por pozo fueron colocados en placas de 96 pozos de fondo redondo. Allí fueron agregados 25µl de la mezcla en buffer de FACS con los anticuerpos  $\alpha$ -CD3 (1:200) acoplado a AlexaFluor488,  $\alpha$ -CD4 (1:300) acoplado a APC/Cy7,  $\alpha$ -CD8 acoplado a PE/Cy5 (1:200); además de ya sea  $\alpha$ -ER (1:200),  $\alpha$ -PR (1:200) o  $\alpha$ -AR (1:100) hechos en conejo, esto fue incubado 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Después de esto se realizó un lavado con buffer de FACS, se agregaron 25µl de anticuerpo secundario anticonejo acoplado a AlexaFluor647 y se incubó 10 minutos más a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente se realiza un último lavado y se

resuspende en 200µl de buffer de FACS. Esto fue almacenado a 4°C en oscuridad por no más de una semana hasta ser leído por en un citómetro Attune azul/rojo.

En el caso de los especímenes fetales los timos fueron disgregados, lavados en 1ml de PBS, centrifugados a 2,000 rpm durante 3 minutos y resuspendidos en 200µl de buffer de FACS y 200µl de paraformaldehído al 4% e incubados durante 10 minutos a 37°C. Posteriormente les fueron agregados 25µl de la mezcla diluida en buffer de FACS de los anticuerpos con anticuerpos  $\alpha$ -CD3 (1:200) acoplado a AlexaFluor488,  $\alpha$ -CD4 (1:300) acoplado a APC/Cy7,  $\alpha$ -CD8 acoplado a PE/Cy5 (1:200), fueron incubados 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Después de esto se realizó un lavado con buffer de FACS, se resuspendió en 200µl de buffer de FACS y fue almacenado a 4°C en oscuridad hasta ser leído por citometría de flujo en un citómetro Attune azul/rojo.

En el caso de los organismos de 4, 8 y 16 semanas, se hizo en el programa FlowJo una selección en el cual primero se seleccionaron eventos correspondientes a una célula, escogiendo una diagonal en una gráfica de puntos de área de dispersión frontal de luz (FSC-A) contra altura de dispersión frontal de luz (FSC-H) (Figura 4A). Posteriormente, se seleccionaron los eventos correspondientes a lo esperado en “tamaño/granularidad” esperado para linfocitos en la gráfica de puntos FSC-A contra área de dispersión lateral de luz (SSC-A) (Figura 4B). Debido a la calibración por el uso de anticuerpos acoplados a varios fluoróforos, a algunos de los eventos se les asignó un valor negativo para la mediana de fluorescencia lo cual desviaba la mediana de fluorescencia, para solucionar esto se seleccionaron aquellos eventos con valores positivos de fluorescencia (Figuras 4C y 4D).

Finalmente se definieron las poblaciones positivas y negativas para los marcadores CD4 y CD8 por cuadrantes (Figura 4E) en el cual el cuadrante de dobles negativos contiene la menos el 90% de los eventos en las muestras sin teñir.

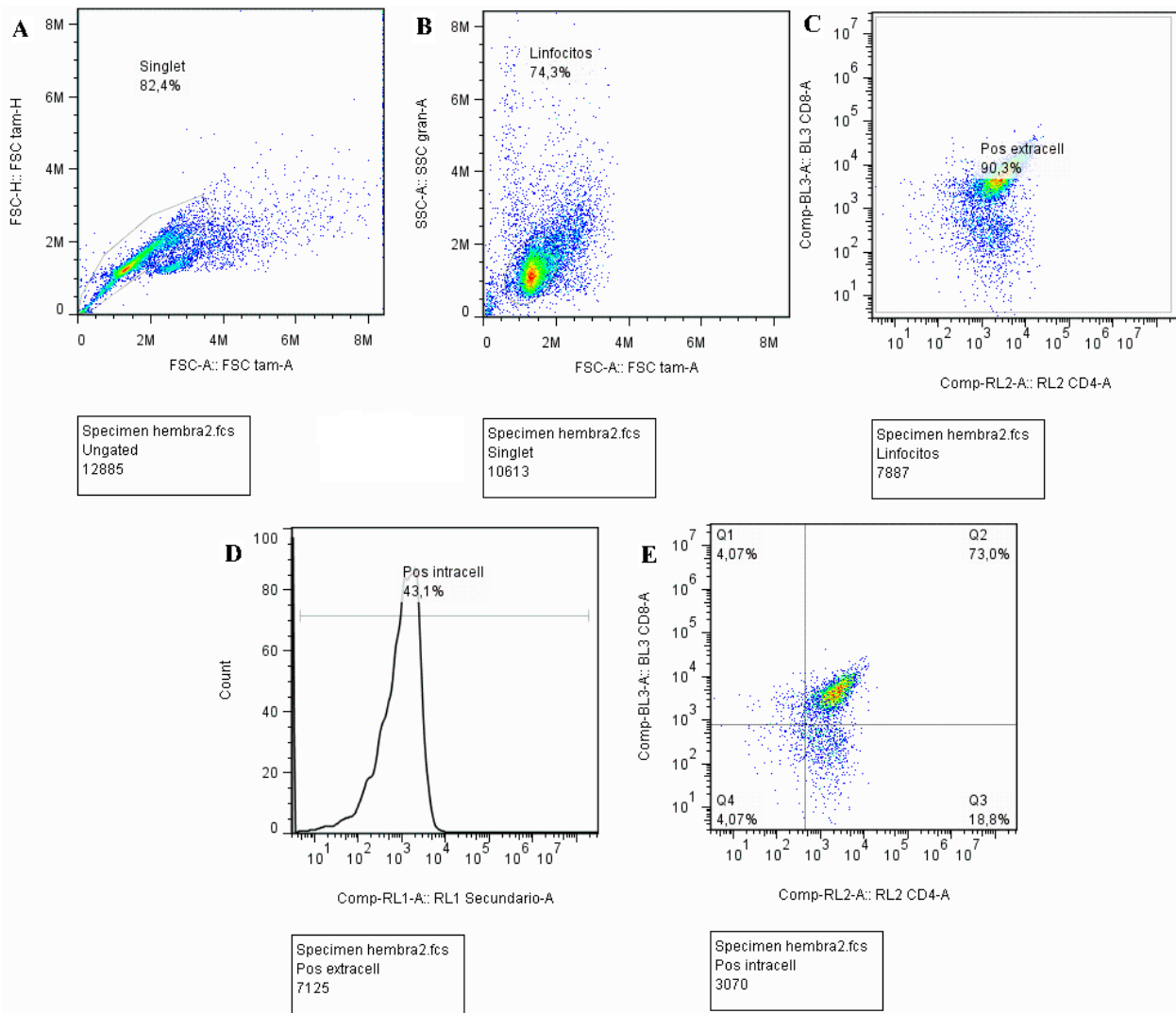


Figura 4. Se ilustrativa de cómo se llevó a cabo la definición de las subpoblaciones a evaluar. **A** Selección de eventos (los cuales son representados por un puntos) correspondientes a una sola célula bajo la lógica que aquellos eventos que se desplacen en el eje de “área” sin desplazarse en la de “altura” corresponderán a dos células o más células que fueron registradas como un solo evento. **B** Selección de eventos correspondientes a linfocitos por “tamaño/granularidad” por la calibración de potencia de los láseres usados por el citómetro. **C** Selección de eventos con lectura con valores positivos para los marcadores CD4/CD8. **D** Selección de eventos con lectura con valores positivos para los marcadores del anticuerpo secundario. **E** Identificación de subpoblaciones por cuadrantes.

Para cuantificar la presencia de los receptores intracelulares se graficó el cociente de la mediana de fluorescencia de la lectura utilizando tanto el anticuerpo contra los receptores intracelulares entre sólo el anticuerpo secundario (Figura 5).

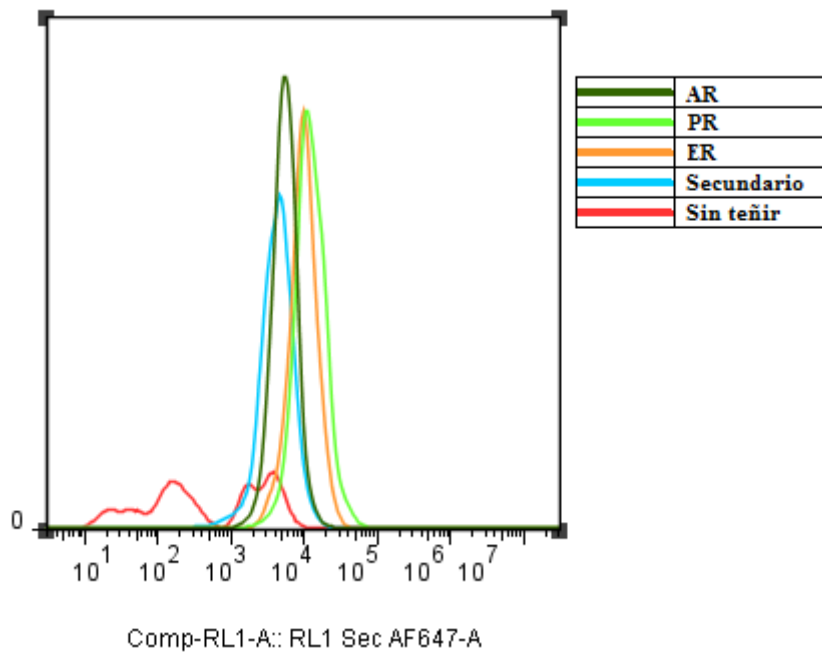


Figura 5. Histograma de intensidad de fluorescencia del canal RL1, en el cual se leyó AlexaFluor647. Se observa una fluorescencia baja de las células sin teñir y una señal media menor en las muestras que sólo tienen el anticuerpo secundario acoplado a AlexaFluor647 que aquellos que también tienen anticuerpos contra algún receptor intracelular.

### *Extracción de RNA*

De cada animal adulto, se aisló el RNA total de los testículos, útero, ovario (órganos controles para la expresión positiva de los receptores de esteroides), bazo y timo, mediante el método de extracción con el reactivo TRIzol (Gibco-BRL, EUA). Después de la eutanasia cada órgano fue guardado inmediatamente en el reactivo TRIzol ( $\approx 1$  mL/0.1 g de tejido), congelado con hielo seco y guardado a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. Para su procesamiento cada muestra de tejido fue homogenizada, y le fueron agregados  $200\mu\text{l}$  de fenol/cloroformo por cada mL de TRIzol.

Posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos y se recuperó la fase acuosa la cual contiene el RNA. A éste se agregó  $200\mu\text{l}$  de cloroformo, se centrifugó nuevamente a 13,000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos y se volvió a recuperar la fase acuosa. Posteriormente se agregó isopropanol en una relación 1:1 con la fase acuosa y se incubó 16 horas a  $4^{\circ}\text{C}$  para permitir que el RNA se precipite. Posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos, se decantó la pastilla y se lavó con etanol al 75%. Se volvió a decantar la pastilla y ésta finalmente se resuspendió en agua DEPC.

La valoración de la concentración de RNA se realizó midiendo el cociente de absorbancia 260/280 nm. La integridad del RNA fue verificada evaluando la muestra mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 1 % tiñendo con SYBR.

#### *Retrotranscripción*

Se tomaron 5 µg de cada extracto de RNA y se les agregó 2µl de cada dNTP 10 µM y 0.5 µl de oligo dT (Gibco-BRL, EUA) 0.5µg/µl y cuanto baste de H<sub>2</sub>O DEPC para competir 17µl. Esto se calentó a 65°C por 5 minutos y 3 a 4°C tras lo cual se agregó 5µl de buffer de retrotranscripción y 2µl de DTT 0.1M. Se incubó 2 minutos a 37°C los cuales se agregan 200U de retrotranscriptasa M-MLV (Applied Biosystems, EUA). Esto se incubó a 37 °C durante 1 h en un volumen de reacción de 25 µl. Después de ese tiempo, se tomó 1.5 µl de DNA complementario (cDNA) y se sometió a PCR para amplificar fragmentos específicos de los genes de interés.

#### *Reacción en Cadena de la Polimerasa*

Cada reacción se realizó en 25 µl e incluyó 1.5 µl de cDNA de la reacción de RT-PCR, 2.5 µl de buffer amplificasa 10X, 1.25µl MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, 10 mM de cada dNTP, 20 µM de cada primer, y 0.25µl de Taq DNA polimerasa. Las condiciones de cada PCR se describen en la tabla 1.

Tras esto se tomaron 25 µl de cada muestra, producto de la PCR, y fueron sometidas a una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%. Los productos se revelaron mediante una tinción con SYBR y exposición a radiación ultravioleta.

#### *Análisis densitométrico*

Los niveles relativos de expresión de cada gen, tomando como base la expresión constitutiva de β-actina, se determinaron mediante el análisis densitométrico de las fotografías correspondientes a los geles de agarosa con ayuda del software ImageJ. La expresión se representa numéricamente como la proporción de la densidad óptica integrada de cada gen estudiado relativa a la expresión en el mismo experimento del gen de 18s.

#### *Análisis estadístico*

Se realizó en el programa GraphPad Prism 6 eliminando los datos atípicos que eran menores a  $Q_1 - 1.5(IQR)$  y mayores a  $Q_3 + 1.5(IQR)$ . Se utilizó una prueba ANOVA de

dos vías con pruebas *post hoc* de Tukey para evaluar diferencias entre sexos y Sidak para evaluar diferencias ente edades. Para los resultados expresados en porcentaje, dado que éstos son no paramétricos se usó una prueba de Mann-Whitney comparando sólo entre sexos. Se tomó como significativo una  $p < 0.05$ . Un “\*” indica  $p < 0.05$ , “\*\*” indica  $p < 0.01$  y “\*\*\*” indica  $p < 0.001$ .

En todos los casos la  $n=4$  ó  $5$ .

Tabla 1. Secuencia de primers y programa de PCR\*

Gen	Primers	Tiempos
<b>IL-10</b>	Fw AACTGGTAGAAGTGATGCCCC	94° 5', (94° 45'', 63° 45'', 72° 45'') <sub>35</sub>
<b>237 pb</b>	Rev CTATGCAGTTGATGAAGATGTCAA	72° 7', 4° ∞'
<b>TGRβ1</b>	Fw CTTCAGCTCCACAGAGAAGAAGTGC	94° 5', (94° 45'', 61° 45'', 72° 45'') <sub>30</sub>
<b>298 pb</b>	Rev CACAATCATGTTGGACAAGTCTCC	72° 7', 4° ∞'
<b>ERα</b>	Fw AGACTGTCCAGCAGTAACGAG	95° 5', (95° 30'', 60° 30'', 72° 1') <sub>25</sub>
<b>251 pb</b>	Rev TCGTAACACTTGCGCAGCCG	72° 5', 4° ∞'
<b>PRA</b>	Fw CAGTGGTGGATTTTCATCCATG	94° 5', (95° 30'', 60° 30'', 72° 45'') <sub>25</sub>
<b>204 pb</b>	Rev CTCCAGAGGGTAGGTGCAG	72° 5', 4° ∞'
<b>AR</b>	Fw GAATGTCAGCCTATCTTTCTTA	94° 5', (95° 1', 56° 1', 72° 1') <sub>36</sub> 72°
<b>365 pb</b>	Rev TGCCTCATCCTCACAGACTGGC	5', 4° ∞'
<b>18s</b>	Fw CGCGGTTCTATTTTTTGGT	94° 10', (94° 30'', 60° 45'', 72° 1') <sub>25</sub>
<b>219 pb</b>	Rev GACCATAAACGATCCGACT	72° 7', 4° ∞'

\*Todas las temperaturas mencionadas como “°” están dadas en grados centígrados.

## 6. Resultados

### 6.1 Porcentajes de subpoblaciones celulares

Durante la lectura de citometría no fue posible detectar la molécula CD3, probablemente debido a que el fluoróforo acoplado perdió fluorescencia o a que el anticuerpo perdió afinidad por el epítipo, por lo que se procedió a realizar el análisis sin este marcador que discrimina a timocitos sin CD4 o CD8 que desarrollarán TCR de aquellos que carecen de él.

Al día 13.5 dpc no se observan diferencias en la proporción de subpoblaciones entre machos y hembras. Se puede apreciar en alta proporción a la subpoblación de linfocitos dobles negativos ( $\approx 89\%$ ), y baja de las demás subpoblaciones que comprende a los linfocitos dobles positivos (menos del 1%), CD8 ( $\approx 9\%$ ) y CD4 ( $\approx 2\%$ ) (Figura 6).

Los porcentajes cambian al día 18.5 dpc en donde predominan las células doble positivas; sin embargo, tampoco se aprecian diferencias en las subpoblaciones entre machos y hembras. La subpoblación de linfocitos doble negativo, se redujo en una cuarta parte ( $\approx 23\%$ ) y aumentó la subpoblación de dobles positivos a ser casi la mitad de los linfocitos ( $\approx 42\%$ ). También aumenta la proporción de linfocitos CD8 llegando a triplicarse ( $\approx 30\%$ ), al igual que la subpoblación de linfocitos CD4 que se duplica ( $\approx 5\%$ ) (Figura 7).

A la semana cuatro, continúan sin apreciarse diferencias en las proporciones de linfocitos. Se puede apreciar que, la subpoblación de linfocitos dobles negativos se reduce nuevamente en una cuarta parte, con respecto al tiempo anterior ( $\approx 5\%$ ) mientras que la subpoblación de dobles positivos llega a ser más de la mitad ( $\approx 68\%$ ). Por otro lado los linfocitos CD4 aumentan su proporción ( $\approx 23\%$ ) y los CD8 la disminuyen ( $\approx 4\%$ ) (Figura 8).

A las 8 semanas, se observa una diferencia entre machos y hembras en la subpoblación de linfocitos dobles negativos siendo el promedio de los machos mayor al de las hembras (aproximadamente 6 y 11% respectivamente) por casi el doble. No se observan diferencias en las subpoblaciones de linfocitos CD4 ( $\approx 20\%$ ) y CD8 ( $\approx 6\%$ ), ni tampoco en linfocitos doble positivos aunque hay más diferencia porcentual entre machos ( $\approx 69\%$ ) y hembras ( $\approx 62\%$ ) que en el grupo de linfocitos doble negativos (Figura 9).

### Subpoblaciones tímicas en fetos 13.5dpc

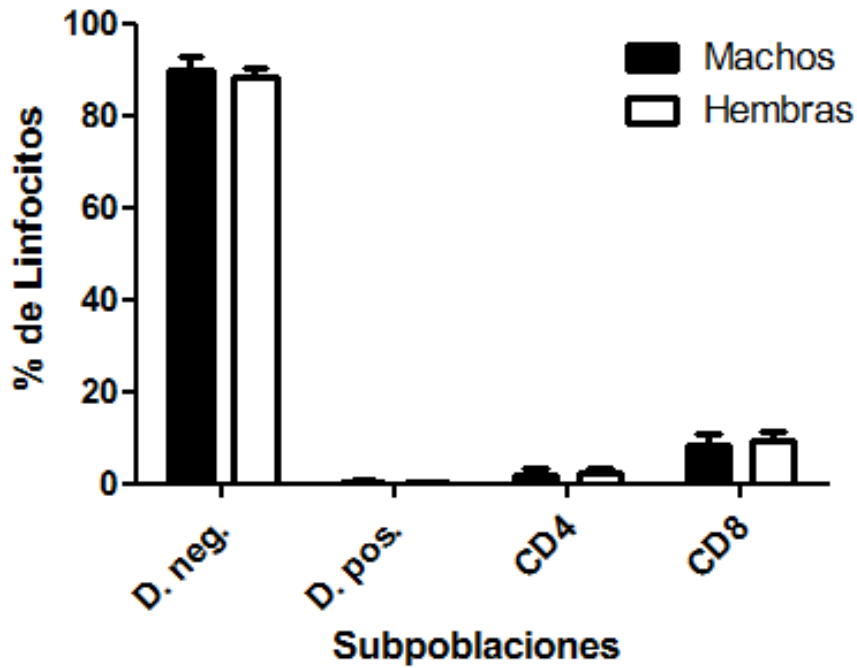


Figura 6. Porcentajes de subpoblaciones de timocitos con base en los marcadores CD4 y CD8 al día 13.5dpc. No se observan diferencias significativas entre machos y hembras; n=3-4 “pools” de 5 individuos.

### Subpoblaciones tímicas en fetos 18.5dpc

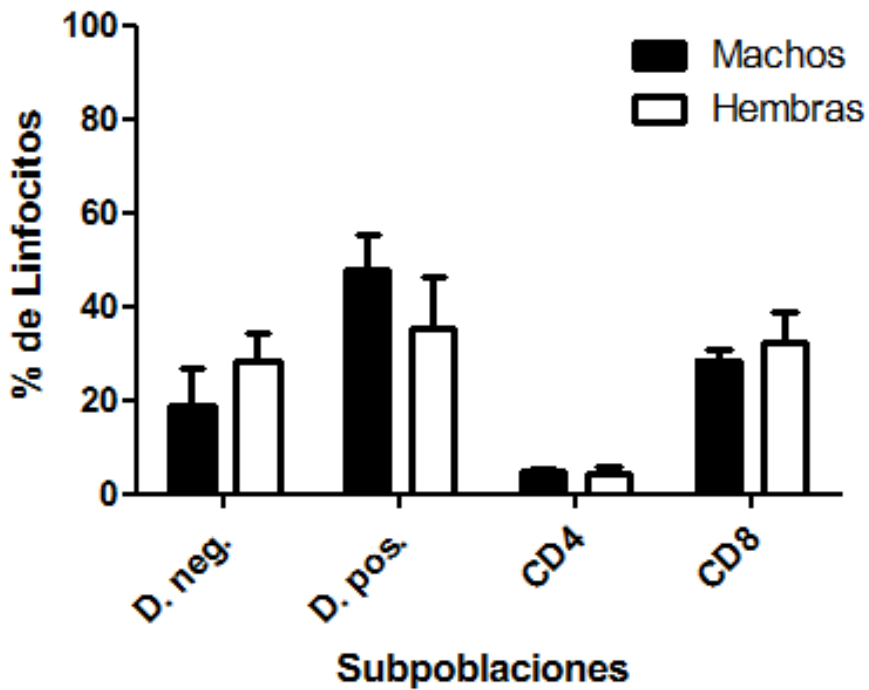


Figura 7. Porcentajes de subpoblaciones de timocitos con base en los marcadores CD4 y CD8 al día 18.5dpc. No se observan diferencias significativas entre machos y hembras; n=4-5 “pools” de 4 individuos.



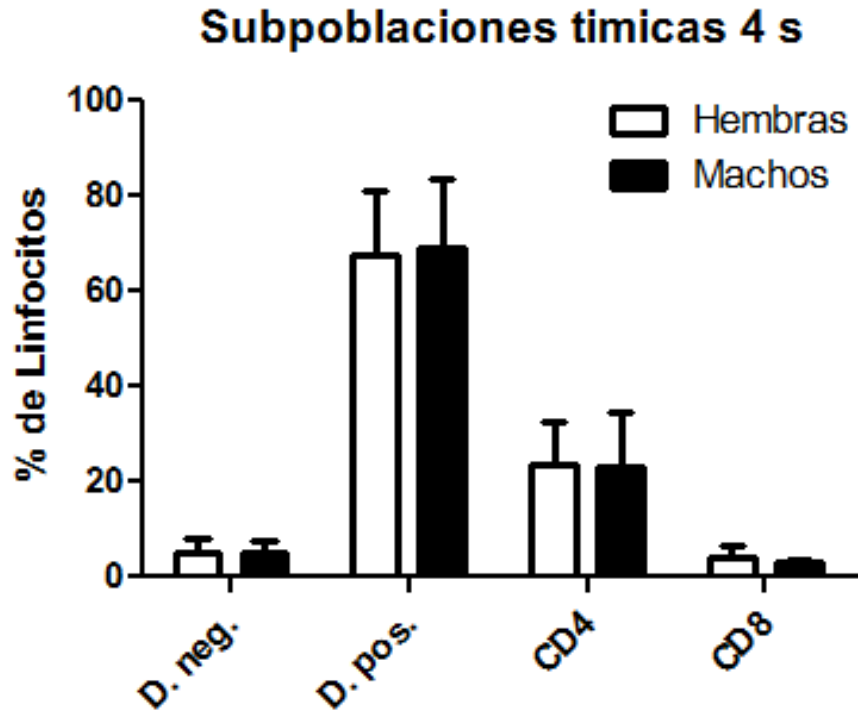


Figura 8. Porcentaje de subpoblaciones de timocitos de ratones prepúberes de 4 semanas caracterizadas por los marcadores CD4 y CD8; n=5 individuos.

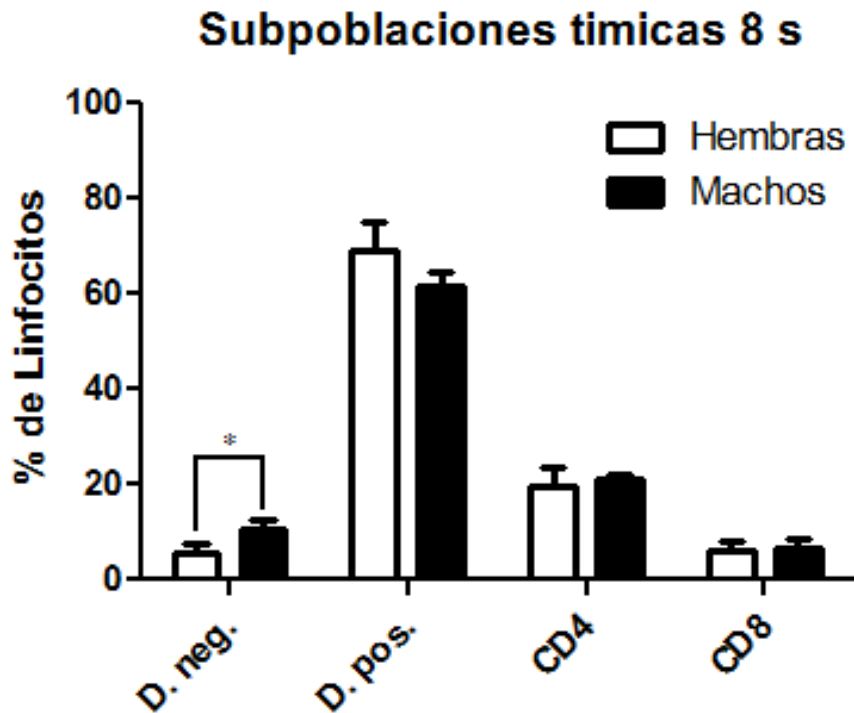


Figura 9. Porcentaje de subpoblaciones de timocitos de ratones prepúberes de 8 semanas caracterizadas por los marcadores CD4 y CD8; n=5 individuos, \* indica  $p < 0.05$

En la semana 20, se observa una diferencia entre machos y hembras en la subpoblación de linfocitos dobles positivos siendo el promedio de los hembras ( $\approx 5\%$ ) mayor al de los machos ( $\approx 2\%$ ) por más del doble, así como en las CD4 en el cual se observa lo contrario, hembras con  $\approx 2\%$  y machos con ( $\approx 5\%$ ). No se observan diferencias las demás subpoblaciones linfocíticas, es decir en las CD8 ( $\approx 0.5\%$ ), las cuales son casi nulas, ni tampoco en linfocitos doble positivos la cual es la población más abundante con más del 90% (Figura 10).

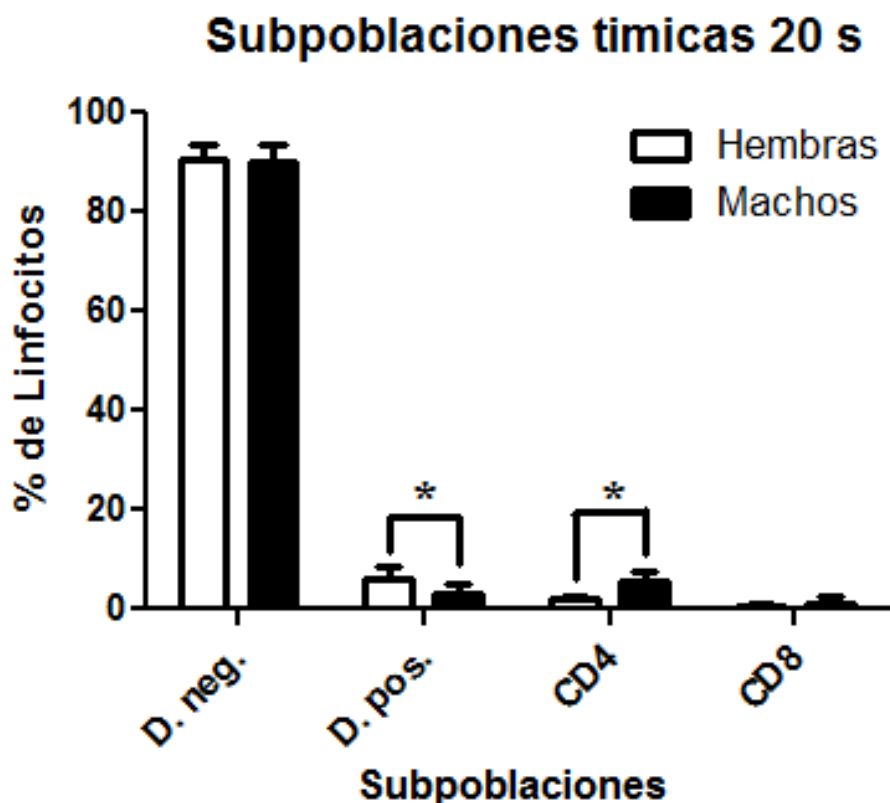


Figura 10. Porcentaje de subpoblaciones de timocitos de ratones de 20 semanas caracterizadas por los marcadores CD4 y CD8; n= 5 individuos, \* indica  $p < 0.05$

## 6.2 Receptores intracelulares en subpoblaciones celulares

En la población de linfocitos doble negativos no se observan diferencias entre individuos prepúberes y adultos ni en ER ni PR. Se observa una diferencia tanto en machos como en hembras entre los grupos de 4 y 8 semanas con respecto a aquellos de 20 semanas en la expresión de ER; esta diferencia se observa en PR sólo en hembras. En esta subpoblación celular se observa dimorfismo sexual en individuos de 20 semanas en el cual la media de hembras es más del doble que machos (Figura 11).

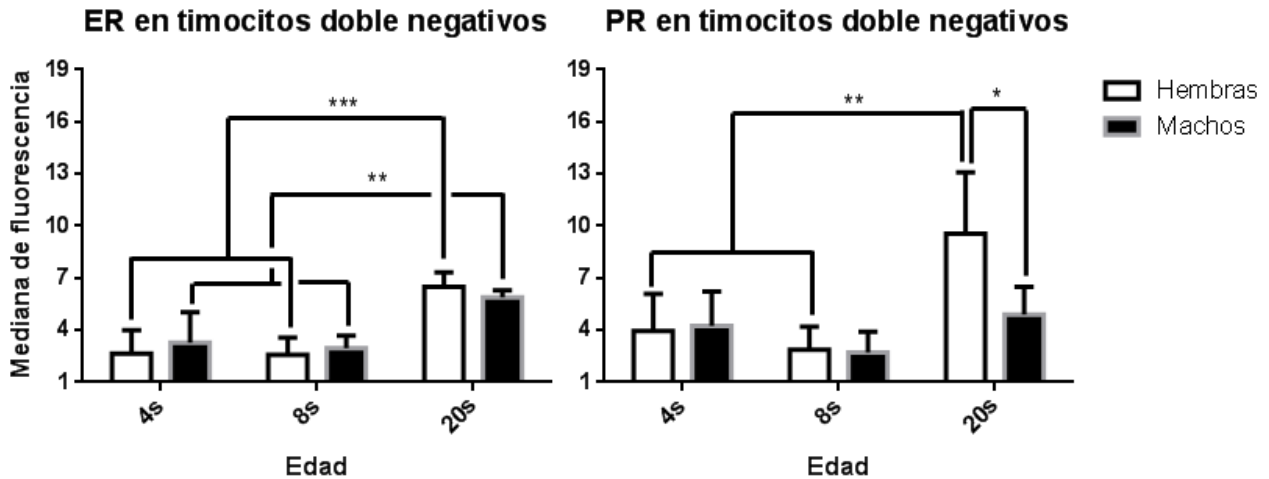


Figura 11. Expresión de los receptores intracelulares a ER y PR en timocitos doble negativos machos y hembras a diferentes edades; n=5 individuos, \* indica  $p < 0.05$ , \*\* indica  $p < 0.01$  y \*\*\* indica  $p < 0.001$ .

En ningún experimento se detectó AR, es decir que la fluorescencia no era diferente a la tinción que sólo incluye el anticuerpo secundario acoplado. Lo anterior es consecuencia de que no existen anticuerpos contra esta proteína cuyo uso haya sido recomendado por la compañía proveedora para usarse en citometría de flujo.

En la población de linfocitos doble positivos se observa una diferencia entre individuos prepúberes (de 4 semanas) y adultos (de 8 y 20 semanas), en ER en machos y entre hembras de 4 y 8 semanas aunque la expresión entre 4 y 20 semanas no es diferente. Cabe mencionar que las medias de ER en individuos prepúberes tienen la media más baja (1.3) de todas las subpoblaciones. En PR no se observan diferencias en machos a diferentes edades; en hembras se observa diferencia entre individuos de 4 y 8 semanas

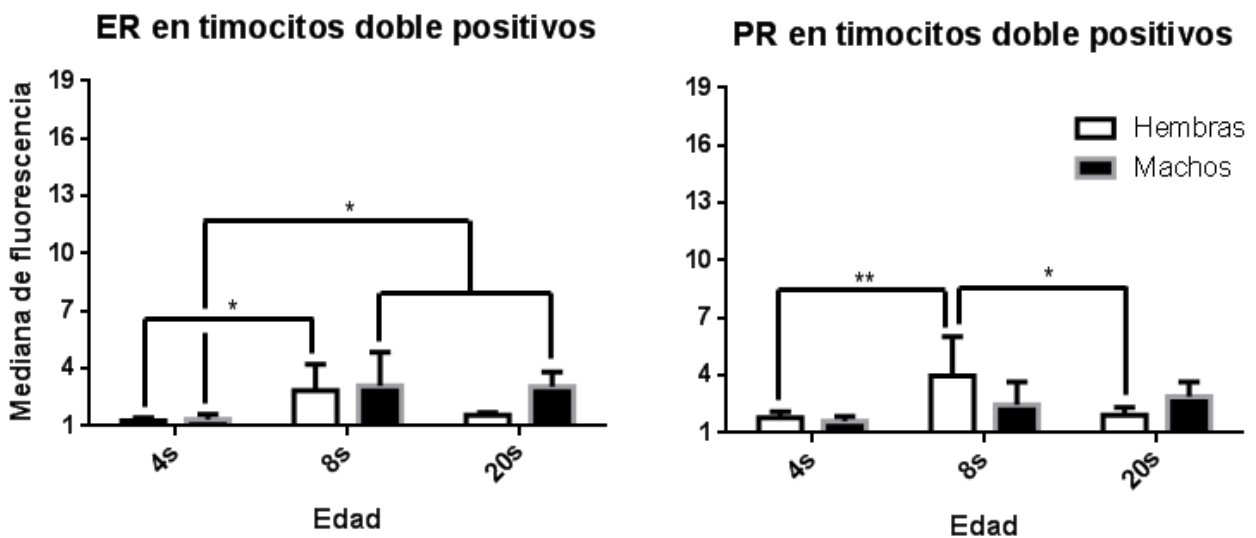


Figura 12. Expresión de los receptores intracelulares a ER y PR en timocitos doble positivos machos y hembras a diferentes edades; n=5 individuos, \* indica  $p < 0.05$  y \*\* indica  $p < 0.01$ .

aunque también de 8 semanas con respecto a 20 (Figura 12).

En la población de linfocitos CD4 se observa dimorfismo sexual en la expresión de ER a las 8 semanas. En hembras se observa diferencia entre el grupo de 4 y 20 semanas y en machos entre 4 y 8 semanas. En PR se observa dimorfismo en el grupo de 20 semanas y entre hembras los grupos de 4 y 8 semanas con respecto a 20 semanas; en machos no hay diferencias de en la expresión de PR a diferentes edades (Figura 13).

En la población de linfocitos CD8 no se observa dimorfismo sexual a ninguna edad se observa dimorfismo sexual en la expresión de ER a las 4 y 8 semanas en machos (Figura 14).

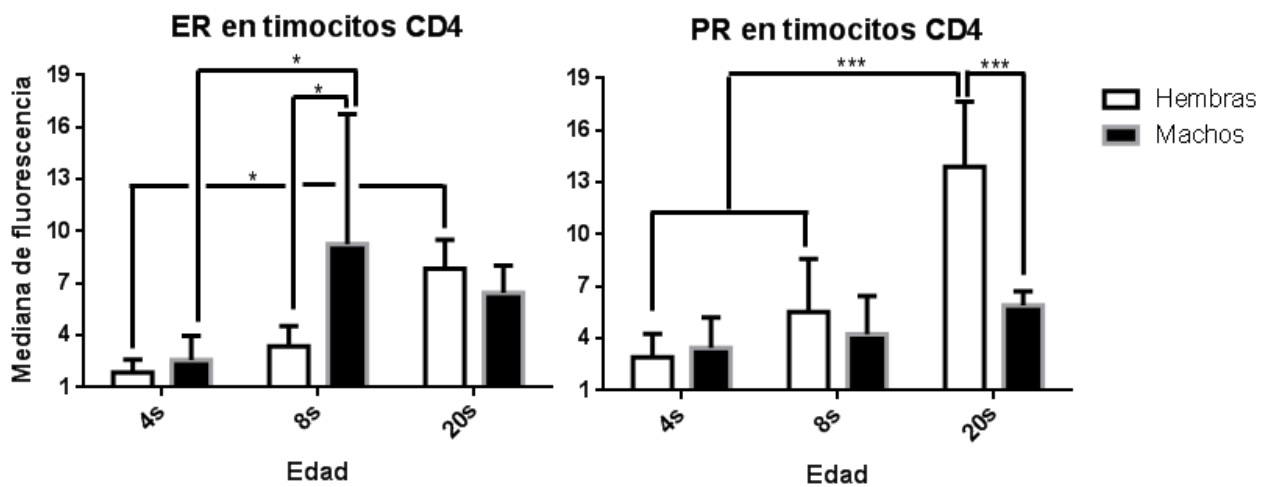


Figura 13. Expresión de los receptores intracelulares a ER y PR en timocitos CD4 machos y hembras a diferentes edades; n=5 individuos, \* indica  $p<0.05$  y \*\*\* indica  $p<0.05$ .

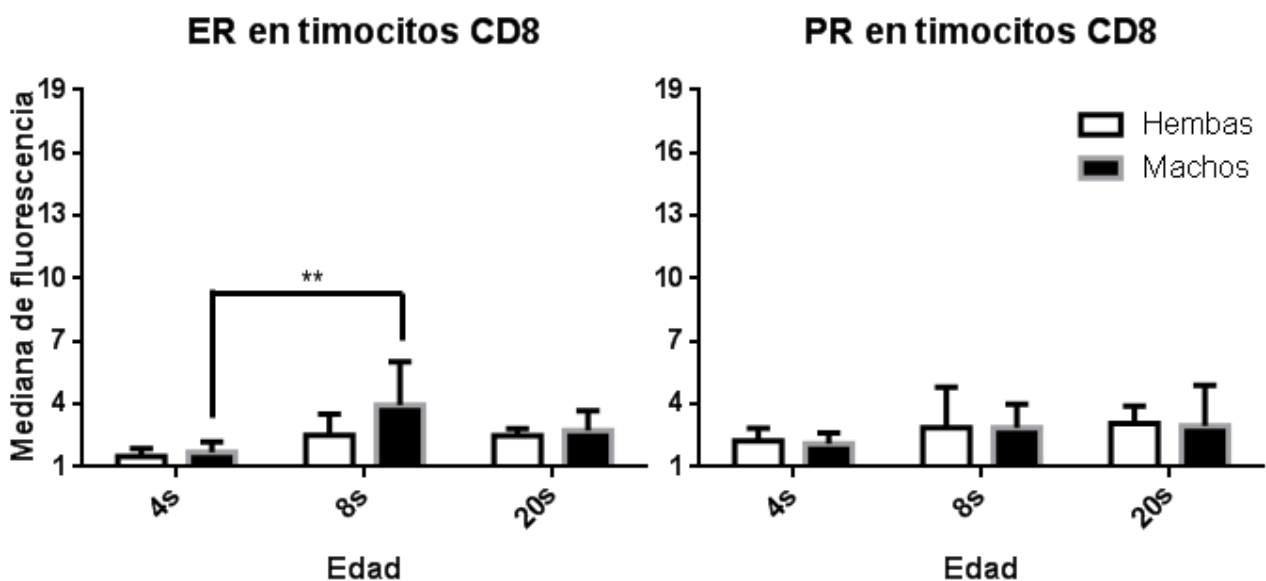


Figura 14. Expresión de los receptores intracelulares a ER y PR en timocitos CD8 machos y hembras a diferentes edades; n=5 individuos, \*\* indica  $p<0.01$ .

### 6.3 Cuantificación de mRNA

No fue posible obtener amplificado para PR en los controles positivos. Para los receptores intracelulares de esteroides sexuales ER y AR no se observa dimorfismo sexual en la expresión de mensajeros. En AR se observa una diferencia entre machos de 4 y 8 semanas con respecto a las de 20 semanas; en hembras se observa diferencia entre 8 y 20 semanas. En cuanto a ER, al igual que en células doble negativas se observa, tanto en machos como en hembras, diferencias entre los grupos de 4 y 8 semanas con respecto a 20 semanas, aunque a diferencia de las anteriores la expresión se ve disminuida en éste último grupo en vez de aumentada como se observa en los resultados obtenidos por citometría de flujo (Figura 15). Todas las gráficas son relativas al gen ribosomal 18s el cual se muestra en la figura del anexo 6.

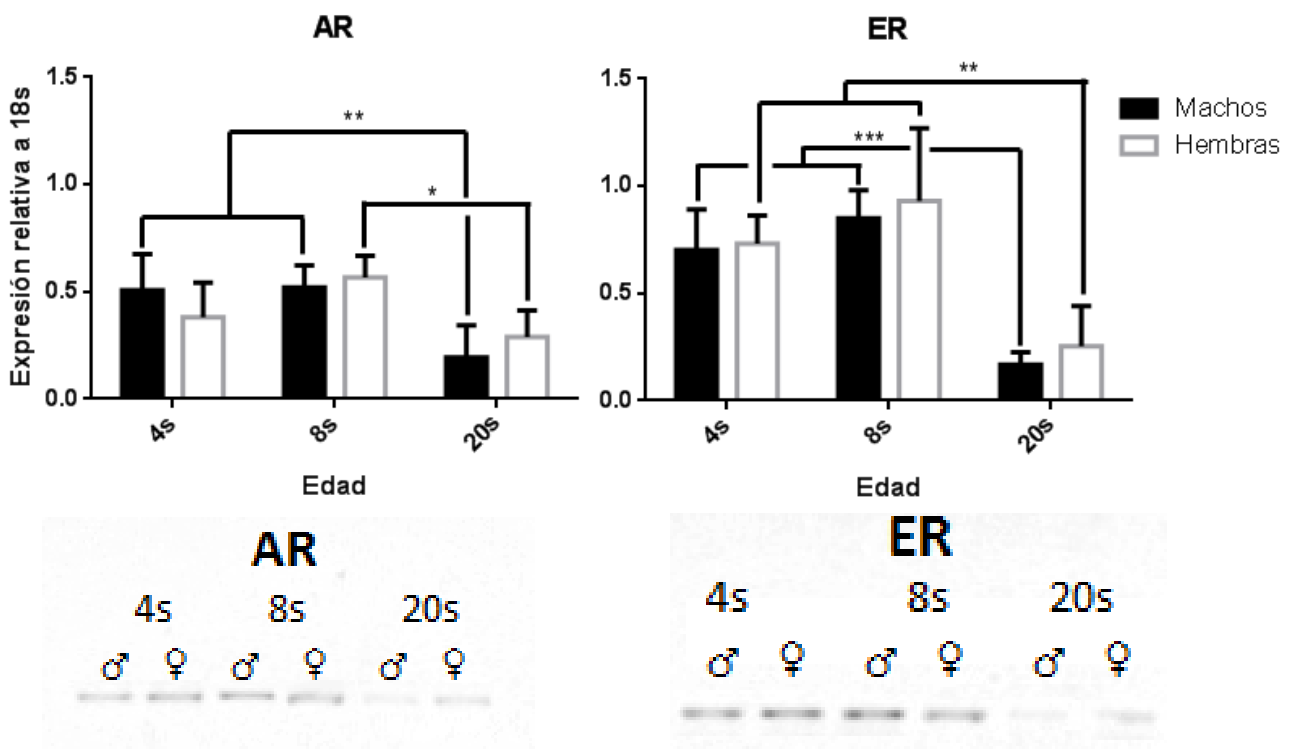


Figura 15. Arriba. Expresión mRNA de AR y ER en timo de hembras a diferentes edades; n=4-5 individuos, \* indica p<0.05, \*\* indica p<0.01 y \*\*\* indica p<0.95. Abajo, bandas obtenidas en el PCR representativas.

En la expresión de IL-10 se observa dimorfismo sexual solamente en individuos prepúberes. También se observa diferencia entre machos de 4 y 8 semanas. No se observó amplificado en timos de individuos de 20 semanas, tanto machos como hembras; estos grupos son estadísticamente diferente al resto (Figura 16). En cambio no

se observa ésto con el TFG $\beta$ , la cual es otra citocina reconocida por su papel inmunomodulador y que es influyente en el desarrollo del timo, en la cual la expresión no es diferente ni entre edades ni entre sexo (Figura 17).

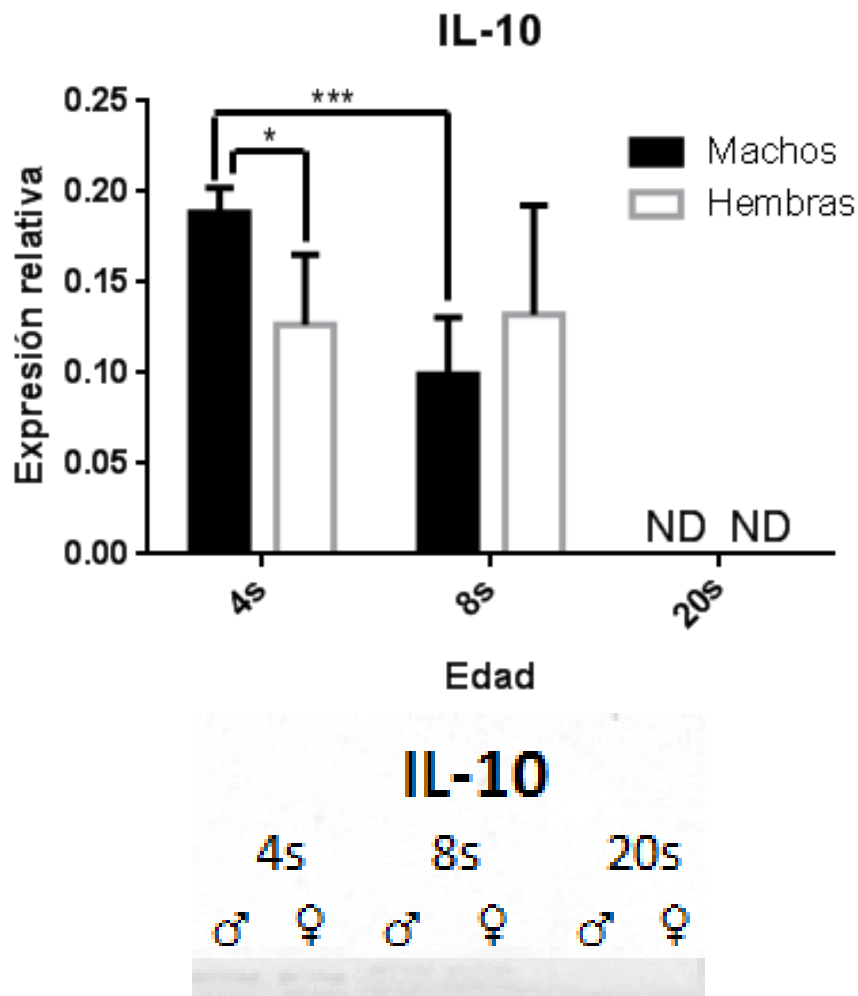


Figura 16. Arriba se muestra la expresión mRNA de IL-10 en timo de hembras a diferentes edades; n=4-5 individuos, \* indica  $p < 0.05$ , \*\* indica  $p < 0.01$  y \*\*\* indica  $p < 0.001$ . Abajo un gel representativo.

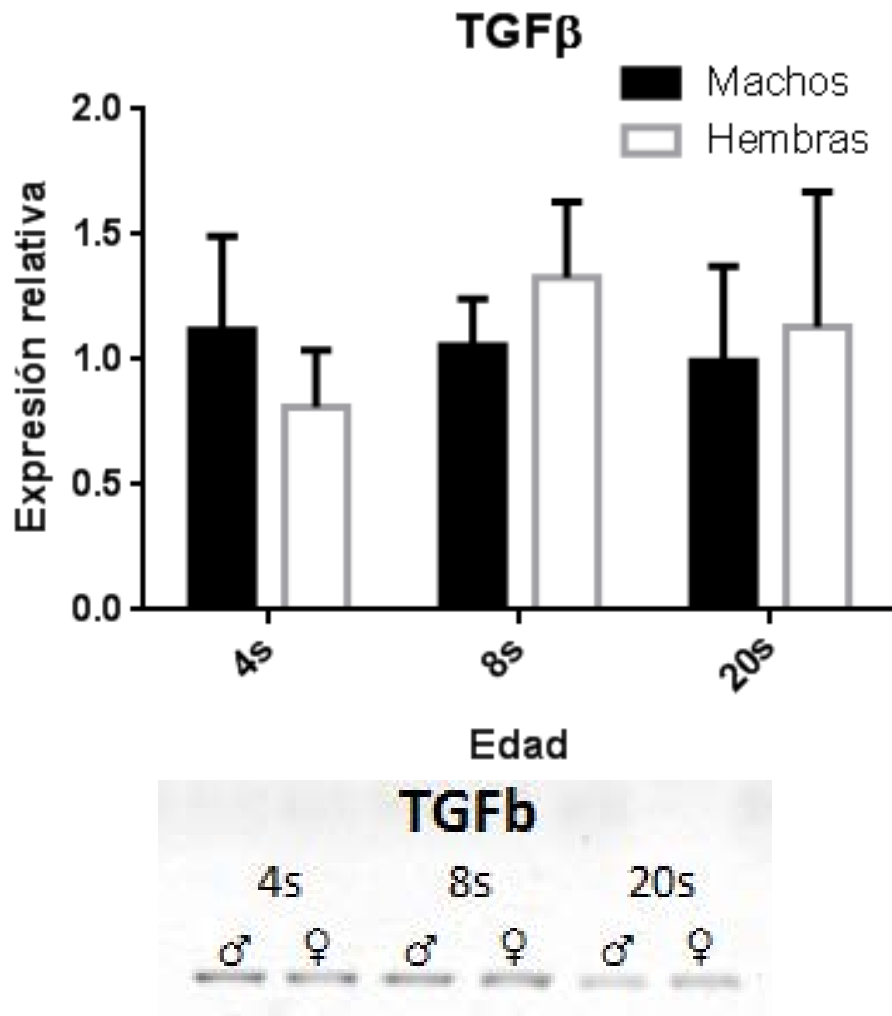


Figura 17. Arriba se muestra la expresión mRNA de TGFβ en timo de hembras a diferentes edades; n=4-5 individuos, \* indica  $p < 0.05$ , \*\* indica  $p < 0.01$  y \*\*\* indica  $p < 0.001$ . Abajo se muestra un gel representativo de los productos de PCR.

## 7. Discusión

Como se mencionó anteriormente, el dimorfismo sexual inmunológico es un fenómeno ampliamente reportado en mamíferos. Es importante mencionar, que no es un fenómeno exclusivo en este grupo. Uno de los grupos en el que dimorfismo sexual inmunológico también ha sido ampliamente documentado es en aves (Romano *et al*, 2011) (Tschirren *et al*, 2003). En éstas, la determinación del sexo también es cromosómico, pero a diferencia de los mamíferos, en ellos el macho es el homocigoto y la hembra la heterocigoto en un sistema de cromosomas llamados ZZ para machos y ZW para hembras (Mizuno *et al*, 2002). En este caso se puede decir que las hembras tienen una menor carga de genes pues el cromosoma W es más pequeño que el Z. Por lo tanto, no se puede atribuir el fenómeno general del dimorfismo sexual inmunológico a la mayor carga de genes del sistema inmune en el cromosoma X (Fish, 2008).

El fenómeno general del dimorfismo sexual independiente de la carga genética, puede ser abordado usando como modelo especies con determinación sexual por temperatura como pueden ser cocodrilos o algunas especies de tortuga.

Otro modelo que podría responder más dudas sobre la influencia de la carga genética sobre el dimorfismo sexual inmunológico sería usar a la lagartija australiana *Pogona vitticeps*, en la cual el sexo puede ser determinado tanto de manera genética como por diferencias en la temperatura de incubación de los huevos (Holleley *et al*, 2015).

### *Porcentajes de subpoblaciones celulares*

En las primeras etapas del desarrollo del timo, representado por el estadio 13.5 dpc se observan casi exclusivamente células doble negativas para los marcadores CD4 y CD8. Esto es debido a que en esta etapa predominan los precursores para los linfocitos T (Douagi *et al*, 2000).

Durante estas etapas del desarrollo es posible encontrar linfocitos que aún carecen de TCR así como aquellos que tienen un TCR formado por cadenas  $\gamma\delta$  en vez de las clásicas cadenas de linfocitos de sangre periférica  $\alpha\beta$ . Estos linfocitos, al igual que los doble negativos, se caracterizan por carecer de los marcadores CD4 y CD8 (Pardoll *et al*, 1987).



La subpoblación caracterizada como doble negativa puede ser subdividida con base en los marcadores CD44 y CD25 (Godfrey *et al*, 1993). Dado que en esta etapa son la subpoblación más abundante es recomendable analizar subpoblaciones caracterizadas por estos marcadores a los 13.5 dpc pues no se puede descartar que existan diferencias en sus porcentajes en esta etapa.

Posteriormente, a los 18.5 dpc se pueden observar linfocitos CD4, CD8 y doble positivos así como doble negativos, los cuales comienzan a asemejar las subpoblaciones encontrados en individuos prepúberes, aunque con niveles menores de la subpoblación de linfocitos doble negativos, lo cual sugiere niveles bajos de maduración de linfocitos T en comparación con individuos postnatales .

El nivel relativamente bajo de linfocitos doble negativos podría ser consecuencia de la acumulación de linfocitos en el timo, especialmente de linfocitos CD8 debido a que en ninguna otra etapa se observan porcentajes tan elevados; lo anterior debido a que en ratones no hay migración de linfocitos a órganos linfoides secundarios previo al nacimiento (Burt, 2013).

Buscar diferencias en esta etapa en la subpoblación de linfocitos Treg a partir de los linfocitos CD4 es poco prometedor debido a que los linfocitos Treg en ratón son formados hasta después del día tres después del nacimiento (Asano *et al*, 1996).

Resulta, sin embargo, importante no olvidar que en el ser humano el desarrollo del sistema inmunológico adaptativo se da de manera importante previo al nacimiento a tal nivel que incluso es posible encontrar linfocitos Treg previo a las 17 semanas de gestación (Cupedo *et al*, 2005), así como son capaces de montar respuestas de linfocitos citotóxicos (Hermann *et al*, 2002).

Se puede observar que previo a la pubertad, la cual es alcanzada por los ratones a las 6 semanas, no se observan diferencias en los porcentajes de subpoblaciones de linfocitos T. En otros estudios en que evalúan las diferencias en subpoblaciones de timo se observan diferencias en la subpoblación de linfocitos doble positivos siendo mayor en hembras que en machos a los 9 meses ( $\approx 36$  semanas) (Aspinall & Andrew, 2001).

En este estudio también se observa una disminución en el número de células totales de timo en individuos de mayor edad, siendo significativamente menor el número de células en machos a partir de los 9 meses de edad. Esto también se observó, aunque no se cuantificó, en los individuos de 20 semanas de edad.

Otra observación hecha es que en casi todas las subpoblaciones analizadas no existen diferencias en número de células a 3 y 9 meses de edad aunque éste número es

casi la mitad a los 6 meses (Aspinall & Andrew, 2001). Esto es posible debido a que en este estudio no se contempla la fase del ciclo estral en que se encuentran las hembras y puede haber variaciones en las subpoblaciones de linfocitos entre sus etapas. Para aclarar el fenómeno que causa esto se deben hacer estudios de subpoblaciones de linfocitos T en hembras en diferentes etapas del ciclo estral y a diferentes edades.

También es importante aclarar que no se observan diferencias en individuos de 3 meses (que equivaldría a 13 semanas), a pesar de que estos individuos son adultos y por tanto desde esta etapa se esperaría encontrar diferencias si los esteroides sexuales fueran determinantes en el fenómeno de dimorfismo sexual.

En sangre periférica se reporta que la proporción de linfocitos CD4/CD8 en sangre periférica es mayor en mujeres que en hombres dentro de una misma familia y que esta diferencia es proporcional a la edad (Amadori *et al*, 1995); en este mismo estudio se comprueba que el porcentaje de subpoblaciones de linfocitos en un individuo depende de más de un alelo heredables.

De lo anterior se puede inferir que el porcentaje de subpoblaciones de linfocitos T en sangre periférica es un fenómeno dependiente del estado hormonal del individuo dado que es dependiente de la edad y del género. También sugiere que para determinar la influencia del sexo en los porcentajes de subpoblaciones de linfocitos T es necesario usar un modelo de ratón singénico, como lo es BalB/C, y no uno alogénico.

A diferencia de lo observado en sangre periférica, en peritoneo de ratones los porcentajes de subpoblaciones no son diferentes entre machos y hembras adultos aunque el número absoluto de linfocitos es el doble en hembras que en machos; lo mismo se ha observado en un modelo de rata (Scotland *et al*, 2011).

Para ambos casos, los cuales son estudios a nivel periférico, es importante recordar que el número de linfocitos T no es necesariamente un reflejo de la cantidad de linfocitos madurados en el timo sino de aquellos linfocitos que hayan sido estimulados vía su TCR y por tanto proliferan clonalmente.

### *Influencia hormonal y receptores a esteroides sexuales*

En los experimentos realizados no se observaron diferencias en receptores de los esteroides sexuales previo a la pubertad. Esto concuerda con lo esperado debido a que la expresión de receptores a esteroides sexuales comienza hasta que los individuos alcanzan la madurez sexual, lo cual ocurre a las 5 semanas de edad (Greenstein, 1978);

lo cual apoya la hipótesis de que el dimorfismo sexual inmunológico, el cual puede ser observado previo a la pubertad, no es dependiente de los esteroides sexuales pues aunque estos estuvieran en cantidades pequeñas no pueden ejercer un efecto directo sobre los linfocitos debido a que no están ni altamente expresados ni presentan dimorfismo en su expresión.

En cuanto a los individuos adultos, no se observa una tendencia clara de dimorfismo de receptores a esteroides sexuales en las subpoblaciones celulares medidos por citometría de flujo, además de que no se observa dimorfismo alguno en los resultados de RT-PCR. Las diferencias en los resultados por citometría, muestran que PR es mayor en hembras, en linfocitos doble negativos y CD4 a las 20 semanas, así como en ER a las 8 semanas en linfocitos CD4 siendo mayor en machos.

Con estos resultados se puede solamente sugerir, que los linfocitos CD4 y doble negativos de hembras adultas de 20 semanas, podrían ser más susceptibles a la influencia de los esteroides sexuales. Esto podría ser explicado por la susceptibilidad que tienen estos linfocitos *virgenes* a censar cambios de progesterona en hembras preñadas.

A nivel del timo, los esteroides sexuales no sólo tienen efecto directo sobre los linfocitos T en el proceso de maduración, sino también un efecto indirecto mediado por su influencia sobre las células epiteliales del timo (TEC), tanto medulares y en mayor medida corticales. Se ha observado que este efecto es diferente en machos y hembras alterando su transcriptoma (Dumont-Lagacé *et al*, 2015). En todos los casos, se observa que hay mayor diversidad transcriptómica en machos castrados.

En nuestros resultados se observa que los cambios en la expresión de ER obtenidos por citometría de flujo no van acorde con los obtenidos por RT-PCR, ya que no hubo correlación aparente entre ambas medidas; ya que se esperaría que en caso de no existir control post transcripcional la cantidad de mensajero debiera ser directamente proporcional a la cantidad de proteína. Esto podría ser explicado por la influencia las TEC sobre la cantidad de mRNA analizado mientras que no se observa en los análisis de citometría de flujo debido a que se descartaron células que no tuvieran características de tamaño y granularidad de linfocito típico.

Para corroborar esto se podría realizar un análisis por inmunohistoquímica o por hibridación fluorescente *in situ* a las edades aquí analizadas. También es necesario realizar estos estudios para descartar la posibilidad de que la cantidad de mRNA no esté

reflejando la cantidad de proteína presente en las células y descartar el uso de la técnica de RT-PCR en futuros estudios del timo.

Los resultados anteriores contrastan con resultados obtenidos en el proyecto “A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes” (Su *et al*, 2004). Éste estudio difiere en varios puntos del presente. Los tejidos analizados son un “pool” de igual número de individuos machos y hembra, los animales usados son adultos de 10-12 semanas de la cepa C57BL6; además a pesar de que en ambos se realiza la retrotranscripción en el estudio citado se utilizan micro arreglos en vez de una PCR punto final.

Se observó que ER $\alpha$  estaba presente en todas las subpoblaciones de timocitos, aunque fuera en cantidades bajas debido a que siempre presentaba un cociente de mediana de fluorescencia mayor a uno. Aunque se reporta que en ninguna de estas subpoblaciones se encuentra mRNA que codifica para este receptor existe la posibilidad de que retengan la proteína sintetizada por las células troncales hematopoyéticas ya que estas últimas sí presentan el mensajero. Sin embargo esto es poco probable debido a que dichos receptores serían diluidos en las rondas de diferenciación de linfocitos doble negativos que ocurren en el timo (Figura Anexo 2).

También es posible que la lectura obtenida de la subpoblación de timocitos doble negativos, sea señal de los linfocitos NK, pues se ha demostrado que estos linfocitos carentes de TCR también pueden ser generados en el timo (Vosshenrich *et al*, 2006).

El caso de PR es diferente, pues se encuentra en cantidades iguales en todas las subpoblaciones tímicas (Figura Anexo 3), cosa que no ocurre con el receptor a progesterona membranar, el cual además se encuentra al parecer en cantidades mayores a la basal (Figura Anexo 4).

Para estudios futuros, es importante considerar también a los mPR pues se ha observado que estos receptores membranales son capaces de inducir respuestas funcionales rápidas en linfocitos (Ndiaye *et al*, 2012)

El AR, a pesar de que no pudo ser medido, ha sido reportado en timocitos, así como en linfocitos T en sangre periférica, así como en linfocitos NK (Figura Anexo 5).

En el caso de los resultados de cuantificación de mRNA de AR, aunque no se encontró en timocitos, nuevamente no queda descartada la posibilidad de que todo mensajero cuantificado provenga de las TEC.

Aunque es innegable la influencia de los esteroides sexuales directamente sobre los linfocitos T y el timo, existe evidencia que otros elementos hormonales del eje Hipotálamo-Pituitaria-Gónada (HPG) también influyen en la función inmune de los linfocitos.

Se ha demostrado que agonistas de GnRH, tienen un efecto independiente de esteroides sexuales sobre los linfocitos, teniendo efectos supresivos en linfocitos de hembras mientras que en machos aumenta su capacidad proliferativa (Rao *et al*, 1996). Mientras que en fetos de rata, se ha visto que el retirar el hipotálamo disminuye la proliferación tanto de linfocitos hepáticos como tímicos y que pueden ser recuperados administrando GnRH (Zakharova *et al*, 2000).

Aunque estas hormonas ríen arriba de los esteroides sexuales, en el eje HPG no son diferentes en machos y hembras, es decir no hay una hormona específica para machos y otra para hembras, las fluctuaciones de su presencia en el torrente sanguíneo lo es, y esto podría explicar el dimorfismo a partir de la pubertad, pues mientras que en machos estas hormonas se secretan de forma continua a partir de la pubertad, en las hembras su presencia es discontinua a lo largo de su ciclo estral.

Otro modo de acción que podría dar lugar a diferencias en la respuesta a hormonas esteroideas, pero que es más complicado de evaluar, es la acción de los esteroides sexuales sobre características de la membrana (McEwen, 1991)

### *Interleucinas*

Se midieron interleucinas que juegan un papel inmunomodulador a nivel periférico debido a que un posible mecanismo de dimorfismo sexual sea la diferencia en formación de linfocitos con fenotipo regulador en el timo. Lo anterior, cobra especial relevancia para poder explicar el dimorfismo de enfermedades autoinmunes debido a que una falta de estos linfocitos reguladores puede inducir estas enfermedades (Sakaguchi *et al*, 1995).

Está reportado que TGF $\beta$ 1 es esencial para la formación de linfocitos T reguladores en timo (Chen & Konkel, 2015); sin embargo, no se encontraron diferencias en ésta citocina entre machos y hembras ni en los distintas edades evaluadas.

A pesar de lo anterior, la importancia de esta citocina no puede ser descartada debido a que puede que se presente dimorfismo en una etapa perinatal, que es cuando

más hay generación de linfocitos T reguladores y se ha observado que la timectomía en ratones a los 3 días de edad induce enfermedades autoinmunes (Bonomo *et al*, 1995).

Por otro lado, se ha reportado que ratones transfectados con IL-10 humana, la cual fue expresada en células presentadoras de antígeno bajo el control del promotor de MHC-II, desarrollan un fenotipo similar a aquellos ratones con Inmunodeficiencia Combinada Severa, en la cual el desarrollo de linfocitos T se arresta en el desarrollo de las cadenas  $\alpha\beta$  (Rouleau *et al.*, 1999). A pesar de lo anterior, no se observa un menor número de linfocitos doble positivos, CD4 o CD8, los cuales ya poseen las cadenas  $\alpha\beta$  de su TCR.

Estudios anteriores indicaban que la generación *de novo* de linfocitos Treg es independiente de TGF $\beta$ , y que el papel de este factor es principalmente de inmunorregulación a nivel periférico (Schramm *et al*, 2004). Sin embargo, estudios más recientes, indican que aunque sea independiente este factor, es necesario para antagonizar la selección negativa de aquellos linfocitos Treg de alta afinidad a antígenos propios (Ouyang *et al*, 2010). Esto debería resultar en una mayor tolerancia y menor propensión a enfermedades autoinmunes. En esto también influye la exposición de estos linfocitos Treg naturales en timo a IL-2 (Bayer *et al*, 2007), así como a IL-7 (Bayer *et al*, 2008).

En caso de realizar futuros estudios determinando dimorfismo en porcentajes de linfocitos Treg, es importante recordar que la fase del ciclo estral de hembras es determinante pues este porcentaje fluctúa teniendo un máximo en la fase folicular tardía, lo cual correlaciona con el pico de E2 (Arruvito *et al*, 2007). Por tanto, puede que sea posible observar o no una diferencia en este porcentaje entre machos y hembras dependiendo de la fase del ciclo estral de las hembras muestreadas.

Por otro lado evidencia similar ha sido mostrado para la testosterona en linfocitos Treg induciendo su proliferación y promoviendo la desacetilación de la histona H4 del promotor del locus que codifica para el factor de transcripción único de linfocitos Treg, Foxp3, que tiene como consecuencia un aumento en la transcripción de este gen al facilitar la unión de AR a dicha secuencia (Walecki *et al*, 2015).

Esta influencia de la estimulación de andrógenos, podría jugar un papel fundamental en el establecimiento del dimorfismo sexual inmunológico en timo en machos, los cuales producen altas cantidades de T4 y DHT durante su desarrollo. Esta vía podría explicar el dimorfismo sexual inmune previo al alumbramiento.

Debido a que la diferencia en prepúberes es en la expresión de IL-10, y ésta está relacionada con linfocitos Treg, es necesario investigar a fondo otros factores relacionados con ésta subpoblación celular, además de cuantificar su porcentaje en individuos prepúberes.

También, será importante corroborar si la mayor expresión de mRNA de IL-10 en machos prepúberes con respecto a hembras también existe a nivel de proteínas. Aunque suele asumirse que IL-10 es secretada principalmente por linfocitos Treg, este no es el caso y se ha reportado que otros estirpes celulares como linfocitos B reguladores la secretan en mayores cantidades (Siewe *et al*, 2014) así como macrófagos de médula ósea estimulados con lipopolisacárido de bacteria gram negativa (Iyer *et al*, 2010). Por este motivo resultaría conveniente determinar ya sea por citometría de flujo o inmunofluorescencia, a que linaje celular se puede atribuir la secreción de IL-10.

Además del TGF $\beta$ , existen otras moléculas que pertenecen a la misma superfamilia, cuyo papel ha sido demostrado en el desarrollo de timocitos, el cual existe desde el desarrollo del timo fetal (Licona *et al*, 2006). Por lo tanto, otros miembros de esta superfamilia pueden ser estudiados para así explicar el dimorfismo inmunológico de neonatos.

Por todo lo anterior resultará interesante realizar ensayos de capacidad funcional de estas células, pues aunque no se observe una disminución de las subpoblaciones analizadas existe la posibilidad de que dichas citocinas con papel regulador desempeñen su función disminuyendo la capacidad de activación de estas células, lo cual no se observaría en los análisis de porcentajes de subpoblaciones en condiciones donde no existe un estímulo inmunológico.

## 8. Conclusiones

- El dimorfismo sexual inmunológico existe previo a la pubertad
- Existe dimorfismo sexual en la expresión de IL-10 en el timo de individuos prepúberes.
- Existen diferencias entre los resultados obtenidos por cuantificación de proteína por citometría de flujo con respecto a aquellos obtenidos por cuantificación de mRNA por RT-PCR.
- Hay diferencias en la cantidad receptores a esteroides sexuales entre sexos en individuos adultos.
- Existen diferencias en la presencia de receptores a hormonas sexuales entre adultos del mismo sexo pero diferentes edades.
- En todas las subpoblaciones celulares existe al menos una diferencia entre la cantidad de ER expresada entre individuos prepúberes y adultos.
- No existen diferencias en los porcentajes de subpoblaciones de linfocitos de timo en individuos prepúberes ni en fetos.



## 9. Perspectivas

- Evaluar los pesos y/o tamaños de los timos; especialmente en estudios que involucran adultos.
- Rectificar las discordancias en las mediciones realizadas por RT-PCR y citometría de flujo con inmunohistoquímica.
- Evaluar el dimorfismo de otros factores de la superfamilia de TGF $\beta$  en el timo.
- Incluir estudios de citometría de flujo donde se evalué la presencia de receptores a hormonas esteroideas en timo de fetos y una gama más amplia de prepúberes incluyendo perinatos.
- Evaluar citocinas y receptores a esteroides sexuales por RT-PCR en timo fetal, especialmente de AR en fetos de machos.
- Incluir y estudiar más a fondo el papel de los linfocitos Treg en el dimorfismo sexual.
- Determinar en qué fase del ciclo estral de hembras adultas es pertinente realizar comparaciones de dimorfismo sexual.
- Cuantificar la concentración de esteroides sexuales en suero y realizar correlaciones con la presencia de sus receptores en linfocitos.
- Utilizar los marcadores c-Kit, CD44 y CD25 para evaluar posibles diferencias en poblaciones de linfocitos T doble negativos.

## 10. Bibliografia

- Allen, D. E., & Lynch, M. (2008). Both costs and benefits of sex correlate with relative frequency of asexual reproduction in cyclically parthenogenic *Daphnia pulicaria* populations. *Genetics*, *179*, 1497–502.
- Amadori, A., Zamarchi, R., De Silvestro, G., Forza, G., Cavatton, G., Danieli, G. A., ... Chieco-Bianchi, L. (1995). Genetic control of the CD4/CD8 T-cell ratio in humans. *Nature Medicine*, *1*, 1279–83.
- Arruvito, L., Sanz, M., Banham, A. H., & Fainboim, L. (2007). Expansion of CD4+CD25+and FOXP3+ regulatory T cells during the follicular phase of the menstrual cycle: implications for human reproduction. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *178*, 2572–8.
- Asano, M., Toda, M., Sakaguchi, N., & Sakaguchi, S. (1996). Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *The Journal of Experimental Medicine*, *184*, 387–96.
- Ashcroft, G. S., & Mills, S. J. (2002). Androgen receptor-mediated inhibition of cutaneous wound healing. *The Journal of Clinical Investigation*, *110*, 615–24.
- Aspinall, R., & Andrew, D. (2001). Gender-related differences in the rates of age associated thymic atrophy. *Developmental Immunology*, *8*, 95–106.
- Bayer, A. L., Lee, J. Y., de la Barrera, A., Surh, C. D., & Malek, T. R. (2008). A function for IL-7R for CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *181*, 225–34.
- Bayer, A. L., Yu, A., & Malek, T. R. (2007). Function of the IL-2R for Thymic and Peripheral CD4+CD25+ Foxp3+ T Regulatory Cells. *The Journal of Immunology*, *178*, 4062–4071.
- Bonomo, A., Kehn, P. J., Payer, E., Rizzo, L., Cheever, A. W., & Shevach, E. M. (1995). Pathogenesis of post-thymectomy autoimmunity. Role of syngeneic MLR-reactive T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *154*, 6602–11.
- Burt, T. D. (2013). Fetal regulatory T cells and peripheral immune tolerance in utero: implications for development and disease. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y. : 1989)*, *69*, 346–58.
- Butts, C. L., Shukair, S. A., Duncan, K. M., Bowers, E., Horn, C., Belyavskaya, E., ...

- Sternberg, E. M. (2007). Progesterone inhibits mature rat dendritic cells in a receptor-mediated fashion. *International Immunology*, *19*, 287–96.
- Chen, W., & Konkel, J. E. (2015). Development of thymic Foxp3(+) regulatory T cells: TGF- $\beta$  matters. *European Journal of Immunology*, *45*, 958–65.
- Chien, C. H., Lai, J. N., Liao, C. F., Wang, O. Y., Lu, L. M., Huang, M. I., ... Chien, E. J. (2009). Mifepristone acts as progesterone antagonist of non-genomic responses but inhibits phytohemagglutinin-induced proliferation in human T cells. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *24*, 1968–75.
- Cupedo, T., Nagasawa, M., Weijer, K., Blom, B., & Spits, H. (2005). Development and activation of regulatory T cells in the human fetus. *European Journal of Immunology*, *35*, 383–90.
- Darwin, C. (1871). *The descent of man, and selection in relation to sex*. By Charles Darwin ... New York,: D. Appleton and company,. doi:10.5962/bhl.title.24784
- De León-Nava, M. A., Nava, K., Soldevila, G., López-Griego, L., Chávez-Ríos, J. R., Vargas-Villavicencio, J. A., & Morales-Montor, J. (2009). Immune sexual dimorphism: effect of gonadal steroids on the expression of cytokines, sex steroid receptors, and lymphocyte proliferation. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *113*, 57–64.
- Dewing, P., Shi, T., Horvath, S., & Vilain, E. (2003). Sexually dimorphic gene expression in mouse brain precedes gonadal differentiation. *Brain Research. Molecular Brain Research*, *118*, 82–90.
- Douagi, I., André, I., Ferraz, J. C., & Cumano, A. (2000). Characterization of T cell precursor activity in the murine fetal thymus: evidence for an input of T cell precursors between days 12 and 14 of gestation. *European Journal of Immunology*, *30*, 2201–10.
- Dougherty, T. F. (1952). Effect of Hormones on Lymphatic Tissue. *Physiol Rev*, *32*, 379–401.
- Dumont-Lagacé, M., St-Pierre, C., & Perreault, C. (2015). Sex hormones have pervasive effects on thymic epithelial cells. *Scientific Reports*, *5*, 12895.
- Erlandsson, M. C., Jonsson, C. A., 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*, 346–51.
- Fish, E. N. (2008). The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses. *Nature Reviews. Immunology*, *8*, 737–44.
- Germain, R. N. (2002). T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nature Reviews. Immunology*, *2*, 309–22.
- Godfrey, D. I., Kennedy, J., Suda, T., & Zlotnik, A. (1993). A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8-triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *150*, 4244–52.
- Gordon, J., & Manley, N. R. (2011). Mechanisms of thymus organogenesis and morphogenesis. *Development (Cambridge, England)*, *138*, 3865–78.
- Greenstein, B. D. (1978). The role of hormone receptors in development and puberty. *Journal of Reproduction and Fertility*, *52*, 419–26.

- Grimaldi, C. M., Cleary, J., Dagtas, A. S., Moussai, D., & Diamond, B. (2002). Estrogen alters thresholds for B cell apoptosis and activation. *The Journal of Clinical Investigation*, *109*, 1625–33.
- Hamilton, W. D., Axelrod, R., & Tanese, R. (1990). Sexual reproduction as an adaptation to resist parasites (a review). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *87*, 3566–73.
- Hannah, M. F., Bajic, V. B., & Klein, S. L. (2008). Sex differences in the recognition of and innate antiviral responses to Seoul virus in Norway rats. *Brain, Behavior, and Immunity*, *22*, 503–16.
- Hanson, L. A., & Söderström, T. (1981). Human milk: Defense against infection. *Progress in Clinical and Biological Research*, *61*, 147–59.
- Hedrick, A. V., & Temeles, E. J. (1989). The evolution of sexual dimorphism in animals: Hypotheses and tests. *Trends in Ecology & Evolution*, *4*, 136–8.
- Hermann, E., Truyens, C., Alonso-Vega, C., Even, J., Rodriguez, P., Berthe, A., ... Carlier, Y. (2002). Human fetuses are able to mount an adultlike CD8 T-cell response. *Blood*, *100*, 2153–8.
- Hernández-Bello, R., Ramirez-Nieto, R., Muñoz-Hernández, S., Nava-Castro, K., Pavón, L., Sánchez-Acosta, A. G., & Morales-Montor, J. (2011). Sex steroids effects on the molting process of the helminth human parasite *Trichinella spiralis*. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, *2011*, 625380.
- Holleley, C. E., O'Meally, D., Sarre, S. D., Marshall Graves, J. A., Ezaz, T., Matsubara, K., ... Georges, A. (2015). Sex reversal triggers the rapid transition from genetic to temperature-dependent sex. *Nature*, *523*, 79–82.
- Ibarra-Coronado, E. G., Escobedo, G., Nava-Castro, K., Jesús Ramses, C.-R., Hernández-Bello, R., García-Varela, M., ... Morales-Montor, J. (2011). A helminth cestode parasite express an estrogen-binding protein resembling a classic nuclear estrogen receptor. *Steroids*, *76*, 1149–59.
- Ingahalikar, M., Smith, A., Parker, D., Satterthwaite, T. D., Elliott, M. A., Ruparel, K., ... Verma, R. (2014). Sex differences in the structural connectome of the human brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*, 823–8.
- Iyer, S. S., Ghaffari, A. A., & Cheng, G. (2010). Lipopolysaccharide-mediated IL-10 transcriptional regulation requires sequential induction of type I IFNs and IL-27 in macrophages. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *185*, 6599–607.
- Kashimada, K., & Koopman, P. (2010). Sry: the master switch in mammalian sex determination. *Development (Cambridge, England)*, *137*, 3921–30.
- Keightley, P. D., & Otto, S. P. (2006). Interference among deleterious mutations favours sex and recombination in finite populations. *Nature*, *443*, 89–92.
- Khan, K. N., Masuzaki, H., Fujishita, A., Kitajima, M., Sekine, I., Matsuyama, T., & Ishimaru, T. (2005). Estrogen and progesterone receptor expression in macrophages and regulation of hepatocyte growth factor by ovarian steroids in women with endometriosis. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *20*, 2004–13.
- Kim, W.-U., Min, S.-Y., Hwang, S.-H., Yoo, S.-A., Kim, K.-J., & Cho, C.-S. (2010). Effect of oestrogen on T cell apoptosis in patients with systemic lupus erythematosus. *Clinical and Experimental Immunology*, *161*, 453–8.

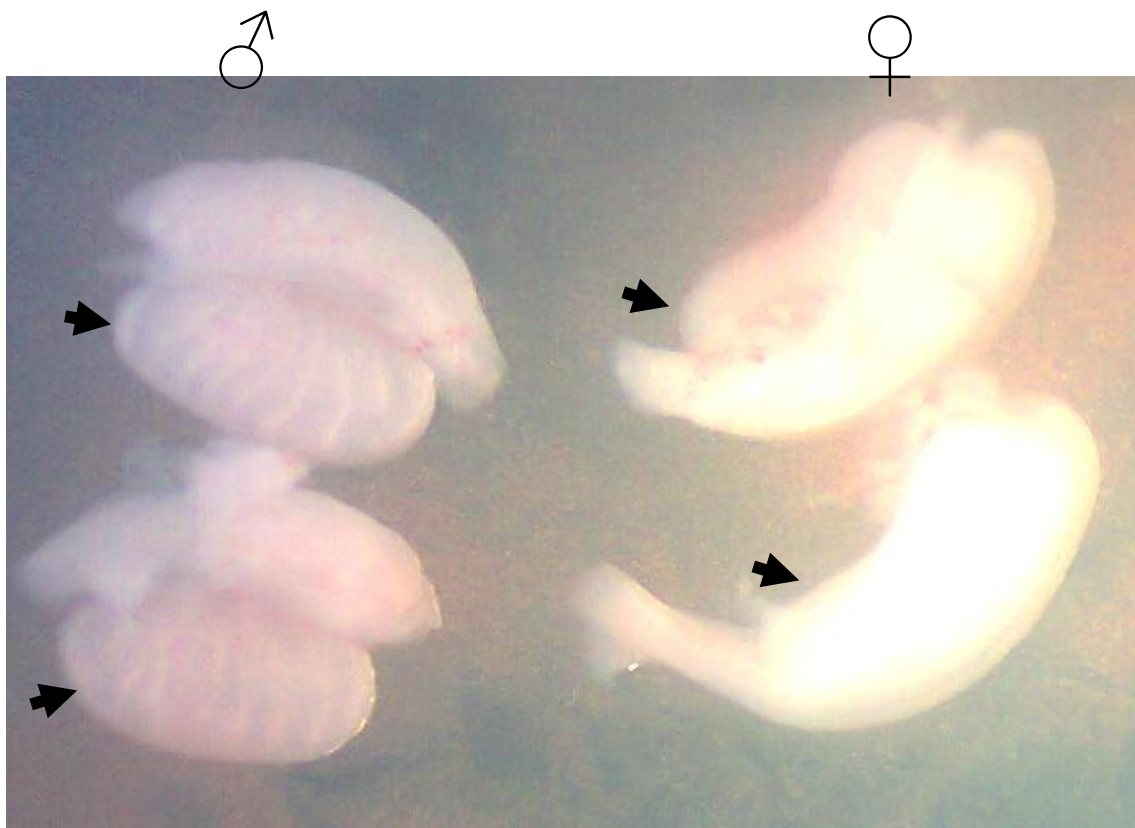
- Klein, S. L. (2000). The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *24*, 627–38.
- Klein, S. L., Hodgson, A., & Robinson, D. P. (2012). Mechanisms of sex disparities in influenza pathogenesis. *Journal of Leukocyte Biology*, *92*, 67–73.
- Kofman-Alfaro, S., & Queipo, G. (2005). Diferenciación sexual normal y patológica, *XXIX*, 109–118.
- Kouzine, F., Wojtowicz, D., Yamane, A., Resch, W., Kieffer-Kwon, K.-R., Bandle, R., ... Casellas, R. (2013). Global regulation of promoter melting in naive lymphocytes. *Cell*, *153*, 988–99.
- Lamason, R., Zhao, P., Rawat, R., Davis, A., Hall, J. C., Chae, J. J., ... Nagaraju, K. (2006). Sexual dimorphism in immune response genes as a function of puberty. *BMC Immunology*, *7*, 2.
- Licona, P., Chimal-Monroy, J., & Soldevila, G. (2006). Inhibins are the major activin ligands expressed during early thymocyte development. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, *235*, 1124–32.
- Livernois, a M., Graves, J. a M., & Waters, P. D. (2012). The origin and evolution of vertebrate sex chromosomes and dosage compensation. *Heredity*, *108*, 50–8.
- Mayer, A., Mosler, G., Just, W., Pilgrim, C., & Reisert, I. (2010). Developmental profile of Sry transcripts in mouse brain. *Development*, *137*, 3921–3930.
- McEwen, B. S. (1991). Non-genomic and genomic effects of steroids on neural activity. *Trends in Pharmacological Sciences*, *12*, 141–7.
- Mizuno, S., Kunita, R., Nakabayashi, O., Kuroda, Y., Arai, N., Harata, M., ... Hori, T. (2002). Z and W chromosomes of chickens: studies on their gene functions in sex determination and sex differentiation. *Cytogenetic and Genome Research*, *99*, 236–44.
- Molina, M. C. T. (2009). Desarrollo puberal normal. Pubertad precoz. *Revista Pediatría de Atención Primaria*, *11*, 127–142.
- Morales-Montor, J., Chavarria, A., De León, M. A., Del Castillo, L. I., Escobedo, E. G., Sánchez, E. N., ... Larralde, C. (2004). Host gender in parasitic infections of mammals: an evaluation of the female host supremacy paradigm. *The Journal of Parasitology*, *90*, 531–46.
- Ndiaye, K., Poole, D. H., Walusimbi, S., Cannon, M. J., Toyokawa, K., Maalouf, S. W., ... Pate, J. L. (2012). Progesterone effects on lymphocytes may be mediated by membrane progesterone receptors. *Journal of Reproductive Immunology*, *95*, 15–26.
- Nussinovitch, U., & Shoenfeld, Y. (2012). The role of gender and organ specific autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, *11*, A377–85.
- O’Shaughnessy, P. J., Baker, P., Sohnius, U., Haavisto, A. M., Charlton, H. M., & Huhtaniemi, I. (1998). Fetal development of Leydig cell activity in the mouse is independent of pituitary gonadotroph function. *Endocrinology*, *139*, 1141–6.
- Ouyang, W., Beckett, O., Ma, Q., & Li, M. O. (2010). Transforming growth factor-beta signaling curbs thymic negative selection promoting regulatory T cell development. *Immunity*, *32*, 642–53.
- Pardoll, D. M., Fowlkes, B. J., Bluestone, J. A., Kruisbeek, A., Maloy, W. L., Coligan,

- J. E., & Schwartz, R. H. (1987). Differential expression of two distinct T-cell receptors during thymocyte development. *Nature*, *326*, 79–81.
- Pernis, A. B. (2007). Estrogen and CD4+ T cells. *Current Opinion in Rheumatology*, *19*, 414–20.
- Rao, L. V., Cleveland, R. P., Kimmel, R. J., & Ataya, K. M. (1996). Gonadotropin-releasing hormone agonist influences absolute levels of lymphocyte subsets in vivo in male mice. *Immunology and Cell Biology*, *74*, 134–43.
- Romano, A., Rubolini, D., Caprioli, M., Boncoraglio, G., Ambrosini, R., & Saino, N. (2011). Sex-related effects of an immune challenge on growth and begging behavior of barn swallow nestlings. *PLoS One*, *6*, e22805.
- Rouleau, M., Cottrez, F., Bigler, M., Antonenko, S., Carballido, J. M., Zlotnik, A., ... Groux, H. (1999). IL-10 transgenic mice present a defect in T cell development reminiscent of SCID patients. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *163*, 1420–7.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., & Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *155*, 1151–64.
- Sapino, A., Cassoni, P., Ferrero, E., Bongiovanni, M., Righi, L., Fortunati, N., ... Bussolati, G. (2003). Estrogen receptor alpha is a novel marker expressed by follicular dendritic cells in lymph nodes and tumor-associated lymphoid infiltrates. *The American Journal of Pathology*, *163*, 1313–20.
- Schramm, C., Huber, S., Protschka, M., Czochra, P., Burg, J., Schmitt, E., ... Blessing, M. (2004). TGFbeta regulates the CD4+CD25+ T-cell pool and the expression of Foxp3 in vivo. *International Immunology*, *16*, 1241–9.
- Scotland, R. S., Stables, M. J., Madalli, S., Watson, P., & Gilroy, D. W. (2011). Sex differences in resident immune cell phenotype underlie more efficient acute inflammatory responses in female mice. *Blood*, *118*, 5918–27.
- Siewe, B., Wallace, J., Rygielski, S., Stapleton, J. T., Martin, J., Deeks, S. G., & Landay, A. (2014). Regulatory B Cells Inhibit Cytotoxic T Lymphocyte (CTL) Activity and Elimination of Infected CD4 T Cells after In Vitro Reactivation of HIV Latent Reservoirs. *PLoS ONE*, *9*, e92934.
- Stimson, W. H. (1988). Oestrogen and human T lymphocytes: presence of specific receptors in the T-suppressor/cytotoxic subset. *Scandinavian Journal of Immunology*, *28*, 345–50.
- Su, A. I., Wiltshire, T., Batalov, S., Lapp, H., Ching, K. A., Block, D., ... Hogenesch, J. B. (2004). A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*, 6062–7.
- Tschirren, B., Fitze, P. S., & Richner, H. (2003). Sexual dimorphism in susceptibility to parasites and cell-mediated immunity in great tit nestlings. *Journal of Animal Ecology*, *72*, 839–845.
- Vacchina, P., Valdéz, R. A., Gómez, Y., Revelli, S., & Romano, M. C. (2008). Steroidogenic capacity of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *111*, 282–6.

- van den Berg, J. P., Westerbeek, E. A. M., van der Klis, F. R. M., Berbers, G. A. M., & van Elburg, R. M. (2011). Transplacental transport of IgG antibodies to preterm infants: a review of the literature. *Early Human Development*, *87*, 67–72.
- Vosshenrich, C. A. J., García-Ojeda, M. E., Samson-Villéger, S. I., Pasqualetto, V., Enault, L., Richard-Le Goff, O., ... Di Santo, J. P. (2006). A thymic pathway of mouse natural killer cell development characterized by expression of GATA-3 and CD127. *Nature Immunology*, *7*, 1217–24.
- Walecki, M., Eisel, F., Klug, J., Baal, N., Paradowska-Dogan, A., Wahle, E., ... Fijak, M. (2015). Androgen receptor modulates Foxp3 expression in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T-cells. *Molecular Biology of the Cell*, *26*, 2845–57.
- Zakharova, L. A., Malyukova, I. V, Proshlyakova, E. V, Potapova, A. A., Saponova, A. Y., Ershov, P. V, & Ugrumov, M. V. (2000). Hypothalamo-pituitary control of the cell-mediated immunity in rat embryos: role of LHRH in regulation of lymphocyte proliferation. *Journal of Reproductive Immunology*, *47*, 17–32.

## 11. Anexo

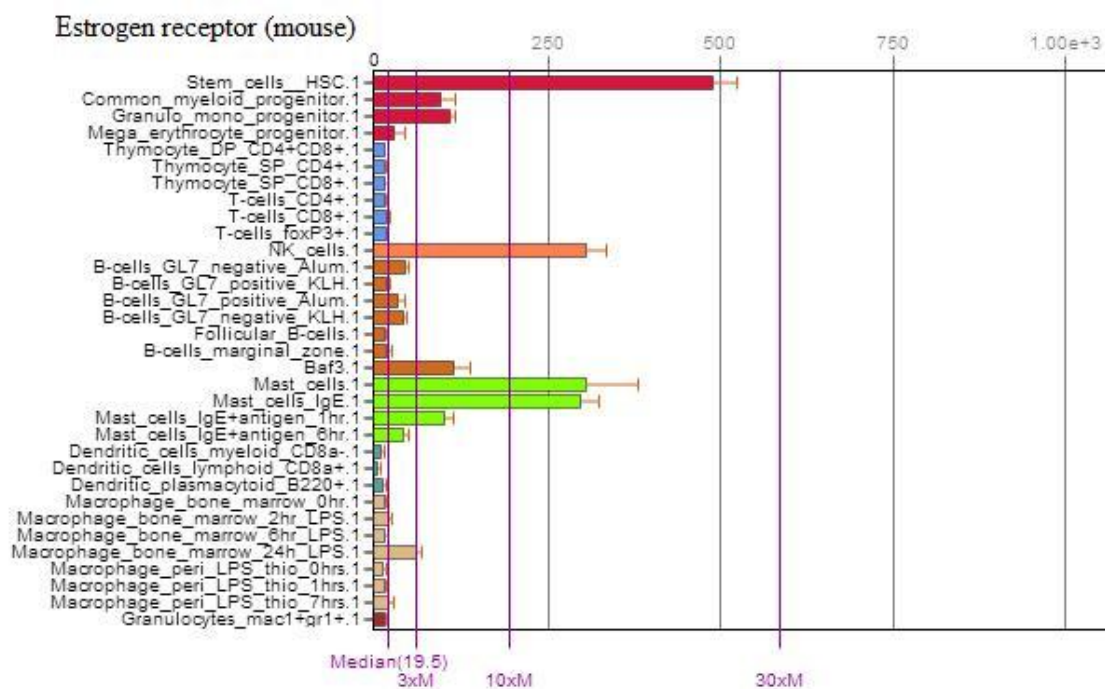
### 11.1 Gónadas fetales



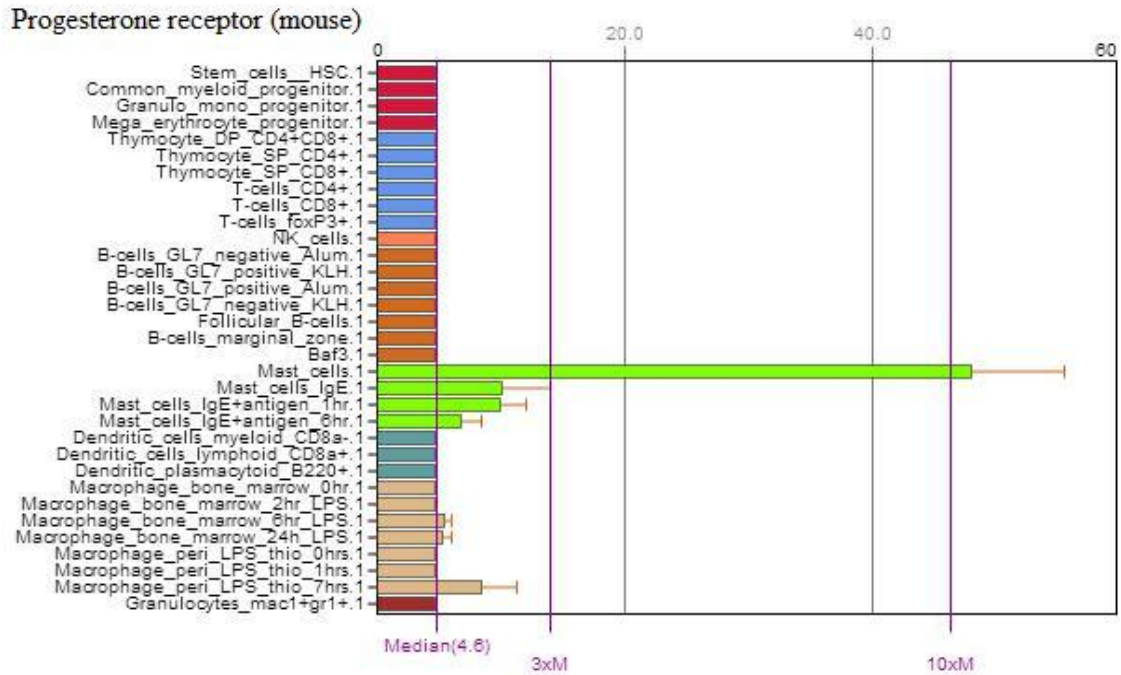
**Figura Anexo 1.** Fotografía de gónadas (indicadas con una flecha) unidas a mesonefros de fetos de 13.5dpc. Se observa a la izquierda las gónadas de machos caracterizadas por presentar septos y a la derecha las gónadas de hembras que no presentan dichos septos.



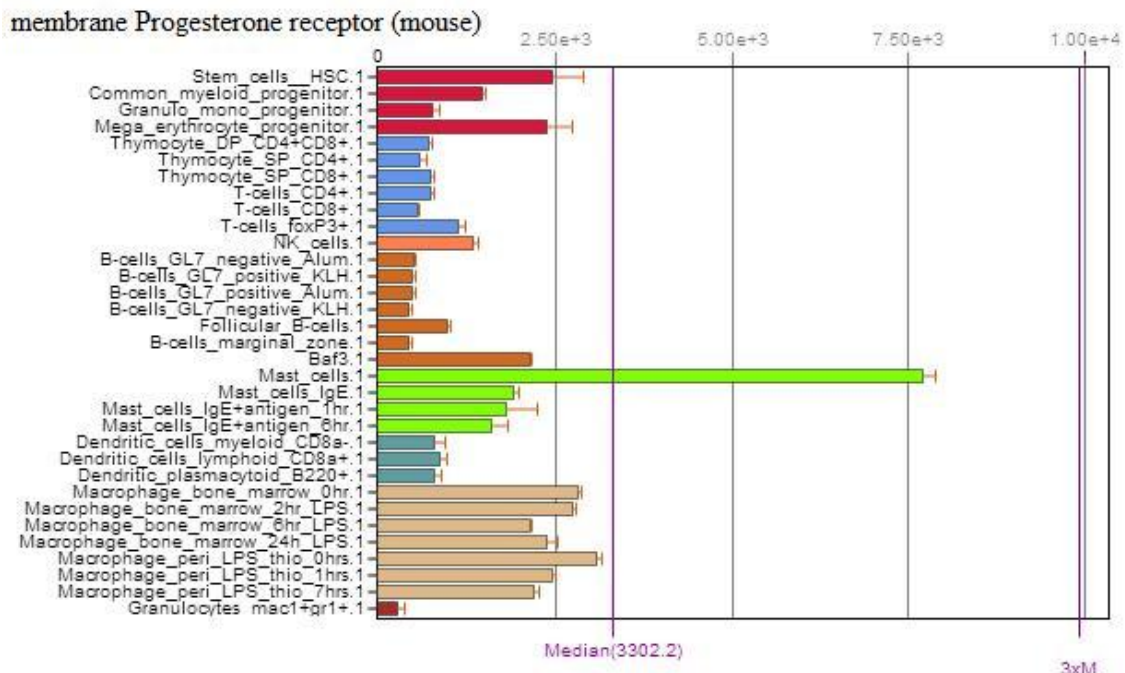
## 11.2 Expresión relativa de receptores esteroideos



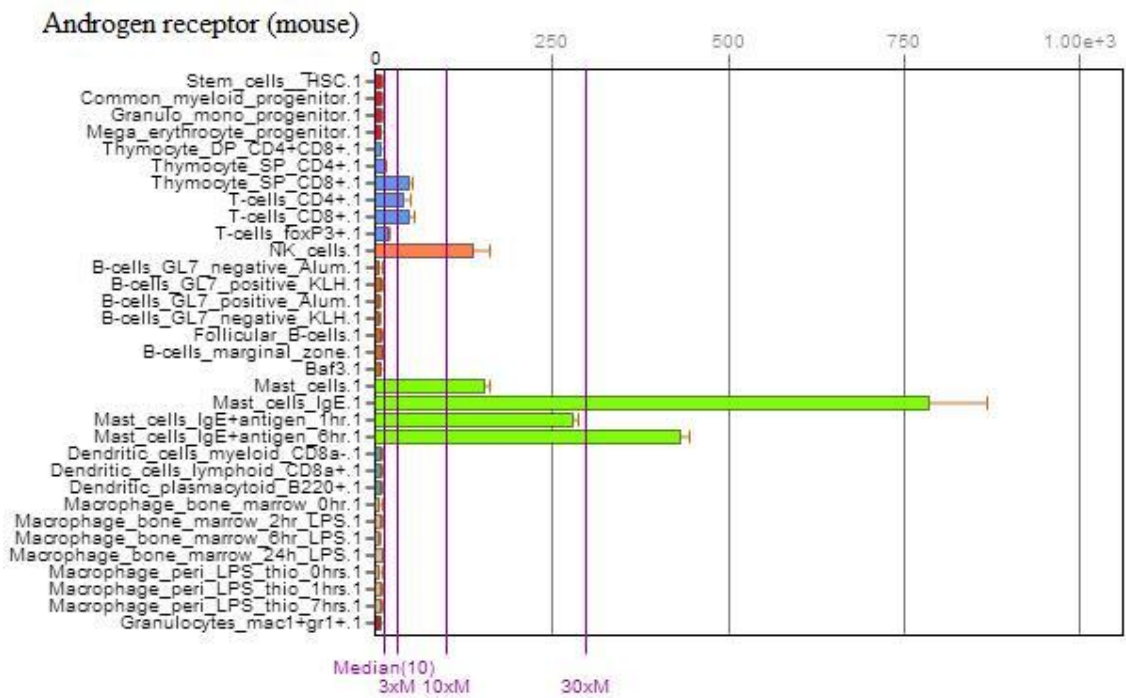
**Figura Anexo 2.** Expresión relativa de ER $\alpha$  en diferentes linajes de células del sistema inmune, de la base de datos de Su *et al* (2004) consultado en <http://www.biogps.com> el 30 de noviembre de 2015



**Figura Anexo 3.** Expresión relativa de PR en diferentes linajes de células del sistema inmune, de la base de datos de Su *et al* (2004) consultado en <http://www.biogps.com> el 30 de noviembre de 2015

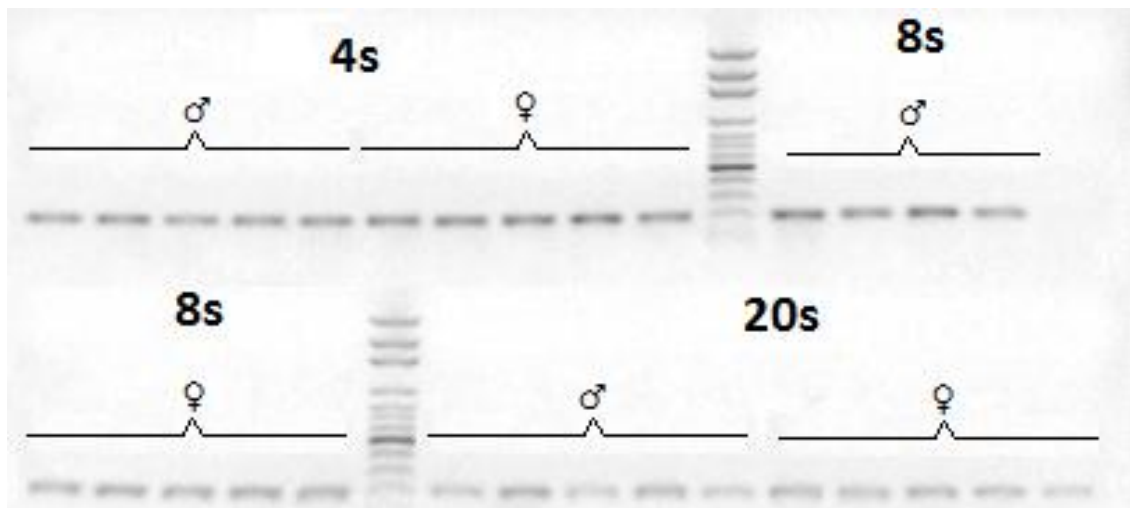


**Figura Anexo 4.** Expresión relativa de mPR en diferentes linajes de células del sistema inmune, de la base de datos de Su *et al* (2004) consultado en <http://www.biogps.com> el 30 de noviembre de 2015



**Figura Anexo 5.** Expresión relativa de AR en diferentes linajes de células del sistema inmune, de la base de datos de Su *et al* (2004) consultado en <http://www.biogps.com> el 30 de noviembre de 2015

### 11.3 Controles de carga del gen ribosomal 18s



**Figura Anexo 6.** Controles de carga utilizados para obtener el cociente de expresión relativa.