



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO *IN VITRO* DEL 17 β -ESTRADIOL (E2) SOBRE LA
EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS CD273 Y CD274 EN
CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MÉDULA ÓSEA
DE RATÓN

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

PAULINA VILLENA LÓPEZ



DIRECTOR DE TESIS:

DR. ANDRÉS ELIÚ CASTELL RODRÍGUEZ

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno

Apellido paterno
Apellido materno
Nombre (s)
Teléfono
Escuela
Carrera
Número de cuenta

1. Datos del alumno

Villena
López
Paulina
56733163
Universidad Nacional Autónoma de México
Biología
304198867

2. Datos del tutor

Grado
Nombre (s)
Apellido paterno
Apellido materno

2. Datos del tutor

Dr.
Andrés Eliú
Castell
Rodríguez

3. Datos del sinodal 1

Grado
Nombre (s)
Apellido paterno
Apellido materno

3. Datos del sinodal 1

M. en C.
Cándida María Cristina
Lemini
Guzmán

4. Datos del sinodal 2

Grado
Nombre (s)
Apellido paterno
Apellido materno

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Martha Luz
Ustarroz
Cano

5.- Datos del sinodal 3

Grado
Nombre (s)
Apellido paterno
Apellido materno

5. Datos del sinodal 3

M. en C.
Gabriela
Piñón
Zarate

6.- Datos del sinodal 4

Grado
Nombre (s)
Apellido paterno
Apellido materno

6. Datos del sinodal 4

M. en C.
Miguel Ángel
Herrera
Enríquez

7. Datos del trabajo escrito

Título

Efecto *in vitro* del 17 β -estradiol sobre la expresión de las moléculas CD273 y CD274 en células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón

Número de páginas

2013

Año

*A Dios, a mis padres y hermana
porque no sé como devolverles
lo mucho que me han dado*

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS PERSONALES.....	i
AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS	ii
ABREVIATURAS.....	iii
RESUMEN.....	v
I. MARCO TEÓRICO	1
1. 1 Generalidades del Sistema Inmune.....	1
1.2 Células dendríticas.....	3
1.2.1 Tipos de células dendríticas	6
1.2.2 Origen y diferenciación de células dendríticas	7
1.2.3 GM-CSF en la diferenciación de células dendríticas	7
1.3 Interacción células dendríticas y linfocitos T.....	8
1.3.1 Procesamiento de antígenos.....	9
1.4 Moléculas coestimuladoras y coinhibidoras	11
1.4.1 CD80/CD86	11
1.4.2 CD273 y CD274.....	12
1.4.3 CD40	14
1.5 Células dendríticas tolerogénicas	15
1.5.1 Manipulación de las CDtol y aplicación en la inmunoterapia.....	17
1.6 17β-estradiol	18
1.6.1 Biosíntesis del estradiol	18
1.6.2 Funciones biológicas	19
1.7 Receptores de estrógenos	20
1.7.1 Estructura	20
1.7.2 Mecanismo de acción	22
1.8 Estradiol y su relación con el sistema inmune.....	24
1.8.1 Interacción de los receptores de estrógenos con el sistema inmune	25
1.9 Efectos del estradiol en la respuesta inmune	27
1.9.1 El estradiol modula la respuesta inmune mediada por linfocitos B y T	28
II. ANTECEDENTES	30
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	33

IV. JUSTIFICACIÓN	33
V. HIPÓTESIS	33
VI. OBJETIVO GENERAL	34
6.1. OBJETIVOS PARTICULARES	34
VII. MATERIALES Y MÉTODO	35
7.1 Diferenciación de células dendríticas a partir de médula ósea de ratón	35
7.2 Obtención de sobrenadante rico en GM-CSF	35
7.3 Curva dosis y tiempo de respuesta del fenotipo de CD tratadas con E₂	36
7.4 Evaluación del inmunofenotipo	36
7.5 Análisis estadístico	37
VIII. RESULTADOS	38
8.1 Diferenciación de CD a partir de médula ósea de ratón	38
8.2 Análisis del fenotipo de las CD mediante citometría de flujo	40
8.3 Determinación del fenotipo de CD sin ser estimuladas con E₂	42
8.4 Efecto de la dosis y el tiempo de respuesta del E₂ en el fenotipo de las CD	44
8.4.1 Efecto de distintas dosis del 17β-estradiol	44
8.4.2 Efecto del tiempo en el fenotipo de las CD	47
IX. DISCUSIÓN	52
X. CONCLUSIONES	59
XI. PERSPECTIVAS	60
XII. REFERENCIAS	61

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Quiero agradecer primero a Dios porque todo este tiempo me ha tomado en su tierna mano dándome fuerza para continuar. Agradezco a papá, mamá, hermana, a mi cuñado y sobrino, por brindarme su amor, apoyo y comprensión, gracias por cada consejo que me dieron en los momentos difíciles y que sin ustedes no hubiera podido seguir.

También agradezco a las personas que me abrieron las puertas para realizar el presente trabajo y que son una parte importante en mi vida. A mi director de tesis el Dr. Castell por su disposición, calidez, cariño y tiempo que siempre me ha brindado. Mike, gracias por los regaños que fueron necesarios para seguir formando mi carácter, por tu comprensión, disposición y tiempo invertido en el presente trabajo. A mi querida Gaby por ser excelente consejera, amiga, maestra y por su apoyo incondicional. A Katy, Bety y a la Dra. Guadalupe Reyes, por sus consejos y por darme ánimo para seguir. Agradezco a mis amigos del Lab de Inmunoterapia, Mar gracias por tu apoyo incondicional, a Rodri por sus consejos, a Maye, Pao, Pato, Karlita, Rosita, Jess, Judith, Mical por su apoyo y por brindarme su amistad; a Daniel, Leo, Rodri, Raúl, gracias a cada uno de ustedes por ser excelentes personas y hacer agradable el trabajo en el lab.

A mis amigas de la Facultad Nadia, Erika, Adonay, Minerva, Nadxilli, Karlita, gracias por brindarme su amistad, comprensión y por compartir conmigo tristezas, alegrías, triunfos.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Agradezco al Dr. Andrés Castell Rodríguez por su dirección y asesorías y al Dr. Miguel Ángel Herrera Enríquez por su dirección en la práctica y teoría, también agradezco a la M. en C. Gabriela Piñón Zarate por su conocimiento y excelentes asesorías teóricas y prácticas. Gracias porque con su colaboración hicieron posible el presente trabajo.

También quiero expresar mi agradecimiento por la colaboración de las siguientes personas:

M. en C. Cristina Lemini Guzmán por haberme proporcionado el 17 β -estradiol

Q. Carlos Castellanos Barba por asesorarme en el manejo del citómetro de flujo

Biol. Barbara Moguel por ayudarme en el análisis estadístico

Laboratorista Daniel Cortés por ayudarme a sacrificar ratones

P. de Biol. Marlene Jiménez Zempoaltecatl

Biol. Rodrigo Jiménez Sandoval

M. en C. Katia Jarquín Yañez

Biol. Beatriz Hernández Piña

M. en C. Jessica Medrano Hernández

ABREVIATURAS

ADN = ácido desoxirribonucleico

APC = alofocianina

Bcl_{XL} = proteína de linfoma de células B XL

CCL1 = ligando de quimiocina tipo 1

CDc = células dendríticas convencionales

CDmo = células dendríticas derivadas de monocitos

CDp = células dendríticas plasmacitoides

CDtol = células dendríticas tolerogénicas

CL = células de Langerhans

CTLA-4 = antígeno 4 de linfocito T citotóxico

EEA = encefalomiелitis experimental autoinmune

EM = esclerosis múltiple

FIT-C = isocianato de fluoresceína

FLT3 = tirosina cinasa 3 parecida a FMS

Foxp3 = proteína tipo 3 forkhead winged helix

FSC = detector de dispersión frontal

GM-CSF = factor estimulante de colonia de granulocitos y macrófagos

IFN γ = interferón gamma

IL-6 = interleucina tipo 6

ILT4 = transcrito 4 tipo inmunoglobulina

ITIM = motivos de inhibición en inmunorreceptores basados en tirosina

LILRA4 = receptor parecido a inmunoglobulina de leucocito, subfamilia A, miembro 4

MAPK = proteína cinasa activada por mitógenos

M-CSF = factor estimulante de colonia de macrófagos

MHCII= complejo mayor de histocompatibilidad clase 2

MIP3 β = proteína inflamatoria de macrófagos 3 beta

PD-1 = receptor de muerte programada 1

PE = ficoeritrina

PRRs = receptores de reconocimiento de patrón

RE = receptor de estrógenos

SSC = detector de dispersión lateral

STAT 3 = transductor de la señal y activador de la transcripción tipo 3

TCR = receptor de linfocitos T

TGF β = factor de crecimiento transformante beta

TNF α = factor de necrosis tumoral alfa

VEGF = factor de crecimiento endotelial vascular

RESUMEN

Las células dendríticas (CD) son células derivadas de médula ósea que se encargan de presentar antígenos y estimular a linfocitos T que no han sido retados con un antígeno o también llamados linfocitos T vírgenes. Las CD también son capaces de estimular a linfocitos T CD8⁺ e inducen y mantienen la tolerancia inmunológica central y periférica mediante distintos mecanismos como la expansión de células T reguladoras (Treg). Las CD pasan por un proceso de maduración que es importante, pero no necesario, para la inducción de una respuesta inmune. En este proceso ocurren cambios morfológicos (pérdida del aspecto dendrítico), en el fenotipo, en la producción de citocinas y en la disminución de endocitosis. Cuando presentan antígenos a linfocitos T, las CD liberan distintas señales que permiten la óptima activación de células T, una de estas señales que contribuye de manera importante al destino de la respuesta inmune es la coestimulación proporcionada por las proteínas de la familia B7 (CD80, CD86, CD273, CD274) y que depende de la unión del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) con el receptor de células T (TCR). La combinación y cantidad de estas proteínas puede dar lugar a estimulación y con ello la proliferación, o bien a la tolerancia que se manifiesta por apoptosis, anergia de linfocitos T o expansión de Treg.

Por otro lado, el 17 β -estradiol (E₂) es una hormona esteroidea, que pertenece al grupo de los estrógenos y se ha descrito regula las respuestas inmunitarias mediante la modulación de la función y fenotipo de las células del sistema inmune como macrófagos, granulocitos, linfocitos, células NK y células dendríticas. En CD se ha documentado que el E₂ induce un aumento en la producción de citocinas antiinflamatorias como IL-10, dicha citocina contribuye a la tolerancia mediante la expansión de las Treg, además induce disminución en la habilidad de las CD para estimular la respuesta proliferativa de linfocitos T; con respecto a lo anterior se sabe que las CD poseen receptores de estrógenos, lo cual indica un efecto directo en dichas células. Estos trabajos y el que a continuación se menciona sugieren un papel inmunosupresor del E₂. En nuestro grupo de trabajo se encontró que el E₂ induce la disminución transitoria de CD de epidermis (células de Langerhans (CL)). La disminución de CL puede llevar a una pérdida de inmunovigilancia, además de inducir cambios en el fenotipo que podría desencadenar en inmunosupresión o activación de la respuesta inmunológica. Por lo anterior el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto *in vitro* del 17 β -estradiol sobre el inmunofenotipo de las CD, en particular si afecta la expresión de las proteínas membranales que aportan señales inhibitoras durante la presentación antigénica (CD273, CD274), de moléculas coestimuladoras (CD40, CD80, CD86) y las relacionadas con la maduración (MHCII y CCR7). Por otro lado se determinó si este efecto es dosis y tiempo dependiente. Se encontró que el E₂ es capaz de modificar el fenotipo de las CD. El efecto sobre el inmunofenotipo es dependiente de la dosis y del tiempo de exposición al E₂, de esta manera dosis altas o suprafisiológicas (100 y 1000 ng/ml) de E₂ lograron incrementar la expresión de CD273, CD86 y MHCII y disminuir la de CD274. El E₂ sólo incrementó la expresión de CD86 de manera proporcional a la dosis, pero indujo un incremento en la expresión que es directamente proporcional al tiempo en el que las moléculas fueron evaluadas (CD273, CD274, CD40, CD80 y MHCII). El E₂, entonces, induce un fenotipo maduro en CD derivadas de médula ósea que potencialmente induciría una tolerancia por la unión de CD273 y CD274 con su receptor PD-1 o bien CD80 con CTLA-4 en linfocitos T.

MARCO TEÓRICO

1. 1 Generalidades del Sistema Inmune

El término inmunidad deriva del latín *inmunitas* y hace referencia a la exención de obligaciones civiles y procesamientos legales ofrecidos a los senadores romanos durante el desempeño de sus cargos. Tucídides (historiador griego) en el siglo V a.C. fue el primero en relacionar este término frente a una infección, así la inmunidad hace referencia a la protección contra agentes extraños o infecciosos. Los órganos (timo, médula ósea, bazo, ganglios linfáticos y tejido linfode asociado a mucosas, etc.), las células (linfocitos, macrófagos, CD, células NK) y moléculas responsables de la inmunidad (anticuerpos, el sistema de complemento) constituyen el sistema inmune. Una de las funciones primordiales del sistema inmune es distinguir lo propio de lo extraño y llevar a cabo una respuesta que trata de eliminar aquello que es reconocido como extraño.

Existen dos tipos principales de respuesta inmune: innata o natural y adaptativa o adquirida. La primera provee una primer defensa contra cualquier elemento reconocido como extraño y consiste en los mecanismos de defensa inespecíficos externos (barreras fisico-químicas y biológicas) que tienden a evitar la infección, cuando los microorganismos consiguen contrarrestar estos mecanismos de defensa, actúan los mecanismos de defensa inespecíficos internos (moléculas y células) para la destrucción del patógeno. Sus características principales son que ejerce sus efectos de manera inmediata asegurando una defensa rápida en contra de patógenos o moléculas extrañas por medio del reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), que son estructuras químicas que comparten microorganismos y virus; también se genera una respuesta inmune que no se incrementa tras exposiciones repetidas al mismo agente, además de no generar memoria inmunológica, es decir que responderá inespecíficamente y con igual magnitud si se vuelve a encontrar con el mismo microorganismo. Los constituyentes de la inmunidad innata son las barreras físicas (como epitelios, moco, cilios), barreras químicas (pH, lípidos, poliaminas, ácidos biliares, lisozima), factores solubles (citocinas, componentes del complemento, anticuerpos no específicos, proteína C reactiva) y células como fagocitos (macrófagos y neutrófilos), subpoblaciones de células asesinas naturales (NK), linfocitos T NK, y linfocitos T $\gamma\delta$ (Abbas y Lichtman, 2004).

La respuesta inmune adaptativa consiste en los mecanismos de defensa específicos tras el reconocimiento del agente extraño (antígeno, se define como molécula de cualquier naturaleza química que puede ser reconocida por células del sistema inmune) durante un determinado tiempo. En este tipo de respuesta se genera memoria inmunológica, es decir que si se enfrenta al mismo organismo puede combatirlo de manera específica, rápida y con mayor magnitud. Sus principales componentes celulares son linfocitos B, T, células dendríticas, macrófagos (éstas dos son células presentadoras de antígenos (CPA), sin embargo los linfocitos B también actúan como CPA). El desarrollo de una respuesta inmune específica depende de la interacción de linfocitos T, B

y CPA, que induce diferenciación clonal de linfocitos restringidos en linfocitos efectores capaces de desencadenar distintas respuestas. Los linfocitos T se dividen en subpoblaciones dependiendo de las proteínas que se expresan en su membrana (marcadores superficiales) y/o sus funciones. Las células T que expresan la proteína CD4 son designadas como células cooperadoras o 'helpers' (conocidos como T_H , del inglés T helpers), están encargadas de establecer y maximizar las capacidades de defensa del sistema inmunitario, en particular la activación y dirección de otras células inmunitarias como linfocitos B para producción de anticuerpos, así como la activación y crecimiento de los linfocitos T citotóxicos y el aumento de la actividad bactericida de fagocitos como los macrófagos. Por otro lado, a los linfocitos que expresan la proteína CD8 se les denomina células T citotóxicas, y son cruciales en la defensa en contra de patógenos intracelulares como virus y bacterias, pues neutralizan células infectadas mediante un ataque directo, logrando su apoptosis mediante distintos mecanismos como la liberación de enzimas tóxicas que provocan su destrucción entre ellas las perforinas o el ligando de Fas (FasL) (Abbas y Lichtman, 2004). Los linfocitos T cooperadores ($CD4^+$) se dividen en varios grupos dependiendo de las citocinas que liberan. En el proceso de diferenciación de estos grupos, las CD tiene una importante función como se verá en los párrafos siguientes. Se han caracterizado varias subpoblaciones de linfocitos T cooperadores: T_H1 , T_H2 , T_H9 , T_H17 y T reguladores. Cada una de estas subpoblaciones coordinan distintas respuestas, de tal manera que por ejemplo, cuando un organismo vertebrado es invadido por algún agente infeccioso, los linfocitos T_H1 , T_H2 , T_H9 y T_H17 se encargan de la destrucción de los microorganismos, en tanto que los linfocitos Treg atenúan la respuesta dada por estos grupos una vez controlada la infección permitiendo una mínima repercusión sobre la totalidad de las células y tejidos del organismo. Sin embargo, se ha descrito un papel supresor en los T_H1 , T_H2 y T_H17 ya que son mutuamente inhibidos, y en el caso de los Treg tienen un papel importante en la coordinación de los primeros pasos de la infección vírica de manera directa, induciendo la diferenciación de los linfocitos T_H17 a través de la secreción del factor de crecimiento $TGF\beta$. Las citocinas que liberan cada subpoblación son las siguientes: los T_H1 liberan principalmente $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, $TNF\beta$, IL-2; los T_H2 producen IL-4, IL-10, IL-5, IL-9 e IL-13; los T_H9 , IL-9; los T_H17 , IL-17, IL-21, IL-22; los Treg producen $TGF\beta$, IL-10 y el factor de transcripción Foxp3 (Wan y Flavell, 2009).

Por otro lado, como se mencionó anteriormente, el sistema inmune es capaz de reconocer lo propio de lo extraño, así como reaccionar sólo contra lo extraño y no con lo propio. Esta homeostasis se logra mediante la tolerancia inmunológica, que es definida como la incapacidad de responder ante un antígeno específico. Existen dos tipos de tolerancia: la central que ocurre en órganos linfoides primarios (médula ósea y timo) y la periférica en órganos linfoides secundarios (ganglios linfáticos, bazo, tejido linfoide asociado a mucosas) y el resto del organismo (Abbas y Lichtman, 2004). Cuando el sistema inmune reconoce lo propio como extraño se induce una respuesta en contra de las células del organismo lo que da lugar a las llamadas enfermedades autoinmunes, en particular la presencia de los linfocitos T_H17 están involucrados en su desarrollo (Togno y Montor, 2009). La tolerancia inmunológica cobra relevancia en la clínica contra el tratamiento de enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple, artritis reumatoide o

lupus eritematoso, o bien ante el rechazo de injertos o para controlar respuestas exacerbadas en contra de un antígeno (Ezzelarab y Thomson, 2011).

1.2 Células dendríticas

Las CD son células hematopoyéticas que pertenecen a la familia de CPA, conocidas como 'profesionales' ya que pueden inducir el comienzo de respuestas inmunitarias activando a linfocitos T vírgenes, llamados así porque no han sido retados con un antígeno (Abbas y Lichtman, 2004). Sus precursores se localizan en la médula ósea. Muchos de los precursores inmediatos migran a través de vasos sanguíneos y se localizan en distintos tejidos, como tejido linfoide, conjuntivo, mucosas y piel, en donde terminan de diferenciarse (Sato y Fujita, 2007). En particular los precursores que renuevan las CD localizadas en piel y mucosas provienen de médula ósea (Banchereau y Steinman, 1998; Belz y Nutt, 2012).

Las CD se caracterizan por ser iniciadoras de la respuesta inmune adaptativa e innata, en particular de la inmunidad adaptativa, ya que son capaces de determinar el tipo, la eficiencia y la magnitud de la respuesta cuando interactúan con linfocitos T. Las CD son importantes como reguladores de la inmunidad ya que en primera instancia estimulan a linfocitos T $CD4^+$ o $CD8^+$ y modulan las respuestas dadas por linfocitos $CD4^+$ promoviendo su polarización hacia distintas subpoblaciones de linfocitos T cooperadores, como T_H1 , T_H17 , T_H2 , además de Treg; inducen y mantienen la tolerancia inmunológica central y periférica, contribuyen también a mantener la memoria; además se consideran mediadoras de la comunicación entre el sistema inmune innato y adaptativo ya que producen interferón alfa ($IFN-\alpha$) ante el reconocimiento de virus, iniciando procesos inflamatorios tras reconocer PAMPs y activando a otras células de la inmunidad innata como las NK (Sallusto y Lanzavecchia, 2002; Ueno, et al., 2007). No sólo las CD estimulan a células T sino a células B a través de citocinas como IL-12, las CD pueden inducir la producción de anticuerpos y la proliferación de células B que fueron estimuladas por CD40L de células T activadas, así como el cambio de clase de las inmunoglobulinas IgA de células B activadas por linfocitos T (Banchereau y Steinman, 1998).

Las CD son capaces de realizar todas estas funciones debido a su plasticidad genética y epigenética, lo cual les permite reprogramarse genéticamente en respuesta a distintos estímulos (ejemplos: microorganismos, virus, citocinas, células apoptóticas, células tumorales o sustancias que podrían causar hipersensibilidad) (Granucci, et al., 2003). Las respuestas transcripcionales inducidas por el microambiente en el que se encuentran las CD, da lugar a la adquisición de un fenotipo funcional, que consiste en todo un repertorio de receptores membranales que utilizan para obtener información acerca de los estímulos exteriores, y para la captación, presentación de antígenos y funciones efectoras de estas células. Las CD pueden adquirir diferentes fenotipos dando lugar a diferentes respuestas (Granucci y Zanoni, 2009; Ueno, et al., 2007). Una parte del repertorio de moléculas que conforman su fenotipo lo componen los receptores de reconocimiento de patrón (PRRs), que está formado por tres familias: receptores tipo Toll (TLRs),

receptores de lectinas tipo C (CLRs) y receptores tipo NOD (NLRs). Los PRR reconocen moléculas conservadas de distintos microorganismos llamados PAMPs (lipopolisacárido, ácido lipoteicoico, secuencias de ADN de microorganismos y virus, etc.), así como factores tisulares (FTs) que son expresados por células de tejidos aledaños en respuesta a patógenos o daño tisular, algunos ejemplos de los FTs son citocinas pro y antiinflamatorias, quimiocinas, eicosanoides, proteínas de choque térmico (HSP), componentes de matriz extracelular, lípidos necróticos y ácido siálico, entre otros (Kapsenberg, 2003). También los PRRs incluyen proteínas que promueven la endocitosis, la activación del complemento, cascadas de coagulación e inducción de apoptosis. Los TLR que se expresan en las CD son: TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 y TLR10 (Ueno, et al., 2007).

Se sabe de la capacidad de las CD de modular distintos tipos de respuestas, la respuesta a la pregunta cómo es que las CD pueden modular la polarización de diferentes respuestas inmunes, depende de varios factores: la naturaleza de los estímulos que reciben de otras células, como los patógenos o sustancias químicas, del microambiente en el que son estimuladas, el tipo de CD, de su maduración fenotípica y de su habilidad para sensar y traducir las señales ambientales (Sallusto y Lanzavecchia, 2002; Ueno, et al., 2007). La naturaleza de los estímulos tiene un papel importante en la polarización de distintas respuestas, las CD al poseer distintos tipos de TLRs pueden reconocer diversos estímulos, dichos estímulos desencadenan maduración en el fenotipo (incremento de moléculas coestimuladoras y MHCII principalmente) y producción de citocinas por parte de las CD, polarizándolas y desencadenando la diferenciación de distintos linfocitos T cooperadores. En concordancia con lo anterior, la unión de los ligandos (lipopéptidos, proteoglicanos de micoplasma y zymosan de la pared celular de levaduras) por el heterodímero TLR2-TLR6 induce la producción de IL-10 en CD; esta citocina está involucrada en la generación de tolerancia como se verá más adelante. TLR3 que reconoce ARN de doble cadena, TLR7 que liga componentes antitumorales sintéticos y residuos de guanosina y TLR9 que reconoce motivos de ADN ricos en CpG inducen la producción de citocinas como IL-12 e IFN tipo I, como IFN α , los cuales inducen una respuesta de tipo T_H1; el TLR4 cuando se une a LPS a distintas concentraciones, puede inducir a concentración baja una respuesta T_H2 y a concentración alta una T_H1. Se ha documentado que la infección por helmintos como *Acanthocheilonema vitae* induce una respuesta de tipo T_H2, pero no se sabe que TLRs están involucrados, así también se ha documentado que diversos patógenos impiden la maduración de las CD o inducen un fenotipo tolerogénico promoviendo la expansión de las Treg, tal es el caso de *Candida albicans* que induce el incremento de IL-10 (Kapsenberg, 2003).

Para que las CD inicien una respuesta es importante, más no necesario, que pasen por un proceso de maduración que a continuación se describe. Ante la ausencia de señales inflamatorias o de daño las CD residentes de tejidos o migratorias permanecen en estado inmaduro incapaces de estimular a linfocitos T, cumpliendo un papel de inmunovigilancia y mantenimiento de la tolerancia inmunológica. En dicho estado, poseen gran capacidad de capturar antígenos mediante fagocitosis, endocitosis o pinocitosis pues en su membrana expresan niveles altos de receptores

que favorecen la endocitosis (como los receptores para la fracción cristalizante (Fc) de las inmunoglobulinas (Fc γ Rs como CD32 y CD64); los receptores de IgE de alta y baja afinidad, Fc ϵ RI y Fc ϵ RII (CD23) respectivamente; los receptores de lectinas tipo C que unen manosa como (DEC-205), los receptores de complemento CD11c y CD11b y los receptores de células apoptóticas $\alpha_v \beta_5$ y CD36), así como también bajos niveles de moléculas MHC y moléculas accesorias (de coestimulación, de adhesión y migración) (Banchereau y Steinman, 1998; Ueno, et al., 2007; Lipscomb y Masten, 2002).

De acuerdo con el paradigma de maduración de las CD, en presencia de estímulos inflamatorios, productos microbianos (LPS, proteoglicanos de bacterias), patógenos, alérgenos, señales de daño celular o la unión a CD40L, comienza el proceso de maduración en las CD, que involucra cambios fenotípicos, morfológicos y funcionales que aseguran la presentación de antígenos a las células T, estos cambios incluyen la acidificación de los lisosomas para optimizar el procesamiento de antígenos; el aumento en la expresión de proteínas relacionadas con la presentación antigénica como proteína de la activación del proteosoma (PA28), la proteína transportadora de antígenos 1 (TAP-1); la reorganización de los endosomas que contienen las moléculas MHC cargados con el antígeno para que sean trasladados a las membranas de las CD para su posterior reconocimiento por las células T; cambios en la morfología, particularmente en el citoesqueleto (pérdida de podosomas o incremento de éstos cuando migran); los niveles de los receptores relacionados con la fagocitosis disminuyen afectando la capacidad de endocitosis; incremento en su superficie de las moléculas del MHC y las moléculas coestimuladoras CD40, CD80 y CD86 que aseguran la estimulación eficiente de linfocitos T, así como de receptores de quimiocinas que facilitan su encuentro con linfocitos T como CCR7; aumento de niveles de producción de las quimiocinas MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2 que permiten la atracción de macrófagos y citocinas que promueven la polarización de la respuesta inmune hacia T_H1, como IL-12 y TNF α ; también se incrementan factores que promueven la supervivencia de las CD como la proteína 1 de ratón que inhibe apoptosis MIAP1, y Bcl-x (Ueno, et al., 2007; Granucci, et al., 2003).

Las CD así maduras son inmunogénicas y migran hacia las zonas T-dependientes de los ganglios linfáticos más cercanos para presentar los antígenos a las células T. Una vez que las CD han presentado los antígenos a linfocitos T mueren dentro de las 48 horas siguientes. Esta apoptosis permite mantener la homeostasis del sistema inmune (Granucci y Zanoni, 2009). El proceso de migración ha sido estudiado sobre todo en CL, y ha descrito que en presencia de factores como leucotrienos e histamina se favorece la migración, pero en particular la prostaglandina E2 incrementa la expresión de CCR7 (receptor tipo 7 de quimiocina Cys-Cys) mediada por leucotrienos. La proteína CCR7 desempeña un papel crucial para su encuentro con los linfocitos T y la inducción de respuestas, ya que la unión CCR7 con CCL19/CCL21 permite la migración de las CD a ganglios linfáticos así como su localización en zonas T-dependientes de bazo y timo (Rivas y García, 2009).

1.2.1 Tipos de células dendríticas

El sistema de células dendríticas está constituido por un grupo heterogéneo de células del sistema inmune, lo cual hace difícil su clasificación, sin embargo se han agrupado en distintos tipos dependiendo de las proteínas o *marcadores* que se expresan en su superficie (Belz y Nutt, 2012), así como por su localización en los tejidos (Sato y Fujita, 2007).

Dependiendo de las proteínas de membrana expresadas, se distinguen cuatro grupos de células dendríticas: convencionales, células de Langerhans (CL), plasmacitoides (CDp) y derivadas de monocitos (Belz y Nutt, 2012).

CD convencionales (CDc). Este grupo de CD se caracteriza por su habilidad de procesar y presentar antígenos a linfocitos T, además de expresar los marcadores CD11c y MHCII. Dentro del grupo se distinguen dos clases de CD. Las CD migratorias, que se dividen en CD11b⁺ (también conocidas como CD dérmicas o intersticiales) y las que son CD11b⁻ CD103⁺ (esta proteína también es conocida como integrina α E). La segunda clase corresponde a las CD residentes de tejido linfoide y que se originan a partir de precursores localizados en los órganos linfoides, se caracterizan por expresar las proteínas CD4 y CD8 α , existiendo tres tipos: CD4⁺ CD8 α ⁻, CD4⁻ CD8 α ⁺ y CD4⁺ CD8 α ⁺. La población CD4⁻ CD8 α ⁺ se caracteriza por tener presentación cruzada de antígenos, así como por su capacidad de activar a linfocitos T CD8⁺, mientras que las CD CD4⁺ CD8 α ⁻ son eficientes en presentar antígenos en el contexto de moléculas MHCII a linfocitos T CD4⁺. Los marcadores CD4 y CD8 α sólo están presentes en ratón. Los marcadores que se usan para CD de humano son CD11c⁺CD1a⁺.

Células de Langerhans (CL). Están localizadas en los epitelios y son capaces de captar antígenos y migrar a ganglios linfáticos para presentar antígenos. Las CL provienen de una población de células precursoras mielomonocíticas LY6C⁺ localizadas en la piel. El fenotipo de estas células es Langerina positiva CD207⁺ y CD103⁺.

CD plasmacitoides (CDp). Este grupo se caracteriza por producir interferones tipo I (IFN α) en respuesta a diferentes tipos de patógenos intracelulares como los virus, además tienen poca capacidad de presentar antígenos. Las CDp expresan varios marcadores superficiales CD11c⁺ B220⁺ NK1.1⁻, niveles variables de MHCII (Togno y Montor, 2009), así como otros marcadores como SIGLEC-H, antígeno 2 estromal de médula ósea (BST2) en ratones; antígeno 2 de CD en sangre (BDCA2) y (LILRA4 o ILT7) en humanos. En ratones y humanos las CDp comparten un marcador CD45RA, también conocido como B220⁺.

CD derivadas de monocitos (CDmo). Se originan en condiciones de inflamación y se caracterizan por ser eficientes presentadoras de antígenos y llevar a cabo presentación cruzada. Normalmente los monocitos expresan el receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSFR), así como LY6C y el receptor 1 de la quimiocina CX₃C (CX₃CR1), sin embargo *in vitro*, en presencia de la

citocina GM-CSF, o *in vivo*, en presencia de los ligandos de los TLR4 o bacterias, pueden diferenciarse a CD expresando de manera característica CD11c, MHCII, CD24, CD172a o SIRP α , MAC3 (marcador de macrófagos) y sobre expresando DC-SIGN/CD209.

1.2.2 Origen y diferenciación de células dendríticas

Existen numerosos trabajos que han tratado de dilucidar el linaje de las CD, en los cuales se ha debatido si tienen un origen mieloide o linfoide, actualmente es aceptado que pueden originarse a partir del progenitor mieloide común (PMC) o progenitor linfoide común (PLC) (Belz y Nutt, 2012; Wu y Liu, 2007).

La diferenciación de los precursores de las CD ocurre durante la leucopoyesis, proceso que se lleva a cabo principalmente en la médula ósea (Sato y Fujita, 2007). La médula ósea provee un ambiente conformado por células, matriz extracelular y factores de crecimiento que permiten la diferenciación de las CD. Durante la diferenciación de las CD están implicadas varias citocinas como GM-CSF, M-CSF y FLT3, (en particular el GM-CSF es sintetizado por las células estromales). También están implicados distintos factores de transcripción que son importantes tanto en etapas tempranas como tardías de su desarrollo (PU.1, Ikaros, factor de crecimiento independiente tipo 1 (GFI1), STAT3 y STAT5, así como E2-2, ID2, BATF3, IRF8) (Satpathy, et al., 2011). A partir de las células troncales hematopoyéticas (CTH), que son células multipotenciales con la capacidad de autorrenovarse, se diferencia el progenitor mieloide común (PMC), el cual da lugar a los precursores de granulocitos y macrófagos (GMP), en tanto que otra población expresa el receptor de la citocina FLT3, la cual es inducida por el factor de transcripción PU.1, dando lugar a precursores de macrófagos y CD (MDP). La MDP es un grupo de células con capacidad proliferativa y constituye el precursor directo de las CD (CDP). Las MDP y CDP expresan niveles altos de receptores para M-CSF y FLT3, así como niveles bajos del factor de células troncales (c-Kit). La CDP da lugar a los distintos grupos de pre-CDc y pre-CDp, pero ya no pueden diferenciarse a monocitos. También se ha documentado que los monocitos que provienen de los MDP pueden dar lugar a CDc en presencia de GM-CSF (Geissman, et al., 2010; Satpathy, et al., 2011; Belz y Nutt, 2012).

1.2.3 GM-CSF en la diferenciación de células dendríticas

GM-CSF es una citocina que fue aislada en 1977 de medio condicionado proveniente de pulmón de ratones que recibieron previamente estímulos con lipopolisacárido (LPS). Originalmente se describió que GM-CSF tiene la capacidad para estimular células progenitoras hematopoyéticas, de diferenciar macrófagos y monocitos a partir de precursores de médula ósea, así como afectar las

funciones de células mieloides maduras como macrófagos, monocitos y eosinófilos. En la actualidad se considera como la citocina que regula el número y activación de macrófagos y granulocitos en condiciones inflamatorias. El GM-CSF es sintetizado por células estromales, fibroblastos, células endoteliales, macrófagos, linfocitos T y células NK, la mayoría de las veces su expresión se induce en respuesta a la liberación de citocinas inflamatorias. Aunque es producido localmente puede actuar de manera paracrina para mejorar la respuesta en contra de algún patógeno como reclutar neutrófilos, monocitos, macrófagos y linfocitos T. La acumulación de este factor induce el desarrollo de enfermedades inflamatorias así como enfermedades autoinmunes, enfermedad renal inflamatoria y desordenes pulmonares como asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (Shi, et al., 2006).

En la actualidad se puede generar casi cualquier tipo de CD *in vitro*, a partir de las citocinas GM-CSF y FLT3, junto con IL-4 y TNF α que contribuyen a su maduración y diferenciación. GM-CSF en particular ha sido usado ampliamente en la generación *in vitro* de CD derivadas de monocitos de sangre periférica y precursores hematopoyéticos de médula ósea (Inaba, et al., 1992 y Lutz, et al., 1999), lo cual sugiere que es importante para la diferenciación de las CD, sin embargo en experimentos *in vivo*, se ha observado que las CD de órganos linfoides se desarrollan normalmente en ausencia de esta citocina y de su receptor. Otros experimentos han demostrado que esta citocina es necesaria para el desarrollo de las CD migratorias de lamina propia CD103⁺ CD11b⁺ pero inhibe el desarrollo de CDp dependientes de STAT 5. GM-CSF es detectable en suero durante la inflamación, lo cual sugiere que esta citocina contribuye a la generación o reclutamiento de CD a partir de monocitos tanto *in vivo* como *in vitro* en condiciones de inflamación (Belz y Nutt, 2012; Merad y Manz, 2009).

Poco se conoce sobre las vías de señalización que se activan durante la diferenciación de las CD en presencia de GM-CSF, sin embargo se sabe que GM-CSF en la diferenciación de monocitos señala a través de la vía de las cinasas Janus/transductoras de la señal y activadoras de la transcripción (JAK/STAT), cuando se une a su receptor, GM-CSFR compuesto por dos cadenas α y β_c , activa a la JAK2 que fosforila a STAT5 induciendo su traslocación al núcleo y la formación de complejos GAS (del inglés secuencias- γ) que se unen a elementos de respuesta GAS regulando la transcripción de los genes *pim-1* y de la citocina inducible con dominios SH2 (CIS) (Lehtonen, et al., 2002). En la diferenciación de las CD se ha descrito que se forman complejos con las STAT1, STAT3, STAT5A, STAT5B y STAT6; de estas proteínas sólo se sabe que STAT3, STAT5A y STAT5B está involucrado en la generación de CD convencionales e inhiben, en el caso de STAT5A y STAT5B, la diferenciación de CD plasmacitoides (Belz y Nutt, 2012).

1.3 Interacción células dendríticas y linfocitos T

La existencia de distintos tipos de CD, así como sus particularidades funcionales está relacionada con diferentes respuestas inmunológicas que son desencadenadas por las CD. Las CD desempeñan

un papel crucial en el inicio de la respuesta inmune adaptativa. Esta respuesta depende de la comunicación que las CD tienen con otras células, en particular con los linfocitos T.

1.3.1 Procesamiento de antígenos

Antes que se realice la presentación de antígenos a linfocitos T, los patógenos o moléculas deben ser reconocidos por las CD mediante PRRs y posteriormente endocitados con ayuda de CD205 o receptores Fc γ Rs (CD32 y CD64). Estas moléculas o patógenos sufren diversos cambios dentro de las CD para poder ser reconocidos por los linfocitos T e iniciar una respuesta. Al conjunto de cambios se le conoce como el procesamiento de antígenos, el cual ocurre por dos vías: la vía exógena o endocítica y la vía endógena o citosólica. En la primera vía los antígenos se asocian a las moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHCII). Los antígenos exógenos son endocitados y dentro de los endosomas las proteasas se encargan de degradarlos, mientras tanto las cadenas α y β del MHCII son sintetizadas en el retículo endoplásmico donde se asocian a la cadena invariante (Ii) que permite el anclaje del antígeno. Ii es una proteína que impide la unión prematura de antígenos propios. El complejo MHCII/Ii se transporta a través del aparato de Golgi, cuyas vesículas liberan las moléculas MHCII a la membrana celular una vez que se han adherido al antígeno. La adhesión del antígeno se produce por la sección parcial de la cadena invariante dando como resultado un fragmento llamado CLIP (péptido de la cadena invariante asociado al MHCII). Así, las moléculas del MHCII junto con los antígenos exógenos son reconocidas por los linfocitos T CD4⁺ (Lipscomb y Masten, 2001).

Por otro lado en la vía citosólica los antígenos endógenos se asocian a las moléculas clase I del complejo principal de histocompatibilidad (MHCI) las cuales son reconocidas por linfocitos T CD8⁺. Los patógenos que son fagocitados o que están presentes en el citosol o proteínas de la misma célula son degradados por proteasomas, así los péptidos antigénicos entran al retículo endoplásmico a través de la proteína transportadora de antígenos (TAP). Dentro del retículo existen proteínas como la calnexina, calreticulina y la HSP gp96 que contribuyen a la unión de la cadena α con el péptido β -microglobulina para así formar el complejo MHCI, mientras que otra proteína llamada tapasina permite la unión del péptido a la molécula MHCI (Lipscomb y Masten, 2001).

Las CD al madurar disminuyen los niveles de los receptores que promueven la endocitosis e incrementan las moléculas de adhesión intercelular (CD54/ICAM-1, CD58/LFA-3), las moléculas clase II (MHCII) y las responsables de la coestimulación, lo cual hace posible la sinapsis inmunológica, que es la interacción de los complejos proteicos en la superficie celular de las CD con los complejos proteicos en linfocitos T para el reconocimiento del antígeno y activación de estas células, permitiendo así la diferenciación y proliferación de linfocitos T específicos para el antígeno que les fue presentado. La óptima activación de los linfocitos T se explica mediante el

modelo de las dos señales, aunque actualmente se propone la existencia de una tercera señal, proporcionada por las CD, que determina la diferenciación del tipo de células T CD4⁺ efectoras (por ejemplo diferenciación hacia una respuesta T_H1, T_H2). Esta tercer señal incluye a factores solubles o citocinas como IL-12 (promueve una respuesta T_H1) y quimiocinas como CCL2 (Fig 1). La primera señal es el reconocimiento del antígeno acoplado a moléculas del MHC por el TCR y representa el inicio de la respuesta, la segunda señal se conoce como coestimulación la cual es brindada por una familia de proteínas que se conoce como B7, su ausencia induce tolerancia o falta de respuesta en contra del antígeno (Zhu, et al., 2011). La coestimulación es un proceso que implica la modificación de la activación de células T mediante la unión de ciertos ligandos con sus receptores expresados en linfocitos T y es responsable de decidir la dirección y la magnitud de la respuesta inmune. Es de notar que la coestimulación es dependiente de las señales inducidas por el TCR y su unión con el MHC de células dendríticas u otra CPA y a su vez modula estas mismas señales. Las respuestas inducidas por estas proteínas pueden ser inhibitoras o estimuladoras dependiendo del tipo de proteínas que estén interactuando (Leitner, et al., 2010; Chen, 2004). Las respuestas o señales estimuladoras se definen como aquellas que desencadenan la activación de células T, producción de factores de crecimiento, sobrevivencia y proliferación, en tanto que las respuestas o señales inhibitoras atenúan las señales proporcionadas por la unión del MHC y TCR, y las estimuladoras dada por ciertas proteínas de la familia B7, disminuyendo así la activación celular, la producción de factores de crecimiento, el ciclo celular y algunas veces incrementando la muerte celular (Collins, et al., 2005).

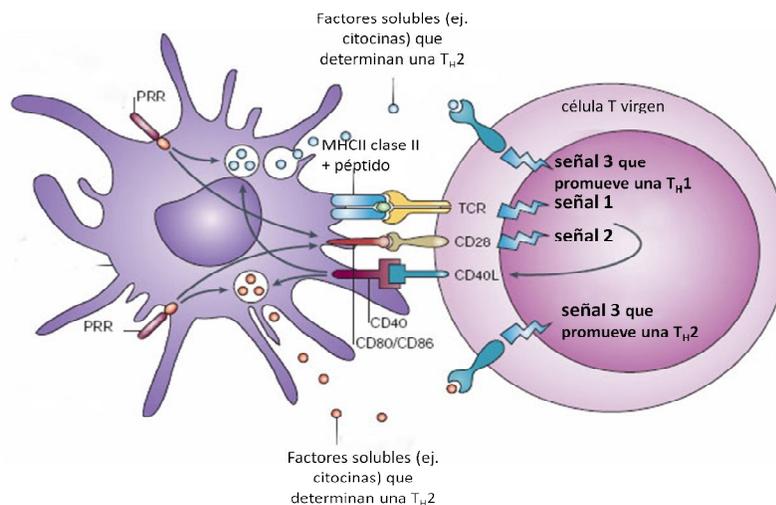


Figura 1. Señales proporcionadas por las CD para la estimulación y polarización de células T. La primera señal: interacción MHCII con el antígeno/TCR. La segunda, conocida como coestimulación, es la interacción CD86/CD80 con CD28/CTLA-4. La tercer señal permite la polarización hacia distintos tipos de células T CD4⁺ cooperadoras a través de citocinas como IL-12 y quimiocinas como CCL2. Modificado de Kapsenberg, 2003.

1.4 Moléculas coestimuladoras y coinhibidoras

La mayoría de las moléculas coestimuladoras y coinhibidoras, excepto CD40, pertenecen a la familia B7, la cual está formada por un conjunto de glucoproteínas transmembranales o unidas al glicosilfosfatidilinositol (GPI), un lípido de membrana. Estas proteínas poseen dominios extracelulares IgV e IgC, parecidos a los dominios variables y constantes de las inmunoglobulinas. La conforman siete miembros: B7.1 (CD80), B7.2 (CD86), ICOS-L (B7-H2), B7-H1 (PD-L1 o CD274), B7-DC (PD-L2 o CD273), B7-H3 y B7-H4. Sus correspondientes receptores se encuentran en linfocitos T y algunos de ellos también se expresan en linfocitos B. Han sido caracterizados en humano, ratón y también algunos miembros se encuentran en aves, peces (Collins, et al., 2005). Sólo nos enfocaremos en las funciones de las proteínas CD80, CD86, CD273 y CD274 (Fig 2).

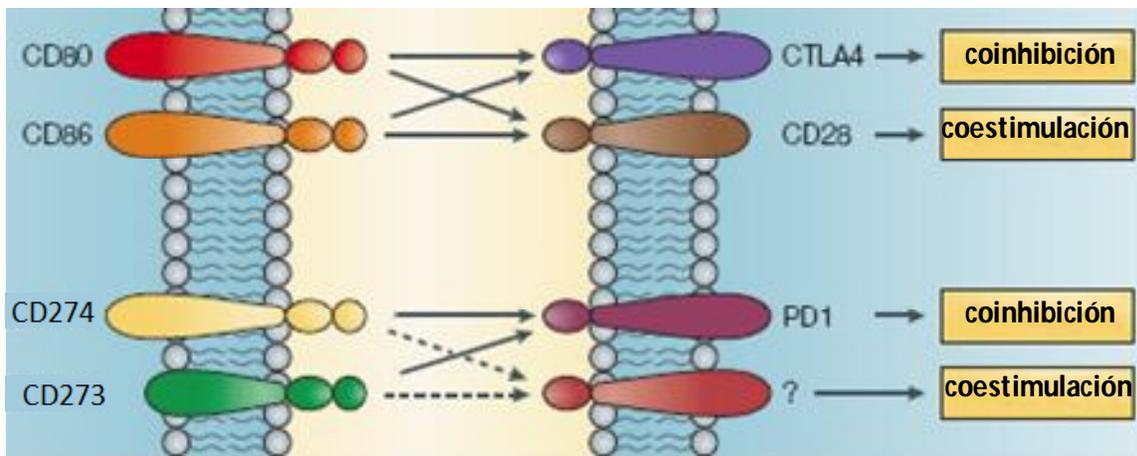


Figura 2. Miembros de la familia B7 que interactúan con sus receptores en linfocitos T. Dependiendo del tipo de molécula con la que se una promoverá distintas respuestas en linfocitos T. Las flechas entrecortadas señalan otro posible receptor de CD273 y CD274 que no se conoce y que tiene funciones de estimulación en linfocitos T. Modificado de Chen, 2004.

1.4.1 CD80/CD86

Los genes de CD80 y CD86 se encuentran en el mismo cromosoma, 3q21 y 16, en humanos y ratones respectivamente. Ambas proteínas se expresan en CPA, así como en linfocitos T. Las dos proteínas pueden unirse indistintamente a sus ligandos CD28 y CTLA-4, sin embargo se ha encontrado que B7.1 o CD80 se une con mayor afinidad a CTLA-4, en tanto que B7.2 o CD86 a CD28 (Collins, et al., 2005). Por otro lado, la expresión de estas dos proteínas es diferencial ya que CD86 es expresada constitutivamente en CD y aumenta su máxima cantidad a las 48 horas, en tanto que la expresión de CD80 es inducida lentamente y es estable por un periodo largo (4-5 días)

(Bathia, S. et. al., 2006). Estos dos aspectos sugieren que sus funciones no son homólogas. En las CD su expresión se incrementa ante bacterias, patógenos, condiciones de inflamación, así como cuando CD40 se une a su ligando CD40L durante la presentación del antígeno.

La unión de CD80 y CD86 con sus distintos ligandos tienen una función dual. La unión de CD80 o CD86 con su receptor CD28 (expresado constitutivamente en linfocitos T) da lugar a señales estimuladoras, sin embargo la unión con CTLA-4 induce señales inhibitoras, estas señales se producen siempre en presencia de la interacción MHC/TCR. En el primer caso la unión de CD80/CD86 con CD28 desencadena vías de señalización en linfocitos T que están relacionadas con la liberación de Ca^{2+} y la activación de factores de transcripción como factor nuclear de células T (NFAT), proteína activadora tipo 1 (AP-1) y factor nuclear κ B (NF κ B) que finalmente inducen la producción de IL-2 y CD25 (cadena α del receptor de IL-2), esta interleucina promueve señales de activación, diferenciación, proliferación y supervivencia de los linfocitos T vírgenes, además el incremento en la expresión de Bcl- χ_L , la cual mantiene la supervivencia y el progreso del ciclo celular de linfocitos T. Se tiene documentado que lo que mantiene la estimulación de células T es la activación del metabolismo de la glucosa, mediado por la cinasa AKT, que es activada por CD28 mediante el reclutamiento de la cinasa de fosfatidil inositol 3 (PI3K) que fosforila a lípidos y éstos activan a la AKT, dicha cinasa está implicada en la síntesis de citocinas y la supervivencia (Leitner, et al., 2010; Crawford y Wherry, 2009). Por otro lado, cuando se une CD80 o CD86 a CTLA-4 en linfocitos T (CTLA-4 a diferencia de CD28, se expresa en bajos niveles, pero se incrementa después de su activación) induce señales inhibitoras para la activación de linfocitos T. Lo anterior es ocasionado mediante varios mecanismos: 1) por competencia de unión con CD28 ya que comparten los mismos ligandos, 2) bloqueando las señales inducidas por CD28, 3) interactuando directamente con el complejo TCR o con las proteínas involucradas en la señalización, 4) la inactivación de la cinasa AKT por reclutamiento de fosfatasa (SHP-1, SHP-2 y PPA2) lo que provoca disminución de IL-2, restringiendo el ciclo celular y por tanto la proliferación de linfocitos T, aumento en la producción de TGF β y la disminución del metabolismo de la glucosa en una vía dependiente de ácido ocaico (Parry, et al., 2005). La adición de anticuerpo contra CTLA-4 bloquea la unión con CD80/CD86 resultando en la estimulación de linfocitos T, mejorando la respuesta humoral y celular. La interacción CD80/CD86 con CTLA-4 es importante para promover la tolerancia a los autoantígenos y evitar la autoinmunidad mediante la expansión de células Treg (Chen, 2004).

1.4.2 CD273 y CD274

Al igual que CD80 y CD86, los genes de las proteínas CD274 (B7-H1, PD-L1) y CD273 (B7-DC, PD-L2), en humano se localizan en el mismo cromosoma 9p24 y 9p24.2, respectivamente, y en el cromosoma 19 en ratón (Collins, et al., 2005). La expresión de las dos moléculas difiere, ya que la expresión de PD-L2 es más restringida que la de PD-L1. La expresión de PD-L2 se restringe a CD,

macrófagos, mastocitos de médula ósea y células B1 del peritoneo, mientras que PD-L1 se expresa constitutivamente en células T, B, CD, macrófagos, células madre mesenquimales y mastocitos obtenidos *in vitro* a partir de médula ósea de ratón. Se ha encontrado ARNm perteneciente a CD274 y CD273 en diversos tejidos de órganos y células que no pertenecen al sistema inmune como placenta, corazón, páncreas, pulmón, hígado, riñón, células músculo esquelético, células de cáncer de mama, sin embargo su expresión en superficie celular no es detectable normalmente (Sharpe, et al., 2007 y Latchman, et al., 2001). La expresión de CD274 y CD273 en tejido linfóide y no linfóide sugiere que podrían mantener la tolerancia en células B y T autoreactivas, así como protección de tejidos durante respuestas inflamatorias agudas. Los ratones deficientes de *Pd1* y PD-L1 son susceptibles a enfermedades autoinmunes. El aumento en la expresión de CD274 y CD273 es inducida por varias citocinas, en particular CD274 se incrementa en presencia de IFN γ en monocitos, CD y queratinocitos, así también IFN α e IFN β ; IL-10 puede inducir su expresión en monocitos. IL-4, GM-CSF, IL-13 e IFN γ inducen un aumento en la expresión de CD273 en CD *in vitro* (Sharpe, et al., 2007; Tseng, et al., 2001; Latchman, et al., 2001).

Durante la sinapsis inmunológica, los ligandos PD-L1 y PD-L2, presentes en CD, se unen al receptor PD-1 en linfocitos T. La unión (en presencia de MHC más el /TCR), desencadena una señal inhibidora por medio de PD-1 (CD279) en los linfocitos T, que posteriormente da lugar a la tolerancia inmunológica. El bloqueo de CD274 y CD273 con anticuerpos en CD derivadas de monocitos induce que linfocitos T proliferen y produzcan citocinas inflamatorias por lo que se les atribuyó funciones inhibidoras, sin embargo algunos experimentos han sugerido un papel estimulador. Otro efecto que se ha descrito de PD-L1 es que su expresión en células tumorales causa apoptosis de células T CD4⁺ y CD8⁺ (Sharpe, et al. 2007; Chen, 2004).

El mecanismo de acción descrito incluye la unión de PD-L1 y PD-L2 a PD-1, que al poseer motivos ITIM e ITSM (motivos de cambio basados en tirosina), permite el reclutamiento de fosfatasa (SHP-2 y SHP-1), que inactivan las proteínas estimuladas por el TCR (ZAP70, PKC θ , CD3 ξ). PD-1 también puede bloquear las señales proporcionadas por CD28 suprimiendo la fosforilación de la cinasa AKT e inactivando a PI3K, el metabolismo de la glucosa se detiene y también la expresión del gen que codifica para Bcl_{xL} afectando su sobrevivencia (Sharpe, et al., 2007; Chen, 2004; Crawford y Wherry, 2009). Las consecuencias funcionales son la disminución de la proliferación de linfocitos T (mayor en células transfectadas con PD-L2) a concentraciones bajas del antígeno, así como la producción de citocinas (IL-2, IL-4, IL-10 e IFN γ) a concentraciones bajas y altas de antígeno. Los mecanismos por los cuales causan inhibición es la retroalimentación positiva de la expresión de PD-1, el arresto del ciclo celular en G₀/G₂ de los linfocitos, así como la fosforilación de SHP-2 que como se mencionó inhibe las señales inducidas por el TCR. Estas respuestas son dependientes de la presencia de TCR que interactúa con el MHC. La coestimulación negativa producida por la unión de PD-L1 o PD-L2 con PD-1 puede ocurrir en presencia de señales estimuladoras: moléculas coestimuladoras expresadas en CD cuando se unen a CD28 (Latchman, et al. 2001; Zhu, et al., 2011). La interacción de estos ligandos no es exclusiva de un receptor, pues se sabe que también

CD274 puede unirse a CD80 en linfocitos T, esta unión induce una respuesta inhibitoria en linfocitos T (Chen, 2004).

Las señales producidas por la interacción CD273/CD274 con PD-1 permiten un balance entre las señales coestimuladoras o inhibitorias permitiendo el desarrollo efectivo de la respuesta inmune, entonces estas proteínas están involucradas en la inducción y mantenimiento de la tolerancia periférica y central previniendo la autoinmunidad y permitiendo la maduración de los timocitos, respectivamente, así también evitan una respuesta exhaustiva durante infecciones, sin embargo en el inicio de las infecciones o en tumores, la expresión de estas moléculas contribuye a favorecer el desarrollo de estos padecimientos (Sharpe, et al., 2007). La expresión de CD273 y CD274 en CD cobra relevancia en la inducción de tolerancia y contribuye a evitar enfermedades autoinmunes. De esta manera, las CD han sido manipuladas experimentalmente para inducir tolerancia y se han usado en el tratamiento de estas enfermedades, tal como se verá más adelante.

1.4.3 CD40

A diferencia de las proteínas coestimuladoras mencionadas, la proteína CD40 pertenece a la superfamilia de receptores TNF. Se expresa en CD, monocitos, linfocitos B, células endoteliales, epiteliales, fibroblastos. Su ligando se expresa mayormente en linfocitos T CD4⁺ (Leitner, et al., 2010).

CD40 tiene múltiples funciones en las CD durante su diferenciación y en etapas tardías. Promueve la proliferación de los precursores hematopoyéticos que aún son CD34⁺, así como la diferenciación de sus precursores más inmediatos; en etapas tardías la señalización inducida por CD40 produce un incremento en su sobrevivencia, la secreción de citocinas como IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF α , MIP-1 α y enzimas como metaloproteinasas de matriz extracelular (MMP). Durante la sinapsis inmunológica o presentación antigénica, CD40 contribuye al proceso de coestimulación. La interacción en CD de CD40 con su ligando CD40L (CD154), expresado en linfocitos T, induce un fenotipo maduro en las CD pues induce el incremento en la expresión de moléculas de maduración (MHCII), coestimuladoras (CD80, CD86), moléculas de adhesión (CD54/ICAM-1, CD58/LFA-3), IL-12, quimiocinas como IL-8, MIP-1 α y β el aumento en estas proteínas induce la maduración 'total' de las CD favoreciendo su capacidad de hacer proliferar linfocitos T. Se ha visto que el bloqueo *in vitro* de CD40/CD40L reduce la proliferación de linfocitos T. La liberación de IL-12, activa a las CDs y permite polarizar la respuesta hacia linfocitos T_H1 (Cella, 1996; Kooten y Banchereau, 2000).

En resumen estas proteínas tienen un papel importante en la regulación de la respuesta inmune, por lo cual han sido aprovechadas en la inmunoterapia induciendo su expresión mediante citocinas, anticuerpos que mimetizan la unión con su receptor o ligando (dependiendo de la célula que se estudie) o ingeniería genética, así, por ejemplo en protocolos donde se utilizan CD para combatir cáncer, al cultivarlas en un ambiente proinflamatorio como citocinas o antígenos que

inducen su maduración, éstas aumentan la expresión de moléculas coestimuladoras en su superficie, producen IL-12 y son capaces de inducir proliferación de linfocitos T específicos para ovalbúmina (OVA) (Rivas y García, 2009).

1.5 Células dendríticas tolerogénicas

Las CD pueden causar tolerancia inmunológica central y periférica, este tipo de CD son llamadas CD tolerogénicas (CDtol) y se pueden definir como CD inmaduras o resistentes a madurar y que pueden presentar antígenos a linfocitos T pero son incapaces de estimularlos. Poseen las siguientes características: niveles bajos de moléculas clase II del MHC y moléculas coestimuladoras (CD80 y CD86) mientras que poseen niveles mayores de moléculas coinhibidoras (CD273 y CD274); incapacidad de sintetizar citocinas que polarizan la respuesta de células T hacia T_H1 como IL12p70; incremento en la producción de IL-10 (citocina antiinflamatoria) e indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO); son resistentes al proceso de maduración ante la unión de distintas señales como CD40L, ligandos de TLRs; también poseen habilidad de generar y hacer proliferar células Treg y responder a estas células mediante el incremento de IL-10 o IDO; pueden promover apoptosis en células T efectoras y la habilidad de migrar a las zonas T de tejido de órganos linfoides secundarios para generar tolerancia a través del incremento en la expresión de receptores de quimiocinas (CCR7) y responder ante sus ligandos (CCL19/21) (Morelli y Thompson, 2007). A pesar de que el incremento de CCR7 es importante para la generación de tolerancia, no es un efecto exclusivo de este proceso, ya que también su incremento es importante durante la maduración de las CD para que puedan migrar a ganglios linfáticos y presentar antígenos a linfocitos T y estimularlos, por lo que CCR7 contribuye tanto a la tolerancia como a la activación de la respuesta inmune (Rivas y García, 2009; Morelli y Thomson, 2007).

La tolerancia central y periférica que las CDtol generan, se manifiesta de tres formas: anergia de linfocitos T, apoptosis de células T reactivas al antígeno, activación de Treg existentes o diferenciación y expansión *de novo* de Treg. La inducción de tolerancia por parte de las CD depende de factores ambientales y estado de las células (ej. fenotipo que presentan, producción de citocinas pro o anti-inflamatorias). Los mecanismos por los cuales las CD inducen los efectos mencionados en las células T han sido objeto de estudio. Las CD que expresan IDO son importantes en el mantenimiento de la tolerancia periférica. IDO es una enzima que degrada el aminoácido esencial triptófano a través de la vía de la quinurenina y como resultado inhibe la proliferación de linfocitos T y promueve su apoptosis. La producción de IDO se incrementa cuando interactúan las moléculas coestimuladoras CD80/CD86 con CTLA-4 (presente en linfocitos Treg constitutivamente y en linfocitos T efectoras pero su expresión es regulada) o mediante la unión de TLR9 con su ligando, en CD plasmacitoides y CD que son $CD11c^+$ $CD19^+$ y $CD103^+$. El incremento de IDO estos dos últimos grupos de CD, es dependiente de la estimulación autócrina de $IFN\alpha$ para la activación de STAT 1 (Morelli y Thompson, 2007). También se sabe que las CD inmaduras

inducen tolerancia por la falta de señales coestimuladoras o de liberación de citocinas, lo cual induce anergia de las células T, la anergia se puede definir como un estado en el que linfocitos T tienen poca capacidad proliferativa y producción de citocinas ante la presencia de un antígeno. Uno de los mecanismos usados por las CDtol para inducir tolerancia es a través de la unión de los ligandos de muerte programada (PDL-1 y PDL-2) con PD-1, su receptor en linfocitos T, lo cual induce apoptosis y anergia manteniendo la tolerancia periférica y central (Maldonado y Andrian, 2010). Otros factores que inducen tolerancia periférica son la enzima hemo-oxigenasa-1 (HO-1), expresada en CD humanas, induce la secreción de citocinas antiinflamatorias e inhibe la proliferación de linfocitos T; así también la interacción de HLA-G (molécula no clásica del MHC I) con su receptor inhibitor ILT4 en CD, de manera *in vitro*, promueve el desarrollo de CDtol en humano ya que interfiere con la señalización del factor de transcripción nuclear κ B (NF κ B) el cual induce la expresión de citocinas proinflamatorias que promueven la maduración de las CD (Ezzelarab y Thomson, 2011).

Por otro lado, la inducción y mantenimiento de tolerancia depende de la interacción de las CDtol con las Treg. Las Treg son un subtipo de linfocitos CD4⁺ que coexpresan CD25⁺ y ante ciertos estímulos pueden expresar Foxp3⁺, se encargan de mantener la tolerancia inmunológica. Se distinguen dos tipos de Treg, las llamadas naturales que derivan del timo y bloquean el inicio de respuestas inmunogénicas a través del contacto celular, en tanto que las Treg tipo 1 o adaptativas, son CD25⁺ y Foxp3⁺, existiendo también las CD8⁺, inducen inactivación de las T_H1 o T_H2 mediante mecanismos independientes del contacto celular, lo realizan mediante la liberación de citocinas como IL-10, IL-35 y TGF β . Las CDtol pueden regular la diferenciación, expansión o habilidad supresora de las Treg *in vitro* o *in vivo*, a su vez las Treg promueven la actividad de las CDtol por retroalimentación positiva (Maldonado y Andrian, 2010). La liberación de citocinas por parte de las CDtol inducen los efectos en las Treg. IL-10 contribuye a la diferenciación y proliferación de Treg, interfiriendo primero en las CD pues reduce la presentación de antígenos y proliferación de linfocitos T, disminuye la expresión de moléculas coestimuladoras y desestabiliza los ARNm de citocinas, mientras que en las células T inhibe coestimulación defosforilando CD28. Además, induce activación de proteínas que inhiben señalización de citocinas como SOCS 1 y 3, así como la activación de la vía de señalización Notch, lo cual contribuye a la generación de Treg 1 o anergia en las T efectoras. TGF β induce la expansión de Treg induciendo la expresión de CD25⁺, CTLA-4 y Foxp3⁺. La unión de CTLA-4 con CD80/CD86 permite que TGF β induzca la expresión de Foxp3⁺ y a su vez Foxp3⁺ induce la expresión de CTLA-4, así también CTLA-4 al unirse a CD80/CD86 induce producción deIDO. Respecto a IL-35 es una citocina específica de Treg de reciente descubrimiento, se ha observado que es importante para mantener la actividad de estas células en ratones *in vitro* e *in vivo*, los mecanismos bajo los cuales influye en su actividad se desconoce, sólo se han visto sus efectos terapéuticos como la supresión de enfermedades autoinmunes (Adalid, et al., 2011).

1.5.1 Manipulación de las CDtol y aplicación en la inmunoterapia

Debido a que las CD son capaces de modular distintas respuestas, como la inducción y mantenimiento de la tolerancia, además de su presencia en muchas patologías, como enfermedades causadas por diversos patógenos, enfermedades autoinmunes, cáncer, etc., por consiguiente han sido usadas en la clínica (Ueno, et al., 2007). Mediante el desarrollo de protocolos en donde se pueden generar numerosas CD, se han estudiado los mecanismos por los cuales distintos tipos de CD generan tolerancia, de esta forma actualmente se generan *in vitro* CD tolerogénicas mediante, 1) el uso de fármacos con propiedades antiinflamatorias e inmunosupresivas, 2) factores solubles biológicos (citocinas, factores de crecimiento) y 3) la modificación genética de las CD. Las CDtol generadas son utilizadas con propósitos terapéuticos para evitar el rechazo de un injerto u órgano o bien para combatir la enfermedad asociada a injertos (GVHD), así como para combatir enfermedades autoinmunes como esclerosis múltiple. Experimentalmente, estas células se han probado en injertos de corazón, pulmón, hígado y riñón (Ezzelarab y Thomson, 2011) (Fig 3). Entre los agentes biológicos usados están IL-10, TGF β , VEGF,IDO. Respecto a los agentes farmacológicos algunos ejemplos son rapamicina, ciclosporina, mofetil micofenolato (MMF), aspirina, corticoesteroides, vitamina D, inductores de AMP cíclico (AMPc) como prostaglandina E₂ (PGE₂), neuropéptidos, histamina, glucosamina, protoporfirina de cobalto, ligandos de los receptores de ILT. Estos agentes farmacológicos inducen disminución en la proliferación de CD, impiden su maduración, inhiben la expresión de moléculas coestimuladoras y la producción de 1L-12p70, además de interferir con la traslocación del factor de transcripción NF κ B al núcleo, lo cual es importante para la diferenciación y maduración de las CD (Morelli y Thomson, 2007; Masanori y Thomson, 2003).

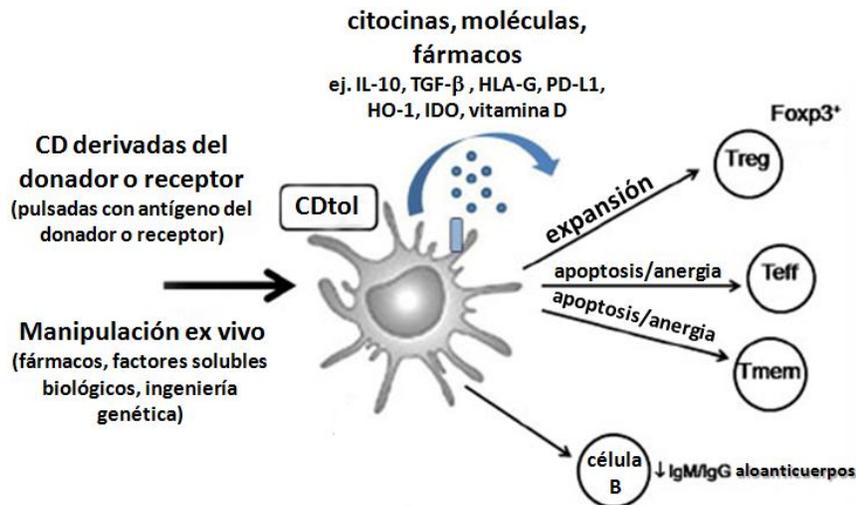


Figura 3. CD tolerogénicas usadas en el trasplante de órganos. Las CD tol que se usan para evitar el rechazo de órganos y con ello su preservación, pueden ser extraídas del mismo receptor o del donador. Las CD extraídas pueden ser pulsadas o no con antígenos del donador, posteriormente son tratadas para inducir CDtol con fármacos, factores de crecimiento (ej. dexametasona, vitamina D3/IL-10, hemoxigenasa-1 (HO-1), o mediante ingeniería genética estimular o inhibir la expresión de moléculas como (PD-L1, NFκB, IL-10). Las CDtol generadas inducirán tolerancia al antígeno del donador estimulando a Treg, mediante la inducción de anergia o apoptosis de células T de memoria (Tmem) o efectoras (Teff). Las CDtol disminuyen las respuestas de células B disminuyendo los anticuerpos generados en contra del receptor, también las CDtol. Modificado de Ezzelarab y Thomson, 2011.

1.6 17β-estradiol

1.6.1 Biosíntesis del estradiol

El 17β-estradiol es una hormona esteroidea, que pertenece al grupo de los estrógenos. Los estrógenos biosintetizados son tres: estradiol (E₂), estrona (E₁) y estriol (E₃), de los cuales el más potente es el E₂. El estriol es sintetizado durante el embarazo como producto de la hidroxilación del 17β-estradiol en el hígado materno y fetal, y la placenta, mientras que la estrona puede ser producida por la aromatización de androstenediona en tejidos no reproductivos, sobre todo hígado, o bien partir de la oxidación del estradiol. La estrona es muy abundante en la postmenopausia y actúa como reservorio del estradiol. Los estrógenos poseen 18 átomos de carbono y comparten una estructura química llamada ciclopentanoperhidrofenantreno formada por tres anillos ciclohexanos (A, B, C) y un anillo de ciclo pentano (D) (Fig 4). El anillo fenólico A es el lugar de fijación específica y de alta afinidad por los receptores estrogénicos (Malgor y Valsecia, 2000a).

La biosíntesis del E₂ durante la etapa reproductiva se lleva a cabo principalmente en ovarios, testículos y en la corteza de las glándulas suprarrenales (Guyton, 2001), pero durante la

postmenopausia se ha documentado que también en el tejido mamario, en las células musculares lisas de la aorta, células del endotelio vascular, células mesenquimales de tejido adiposo, osteoblastos y condrocitos, y en el sistema nervioso por los astrocitos, células gliales, piramidales y granulares del hipocampo. En la etapa gestacional la placenta contribuye también a su síntesis (Simpson, 2003; Arellano y Silva, 2006). Durante los años reproductivos de la mujer, la mayoría del estradiol es producido por la colaboración de las células de la teca y las de la granulosa de los folículos ováricos. La biosíntesis del E₂ comienza a partir del colesterol proveniente de las lipoproteínas de la circulación; el citocromo P450 rompe la cadena lateral del colesterol convirtiéndolo en pregnenolona (precursor de varias hormonas esteroideas); después de varias reacciones se sintetizan dos precursores directos del estradiol: testosterona y androstenediona, a través de la enzima aromatasa ocurre la aromatización de la androstenediona (producida en las células foliculares tecales) a estrona, seguido de la conversión de estrona a estradiol por la enzima 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa, reacción que ocurre en las células de la teca. También el E₂ se puede sintetizar en las células de la teca a partir de la aromatización de la testosterona proveniente de la androstenediona o androstenediol (Malgor y Valsecia, 2000a).

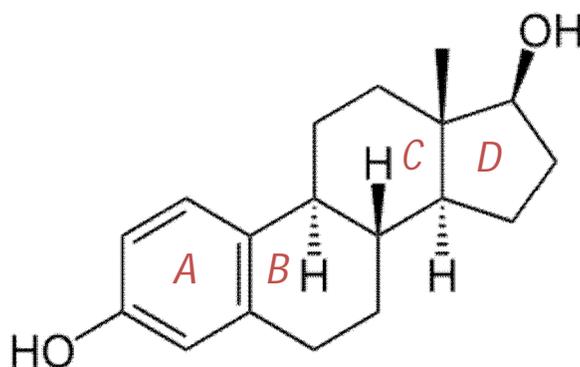


Figura 4. Estructura química del 17β-estradiol. Constituido por 4 anillos, el anillo A tiene tres dobles ligaduras, además la estructura química del E₂ posee dos grupos OH en el carbono 3 y 17. Se denomina 17β debido a que el grupo químico OH se encuentra en el carbono 17 en posición beta (viendo hacia arriba).

1.6.2 Funciones biológicas

El E₂ tiene distintas funciones biológicas en los distintos sistemas de los organismos. Las funciones más conocidas son las que tienen lugar en el sistema reproductor. Causa la proliferación celular y crecimiento de los tejidos de los órganos sexuales femeninos y masculinos, y en el caso de las mujeres, de los ovarios, las trompas de Falopio, el útero, la vagina, las glándulas mamarias. La proliferación es importante para mantener el desarrollo y función que desempeñan estos órganos. Durante el ciclo menstrual en humanos o estral en roedores, el estradiol producido por el folículo

en crecimiento promueve la ovulación por medio de retroalimentación positiva en la producción de estradiol, que se logra a través del incremento en los niveles de la hormona luteinizante. También regula la función de otros sistemas, sólo se mencionaran el efecto de esta hormona en algunos sistemas. En el metabolismo induce el aumento de la lipogénesis en el tejido adiposo. En el sistema óseo promueve un aumento en la actividad osteoblástica en los huesos durante la pubertad en ambos sexos y dan lugar a la fusión temprana de las epifisis con las diáfisis de los huesos largos. Se le ha atribuido un papel cardioprotector, ya que induce vasodilatación rápida, disminuyendo el desarrollo de aterosclerosis (Guyton, 2001; Simoncini y Genazzani, 2003). En el sistema nervioso se ha descrito que los esteroides ováricos tienen importantes efectos sobre la función cerebral incluyendo la regulación neuroendocrina de la reproducción, el humor y la cognición, así como un efecto neuroprotector contra de estímulos tóxicos, la isquemia y en enfermedades como esclerosis múltiple en modelos animales. Además, el E₂ tiene efectos excitatorios y moduladores a través del sistema de glutamato, incrementa la excitabilidad cerebral y la densidad de uniones sinápticas en el hipocampo (Arellano y Silva, 2006).

1.7 Receptores de estrógenos

Los efectos del E₂ se deben a la interacción con sus receptores ubicados en las células blanco. Se han descrito dos receptores para estrógenos. Los primeros son conocidos como receptores clásicos (las isoformas RE α y RE β) y un nuevo receptor llamado receptor 30 acoplado a proteína G (GPR30) o bien receptor de estrógenos 1 acoplado a proteína G (GPER1) (Prossnitz, et al., 2007; Dahlman, et al., 2006; Togno y Montor, 2009). El efecto de los receptores clásicos es a nivel genómico pero también cumplen con funciones extranucleares, no transcripcionales o no genómicas, pues participan en vías de señalización mediante su asociación a membranas o con otras proteínas como las proteínas G o cinasas. La diferencia entre los receptores que actúan a nivel transcripcional o bien en vías de señalización radica en el mecanismo de acción, consecuencias funcionales y tiempo de respuesta. Los primeros actúan en horas a días, mientras que los que participan en cascadas de señalización actúan en minutos o segundos (Fu y Simoncini, 2008; Simoncini y Genazzani, 2003).

1.7.1 Estructura

Los receptores nucleares son conocidos como factores activadores de la transcripción dependientes de un ligando y pertenecen a la familia de receptores nucleares hormonales. Los receptores RE α y RE β , son codificados por diferentes genes, ESR1 y ESR2 respectivamente, se localizan en distintos cromosomas, en humanos ESR1 en el 6 (6q25.1) y ESR2 en el 14 (14q); en ratones en el 10 y 12 respectivamente (PubMed). Los dos receptores presentan tres principales dominios (Fig 5): 1) dominio N terminal (NTD, por sus siglas en inglés) en el cual se localiza un

dominio de transactivación funcional, AF-1 que se encarga de la activación de la transcripción permitiendo la interacción de proteínas correguladoras, 2) el dominio de unión al ADN (DBD, por sus siglas en inglés) que se une a una secuencia palindrómica (5-GGTCAnnnTGACC-3) localizada en el promotor de los genes transcritos llamada elementos de respuesta a estrógenos (ERE) y 3) dominio de unión al ligando (LBD, por sus siglas en inglés). Este último dominio, además de ser el sitio de unión al estradiol, contiene una secuencia que permite su translocación al núcleo, así como otro dominio de transactivación funcional (AF-2) que dicha región además de promover la transcripción, promueve la unión del ligando y la dimerización de los receptores que permite la unión a los ERE (Thornton, 2002). El dominio LBD forma un surco, en donde se une el estradiol o sus agonistas, tras lo cual la región transactivadora, AF-2, es expuesta permitiendo la interacción de otras proteínas coactivadoras o correpressoras de la transcripción o bien factores de transcripción, esto sugiere que los receptores también pueden actuar indirectamente en la transcripción (Dahlman, et al., 2006).

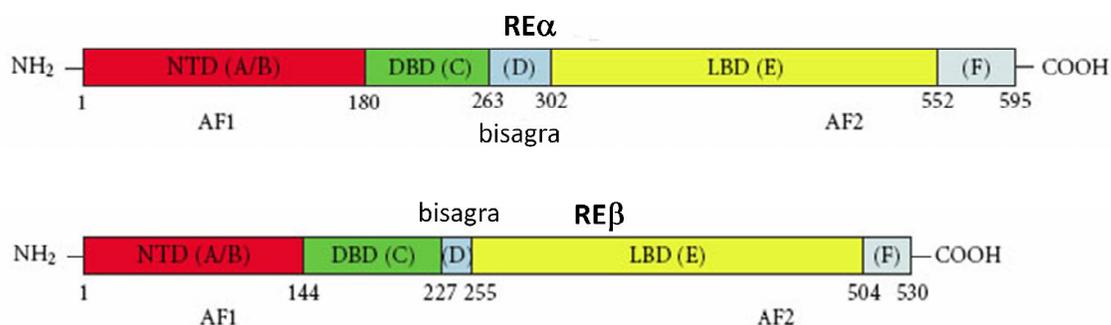


Figura 5. Organización de la secuencia de las dos isoformas de receptores de estradiol (RE α y RE β) con todos sus cinco dominios. El dominio A/B es el denominado dominio N terminal, el cual contiene la región AF1; el dominio C (DBD) permite la unión a ADN; el dominio D o región de bisagra que contiene la secuencia de localización nuclear que cuando se une el E₂ se desenmascara y permite su translocación al núcleo, además es una región flexible que permite la unión del dominio DBD y LBD; dominio E que contiene la secuencia que permite la unión con el ligando, además otra región AF-2 y el dominio F, también llamado dominio C terminal, modula la transcripción de genes específica de un ligando y contribuye a la dimerización del receptor. Los números indican la posición de los dominios en la secuencia de aminoácidos. Modificado de Kumar, et al., 2011.

Ambos receptores tienen una alta similitud al comparar las secuencias de aminoácidos. Comparten un 97% de similitud en la secuencia de aminoácidos correspondiente al dominio de unión al ADN y aproximadamente un 56% en el dominio de unión al ligando, sin embargo el dominio N terminal posee muy poca similitud, 24%, lo cual sugiere diferencias en la forma de activación de la transcripción entre las dos isoformas. Los RE α y β difieren también en los tejidos en los que se expresan, sin embargo algunas veces su expresión coincide en el mismo tejido, pero no en el tipo celular, estos dos aspectos sugieren diferencias funcionales. RE α se expresa

mayormente en útero, células estromales de la prostata, células de la teca del folículo, en células de Leydig, epidídimo, hueso, células mamarias, hígado y ciertas áreas cerebrales; en tanto que el RE β se expresa también en células epiteliales de prostata, colon, testículos, en las células de la granulosa del ovario, endotelio vascular, médula ósea, algunas áreas del cerebro y glándulas salivales (Dahlman, et al., 2006). Se ha descrito también su expresión en células del sistema inmune como linfocitos B y T, células NK, macrófagos, monocitos, neutrófilos, mastocitos, células dendríticas, así como en progenitores hematopoyéticos de médula ósea (Kovats y Carreras, 2008; Bouman, et al., 2005).

Los estudios realizados que han tratado de caracterizar a los receptores membranales mencionan que son parecidos a los RE clásicos α y β , así, se han identificado en las membranas de distintos tipos celulares, como células endoteliales (EC), células de cáncer de mama y cardiomiocitos (Levin, 2005; Hammes y Levin, 2007).

El receptor GPR30 fue descrito en células de cáncer de mama MCF-7 y pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G que atraviesan la membrana 7 veces, conocidos como 7TM-GPCR. Se expresa en distintos tejidos como prostata, hígado, placenta, ovario (Prossnitz, et al., 2007); también se ha descrito su expresión en CD derivadas de monocitos de humano (Uemura, et al., 2008), en linfocitos T CD4⁺, y timo (Wang, et al., 2009). Debido a que no se le conocía un ligando específico era llamado receptor huérfano acoplado a proteína G (GPCR). Este receptor desempeña un papel en la proliferación celular y apoptosis. Estudios realizados en distintos tipos celulares demuestran que la unión GPR30-estradiol induce la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 y proteínas del ciclo celular como la ciclina D (Prossnitz, et al., 2007).

1.7.2 Mecanismo de acción

El mecanismo de acción de los receptores depende del tipo de receptor del que se hable. En el caso de los receptores nucleares se ha documentado que la región AF-1 puede ser activada en ausencia del ligando, en este sentido se hipotetiza un mecanismo independiente de la unión del estradiol y dependiente de éste. En el segundo caso cuando no está el ligando, los RE α o β , se encuentran unidos a una proteína de choque térmico (HSP), al unirse el ligando se separa la HSP y se forman dímeros ($\alpha\alpha$ o $\beta\beta$) o heterodímeros $\alpha\beta$ que se translocan al núcleo mediante una secuencia de señalización nuclear, la dimerización permite su estabilidad y promueve su unión a los ERE de los genes, seguido del reclutamiento de complejos coreguladores de la transcripción mediante las regiones AF-1 y AF-2 de los RE. Los complejos coreguladores incluyen proteínas coactivadoras o coinhibidoras, que permiten cambios en la cromatina, promoviendo o inhibiendo la expresión de genes (ejemplos: coactivador 1 receptor esteroide (CREB), activador-proliferador-peroxisoma r-coactivador 1 α (PGC-1 α) y el PGC1- α coactivador relacionado a estrógenos (PERC)) (Thornton, 2002). El patrón de expresión en los tipos celulares depende del tipo de ligando y su

concentración, de la expresión de las dos isoformas ($RE\alpha$ y $RE\beta$) y de la cantidad y disponibilidad de coreguladores. La expresión de genes por los RE unidos a su ligando están relacionados con la diferenciación celular, crecimiento y supervivencia de las células (Kovats y Carreras, 2008). Respecto al primer mecanismo, los RE pueden activarse indirectamente por moléculas no estrogénicas, como distintos factores de crecimiento: factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), proteínas del ciclo celular, cinasas. Se ha documentado que EGF e IGF-1 pueden unirse a AF-1 más no a AF-2, sin embargo se hipotetiza que la unión de alguno de los dos factores a su receptor desencadena la fosforilación de los RE mediada por la vía de las MAP cinasas. Los RE también pueden regular la expresión de genes que no tienen ERE, mediante su unión a complejos reguladores de la transcripción como AP-1 (Heldring, et al., 2007).

Los receptores que tienen funciones no transcripcionales (RE membranales y GPR30), llamados así porque no tienen contacto directo en la transcripción de genes, sin embargo pueden desencadenar de manera indirecta una acción genómica a través de las proteínas que se activan como consecuencia de las cascadas de señalización. Los RE membranales se localizan en balsas lipídicas (dominios moleculares situados en la membrana plasmática que consisten en asociaciones estables entre los esfingolípidos y el colesterol) en donde se congregan proteínas para una rápida señalización. Entre las proteínas o receptores que promueven distintas rutas de señalización están las proteínas G, receptores acoplados a proteínas G, receptores tirosina cinasas de factores de crecimiento endotelial e insulínico (EGF-R, IGF-1R respectivamente), canales iónicos, PI3K, AKT, familia de las MAP cinasas, miembros de la familia Src, proteínas cinasas A y C (PKA y PKC respectivamente), la unión del ligando a los RE permite la activación de estas proteínas y el inicio de las cascadas de señalización (Fu y Simoncini, 2008; Simoncini y Genazzani, 2003; Hammes y Levin, 2007), que desencadenan la liberación de segundos mensajeros, activación de proteínas efectoras o transcripción de genes. Se ha documentado que las subunidades de las proteínas G $\gamma\delta$ y α de los receptores GPR30 tiene parte en la señalización mediada por el E_2 . Las vías de señalización más comunes de GPR30 son la activación de ERK1/2 (cinasa regulada por señales extracelulares por sus siglas en inglés, también llamada MAP1) por transactivación de EGF-R mediado por el E_2 , la activación de la adenilato ciclasa y con ello la producción de AMP cíclico y la activación de PI3K lo cual induce un aumento de IP3 y activación de la AKT. La activación de estas proteínas desencadenan cambios intracelulares como la liberación de segundos mensajeros como calcio, AMP cíclico, éste último induce la expresión del gen *c-fos* en macrófagos y la expresión de Bcl-2 y cíclica D, las cuales promueven el ciclo celular y la supervivencia (Prossnitz, et al., 2007).

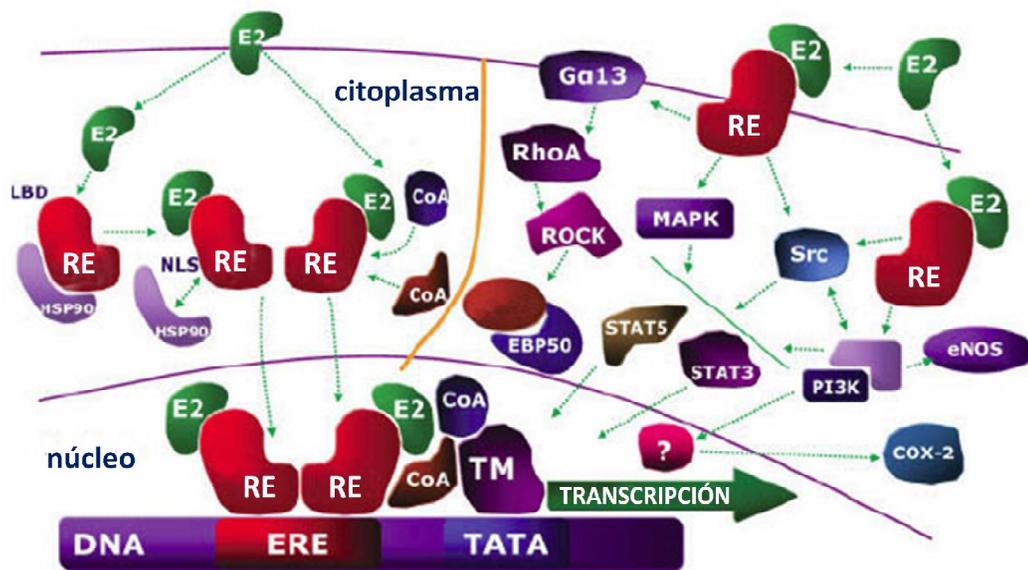


Figura 6. Mecanismo de acción de los RE con efectos genómicos y no transcripcionales. Cuando se une el ligando (E_2) a los RE se forman dímeros que cambian su conformación y se traslocan al núcleo para la transcripción de genes, también se unen a ellos coactivadores de la transcripción (CoA), (A). Los RE con funciones no transcripcionales activan cascadas de señalización mediadas por MAPK, PI3K, proteínas G, cinasa RhoA asociada a ROCK (RhoA/ROCK). Estas cascadas dan lugar a la transcripción de genes o activación de proteínas. MAPK=cinasa activada por mitógenos; PI3K=cinasa de fosfatidilinositol-3-OH; eNOS=sintasa de óxido nítrico; EBP50=fosfoproteína 50 que une ERM (Ezrina/Radixina/Moesina); COX-2=ciclooxigenasa tipo 2; STAT, transductor de la señal y activador de la transcripción; LBD=dominio de unión al ligando; NLS=secuencias de localización nuclear; CoA=coactivador; HSP90=proteína de choque térmico 90; DNA=dominio de unión al ADN; ERE=elemento de respuesta a estrógenos; TM=maquinaria de transcripción; TATA=secuencia TATA. Modificado de Fu y Simoncini, 2008.

1.8 Estradiol y su relación con el sistema inmune

La homeostasis del sistema inmune requiere de una respuesta efectiva contra algún patógeno pero al mismo tiempo evita la inducción de respuestas hacia los antígenos propios, dicha homeostasis puede ser modulada sistémicamente por hormonas como esteroides, glucocorticoides, prolactina, etc. Se sabe de la existencia de un eje neuroinmunoendocrino, en el cual los tres sistemas colaboran para coordinar procesos fisiológicos tal es el caso del metabolismo, la reproducción y el desarrollo de diversas respuestas inmunes (Dronca, et al., 2011). La primera observación que evidenció la existencia de comunicación entre el sistema endocrino e inmune fue el experimento de Calzolari, en 1898, en el cual el tamaño del timo de los conejos castrados antes de la madurez sexual era más grande que el de los controles y la administración de andrógenos revertía la hipertrofia tímica (De León y Morales, 2006). Esta observación fue confirmada con otros experimentos en los cuales la administración de andrógenos indujo la involución del timo; por otro lado la remoción del timo, especialmente en el periodo

neonatal puede inducir enfermedades en ovarios, testículos y tejido tiroideo, lo cual pone de manifiesto la existencia y la importancia de dicha comunicación (Ansar, 2000). Los esteroides sexuales, en particular los estrógenos mantienen una comunicación neuroinmunoendocrina, regulando el estado de ánimo, la presión arterial, la masa ósea y modulando las respuestas inmunes (Togno y Montor, 2009).

El desarrollo óptimo de procesos fisiológicos como el embarazo, el ciclo menstrual y la ovulación están influenciados por respuestas inmunitarias que a su vez están reguladas por el estradiol, el cual está presente en diferentes concentraciones durante dichos procesos. Se ha estudiado el papel de los estrógenos en diferentes contextos. En el embarazo es necesario mantener un ambiente inmunotolerante para evitar el rechazo del embrión, esto se le atribuye a niveles hormonales de estradiol y otras hormonas como la progesterona y la gonadotropina coriónica humana (hCG), que modulan la liberación de citocinas inhibitorias como IL-10, promueven la disminución de citocinas proinflamatorias como TNF α e IL-1 β (Segerer, et al., 2009), evitando de esta forma una respuesta en contra del feto y contribuyendo así a crear un ambiente 'pro-fetal'. Por otro lado, la susceptibilidad e incidencia de enfermedades autoinmunes en mujeres (lupus eritematoso sistémico SLE (9:1, proporción mujeres:hombres), esclerosis múltiple EM (2:1) y artritis reumatoide AR (3:1), etc.) y que sean más frecuentes en la etapa reproductiva, así como la resistencia a infecciones por varios patógenos (protozoarios como, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, *Taenia crassiceps*, etc.) que está relacionada con la presencia de altos niveles de inmunoglobulinas en hembras y mujeres lo cual hace pensar en la existencia de un dimorfismo sexual inmunitario debido al estradiol (De León y Morales, 2006).

1.8.1 Interacción de los receptores de estrógenos con el sistema inmune

Se han descrito múltiples vías de señalización que siguen los receptores RE α o RE β membranales y GPR30, así como los genes que se expresan por dichas vías de señalización. La mayoría de los estudios relacionados a los mecanismos de acción, vías de señalización y efectos funcionales se han realizado en células de cáncer de mama, células endoteliales, vasculares de músculo liso, osteoblastos y sistema nervioso (Fu y Simoncini, 2008). Las células del sistema inmune poseen receptores para esta hormona, pero poco se ha estudiado sobre las vías de señalización que se activan o suprimen debido al E₂. Existe un trabajo realizado en células dendríticas de ratón en donde se documenta que el E₂ está involucrado en la expresión de CD40 vía dos MAP cinasas: JNK y p38, la activación de estas proteínas induce la expresión de otra proteína involucrada en la replicación (MCM6) que a su vez induce la expresión de CD40; el incremento de CD40 tiene que ver en este estudio con el papel del estradiol en la susceptibilidad a desarrollar lupus, pues el aumento de CD40 incrementaría la actividad de linfocitos T autoreactivos (Xie, et al., 2011).

Por otro lado, poco se ha explorado acerca del papel que juegan los receptores de estradiol en las células del sistema inmune como la producción de citocinas, factores de transcripción y otras moléculas que promueven respuestas pro o antiinflamatorias en el sistema inmune y si los receptores están directamente implicados en la transcripción de los genes. En este sentido se ha documentado que el estradiol regula la expresión de $IFN\gamma$ en linfocitos T y esplenocitos, lo cual se debe a la interacción directa de los RE con una secuencia que se asemeja a los ERE, localizada en la dirección 5' del gen de $IFN\gamma$ (Fox, et al., 1991), que explica el incremento en su expresión a nivel de ARNm y de proteína en estas células (Karpuzoglu, et al., 2006). La expresión de $IFN\gamma$ se ha documentado que afecta a su vez la expresión de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOs) y con ello el aumento de óxido nítrico (NO) y la enzima ciclooxigenasa-2, provocando un ambiente proinflamatorio en presencia de estradiol (Karpuzoglu, et al., 2006). Con respecto a la producción de NO, está documentado que el estradiol puede inducir su producción en monocitos y neutrófilos vía los receptores membranales, lo cual se confirma con la liberación de calcio intracelular (Stefano et al., 1999; Stefano et al., 2000), pero en macrófagos disminuye la expresión de iNOs y también la producción de NO (Hayashi, et al., 1998).

En algunos estudios se ha documentado que los receptores de estrógenos pueden interactuar con $NF\kappa B$. $NF\kappa B$ es un factor de transcripción que regula la expresión de genes involucrados en promover respuestas proinflamatorias en el sistema inmune, como genes de citocinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, $TNF\alpha$, $IFN\gamma$, moléculas de adhesión celular y factores de complemento. Se ha demostrado en células transfectadas que la interacción de RE y $NF\kappa B$ antagoniza la transcripción de genes de $NF\kappa B$ sólo en ciertas células. Se tienen distintas hipótesis sobre los mecanismos de cómo sucede dicho antagonismo: una es que los RE interactúan directamente con $NF\kappa B$ uniéndose a la subunidad p65 del factor de transcripción impidiendo su translocación al núcleo ya que p65 contiene la secuencia de localización nuclear, y la segunda es que los RE bloquean la fosforilación del inhibidor $I\kappa B\alpha$ y con ello su degradación, por lo que impide la traslocación de $NF\kappa B$ al núcleo para la transcripción de genes (McKay y Cidlowski, 1999). En macrófagos de humano ocurre algo similar al último mecanismo mencionado, sin embargo están implicados microARNs (miARNs). En dicho estudio proponen que $NF\kappa B$ es regulado por estradiol, ya que induce el incremento en la expresión de una proteína (κB -Ras2) que se une a $I\kappa B\alpha$ impidiendo su degradación. κB -Ras2 es regulada por miARNs en particular, premiR-125b, que se incrementa en presencia de estradiol; este microARN incrementa a su vez la expresión de κB -Ras2, de esta manera se inhibe la actividad de $NF\kappa B$ (Murphy, et al., 2010). Aunque en este estudio no mencionan que receptores están involucrados en dichos efectos, en otro experimento realizado en células de músculo liso de aorta de rata documentan que los RE median la expresión de $I\kappa B\alpha$ (Xing, et al., 2012). Así, la atenuación de la actividad de $NF\kappa B$ por los RE disminuye la expresión de citocinas proinflamatorias, suprimiendo las actividades efectoras de dichas células. Actualmente, sólo se ha encontrado que los RE pueden interactuar directamente con los promotores del gen de $IFN\gamma$, sin embargo estudios no recientes muestran que pueden reprimir indirectamente la transcripción de

citocinas como IL-6 (Kurebayashi, et al., 1997) y $TNF\alpha$ (An, et al., 1999), mediante la activación de la región AF-2 de los RE.

GPR30 al expresarse en timo y linfocitos T sugiere un efecto en ellos. Existen estudios que documentan que contribuye junto con los $RE\alpha$ a la atrofia tímica y es indispensable para la apoptosis de timocitos, otros observan un efecto supresor de la EEA (encefalomielitis experimental autoinmune, modelo murino de la enfermedad autoinmune esclerosis múltiple) ya que induce aumento en la expresión del receptor de muerte programada PD-1 en linfocitos T $CD4^+$ y $Foxp3^+$ promoviendo tolerancia o anergia en linfocitos T autoreactivos (Wang, et al., 2009). Sin embargo también se ha visto un efecto contrario con el aumento de IL-17A e IL-10 en linfocitos T $CD4^+ T_H17$ que apoya la incidencia de enfermedades autoinmunes por efectos del E_2 (Brunsing, et al., 2010).

1.9 Efectos del estradiol en la respuesta inmune

Las células del sistema inmune poseen receptores para estradiol lo cual indica que esta hormona afecta directamente el sistema inmune. Las células que poseen receptores clásicos para estradiol son linfocitos B y T, células NK, macrófagos, monocitos, neutrófilos, mastocitos y CD (Togno y Montor, 2009).

Se ha documentado que los efectos del E_2 dependen de su concentración. En dosis altas (niveles farmacológicos y observados en el embarazo) la respuesta inmune se inhiben, mientras que dosis bajas (subfisiológicas o fisiológicas durante el ciclo menstrual o estrol) promueven una mejor respuesta humoral y celular (Whitacre, et al., 1999; De León y Morales, 2006), sin embargo las propiedades antiinflamatorias y proinflamatorias que se le atribuyen no sólo dependen de la concentración sino del tiempo de exposición, de la población celular que se examina, la variabilidad con la que se expresan los receptores de estrógenos en distintas células, del sexo, edad de los sujetos y si los experimentos son realizados en modelos animales o humanos (Kovats y Carreras, 2008).

Los múltiples efectos del estradiol se han estudiado en distintos contextos, se ha encontrado que puede promover enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso sistémico, sin embargo tiene efectos supresores en la esclerosis múltiple (EM) y artritis reumatoide (AR) en los modelos murinos (Whitacre, et al., 1999; Liu, et al., 2002), dichos efectos están relacionados con la polarización de la respuesta T_H1 y T_H2 o expansión de las Treg inducida por el estradiol. También se han estudiado los efectos terapéuticos del estradiol en enfermedades contra diversos patógenos potenciando la respuesta celular contra algunos patógenos, lo cual se ha observado en mujeres más que en hombres. Por otro lado, también se sabe que el E_2 promueve una respuesta humoral, lo cual se ha logrado observar de manera *in vitro* con el incremento de anticuerpos IgG e IgM en

células mononucleares de sangre periférica (del inglés PBMC) de humano que han sido tratados con E₂ (González, et al., 2010).

En contexto con lo anterior, se han estudiado los mecanismos moleculares bajo los cuales el estradiol está actuando, por lo cual los efectos de esta hormona se pueden observar en distintas células del sistema inmune y en diferentes niveles de estudio desde el desarrollo, diferenciación, producción de citocinas, así como su activación y sobrevivencia. Estos estudios se han llevado a cabo en células humanas y modelos murinos de distintas enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple y lupus eritematoso sistémico. En este caso nos enfocaremos a los efectos en células T y B ya que las CD interactúan con estas células.

1.9.1 El estradiol modula la respuesta inmune mediada por linfocitos B y T

Estudios *in vitro* en ratones muestran que el estradiol afecta el desarrollo de las células B y T. En el caso de las células B el E₂ aumenta la linfopoyesis en bazo de algunas subpoblaciones de células B, sin embargo en médula ósea el E₂ contribuye a la disminución de células B B220+, además de afectar negativamente su diferenciación y proliferación. El E₂ en el timo promueve su involución disminuyendo la mayoría de las subpoblaciones de linfocitos T como CD44⁺ CD25⁺; CD44⁻ CD25⁺; CD44⁻ CD25⁻ y CD4⁺ CD8⁺, sin embargo en bazo incrementan los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺, efecto mediado por GPR30 y RE (Lang, 2004).

El E₂ es capaz de inducir la producción de inmunoglobulinas en células B en humanos y ratones bajo condiciones normales y en enfermedades autoinmunes. En un estudio una cepa de ratones no autoinmune el E₂ fue capaz de promover la generación de autoanticuerpos en células B CD5+. En ratones transgénicos para la cadena pesada de anticuerpos anti-ADN (R4A-γ2b Balb/c) se demostró que el tratamiento con E₂ también promueve el incremento de anticuerpos IgG2b anti-ADN desarrollando de esta manera un fenotipo parecido al lupus (Lang, 2004). En un modelo murino autoinmune para artritis reumatoide el E₂ incrementa los niveles de anticuerpos IgG1 anticolágena, así como de otros autoanticuerpos anticardiolipina, antifosfatidilserina y antifosfatidilinositol en modelos no autoinmunes. Otro estudio muestra que en un modelo de lupus eritematoso (MRL lpr/lpr), las concentraciones de E₂ en el embarazo incrementan la frecuencia de las células B productoras de IgM e IgG (Straub, 2007). Estos efectos observados tienen que ver con que el E₂ contribuye a su activación (incrementa los niveles de CD86 pero no de CD80), expansión de linfocitos B autoreactivos (de la zona marginal de bazo y es independiente de linfocitos CD4⁺) inhibiendo su apoptosis, promoviendo su sobrevivencia mediante el incremento de proteínas que evitan su apoptosis como Bcl-2, CD22, SHP-1 y V-CAM; dicho incremento es mediado por los RE α y β . En particular el incremento de CD22 y SHP-1 evita la apoptosis mediada por el receptor de células B (BCR) (Grimaldi, et al., 2001; Grimaldi, et al., 2002).

El conocimiento de los efectos del E_2 en los linfocitos T ha derivado de estudios que tratan de dilucidar el papel de los estrógenos con el desarrollo de lupus eritematoso (enfermedad en la cual se producen en mayor proporción citocinas T_H2), así como el efecto supresor de la EM, que se caracteriza por una T_H1 . En este sentido, distintos estudios muestran que el estradiol induce la producción de citocinas en linfocitos T, polarizando la respuesta de T_H1 a T_H2 dependiendo de su concentración; así, varios experimentos han demostrado que linfocitos T $CD4^+$ obtenidos de sangre de pacientes o ratones con EEA en presencia de concentraciones observadas en el embarazo (>10 ng/ml) de E_2 promueve la producción de IL-10 e IL-4 (citocinas producidas por las T_H2) y el ARNm del factor de transcripción GATA-3 (involucrado en la generación de linfocitos T_H2), mientras que dosis observadas en el ciclo menstrual y cercanas a las del embarazo inducen la producción de $TNF\alpha$, $IFN\gamma$ e IL-2 (citocinas proinflamatorias y que inducen una respuesta de tipo T_H1). En este caso la producción de $TNF\alpha$ es dual ya que a dosis farmacológicas disminuye (Gilmore, et al., 1997; Salem, et al., 2000; Maret, et al., 2003). En contraste con lo mencionado, también varios experimentos muestran que dosis observadas en el embarazo pueden incrementar la producción de $IFN\gamma$ en linfocitos T vía los $RE\alpha$, así como en linfocitos T asesinos naturales de ratones. $IFN\gamma$ es una citocina que además de inducir una T_H1 , también está involucrado en inhibir a las T_H17 , las cuales tienen un papel proinflamatorio en enfermedades autoinmunes (Straub, 2007).

El efecto protector del E_2 en la EM, demostrado en modelos murinos, es mediado por la inducción de una T_H2 a través de la secreción de citocinas (IL-10 e IL-4). Recientemente se documentó que el E_2 inhibe la actividad de las T_H1 y T_H17 , mediante la disminución de IL-17 e $IFN\gamma$, dicho efecto se debe a la acción de los $RE\alpha$ en linfocitos T (Lélu, et al., 2011). Efectos contrarios se han visto con el receptor GPR30 (Brunsing, et al, 2010). La disminución de la EEA también tiene que ver con que el E_2 a concentraciones observadas en el embarazo aumenta la expresión de FoxP3, además de contribuir a la expansión de linfocitos Treg $CD4^+ CD25^+ FoxP3^+$ (Polanczyc, et al., 2004b).

II. ANTECEDENTES

El hecho de que las CD posean receptores clásicos para estradiol ($RE\alpha$ y $RE\beta$) y GPR30 (Uemura, et al., 2008; Liu, et al., 2002; Mao, et al., 2005), sugiere un impacto en la función y desarrollo de las mismas. Los efectos del E_2 en linfocitos T y B mencionados anteriormente podrían estar mediados por su efecto en las CD (Liu, et al., 2002; Petterson, et al., 2004; Lélú, et al., 2011).

Existen trabajos que analizan los efectos del E_2 en las CD, desde distintas situaciones: por un lado se ha explorado cómo está involucrado el E_2 y las CD en el desarrollo de enfermedades autoinmunes, así como en la atenuación de la EEA y la EM (Polanczyk, et al., 2004a; Liu, et al., 2002; Pettersson, et al., 2004; Lélú, et al., 2011), con respecto a esto sólo existe un estudio realizado en un modelo murino de esclerosis múltiple en el que el estradiol puede inducir CD tolerogénicas (porcentaje alto de CD que expresan CD273 y CD274; bajos niveles de IL-12, IL-6 e incremento de IL-10 y $TGF\beta$) y con ello atenuar la enfermedad (Papenfuss, et al., 2011). Es de notar que esto no se ha probado con el 17β -estradiol. Por otro lado se ha estudiado el papel de las CD y el E_2 en generar un ambiente inmunotolerante en el embarazo, el cual hace posible el establecimiento del feto en el útero materno (Slawek, et al., 2012). Las CD son abundantes en la decidua durante el inicio del embarazo (Zarnani, et al., 2007), lo cual sugiere que desempeñan un papel importante en este proceso. También se han documentado efectos en la disminución del número de células de Langerhans en piel (Herrera, et al., 2013). Así, se han estudiado los mecanismos moleculares (producción de citocinas, fenotipo, funciones efectoras, sobrevivencia, entre otros), por los cuales el E_2 influye en las CD provocando los efectos mencionados. Estos efectos se describen a continuación.

El E_2 afecta las funciones efectoras de las CD; varios estudios coinciden en que el E_2 disminuye la capacidad de las CD de hacer proliferar linfocitos T (Yang, et al., 2006; Yang, et al., 2005; Jiang, et al., 2008; Petterson, et al. 2004; Segerer, et al., 2009) lo cual explica su actividad terapéutica e inmunosupresora de la esclerosis múltiple en el modelo murino (Liu, et al., 2002; Xiao, et al., 2004), así como su contribución a crear el ambiente inmunotolerante durante el embarazo (Segerer, et al., 2009). Los estudios que demuestran este efecto fueron realizados en CD provenientes de bazo de ratón y rata, derivadas de médula ósea de ratón, así como CD humanas derivadas de monocitos, además demuestran que ocurre en dosis suprafisiológicas o farmacológicas (10^{-6} – 10^{-7} M, o >60 ng/ml) y fisiológicas (10^{-8} – 10^{-12} M, o 10 - 60 ng/ml), lo cual sugiere que el efecto observado no es dependiente de la dosis. Por otro lado, el E_2 promueve la disminución de $NF\kappa B$ en CD (Yang, et al., 2006); $NF\kappa B$ es un factor de transcripción que está involucrado en la transcripción de citocinas proinflamatorias, en la sobrevivencia y proliferación de células del sistema inmune, en particular en las CD promueve su maduración fenotípica y la producción de IL-12, IL-6 (Rescigno, et al., 1998), por consiguiente el efecto observado sugiere que el E_2 impide su maduración lo cual puede promover la tolerancia o inmunosupresión en estas células. No sólo el E_2 tiene actividad supresora en las CD, también se ha documentado que durante

el ciclo menstrual promueve la susceptibilidad de adquirir VIH-1, incrementando la expresión de receptores que reconocen este virus, como el DC-SIGN/CD209, molécula no-integrina 3-fijadora de adhesión intercelular específica, por sus siglas en inglés (Wira, et al., 2010).

También se ha descrito que el E₂ afecta la producción de citocinas inhibitorias y proinflamatorias en CD. Algunos estudios concuerdan en que el E₂ induce un incremento en la producción de IL-10 (citocina supresora, que evita la maduración de las CD e inhibe la producción de IL-12, promoviendo una respuesta de tipo T_{H2} e inhibiendo una de tipo T_{H1}, pero sobre todo contribuye a la generación de CD tolerogénicas que a su vez permiten la diferenciación y expansión de Treg) a nivel transcripcional o de ARN mensajero (Yang, et al., 2005), también intracelular (Yang, et al., 2006) y en el sobrenadante (Kyurchev, et al., 2007; Huck, et al., 2005; Uemura, et al., 2008). Por otro lado, el E₂ induce la disminución en citocinas proinflamatorias, TNF α , IFN γ e IL-12 en CDs de bazo de ratón cuando son pretratadas con estradiol y expuestas o no en presencia de linfocitos T específicos para la proteína básica de la mielina (MBP) en un modelo murino de esclerosis múltiple (Liu, et al., 2002). La disminución de IL-12 y TNF α a concentraciones de E₂ de 10, 100 y 1000 nM concuerda con otro estudio realizado en CD de bazo (Yang, et al., 2006). Otros estudios muestran que el estradiol induce la producción de IL-6 (citocina anti y proinflamatoria) en CDs de bazo de ratón y humanas inmaduras (Yang, et al., 2006; Bengtsson, et al., 2004). Entre otras citocinas que se incrementan en presencia de E₂ está IL-27, esta citocina tiene un papel regulador es anti-inflamatoria y promueve la polarización de respuestas T_{H2} así como la generación de células T reguladoras (Kyurchev, et al., 2007), además del incremento de la quimiocina CCL1 en CD derivadas de monocitos, importante en el reclutamiento de linfocitos T_{H2} y Treg que expresan CCR8 (Uemura, et al., 2008). La enzimaIDO se incrementa en CD en presencia del E₂, dicha enzima contribuye a la atenuación de la EM y EEA, además de inducir tolerancia inmunológica (Xiao, et al., 2004; Petterson, et al., 2004 y Zhu, et al., 2007). La liberación de citocinas inhibitorias y el decremento de proinflamatorias (IL-12, TNF α e IFN γ) en CD por el E₂, sugiere que puede atenuar la EEA (caracterizada por una respuesta T_{H1}) polarizando una respuesta T_{H2} en vez de T_{H1} (Petterson, et al. 2004; Liu, et al., 2002), pero también se explica el desarrollo de lupus eritematoso pues favorece una T_{H2}. Con el incremento de IL-10, IL-27 e IDO se promueve la presencia de CD tolerogénicas promoviendo la expansión de las Treg, anergia de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ generándose de esta manera tolerancia, lo cual sugiere que el E₂ induce inmunosupresión. A pesar del efecto supresor del E₂ también se ha visto que el E₂ promueve el incremento de quimiocinas (CXCL8, también llamada IL-8) y CCL2 (Bengtsson, et al., 2004; Kyurchev, et al., 2007).

El E₂ ha demostrado tener impacto en la maduración de las CD y por tanto en la modificación de su fenotipo. Estudios previos documentan que el 17 β -estradiol promueve la diferenciación *in vitro* de distintos tipos de células dendríticas: convencionales con fenotipo CD11c⁺ CD11b^{med} y células dendríticas parecidas a Langerhans con fenotipo CD11c⁺ CD11b^{med} Ly6C⁻, que además expresan Langerina (CD207⁺) y poseen gránulos de Birbeck (Paharkova, et al., 2004; Douin-Echinard, et al., 2008; Nalbandian, et al. 2005; Mao, et al., 2005). En estos estudios los tipos de CD derivadas de médula ósea de ratón que se diferencian *in vitro* en presencia de concentraciones fisiológicas de

E₂, observadas en el ciclo menstrual y estral, poseen un fenotipo maduro pues esta hormona induce incremento en la expresión superficial de proteínas de maduración (MHCII) y coestimuladoras (CD80, CD86 y CD40) (Paharkova, et al., 2004; Douin-Echinard, et al., 2008; Nalbandian, G. et al. 2005). Este efecto es mediado por los RE, ya que la administración del antagonista de los receptores de estrógenos (ICI 182,780), moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (raloxifen o tamoxifen) o bien de ratones que carecen de los RE α provoca que disminuya la expresión de MHCII y CD86 (Paharkova, et al., 2004; Douin-Echinard, et al., 2008; Nalbandian, et al., 2005; Jiang, et al., 2008). Otros estudios también demuestran que el E₂ puede tener distintos efectos en el fenotipo dependiendo del estado de maduración de las CD, de esta manera concentraciones fisiológicas en el embarazo a suprafisiológicas (10 a 1000 nM, equivalente a 3-300 ng/ml) promueven el incremento de CD40 y MHCII en CD de ratones con lupus eritematoso (Jiang, et al., 2008), de la misma manera se incrementa CD40, CD83, HLA-DR (MHCII) y CD86 de humanos (Segerer, et al., 2009) dicho incremento se observa en CD inmaduras, pero disminuye en CD maduras. También, se ha documentado que diferentes concentraciones de E₂ causan distintos efectos, sólo un estudio muestra que una concentración baja o fisiológica (10 nM) promueve la expresión de CD40 y CD54 (proteína de adhesión celular que contribuye a la sinapsis inmunológica). Estos resultados sugieren que una concentración fisiológica de E₂ contribuye a su maduración fenotípica, lo cual podría promover que las CD estimulen a los linfocitos T, y respondan frente a algún reto antigénico. En este mismo estudio el E₂ también induce un incremento de MHCII de manera dosis dependiente, mientras que la expresión de CD80 y CD86 no se ve afectada (Yang, et al. 2006), sin embargo observando los efectos de las dosis en otro estudio el E₂ induce incremento de estas dos moléculas a concentraciones fisiológicas (10 nM) (Xie, et al., 2011). Es de notar que no se ha documentado si el E₂ modifica la expresión de CD274 y CD273, pertenecientes a la familia B7 de proteínas que participan en la segunda señal.

Estudios realizados con células de Langerhans y E₂ demuestran que las CL de epitelio vaginal y de epidermis están bajo control hormonal. En la etapa tardía de diestro, proestro y estro, cuando los niveles de E₂ son altos el número de células de Langerhans del epitelio vaginal disminuye con la administración de una inyección de E₂ (5.8 nM) a animales ovariectomizados, manteniendo el efecto hasta las 48 horas (citados por Herrera, et al., 2013). En concordancia con lo anterior, nuestro grupo de trabajo observó que la aplicación epicutánea de E₂ en orejas de ratones machos disminuye drásticamente el número de CL epidérmicas. La disminución de CL fue significativa a una concentración suprafisiológica de E₂ (200 ng/ml) a la primer y segunda hora de tratamiento; el efecto visto es transitorio y local, porque primero se restablece el número de CL a las 24 y 48 horas y segundo el efecto sólo se observa en el lugar de aplicación del E₂ (Herrera, et al., 2013).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El E₂ es capaz de modular la respuesta inmune afectando a las CD. En estudios realizados en nuestro grupo con CL de piel de ratón se encontró un efecto inmunosupresor, ya que la exposición a una concentración suprafisiológica de 200 ng/ml de E₂ durante una y dos horas provoca la disminución local de estas células, comprometiendo la inmunovigilancia local del tejido. Adicionalmente a la pérdida de inmunovigilancia ocasionada por el E₂, también podría estar ocurriendo el cambio en el inmunofenotipo de las CD de una manera dosis y tiempo dependiente. Por lo que, si el E₂ produce un cambio en el incremento de las moléculas coinhibidoras promovería la tolerancia inmunológica local. Por lo tanto, es importante evaluar el cambio en el inmunofenotipo de las CD diferenciadas a partir de médula ósea de ratón, en particular de las moléculas que inducen una respuesta inhibitoria o tolerancia (CD273 y CD274), y de las cuales no se ha documentado efectos en presencia de 17β-estradiol.

IV. JUSTIFICACIÓN

El estradiol ha demostrado tener efectos en el sistema inmune, en particular afecta el funcionamiento de las CD. El presente estudio pretende documentar el efecto del E₂ en el cambio del inmunofenotipo, para saber si las CD tratadas con dosis fisiológica y suprafisiológicas de 17β-estradiol son potencialmente tolerogénicas. La tolerancia inmunológica puede repercutir en el desarrollo adecuado de la respuesta inmune contra algún patógeno, célula cancerígena o al ambiente, favoreciendo el desarrollo de infecciones, enfermedades o cáncer. Por otro lado, las CD al ser capaces de modular la actividad de células T, han sido manipuladas para favorecer ciertos tipos de respuestas, por lo que si el E₂ promueve la generación de un fenotipo que induzca la tolerancia inmunológica esta propiedad podría ser utilizada para el desarrollo de medicamentos útiles para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, como esclerosis múltiple, o bien que se promueva la preservación de injertos u órganos como hígado, corazón, riñón.

V. HIPÓTESIS

Si el E₂ tiene efectos inmunosupresores en las CD cuando se exponen a la presencia de E₂ posterior a su diferenciación con GM-CSF, las CD exhibirán una modificación en su inmunofenotipo mostrando un incremento en la expresión de las moléculas coinhibidoras (CD273 y CD274) y de migración (CCR7) y una disminución en las moléculas coestimuladoras (CD40, CD80 y CD86) y de maduración (MHCII).

VI. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto *in vitro* de diferentes concentraciones de 17β -estradiol en el inmunofenotipo de células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón diferenciadas con GM-CSF.

6.1. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar la expresión de las moléculas coinhibidoras (CD273 y CD274), así como las moléculas coestimuladoras (CD40, CD80, CD86), de maduración (MHCII) y de migración (CCR7) en células dendríticas derivadas de médula ósea cuando son expuestas a E_2 con citometría de flujo.
2. Determinar el efecto dosis y tiempo de respuesta del E_2 en el inmunofenotipo de las células dendríticas.

VII. MATERIALES Y MÉTODO

7.1 Diferenciación de células dendríticas a partir de médula ósea de ratón

En cada ensayo se utilizaron 4 ratones machos de 6 a 8 semanas de edad de la cepa Balb/c, los cuales fueron mantenidos en las instalaciones del bioterio del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, UNAM, controlando periodos de luz oscuridad, y con disponibilidad de agua y alimento *ad libitum*. Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical e inmediatamente se colectaron los huesos de las extremidades posteriores y anteriores (fémur, tibia, radio), procurando remover todo el tejido muscular y evitar fracturas en los huesos. Bajo condiciones asépticas (en una campana de flujo laminar) los huesos se sometieron a dos lavados asépticos con alcohol al 70% a 4 °C, el cual fue removido mediante tres lavados con solución salina balanceada de Hanks (SSBH) estéril a 4 °C. Sobre una caja de petri estéril de plástico se obtuvo la médula ósea por perfusión usando una jeringa de insulina (este procedimiento debe ser rápido para evitar la formación de coágulos en la médula ósea). Mediante pipeteo continuo se rompieron los agregados celulares hasta que se obtuvo una suspensión homogénea, que se centrifugó para obtener un botón celular. Debido a que la suspensión celular tiene eritrocitos, éstos se eliminaron con buffer de lisis (NH_4Cl 0.15 M, KHCO_3 y EDTA), dejando dicho buffer por 2 minutos. Después de lisar los eritrocitos se obtuvo una suspensión celular, a partir de la cual se determinó el número de células totales de médula ósea por mililitro y su sobrevida mediante tinción con azul tripano. En una placa de cultivo de 75 cm² se sembró la suspensión celular obtenida previamente a una densidad de 1×10^6 células/ml en medio de cultivo DMEM (marca GIBCO) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% (marca PAA), antibiótico al 1% (marca GIBCO) y con GM-CSF al 20%, ésta citocina indujo la diferenciación de células dendríticas, y se mantuvo hasta 10 días en cultivo con cambios de medio cada 48 horas, a una temperatura de 37°C, 5% de CO₂. El GM-CSF fue obtenido del sobrenadante de la línea celular CHO, obtenida de cáncer de ovario de hámster chino (*Cricetulus griseus*) que fueron transfectadas con el gen de GM-CSF. En cada cambio de medio, los cultivos fueron observados bajo el microscopio fotónico invertido de contraste interferencial diferencial OLYMPUS 1X71, con el propósito de registrar los cambios morfológicos durante el proceso de diferenciación.

7.2 Obtención de sobrenadante rico en GM-CSF

Para la obtención del sobrenadante de células CHO que contiene GM-CSF, la línea celular CHO primero pasó por un proceso de selección usando medio F12 (marca GIBCO) suplementado con SFB al 10%, con antibióticos y antimicóticos al 1% (penicilina, estreptomycin y anfotericina) y el antibiótico de selección fue geneticina que se añadió a una concentración de 1 mg/ml. Se realizaron tres pases de selección. La selección consistió en obtener una población homogénea de células que en este caso crezcan en presencia de geneticina y que produzcan GM-CSF, para lo cual se dejaron crecer con el medio F12 suplementado con antibióticos y antimicóticos al 1% y

geneticina, cuando llegaron al 80-90% de confluencia, las células CHO se despegaron y las que permanecieron en la caja se dejó que crecieran de nuevo agregándoles de 7-5 ml de medio F12 suplementado de la manera antes mencionada. Las células CHO que se despegaron se desecharon. Se realizó este mismo proceso dos veces sucesivas. Las células que se obtuvieron en el último pase de selección se despegan y se dejan crecer en una nueva placa de cultivo en medio F12 con SFB al 10%, solución de antibióticos y antimicóticos al 1% (penicilina, estreptomicina y anfotericina). Se dejaron crecer hasta que llegaron a una confluencia del 80-90%, las células se volvieron despegar para expandirlas en más placas de cultivo y de igual manera se dejaron crecer hasta una confluencia del 80-90%. Finalmente, para la producción de GM-CSF, las células que fueron expandidas en más placas de cultivo se les retiró el F12 suplementado con SFB al 10% y agregó medio F12 sin SFB por un mínimo de 48 horas y un máximo de 96 horas, tras lo cual se obtuvo el sobrenadante, que fue filtrado (usando filtros de 0.2 μ m) y alicuotó en tubos Falcon de 10 ml. Para retirar las células adheridas a la caja de cultivo se usó tripsina al 0.05% más EDTA al 0.02% disuelto en SSBH.

7.3 Curva dosis y tiempo de respuesta del fenotipo de CD tratadas con E₂

Con el objetivo de determinar el efecto dosis y tiempo de respuesta del 17 β -estradiol en el inmunofenotipo de las células dendríticas se realizó una curva para determinar la dosis en la cual se observa algún efecto, con dicha concentración se realizó otra curva para determinar como se comporta el inmunofenotipo de las CD en el tiempo (primera, segunda, 12, 24 y 48 horas) de haber sido expuestas a E₂. El 17 β -estradiol fue proporcionado gentilmente por el Laboratorio de Farmacología Endocrina de la Facultad de Medicina, UNAM.

Transcurridos los diez días de diferenciación, se obtuvieron por pipeteo las CD de las cajas de cultivo, mediante centrifugación se retiró el medio de cultivo suplementado con el factor de crecimiento y se sembraron en placas de cultivo a una proporción de 2 X10⁵ células/ml en medio DMEM+SFB al 10 % para que recibieran el tratamiento con E₂ a distintas concentraciones: 10, 100 y 1000 ng/ml y sin E₂ que fue el control (Herrera, et al., 2013), durante 24 horas. Se volvieron a obtener CD y se cultivaron en presencia de una sola dosis de E₂ durante 1, 2, 12, 24 y 48 horas (Herrera, et al., 2013). Cada experimento se realizó por triplicado. Las diluciones del 17 β -estradiol se realizaron a partir de una solución madre cuya concentración era de 1 mg/ml de 17 β -estradiol disuelto en etanol.

7.4 Evaluación del inmunofenotipo

Después del tratamiento con E₂ se realizó el inmunomarcaje para evaluar la expresión de MHCII, CD40, CD80, CD86, CD273, CD274 y CCR7, así como la proteína para identificar las CD (CD11c), el cual fue analizado posteriormente en un citómetro de flujo (FACSCalibur BDBiosciences). Los anticuerpos fluorocromados utilizados fueron: FITC anti-I-A/I-E (reconoce MHCII de ratón), PE anti-

CD273, PE anti-CD274 y APC anti-CD11c (BIOLEGEND), dichos anticuerpos se usaron con una dilución 1:200. Los anticuerpos biotinilados utilizados fueron: conjugado con Biotina anti-CCR7, conjugado con Biotina anti-CD80, conjugado con Biotina anti-CD86, conjugado con Biotina anti-CD40 (BD Biosciences), se usaron con una dilución 1:200. Los anticuerpos que tienen Biotina posteriormente fueron incubados con Estreptavidina Cy5 y PE (BD Biosciences) durante 15 minutos a temperatura ambiente en un lugar oscuro. La estreptavidina Cy5 y PE se usaron con una dilución 1:400. Las CD que recibieron o no tratamientos con distintas dosis de E_2 , así como a diferentes tiempos con una sola dosis de E_2 , se dejaron incubar con los anticuerpos mencionados anteriormente durante 15 minutos a temperatura ambiente en un lugar oscuro, las CD se dejaron incubando en una solución buffer de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés), el cual fue suplementado con albúmina al 0.1% y azida de sodio al 0.02%; transcurrido dicho tiempo se realizaron dos lavados con el mismo PBS suplementado. Una vez concluido el inmunomarcaje, para evitar que cambie el fenotipo de las células, éstas se fijaron con PBS/paraformaldehído al 0.5% y posteriormente fueron leídas en el citómetro de flujo. Los datos obtenidos en el citómetro de flujo fueron analizados en el programa FlowJo versión 8.7.

7.5 Análisis estadístico

Para determinar la existencia de cambios significativos en la expresión de cada molécula (CD273, CD274, CD40, CD80, C86, MHCII y CCR7) con respecto a la curva dosis-respuesta y la curva tiempo de respuesta, se solicitaron los valores de la media de intensidad de fluorescencia (MIF) (expresión) y el porcentaje de CD positivas para cada molécula (cuántas células lo expresan) en el programa FlowJo versión 8.7. Posteriormente los valores solicitados se analizaron en el programa de estadística JMP versión 9 con el objetivo de identificar los valores que fueron estadísticamente significativos. Se evaluó la igualdad de varianzas de los datos mediante la prueba de Levene, el grupo de datos que tuvo igualdad de varianzas fueron analizados primero con la prueba análisis de varianza (ANOVA) y posteriormente con la de prueba de Tukey, ésta última se realizó para distinguir que tratamientos fueron estadísticamente significativos con respecto al control. Para el grupo de datos que no tuvo igualdad de varianzas, se analizaron mediante la prueba Kruskal Wallis/Wilcoxon (Suma de Rangos). Los valores $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

VIII. RESULTADOS

8.1 Diferenciación de CD a partir de médula ósea de ratón

Se registraron los cambios morfológicos característicos de las células de médula ósea que fueron obtenidas y estimuladas con GM-CSF (obtenido previamente del sobrenadante de células de cáncer de ovario de ratón chino (CHO) durante 10 días. Los cultivos de médula ósea presentaron dos tipos de poblaciones que se caracterizan por su adherencia o no a la caja de cultivo; así, las que se adhieren fuertemente a la caja son células estromales y macrófagos, las cuales forman el estroma, mientras que las células presentes en el sobrenadante son células hematopoyéticas, en particular un estudio previo reportó que son precursores de granulocitos y es aquí donde se encuentran los precursores de las CD (Inaba, et al., 1992). En la figura 7 se muestran los cambios morfológicos registrados durante la diferenciación de las CD, los cuales se describen a continuación.

En el tiempo cero de cultivo, las células de médula ósea recién sembradas tienden a formar agregados celulares. En las primeras 2 y 12 horas de cultivo comenzaron a adherirse a la caja macrófagos y células estromales, respectivamente. Las células estromales tomaron una morfología alargada cuando se adhieron a la caja. Entre el tercer y cuarto día se comenzaron a formar colonias de células que en primera instancia se adhieron débilmente a la capa de células estromales y macrófagos, después se adhieron fuertemente a la caja, permitiendo el contacto con estas células lo cual promovió la diferenciación de las CD. Algunos de los agregados celulares tuvieron proyecciones citoplasmáticas que se conservaron durante el tiempo de diferenciación. Conforme avanzaron los días del cultivo se formaron más agregados celulares unidos fuertemente a la capa de células que se adhieron en las primeras horas a la caja de cultivo. Entre el día 6 a 9 de cultivo muchas de las colonias celulares comenzaron a desprenderse y quedaron en el sobrenadante, algunas células permanecieron de manera individual y otras en colonias que todavía estaban adheridas, la mayoría conservó las proyecciones citoplasmáticas.

El porcentaje de viabilidad promedio de las células dendríticas transcurridos los diez días de diferenciación y previo al tratamiento con E_2 fue de 85.35 %.

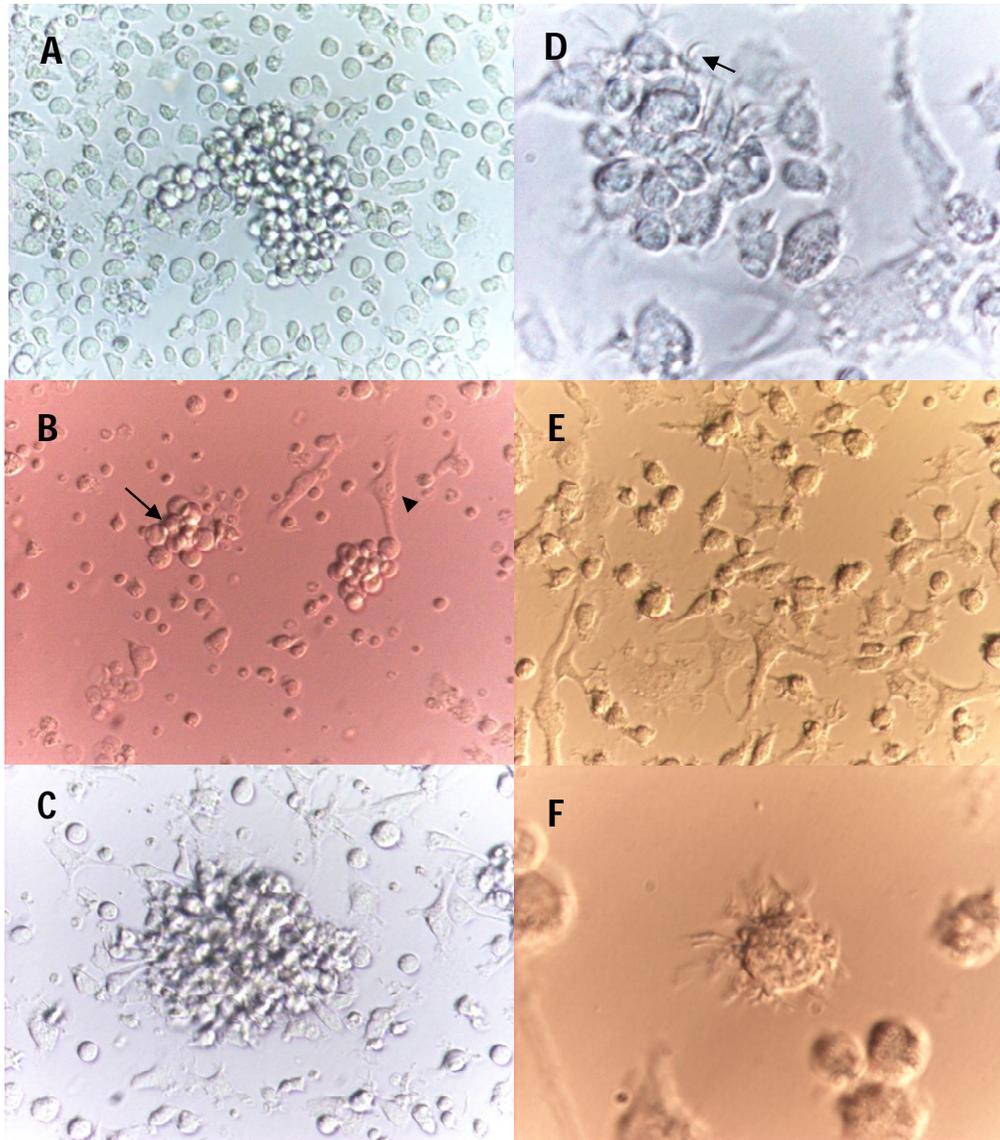


Figura 7. Fotomicrografías a diferentes aumentos tomadas de un microscopio fotónico de contraste interferencial diferencial obtenidas a distintos tiempos de un cultivo de médula ósea suplementado con GM-CSF. (A) Cultivo en el tiempo cero que muestra un agregado celular. Se distingue la presencia de otras células en el piso de la caja que comienzan a cambiar su morfología para adherirse a la caja de cultivo. 200x. **(B)** Cultivo de 2 días, se muestran dos poblaciones celulares. La punta de flecha corresponde a una célula estromal que mantiene una forma alargada al adherirse a la caja. La flecha señala un agregado celular que corresponden a precursores de las CD. 200x. **(C)** Cultivo de 4 días. En esta fotomicrografía se observa un agregado celular adherido fuertemente a la capa de células estromales. 200x. **(D)** Cultivo de 6 días que muestra células dendríticas desprendidas de la caja de cultivo y que poseen proyecciones citoplasmáticas (flecha). 400x. **(E)** Cultivo de 8 días, algunas de células que estaban en grupos ahora permanecen aisladas, pero también sigue habiendo agregados celulares. 200x. **(F)** En esta fotomicrografía se aprecia claramente una célula dendrítica de 9 a 10 días de cultivo con proyecciones citoplasmáticas. 400x.

8.2 Análisis del fenotipo de las CD mediante citometría de flujo

La expresión de las proteínas de membrana o inmunofenotipo de las células dendríticas se determinó mediante la técnica de citometría de flujo (CMF), la cual permite el análisis de diversas características tanto fisicoquímicas, inmunológicas o fenotípicas de las células.

En un dotplot de granularidad contra tamaño (obtenido a través del análisis celular realizado en el programa de citometría de flujo FlowJo versión 8.7) se seleccionaron las células dendríticas que fueron o no tratadas con E₂, éstas se ubicaron identificando aquella población con mayor granularidad y tamaño, y excluyendo los detritos celulares (Fig 8, A). Además de la evaluación morfológica de las CD, mencionado en el apartado anterior, se corroboró su fenotipo con el anticuerpo anti-CD11c, y con el control de isotipo se pudo ubicar la zona que corresponde a las células que expresan CD11c y por tanto son positivas para esta molécula (Fig 8; B, C). De todos los cultivos realizados se obtuvo en promedio un 59.17 % ± 18.56 de diferenciación, es decir que en cada ensayo se obtuvo aproximadamente un 60% de células CD11c positivas y por tanto CD.

A partir de la población CD11c positiva seleccionada se realizaron histogramas de expresión para cada proteína (Fig 8, D): de maduración y migración (MHCII y CCR7 respectivamente), de coestimulación (CD80, CD86 y CD40) y de coinhibición (CD273 y CD274); y mediante los valores estadísticos, solicitados en el programa de análisis de datos de citometría realizada, como la media de intensidad de fluorescencia (MIF) y el porcentaje de células positivas para cada molécula, se determinaron cambios cuantitativos en la expresión superficial de cada molécula en presencia de E₂.

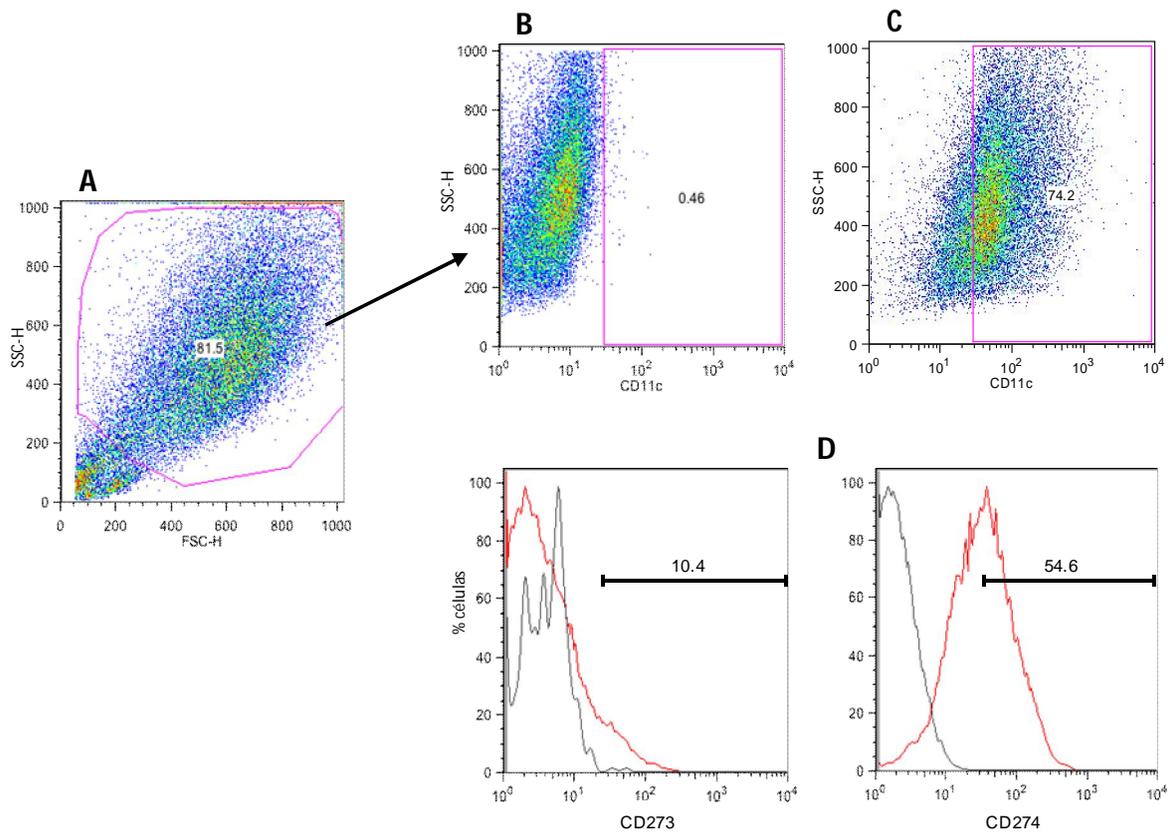


Figura 8. Análisis de las CD adquiridas mediante citometría de flujo. Se representan gráficos de células, obtenidos del programa de análisis de datos para citometría de flujo (FlowJo versión 8.7). **(A)** Dot plot en el que se grafica tamaño (FSC-H) contra granularidad (SSC-H) de todas las células adquiridas en el citómetro de flujo. La región seleccionada en color rosa representa a la población celular de mayor tamaño y con más gránulos, estas características corresponden a células dendríticas. **(B)** Dot plot del control de isotipo en el que se representa granularidad contra intensidad de fluorescencia del anticuerpo anti-CD11c. Se muestra la población negativa para el anticuerpo anti-CD11c, esta población se ubica al lado izquierdo de la región seleccionada en color rosa. Las células que expresan CD11c se ubica en la región rosa. **(C)** Dot plot de granularidad contra intensidad de fluorescencia del anticuerpo anti-CD11c, en donde se representa la población de células que posee muchos gránulos y que es positiva para CD11c. **(D)** Ejemplos de histogramas realizados a partir de la población CD11c positiva. Los histogramas muestran el porcentaje de células dendríticas que expresan con distinta intensidad las proteínas de membrana CD273 y CD274 (en color rojo), en color negro se representa el control de isotipo. El eje x representa la intensidad de fluorescencia en escala logarítmica, el eje y el número de CD que expresan dichas moléculas. Las barras horizontales representan el porcentaje de células CD11c positivas para CD273 y CD274.

8.3 Determinación del fenotipo de CD sin ser estimuladas con E₂

Las células dendríticas que fueron obtenidas a partir de cultivos de médula ósea de ratón, mantenidos durante diez días con medio de cultivo regular (DMEM suplementado con 10% SFB y 1% de antibiótico) y GM-CSF al 20% para su diferenciación, mostraron diferentes patrones de expresión para las moléculas de maduración, coestimulación e inhibición. Para facilitar la lectura de los histogramas se tomarán las siguientes consideraciones, una intensidad media de expresión se ubicará en la región que representa, en escala logarítmica, una intensidad de fluorescencia de 10^1 a 10^2 y la intensidad alta se ubicará en la región de 10^2 a 10^4 . De acuerdo a lo anterior, según la Figura 9, en promedio un poco más del 80% de las CD expresa con una intensidad media a alta de MHCII (Fig 9, A), respecto a CCR7 la mayoría de las CD se ubican entre 10^1 y 10^2 , por lo tanto la expresan medianamente y una minoría con intensidad alta (Fig 9, B). En cuanto a las moléculas coestimuladoras, CD40 se expresa en la mayoría de la población en cantidad media (Fig 9, C). CD80 se expresa aproximadamente en la mitad de las CD con una intensidad o cantidad media y la otra la expresa con una intensidad alta (Fig 9, D). En comparación con CD80, CD86 se expresa con una intensidad alta en un mayor porcentaje de CD (Fig 9, E). Respecto a las moléculas coinhibidoras se observa evidentemente que existen diferencias en cuanto a la intensidad con la que se expresa y al porcentaje de células que las están expresando. CD274 se expresa en un mayor porcentaje de CD con una intensidad media y en una minoría con una intensidad alta (Fig 9, G). Respecto a CD273 se expresa en un pequeño porcentaje de CD con una intensidad media lo cual sugiere una expresión más restringida en el caso de esta molécula (Fig 9, F).

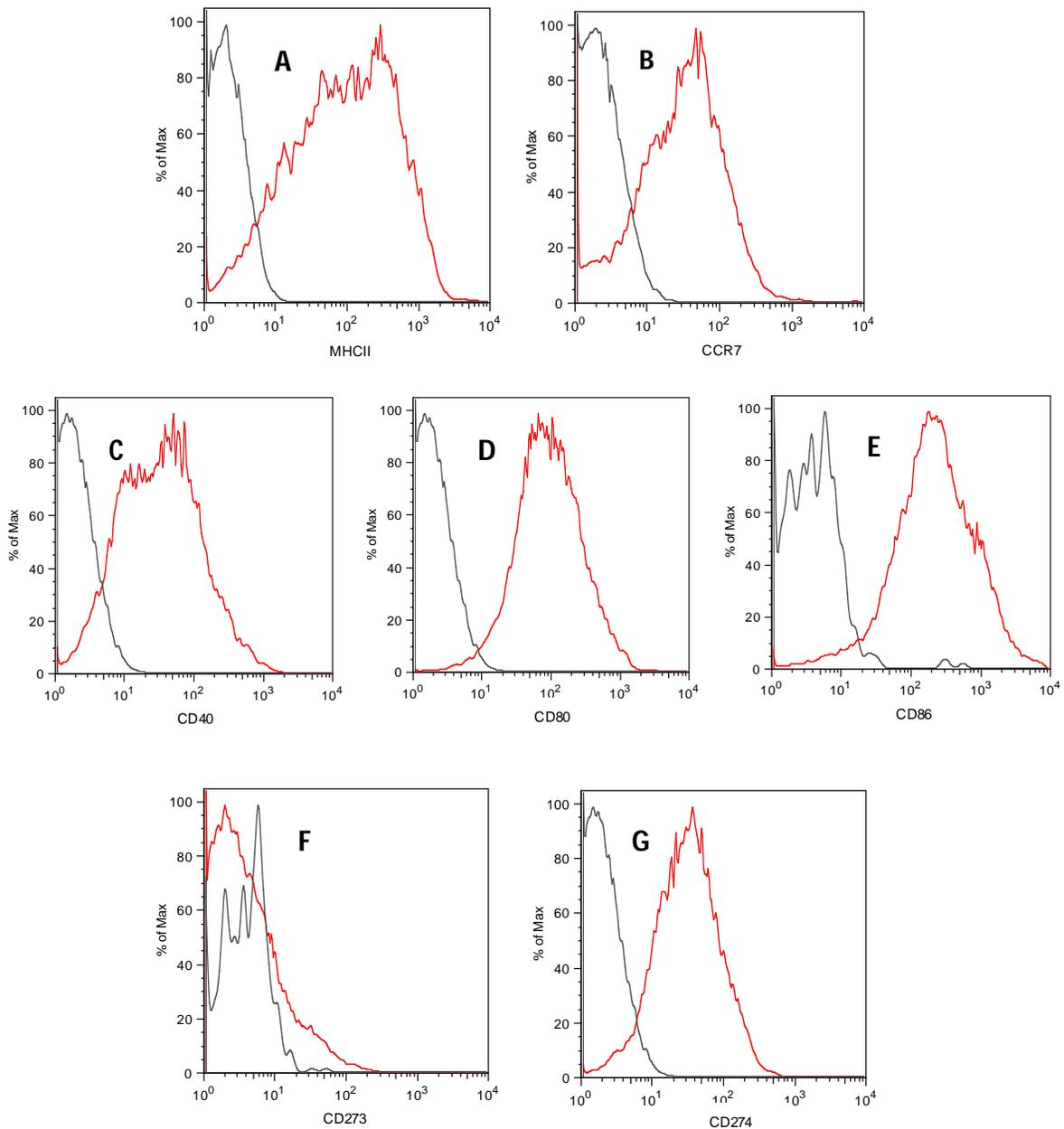


Figura 9. Fenotipo de las células dendríticas obtenidas de cultivos de médula ósea después de diez días de haber sido estimuladas con GM-CSF. Se muestran los histogramas de expresión para cada proteína evaluada. De manera general los histogramas muestran la cantidad de células dendríticas CD11c positivas (representado en porcentaje por el eje y) que expresan con distinta intensidad las proteínas que se evaluaron (cuanto más la población se desplace a la derecha cuanto más aumenta la expresión de la proteína). En color negro se representa el control de isotipo de expresión de la molécula correspondiente, mientras que en color rojo representa las células que están expresando las moléculas: **(A)** MHCII, **(B)** CCR7, **(C)** CD40, **(D)** CD80, **(E)** CD86, **(F)** CD273 y **(G)** CD274.

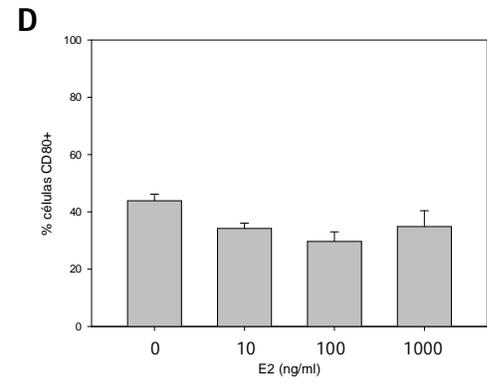
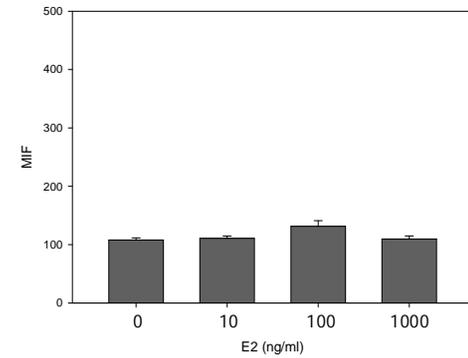
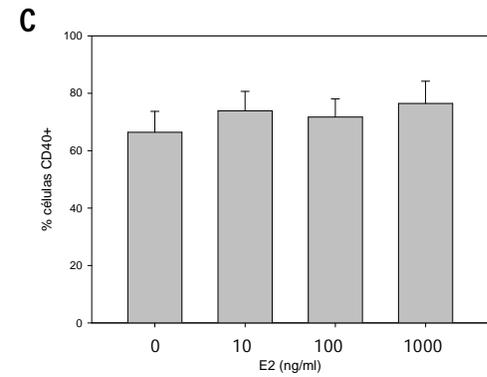
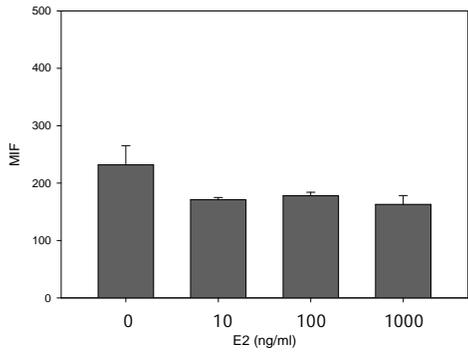
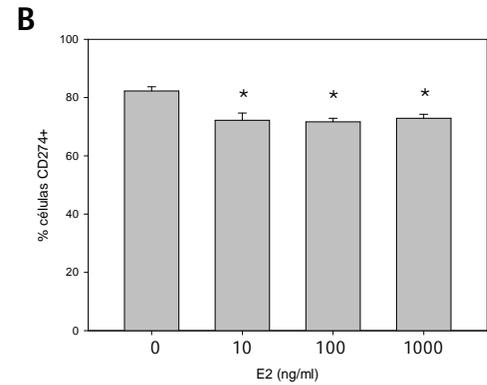
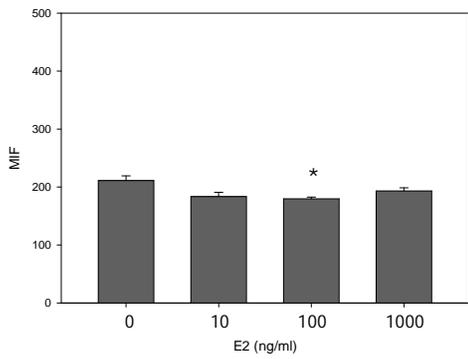
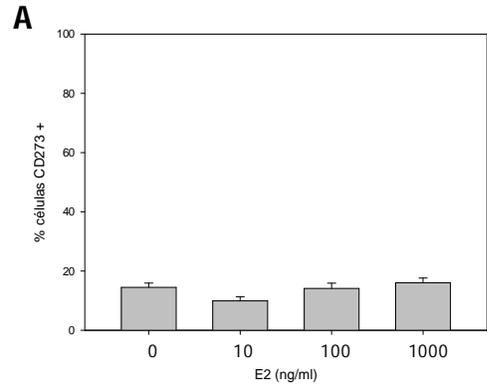
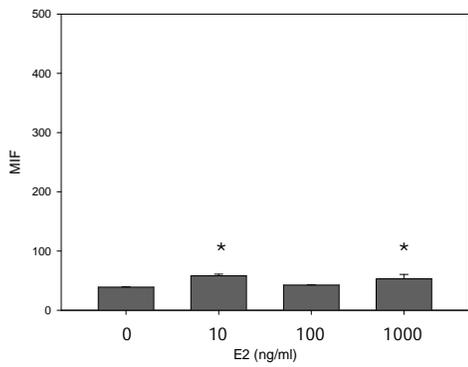
8.4 Efecto de la dosis y el tiempo de respuesta del E₂ en el fenotipo de las CD

8.4.1 Efecto de distintas dosis del 17β-estradiol

Para determinar el efecto de la concentración del E₂ en el inmunofenotipo de las CD y en particular de las moléculas o proteínas CD273 y CD274, se realizó una curva a diferentes dosis de E₂: fisiológicas observadas en el embarazo (10 ng/ml) y suprafisiológicas o farmacológicas (100 y 1000 ng/ml). La concentración de E₂ afectó la expresión estadísticamente significativa de ciertas proteínas (CD273, CD274, MHCII y CD86). El E₂ indujo cambios distintos en las moléculas cuyas diferencias fueron estadísticamente significativas y también en las que no fueron significativas (Fig 10). En el caso de CD273, CD86 y MHCII indujo el incremento de la MIF y por tanto de su expresión. Fue de manera dosis dependiente para CD86 (Fig 10, E), para MHCII existió un incremento a los 100 ng/ml y se mantiene a los 1000 ng/ml (Fig 10, F), y en el caso de CD273 aumenta a los 10 y 1000 ng/ml (Fig 10, A). A una dosis de 100 ng/ml el E₂ disminuyó la expresión significativa de CD274 aunque no de manera dosis dependiente (Fig 10, B). Respecto a las moléculas que no tuvieron diferencias significativas con respecto al control sólo se puede hablar de tendencias, con respecto a la expresión de CD40 y CCR7 tiende a disminuir. En el caso de particular CD40 disminuye en todas las concentraciones de E₂ que se utilizaron (Fig 10, C) y sólo en 100 y 1000 ng/ml para CCR7 (Fig 10, G); en tanto que tiende a aumentar la expresión de CD80 sólo en presencia de 100 ng/ml (Fig 10, D).

Si se compara el porcentaje de células positivas para cada proteína con la MIF (gráficas de la columna derecha, Fig 10), se observa que el E₂ también indujo cambios distintos en la MIF y en el porcentaje de cada molécula. De las moléculas cuyas diferencias en el porcentaje fueron estadísticamente significativas (CD86) y también en las que no (CD273, CD40, CD80) muestran cambios que son contrarios a los observados en la MIF en todas las dosis que se usaron, pero en particular 100 y 1000 ng/ml fueron significativos para CD86, así, el E₂ promovió la existencia de un menor porcentaje de células positivas para CD86, a una concentración de 100 y 1000 ng/ml, pero indujo un aumento en la expresión de cada célula que es positiva para la molécula o proteína (Fig 10, E). En el caso particular de CD274 coincide la disminución en su expresión con la disminución en el porcentaje de células CD274 positivas en todas las dosis de E₂ (Fig 10, B). Con respecto a CCR7, aunque el E₂ no indujo cambios significativos, los cambios observados en la expresión son los mismos en el porcentaje, excepto en 1000 ng/ml de E₂ (Fig 10, G).

Las concentraciones de E₂ que indujeron cambios estadísticamente significativos en mayor proporción, tanto en la expresión como en el porcentaje de células para cada proteína (no se tomó en cuenta si indujo disminución o aumento), fueron 100 y 1000 ng/ml. Debido a que estadísticamente no fueron significativos entre sí, para los experimentos restantes se pudo tomar en cuenta cualquiera de las dos concentraciones, sin embargo debido a que nuestro grupo de trabajo documentó que, en una curva de tiempo, una dosis de 200 ng/ml de E₂ favorece la disminución significativa del número de CL en epidermis de ratón, se utilizó 100 ng/ml de E₂.



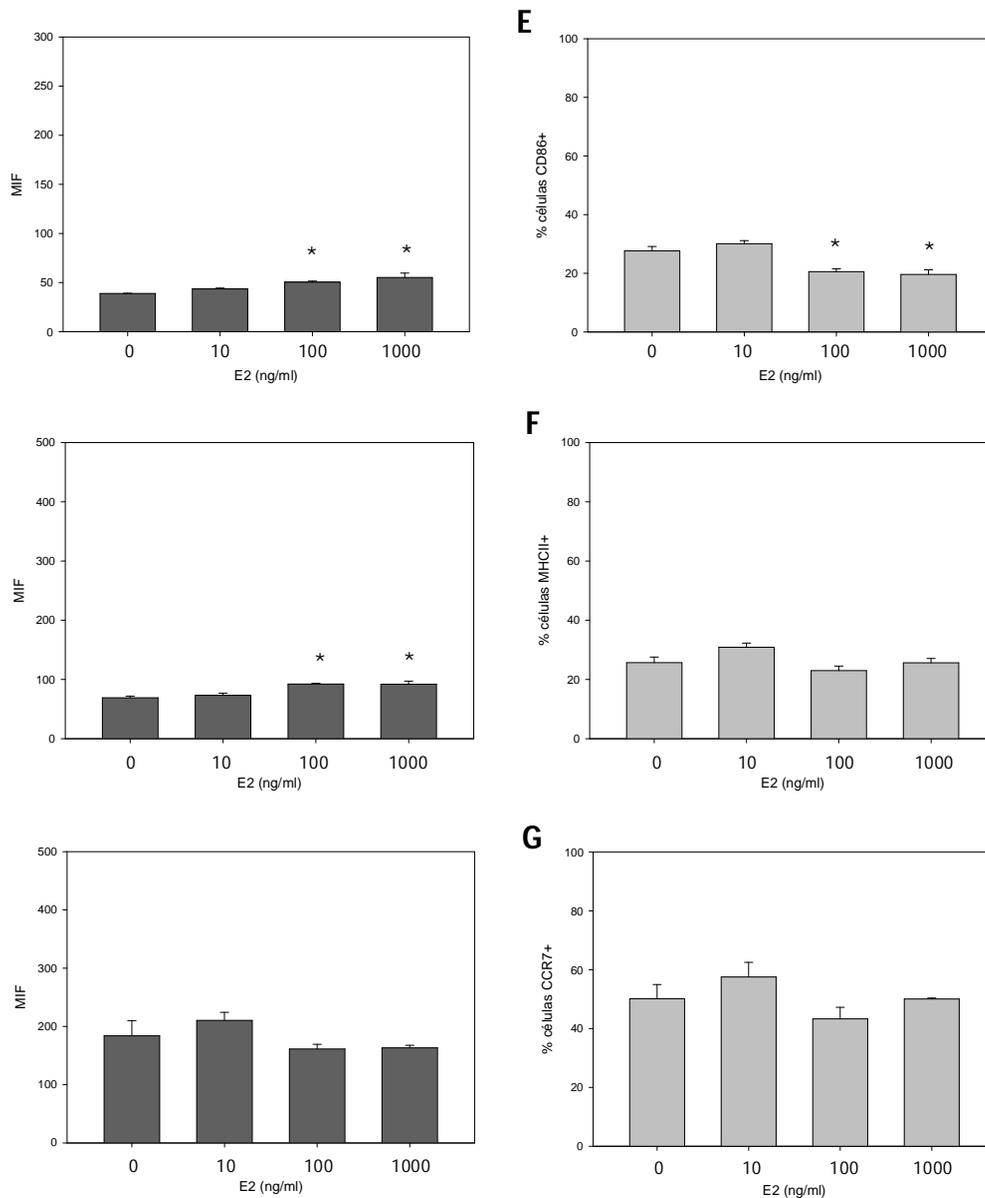


Figura 10. Efecto de la concentración de E₂ en la expresión de las moléculas de coinhibición, coestimulación y maduración en CD derivadas de médula ósea diferenciadas con GM-CSF. Las células dendríticas, cumplido el periodo de diez días de diferenciación, fueron tratadas con distintas dosis de E₂: 10, 100 y 1000 ng/ml durante 24 horas al cabo del tratamiento, se midió mediante citometría de flujo la expresión de cada proteína o molécula. En este grupo de gráficas de barras se representan los datos correspondientes a la media de intensidad de fluorescencia (MIF), columna izquierda, así como el porcentaje de células CD11c positivas que expresan las proteínas evaluadas, columna derecha. **(A)** CD273, **(B)** CD274, **(C)** CD40, **(D)** CD80, **(E)** CD86, **(F)** MHCII y **(G)** CCR7. Las barras representan el promedio \pm el error estándar de tres repeticiones. *p<0.05.

8.4.2 Efecto del tiempo en el fenotipo de las CD

Las CD en cultivo se trataron con una dosis de 100 ng/ml de E₂ durante 1, 2, 12, 24 y 48 horas con el objetivo de determinar si el E₂ modifica la expresión de moléculas de inhibición, coestimulación, maduración y migración de una manera tiempo dependiente.

Moléculas coinhibidoras

El efecto del E₂ en el fenotipo de las CD es dependiente del tiempo. En condiciones basales (previamente estimuladas con GM-CSF, sin E₂ y a las cero horas) las CD expresaron niveles bajos de CD273 y el número de células que lo expresaron es poco (Fig 9, F). Cuando son expuestas a 100 ng/ml de E₂ durante 1, 12, 24 y 48 horas (excepto 2 horas), existió un incremento notable de la MIF de esta molécula, lo cual se traduce en aumento en la expresión de CD273 a las 12 horas, y siguió incrementándose a las 24, hasta llegar a un máximo de expresión a las 48 horas, siendo estos últimos grupos estadísticamente significativos con respecto al control (Fig 11, A). No se observó un cambio significativo en el porcentaje de células CD273 positivas con respecto al tiempo. CD274 se expresó, en condiciones basales, en un porcentaje mayor de CD y en mayor cantidad, en comparación con CD273 (Fig 9, G). En el caso de CD274 se observó un comportamiento similar a lo que ocurre con CD273, puesto que presentó un mayor incremento en la MIF a las 12 horas y este aumento fue proporcional al tiempo de exposición, pues a las 24 y 48 horas siguió aumentando de manera significativa, y se pudo notar que a las 48 horas de expresión aumentó más del doble que el control (Fig 11, B). A diferencia de CD273, el porcentaje de CD274 incrementó significativamente de una manera tiempo dependiente.

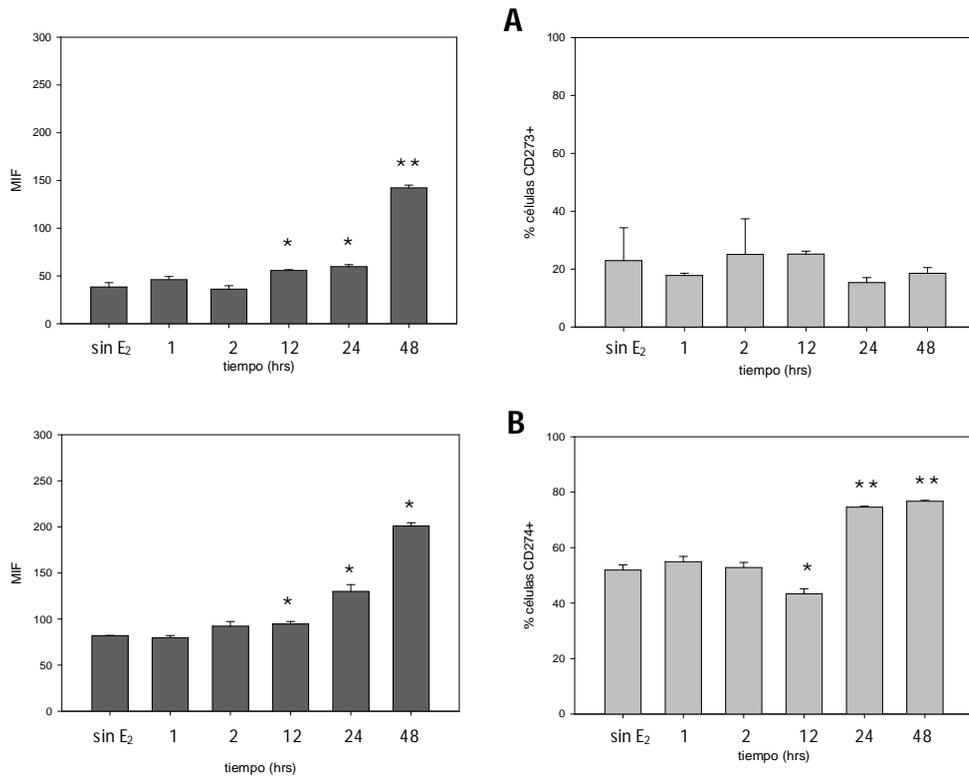


Figura 11. Efecto del tiempo en la expresión de las moléculas coinhibidoras en CD CD11c positivas cuando son tratadas con 100 ng/ml de E₂. En la columna izquierda se muestran gráficas de barras correspondientes al cambio en la media de intensidad de fluorescencia (MIF) con respecto al tiempo, en tanto que la columna derecha representa el porcentaje de CD que expresan las moléculas coinhibidoras: **(A)** CD273 y **(B)** CD274. Las barras representan el promedio \pm el error estándar de tres repeticiones. *p<0.05, **p<0.0001.

Moléculas coestimuladoras

Las gráficas de barras de la MIF para estas moléculas muestran que el E₂ a una concentración de 100 ng/ml promovió igualmente un incremento estadísticamente significativo en la expresión de CD40 y CD80, y dicho efecto es dependiente del tiempo. Analizando los resultados para cada molécula, se observó en las gráficas que la media de intensidad de fluorescencia para CD40 comenzó a incrementarse a las 12 horas, y siguió aumentando a las 24 y 48 horas, en esta última aumentó el triple comparado con el control. El porcentaje de células CD40 positivas aumentó de manera tiempo dependiente, aunque no es estadísticamente significativo (Fig 12, A). El E₂, de la misma manera que CD40, excepto porque el incremento de esta molécula comienza a las 2 horas, indujo un aumento en la expresión y porcentaje de CD80, llegando a un máximo a las 48 horas (Fig 12, B). En cuanto a CD86, el incremento observado a las 48 horas no difiere estadísticamente con respecto al control. En la gráfica de la MIF se observa algo peculiar, a las 12 horas permaneció la expresión comparado con el control, sin embargo a las 24 horas su expresión disminuyó repentinamente y volvió a incrementarse a las 48 horas. Con respecto al porcentaje de células aumenta a las 12 horas y disminuye a las 48 siendo estadísticamente significativo (Fig 12, C).

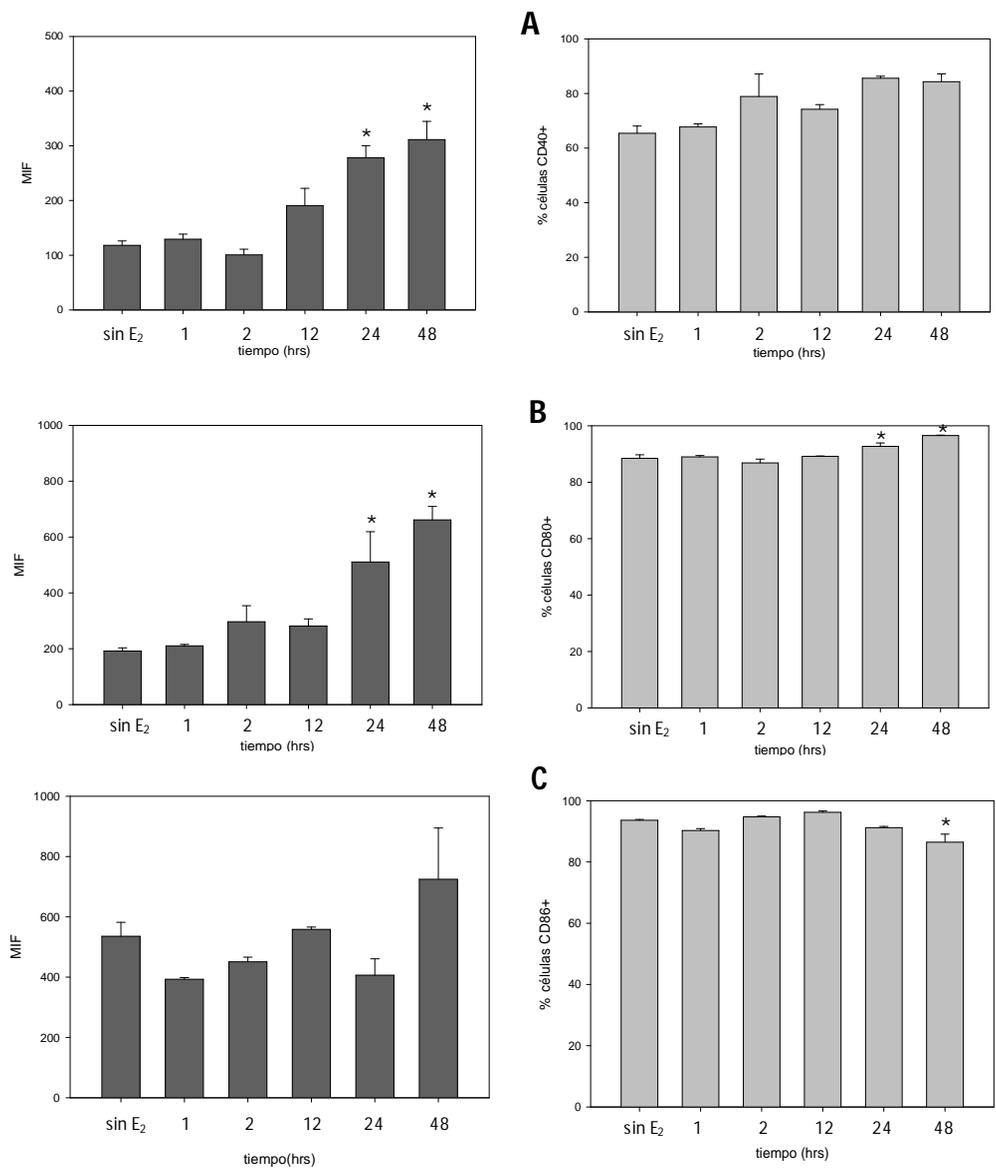


Figura 12. Efecto del tiempo en la expresión de las moléculas coestimuladoras en CD CD11c positivas cuando son tratadas con 100 ng/ml de E₂. En la columna izquierda se muestran gráficas de barras que representan el cambio en la media de intensidad de fluorescencia (MIF) con respecto al tiempo, en tanto que la columna derecha representa el porcentaje de CD que expresan las moléculas coestimuladoras: **(A)** CD40, **(B)** CD80, **(C)** CD86. Las barras representan el promedio \pm el error estándar de tres repeticiones. *p<0.05.

Moléculas de maduración y migración

Al analizar las gráficas correspondientes a las moléculas clase II del MHC se observó que el E₂ también indujo el incremento significativo en la expresión de esta proteína, sin embargo indujo un menor porcentaje de células MHCII positivas a las 48 horas. En condiciones basales las CD presentan niveles medios de las moléculas MHCII, su expresión aumentó en las primeras 2 a 12 horas de haber sido expuestas a E₂, a las 24 horas disminuyó ligeramente el promedio de la intensidad de fluorescencia, sin embargo a las 48 horas su expresión volvió a incrementar casi el doble comparado con el control (Fig 13, A). Aunque los cambios observados en la proteína CCR7 no son estadísticamente significativos, se observó que el E₂ a 100 ng/ml promovió el incremento en su expresión de manera tiempo dependiente (excepto a la primer hora, pues el error estándar es muy grande), sin embargo indujo que disminuyera repentinamente a las 48 horas. Esto mismo se observa en el porcentaje (Fig 13, B).

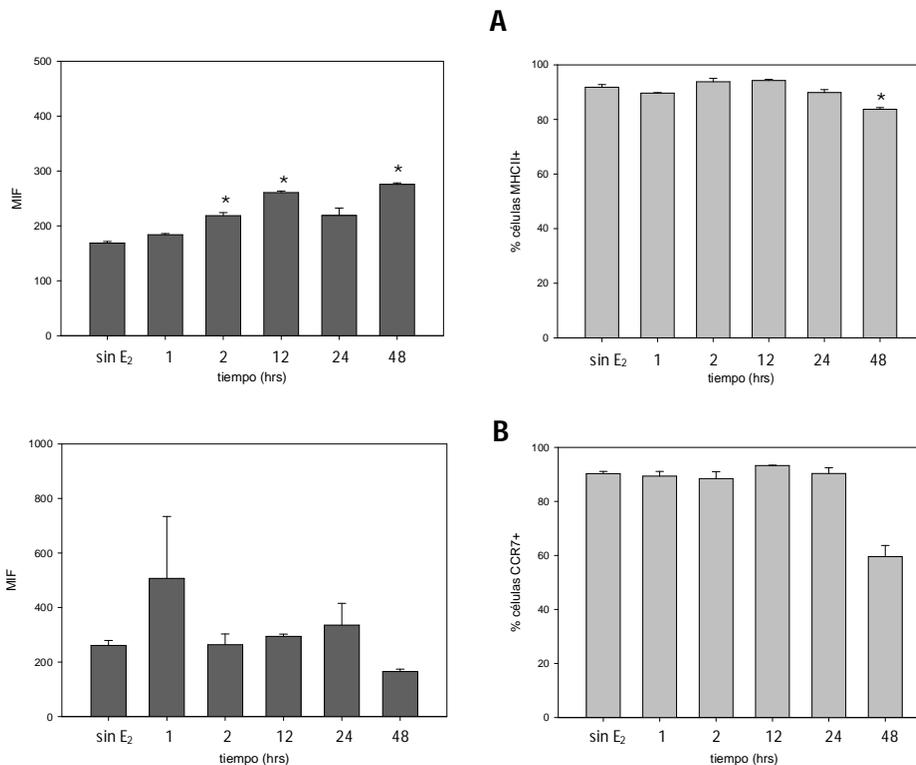


Figura 13. Efecto del tiempo en la expresión de las moléculas de maduración y migración en CD CD11c positivas cuando son tratadas con 100 ng/ml de E₂. En la columna izquierda se muestran gráficas de barras correspondientes al cambio en la media de intensidad de fluorescencia (MIF) con respecto al tiempo de MHCII (A) y CCR7 (B), en tanto que la columna derecha representa el porcentaje de CD que expresan las moléculas correspondientes. Las barras representan el promedio \pm el error estándar de tres repeticiones. *p<0.05.

IX. DISCUSIÓN

En el presente trabajo los resultados muestran que el E₂ es capaz de modificar la expresión de las moléculas coinhibidoras, coestimuladoras y de maduración de las CD derivadas de médula ósea de ratón en una manera dosis y tiempo dependiente.

Existen distintos protocolos que se han desarrollado para la generación de células dendríticas de manera *in vitro*. Los protocolos más usados obtienen precursores de CD a partir de la médula ósea generalmente de animales o bien de monocitos CD14⁺ de sangre periférica de humano, dichos precursores son cultivados con dos citocinas que permiten su diferenciación, GM-CSF o bien con el ligando de la tirosina cinasa Flt3 (Flt3-L) (Belz y Nutt, 2012). Así, en este estudio se lograron generar células dendríticas que se diferenciaron a partir de precursores de médula ósea de ratón usando el factor estimulante de colonia de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), cuya morfología, evaluada al microscopio óptico invertido, corresponde a CD: células grandes, granulosas y con abundantes proyecciones citoplasmáticas (Steinman y Cohn, 1973). Esta morfología ha sido corroborada en trabajos previos en los que se generaron CD empleando esta misma citocina y bajo condiciones similares de cultivo. Por otro lado, en los cultivos de diferenciación hacia CD también existieron otras similitudes con trabajos previos como la presencia de dos poblaciones: adherente o no adherente a la caja de cultivo, la formación de agregados celulares proliferantes que se adhieren laxamente a la caja de cultivo y que se diferencian a CD (Inaba, et al., 1992 y Lutz, et al., 1999).

En el presente trabajo se corroboró que las células obtenidas fueran CD mediante la expresión de CD11c, específico para este tipo celular. El porcentaje de CD CD11c⁺ obtenidas fue del 60%. De acuerdo con los ensayos de nuestro grupo de trabajo y con el trabajo de Lutz, et al., 1999, se obtuvo un porcentaje intermedio de diferenciación. En el estudio de Lutz emplearon algunas condiciones de cultivo que coinciden con las seguidas en este protocolo, como el tiempo de diferenciación, la no selección del cultivo y no eliminar linfocitos B, T y granulocitos, condiciones que favorecen una producción de CD de entre el 80 a 90%. Es posible que en este trabajo no se haya obtenido tal porcentaje debido a que fue distinto la manera en que las células fueron alimentadas ya que en comparación con el trabajo de Lutz, cada 3^{er} día durante 10 días se reemplazó todo el medio, aspirando las CD o sus precursores y volviéndolas a sembrar, pudiendo ocurrir la pérdida de una parte de las células en la centrifugación. Por otro lado, el 60% de CD obtenidas es similar al del trabajo de Inaba, et al., 1992, sin embargo las condiciones de cultivo difieren a las que se siguieron en el presente estudio, como tiempo de diferenciación y la eliminación de las células no adherentes en cada cambio de medio. Por otra parte, la cantidad de GM-CSF (20% v/v) con la que se suplementaron los cultivos fue estandarizada como óptima para la diferenciación de CD, por lo que se descarta que lo anterior haya influido en la obtención de un porcentaje bajo de CD. A pesar de que no se logró obtener una producción alta de CD, el método es consistente y eficiente para la generación masiva de estas células y evita el problema del aislamiento laborioso en cuanto al número de CD obtenidas, además permite la obtención de CD

fenotípicamente homogéneas y con capacidad presentadora de antígenos lo cual permite su estudio y aplicación clínica.

Las CD que fueron generadas con GM-CSF poseen un inmunofenotipo con una cantidad media a alta de moléculas de coinhibidoras, coestimuladoras, maduración y migración. Se ha documentado que el empleo de GM-CSF para diferenciar CD a partir de precursores de médula ósea puede afectar el fenotipo de estas células incrementando la expresión de moléculas coestimuladoras como CD86 (Xu, et al., 2007), CD80 y CD40, además de moléculas clase MHCII. Se ha demostrado que este incremento en la expresión de moléculas coestimuladoras es dependiente del tiempo de exposición al GM-CSF (Lutz, et al., 1999). Las características del inmunofenotipo de las CD en el presente trabajo, en particular el alto porcentaje de CD que expresaron con intensidad media las moléculas clase MHCII, CD80 y CD86, son consistentes con lo observado por Lutz, et al. (1999) y Xu, et al. (2007), ya que los 10 días de exposición a esta citocina, contribuyeron a generar un fenotipo inmaduro. Otros estudios coinciden en que las CD generadas con GM-CSF presentan características funcionales parecidas a las presentadas en condiciones inflamatorias, como la capacidad de producir citocinas proinflamatorias (observado de manera *in vitro*) y que presenten un fenotipo maduro, lo cual las hace inmunogénicas (Belz y Nutt, 2012; Naik, 2008). Por otro lado, es notable la diferencia del patrón de expresión de CD273 y CD274 que se observó en este trabajo (Fig 9 (F y G)), lo que está de acuerdo con lo documentado respecto a la expresión de cada proteína pues CD274 se expresa constitutivamente, mientras que CD273 es inducible *in vitro* por citocinas como IFN γ , IL-4 e IL-13 (Chen, 2004 y Sharpe, et al., 2007).

El E₂ tiene efectos pleiotrópicos sobre las células del sistema inmune, los cuales se manifiestan durante las condiciones fisiológicas y en el desarrollo de respuestas inmunes, esta serie de efectos también incluyen a las CD. En particular se han documentado efectos en CD de humanos y roedores a distintos niveles: producción de citocinas, cambio de fenotipo y funciones efectoras. Muchos de los trabajos coinciden en que el E₂ disminuye la habilidad de hacer proliferar a linfocitos T, además de incrementar citocinas inhibitoras y disminuir proinflamatorias. En un trabajo previo nuestro grupo de trabajo sugirió un efecto inmunosupresor en las CL de piel de ratón, pues el número de ellas disminuyó cuando fueron expuestas a una sola aplicación tópica de E₂, sugiriendo una disminución en la inmunovigilancia cutánea.

En el presente trabajo se evaluó si el E₂ es capaz de modificar el fenotipo de las CD derivadas de médula ósea de ratones; los resultados muestran que el E₂, a diferentes dosis y tiempos, es capaz de modificar la expresión de las moléculas, que en ausencia de la hormona mostraron un nivel de expresión medio. De acuerdo a la curva dosis, cuando las CD fueron tratadas con distintas dosis de E₂ existió una proporción mayor de cambios estadísticamente significativos, en las concentraciones suprafisiológicas de 100 y 1000 ng/ml para CD273 y CD274, CD86, y clase MHCII; sólo en el caso de CD86 se observó aumento en su expresión de una manera dosis dependiente. Se ha reportado que el E₂ tiene efectos en estas concentraciones en CD; trabajos previos han observado efectos en la concentración de E₂ utilizada para la curva de tiempo, 100 ng/ml, (Herrera, et al., 2013). Otros han observado que induce cambios en el fenotipo de CD en una dosis

parecida a la utilizada en el presente trabajo (Yang, et al., 2006; Jiang, et al., 2008). Por otro lado, no se observó un cambio en la expresión de las moléculas de la manera en como fue propuesto en la hipótesis, pues indujo sólo el incremento en la expresión de CD273, en 10 y 1000 ng/ml, pero no de CD274, la cual mostró una disminución significativa en 100 ng/ml. Respecto a lo que se esperaba de las demás moléculas, se observó lo contrario, pues el E₂ indujo el incremento de CD86 y moléculas clase MHCII.

Estudios en farmacodinamia reportan que la interacción de receptores de membrana con su ligando de manera frecuente y continua puede producir cambios en el tipo de unión química ligando-receptor, en el número de receptores disponibles y en la afinidad del agonista con el receptor (Malgor-Valsecia, 2000b); lo anterior explica porque ocurrieron cambios en las concentraciones de 100 y 1000 ng/ml, además del aumento significativo en la expresión de las moléculas, MHCII, CD86 y CD273, se debe a que altas concentraciones de E₂ promueven que los receptores de E₂ (RE) estén ocupados frecuentemente y de manera continua, pues las CD se mantuvieron 24 horas en dichas concentraciones, lo cual podría favorecer la sensibilización de los RE y la síntesis de los mismos generando un proceso de retroalimentación positiva. Por otro lado la disminución en la expresión de CD274 podría deberse a la desensibilización de los RE y que disminuya su síntesis o degradación de los RE (Malgor-Valsecia, 2000b), sin embargo no se ha documentado nada acerca de la relación de los RE y expresión de moléculas coinhibidoras.

De acuerdo a la curva de tiempo realizada con la concentración elegida, el E₂ promueve una disminución de CCR7 a las 48 horas y un incremento significativo en las moléculas MHCII, CD40, CD80, y en particular CD273 y CD274 en CD que fueron tratadas con una concentración de 100 ng/ml, siendo el tiempo de exposición al E₂ un factor determinante en provocar dicho efecto. El aumento en la expresión (MIF) inició a las 12 o 24 horas llegando a un máximo de expresión a las 48 horas, que fue significativo con respecto al control, excepto para CD86. Así, los resultados indicaron que el efecto del E₂ sobre la expresión de las moléculas evaluadas es tiempo dependiente. Analizando el efecto del E₂ en la curva, el tiempo de respuesta del E₂ es más o menos prolongado, pues a las 48 horas se alcanzó un máximo de expresión. El tiempo de respuesta prolongado del E₂ observado en este trabajo tiene relación con otros trabajos en donde mantuvieron las CD con E₂ durante 6 a 7 días, que aunque no se realizó una curva de tiempo, se aprecia que la hormona promueve el mantenimiento de una expresión media a alta de moléculas de maduración y coestimuladoras de manera tiempo dependiente (Paharkova, et al., 2004; Douin-Echinard, et al., 2008; Nalbandian, et al., 2005; Jiang, et al., 2008).

La manera en como se expresaron las moléculas evaluadas con respecto al tiempo, se explica de igual manera con lo mencionado en el párrafo anterior, así las CD que estuvieron en presencia de 100 ng/ml de E₂ (considerada como suprafisiológica o farmacológica), durante 48 horas, favoreció que los receptores presentes en las CD fueran ocupados por el E₂ y ocurriera una respuesta de mayor magnitud, así también la presencia continua de la hormona induce que se promueva la expresión de más receptores para E₂ que a su vez promoverían el incremento en la expresión de las moléculas evaluadas llegando a un máximo de expresión observado a las 48 horas. El tiempo

de respuesta prolongado, 48 horas, probablemente se deba a que la inducción de expresión de las proteínas evaluadas por la unión del E₂ con su receptor, implican procesos que requieren de tiempo, pues la expresión y síntesis de proteínas involucra la activación de todo un repertorio de proteínas de la transcripción (ARNm, polimerasas de ARN, factores de transcripción) y de la traducción (ribosomas, aminoacil ARNt, aminoacil ARNt sintetasas, factores de elongación), además de los procesos post-traduccionales de la proteína y su anclaje a la membrana.

La capacidad del E₂ para modificar la expresión de MHCII, CD40, CD80 y CD86 se confirma con trabajos previos, en los cuales también induce su incremento, en la mayoría utilizan concentraciones fisiológicas, pero también se observa en dosis supra fisiológicas como también se demostró en el presente trabajo (Xie, et al., 2011; Paharkova, et al., 2004; Douin-Echinard, et al., 2008; Nalbandian, et al. 2005; Yang, et al., 2006; Jiang, et al., 2008). Por otra parte, es de destacar que el incremento de CD273 y CD274 inducido por el E₂ de una manera tiempo dependiente en CD derivadas de médula ósea de ratón no se había documentado. Sólo existe un trabajo en que el estriol (E₃), pero no 17β-estradiol, promueve el incremento en la expresión de estas proteínas en CD provenientes de bazo de ratón (Papenfuss, et al., 2011). En contraste con nuestros resultados, se ha documentado que el E₂ no afecta la expresión de CCR7 (Bengtsson, et al., 2004). La disminución de la expresión de CCR7 inducida por el E₂ podría deberse a la producción de IL-10, que aunque no se cuantificó en el presente estudio se ha documentado que esta hormona induce su expresión y producción en CD de bazo o derivadas de células mononucleares de sangre periférica (véase antecedentes), en este sentido en un estudio se documentó que el incremento de esta citocina promueve la disminución en la expresión de CCR7 (Ato, et al., 2002).

En los estudios que confirman el incremento de moléculas coestimuladoras y MHCII demostraron que dicho efecto es mediado por los RE en CD, en particular los RE α , ya que la administración del antagonista de los receptores de estrógenos (ICI 182,780), moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (raloxifen o tamoxifen) o bien de ratones que carecen de los RE α , provoca que disminuya la expresión de MHCII, CD40, CD86 (Paharkova, et al., 2004; Douin-Echinard, et al., 2008; Nalbandian, et al. 2005; Jiang, et al., 2008). De acuerdo a lo anterior, el incremento observado en la expresión de moléculas coestimuladoras y MHCII probablemente se deba a que el E₂ está afectando, a través de los receptores de estrógenos, las vías de señalización que inducen la expresión de las proteínas evaluadas en el presente trabajo. Aunque no hay trabajos de la interacción de RE con vías de señalización que inducen la expresión de las proteínas evaluadas, si se ha reportado que el E₂ induce la expresión de CD40 en CD vía dos MAP cinasas: p38 y JNK, excepto la MAP cinasa ERK. La activación de estas dos MAP cinasas induce la expresión de otra proteína involucrada en la replicación (MCM6) que a su vez incrementa la expresión de CD40, sin embargo en este estudio no se exploró qué tipo de RE estaban actuando (Xie, et al., 2011). La participación de las MAP cinasas en la expresión de las moléculas coestimuladoras (CD40, CD80 y CD86) en CD plasmotocitoides se confirma en un artículo de revisión (Gilliet, et al., 2008). Los RE no transcripcionales señalizan vía ERK, por otro lado, se sabe que la MAP cinasa ERK (cinasa regulada por señales extracelulares, por sus siglas en inglés) está

relacionada con la inhibición de las CD ya que suprime la expresión de CD86 y MHCII en CD derivadas de monocitos (Puig-Kröger, et al., 2001), tomando en cuenta esto, los RE no transcripcionales podrían estar activando las MAP cinasas p38 y JNK.

De acuerdo al paradigma de maduración de las CD o también llamado paradigma de las células de Langerhans (Villadangos y Heath, 2005; Sousa, 2006), *"las CD inmaduras presentes en tejido linfoide y no linfoide son capaces de captar y procesar antígenos, cuando reciben señales de activación/inflamatorias (por ejemplo PAMPs, señales de daño o citocinas inflamatorias) ocurre el proceso de maduración, en el cual disminuye la capacidad de captar y procesar antígenos, y se promueve la migración a ganglios linfáticos en donde inician una respuesta con linfocitos T promoviendo su activación"*.

Para explicar cómo sucede esto, se comenzó a explorar el fenotipo y funciones efectoras de las CD, encontrando que el proceso de maduración está relacionado con las características fenotípicas de las CD, de tal manera que un fenotipo maduro en las CD (cantidad alta de MHCII, CD40, CD80, CD86) está relacionado con su capacidad de iniciar una respuesta de tipo T_H o "inmunogénica", ya que los niveles altos de dichas proteínas proporcionan las dos señales necesarias para estimular a linfocitos T o dar lugar a respuestas T_H , o bien las CD con fenotipo inmaduro (cantidad baja de coestimuladoras y MHCII, por tanto incapaces de dar la primer y segunda señal) en primera instancia no pueden activar a linfocitos T induciendo así tolerancia inmunológica, si bien esto llega a ocurrir, se ha documentado que CD generadas *in vitro* con un fenotipo maduro no necesariamente puede producir una respuesta inmunogénica, es decir que se induzcan respuestas dependientes de linfocitos T cooperadores o citotóxicos (Sousa, 2006).

En concordancia con lo anterior, se ha denominado un nuevo estado en las CD al que llaman semimaduro (algunos autores refieren las características de las CD semimaduras con cantidad intermedia de MHCII, CD40, CD80 y CD86 (Ezzelarab y Thomson, 2011), en tanto que otros autores con niveles altos de fagocitosis, cantidad alta de moléculas coestimuladoras y moléculas clase II, producción de IL-10 (aunque éste no es un requerimiento necesario) y nula de citocinas proinflamatorias, IL-12, IL-6, $TNF\alpha$ (Adalid, et al., 2011; Lutz y Schuler, 2002,)), estas CD semimaduras, obtenidas de manera *in vitro* y estimuladas con $TNF\alpha$ o microorganismos, (*Bordetella pertussis* o lactobacilos) o $TNF\alpha$ más IL-1 β , IL-6, pueden inducir tolerancia a través del incremento de las Treg CD4⁺ CD25⁺ e IL-10 (Fu, et al., 2010), así como promover la producción de IL-10 en linfocitos T CD4⁺ (Menges, et al., 2002) y también la expansión de las Treg que expresan Foxp3, además del incremento de esta proteína Foxp3 en dichas células (Banerjee, et al., 2006).

Las CD activadas alternativamente (CD manipuladas que recibieron un estímulo inflamatorio (LPS, TLRs) después de un tratamiento con citocinas antiinflamatorias o corticoesteroides y presentan cantidades medias de MHCII, CD40, CD80 y CD86) que se resisten a madurar ante estímulos inflamatorios y por tanto pueden inducir tolerancia mediante distintos mecanismos: inhibiendo proliferación de linfocitos T e incrementando la producción de IL-10 (Anderson, et al., 2008).

Tomando en cuenta lo mencionado y la capacidad del E₂ para modificar la expresión del inmunofenotipo en las CD, aunque no de la manera en que se propuso en la hipótesis (niveles altos de coinhibidoras y bajos de coestimuladoras y maduración, que caracteriza a las CD tolerogénicas clásicas (Morelli y Thomson, 2007), sin embargo sí favorece un fenotipo maduro, (un fenotipo maduro incluye también el incremento de CD273 y CD274, además de las ya conocidas MHCII, CD40, CD80 y CD86) que potencialmente podría inducir tolerancia o inmunosuprimir la respuesta inmune en la interacción con linfocitos T, si se toman en cuenta las siguientes consideraciones según los resultados obtenidos. Aunque el E₂ provoca el incremento de marcadores de maduración y coestimulación, también existe un incremento en la expresión de las moléculas CD273 y CD274 en presencia del E₂, en el caso de CD274 también induce un incremento del porcentaje de células que expresan esta proteína. El aumento en la expresión de CD273 y CD274 en células dendríticas y su unión con PD-1 está relacionado con la inhibición de la activación de linfocitos T (en cuanto a disminución de su proliferación y producción de citocinas proinflamatorias como IFN γ , IL-4 (Brown, et al., 2003; Latchman, et al. 2004; Zhang, et al., 2006) y por consiguiente induce tolerancia en células T, además de la formación y mantenimiento de la función de Treg mediante el incremento de Foxp3 (Francisco, et al., 2009). En concordancia con el efecto tolerogénico/inhibidor de estas dos moléculas, otro estudio documenta que CD específicas para el antígeno de mielina que fueron transfectadas para que expresen una cantidad alta de CD274 contribuye a la disminución de la respuesta autoinmune que se desencadena en la esclerosis múltiple en un modelo murino, disminuyendo la proliferación de linfocitos T específicos para el antígeno y el infiltrado de macrófagos y linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (Hirata, et al., 2005).

Por otro lado, el incremento significativo en la expresión y porcentaje de CD CD80 positivas (CD86 también se incrementó aunque no significativamente) inducido por el E₂ también podría contribuir a generar inhibición o atenuación en la actividad de los linfocitos T, en tanto que estas moléculas se unan a CTLA-4 en linfocitos T. En particular estudios de cristalografía revelan que CD80, en comparación con CD86, tiene más afinidad por CTLA-4 que por CD28 (Collins, et al., 2005), lo cual sugiere de acuerdo a los resultados que se favorecería la unión con CTLA-4 porque hay un incremento de CD80, sin embargo esto depende también de la cantidad de CTLA-4 en la superficie membranal de linfocitos T así como de factores ambientales (citocinas, quimiocinas, etc.). La unión de CD80 a CTLA-4 como se mencionó suprime las respuestas de células T y contribuye a la inducción de tolerancia a través de la activación de Treg (CTLA-4 se expresa en estas células) (Chen, 2004) y esta unión también induce la producción deIDO, importante en la inducción de tolerancia, aunado a esto se ha documentado que el E₂ también contribuye a la producción deIDO (Xiao, et al. 2004; Petterson, et al., 2004 y Zhu, et al, 2007). Por otro lado la presencia de CD80 y/o CD86 y su unión con sus receptores es importante en el mantenimiento de las Treg y en la conversión de linfocitos T CD4⁺ a Treg con fenotipo CD4⁺ CD25⁺ (Liang, et al., 2005; Salomon, et al., 2000).

A pesar de que CD40 esta relacionado con respuestas inmunogénicas en linfocitos T, el incremento en el porcentaje y expresión de CD40 en CD en presencia de E₂, podría contribuir a la

tolerancia. Existe un trabajo que documenta un papel inmunosupresor, pues los ratones deficientes de CD40 tienen un menor número de Treg en timo, sangre y bazo, además contribuye a la homeostasis y sobrevivencia de estas células (Guiducci, et al., 2005). La presencia del MHC en la coestimulación es importante ya que las señales inhibitoras o estimuladoras dadas por las proteínas de la familia B7 dependen de la unión del MHC con un TCR (Chen, 2004), así que el incremento en la expresión de MHCII en las CD expuestas a E₂ favorece la estimulación de linfocitos T independientemente de que se den señales inhibitoras o estimuladoras. Respecto a CCR7 y tomando en cuenta un trabajo en el que se documenta que el E₂ induce la migración de CD pero es independiente de la expresión de CCR7 (Bengtsson, et al., 2004), por lo que aunque el E₂ induzca que disminuya su expresión a las 48 horas éstas CD podrían migrar e inducir tolerancia con el fenotipo que presentan en el presente trabajo, mediante otros mecanismos como el incremento de otros receptores de quimiocinas como CXCR4 que también se expresa en CD maduras con alérgenos (Rivas, y García, 2009).

El fenotipo de las CD, hablando en particular de las proteínas evaluadas en el presente trabajo, puede modificarse dependiendo de los estímulos ambientales. El balance de expresión, inducido por el E₂, de moléculas coestimuladoras, coinhibidoras y de maduración podría modular respuestas selectivas regulando así distintos tipos de células T o bien regular distintos estados durante la activación de células T (Zhu, et al., 2011), así las CD con fenotipo maduro no necesariamente contribuye a una respuesta inmunogénica (Sousa, 2006), sino que puede dar lugar a tolerancia en células T; esto nos lleva a decir que el tipo de fenotipo no siempre determina la funcionalidad o el tipo de respuesta proporcionada por las CD, en cambio existen otros factores que intervienen en el tipo de respuesta que se desarrollará como tipo de citocinas, el microambiente, el tipo de estímulos, entre otros factores.

Recapitulando, debido a la capacidad de las CD de inducir distintas respuestas, y que de manera *in vitro* puedan manipularse, las CD generadas en el presente trabajo, al expresar una cantidad media a alta de CD273 y CD274, así como de coestimuladoras (CD80, CD40) y de MHCII, podrían ser usadas en el tratamiento de distintas condiciones clínicas como enfermedades autoinmunes (esclerosis múltiple y alergias), así como para la inducción de tolerancia en el trasplante de injertos (ejemplos piel, corazón, riñón e hígado) y prolongar su sobrevivencia, o bien evitar la enfermedad del hospedero contra el injerto (GVHD). Con respecto al trasplante de injertos se ha documentado que las CD con fenotipo maduro, así como CD activadas alternativamente, los dos tipos con niveles medios de coestimuladoras contribuyen a prolongar la vida y mantener la tolerancia de los injertos por sí solas (Fu, et al., 2010; Anderson, et al., 2008) o con la adición de agonistas de CTLA-4 (CTLA-4 Ig) (Lan, et al., 2006). Se requieren realizar más estudios en las CD obtenidas en este modelo de cultivo para observar las citocinas que liberan en presencia de E₂ y si se relaciona con un estado semimaduro.

X. CONCLUSIONES

De acuerdo al protocolo de diferenciación seguido en el presente trabajo se logró obtener de manera *in vitro* CD que expresan con una intensidad media moléculas coinhibidoras, coestimuladoras, de maduración y migración sin presencia de la hormona.

El 17 β -estradiol es capaz de modificar de manera significativa el fenotipo cuando se usan dosis de 100 y 1000 ng/ml de E₂, aumentando la expresión de CD273, CD274 (sólo hubo cambio en 100 ng/ml), y MHCII aunque no de manera dosis dependiente; sólo se observó un efecto dosis dependiente para la proteína CD86. El E₂ también induce el incremento significativo de manera tiempo dependiente en la expresión de CD273, CD274, CD40, CD80 y MHCII. Se logró establecer una curva en la cual se alcanza un máximo de expresión a las 48 horas para estas moléculas, aunque en el caso de CCR7 el E₂ indujo su disminución repentina en dicho tiempo.

El E₂ promueve que las CD adquieran un fenotipo maduro (que expresan con una intensidad cantidad media a alta CD273, CD274, CD40, CD80 y MHCII) que potencialmente promovería tolerancia inmunológica por la unión de CD273 y CD274 con su receptor PD-1 o bien CD80 y/o CD86 con CTLA-4 en linfocitos T, que se ha documentado estos dos receptores pueden actuar sinérgicamente y/o diferencialmente. Por otro lado, se encontró que el E₂ afecta a otros miembros de la familia B7 relacionados con el desarrollo de una respuesta inmune inhibidora, CD273 y CD274, en CD derivadas de médula ósea de ratón.

XI. PERSPECTIVAS

Para complementar la curva de tiempo del presente trabajo convendría cultivar las CD con E₂ durante más tiempo (72 y 96 horas) horas con el objetivo de observar si sigue aumentando la expresión de las proteínas evaluadas, así como cuantificar si incrementa la citocina TGFβ, IL-10, IL-12 en CD en presencia de E₂, y si entonces recuerdan al estado semimaduro que se caracteriza por tener una cantidad alta de proteínas coestimuladoras y de MHCII y no producir citocinas proinflamatorias.

Así también para comprobar el efecto inmunosupresor de las CD, se podría realizar un cocultivo de las CD (previamente tratadas con E₂) y linfocitos T en presencia de un antígeno (MAGE), y evaluar su proliferación, posteriormente dichas CD serían inyectadas en un ratón con melanoma, para observar si el tamaño del tumor aumenta y medir la presencia de células Treg.

Por otro lado, también sería conveniente realizar más estudios primero para comprobar, que en nuestro modelo, el E₂ está induciendo el incremento de CD273 y CD274 vía RE, lo cual podría realizarse cultivando a las CD en presencia de E₂ con el antagonista de los RE o bien con anticuerpos que bloqueen los receptores de estrógenos.

Para profundizar en el mecanismo molecular por el cual se afecta la expresión de CD273 y CD274 podría investigarse, que tipo de RE (clásicos con efectos genómicos, receptores con efectos no genómicos o GPR30) están actuando y si estos activan las proteínas p38 y JNK, o que otras proteínas se están activando en la vía de señalización de los RE.

Las CD generadas en presencia del 17β-estradiol en el presente estudio podrían probarse en un modelo murino y luego en seres humanos, así, de manera *in vitro* se generarían CD, se tratarían con E₂ para posteriormente ser usadas en el tratamiento de enfermedades autoinmunes como esclerosis múltiple, así como para la inducción de tolerancia en el trasplante de órganos o injerto y con ello contribuir a la preservación de los mismos (ejemplos de trasplantes: piel, corazón, hígado, riñón, pulmón).

XII. REFERENCIAS

- Abbas K. y Lichtman A. **Inmunología celular y molecular**. 5ª ed. Elsevier, 2004. 563 pp.
- Adalid, L., Fragoso G., Fleury A. y Scitutto E. **Mechanisms underlying the induction of regulatory T cells and its relevance in the adaptive immune response in parasitic infections**. International Journal of Biological Sciences, 2011. 7(9):1412-1426.
- An, J., Ribeiro R. C., Webb P., Gustafsson J.A., Kushner P. J., Baxter J. D. y Leitman D. C. **Estradiol repression of tumor necrosis factor- α transcription requires estrogen receptor activation function-2 and is enhanced by coactivators**. Proceedings of the National Academy of Science, 1999.96:15161–15166.
- Anderson, A. E, Sayers B. L., Haniffa M. A., Swan D. J., Diboll J., Wang X. N., Isaacs J. D. y Hilkenset C. **Differential regulation of naive and memory CD4+ T cells by alternatively activated dendritic cells**. Journal of Leukocyte Biology, 2008. 84:124–33.
- Ansar, S. **The immune system as a potential target for environmental estrogens (endocrine disrupters): a new emerging field**. Toxicology, 2000. 150:191-206.
- Arellano, S. y Silva R. **Reemplazo hormonal, función cognitiva y memoria**. Revista de Endocrinología y Nutrición, 2006. 14(3):185-190.
- Ato, M., Stäger S., Engwerda C. y Kaye P. **Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis**. Nature Reviews of Immunology, 2002. 3 (11): 1185-1191.
- Banerjee, D. K., Dhodapkar M. V., E. Matayeva, Steinman R. M. y Dhodapkar K. M. **Expansion of FOXP3^{high} regulatory T cells by human dendritic cells (DCs) *in vitro* and after injection of cytokine-matured DCs in myeloma patients**. Blood Journal, 2006. 108: 2655-2661
- Banchereau, J. y Steinman R. **Dendritic cells and the control of immunity**. Nature, 1998. 392:254-252.
- Belz, G. y Nutt S. **Transcriptional programming of the dendritic cell network**. Nature Reviews Immunology, 2012. 101:113
- Bengtsson, A., Ryan E., Giordano D., Magaletti D. y Clark E. **17 β -Estradiol (E₂) modulates cytokine and chemokine expression in human monocyte-derived dendritic cells**. Blood Journal, 2004. 104: 1404-1410.
- Bouman A., Heineman M. y Faas M. **Sex hormones and the immune response in humans**. Human Reproduction Update, 2005.11 (4): 411–423.
- Brown, J., Dorfman D., Ma F., Sullivan E., Munoz O., Wood C., Greenfield E. y Freeman G. **Blockade of Programmed Death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production**. Journal of Immunology, 2003, 170: 1257–1266.

Brunsing, R., Hathaway H. y Prossnitz E. **Signaling through the membrane-bound estrogen receptor GPR30 induces IL-10 and IL-17A expression in Th17 cells.** Journal of Immunology, 2010. 184:139.

Cella, M. **Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation.** Journal of Experimental Medicine, 1996.184:747-752.

Collins, M., Ling V. y Carreno B. **The B7 family of immune-regulatory ligands.** Genome Biology, 2005. 6:223.

Chen, L. **Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of the T cell immunity.** Nature Reviews Immunology, 2004. 4:336-347.

Crawford A. y Wherry J. **The diversity and inhibitory receptor pathways and regulation of antiviral T cell responses.** Current Opinion in Immunology, 2009. 21:179-186.

Dahlman, K., Cavailles V., Fuqua S., Jordan V., Katzenellenbogen J., Korach K., Maggi A., Muramatsu M., Parker M. y Gustafsson J. **Estrogen Receptors.** International Union of Pharmacology. LXIV. Pharmacological Reviews, 2006. 58:773–781.

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

Douin-Echinard, V., Laffont S., Seillet C., Delpy L., Krust A., Chambon P., Gourdy P., Arnal J. y Guéry J. **Estrogen Receptor α , but not β , is required for optimal dendritic cell differentiation and of CD40-induced cytokine production.** Journal of Immunology, 2008.180: 3661–3669.

Dronca, R. S., Markovic S., Holtan S. y Porrata L. **Neuro-endocrine-immune crosstalk and implications for cancer therapy.** Journal of Cell Science and Therapy, 2011. 2(2): 1-7.

Ezzelarab, M. y Thomson A.W. **Tolerogenic dendritic cells and their role in transplantation.** Seminars of Immunology, 2011. YSMIM-818. 1-12.

Fox, H. S., Bond B. L. y Parslow T. G. **Estrogen regulates the IFN-gamma promoter.** Journal of Immunology, 1991. 146(12):4362-4367.

Francisco, L., Salinas V., Brown K., Vanguri V., Freeman G., Kuchroo V. y Sharpe A. **PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells.** Journal of Experimental Medicine, 2009. 206 (13): 3015-3029

Fu, B., He X., Yub S., HuA., Zhang J., MaaY., Tam N. y Huang J. **A tolerogenic semimature dendritic cells induce effector T-cell hyporesponsiveness by activation of antigen-specific CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells that promotes skin allograft survival in mice.** Cellular Immunology, 2010.261: 69–76.

Fu, X. y Simoncini T. **Extra-nuclear signaling of estrogen receptors**. IUBMB Life, 2008. 60(8): 502–510.

Geissmann, F., Manz M., Jung S., Sieweke M., Merad M. y Ley K. **Development of monocytes, macrophages and dendritic cells**. Science, 2010.327(5966): 656–661.

Gilliet, M., Cao W. y Liu Y. **Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases**. Nature Reviews of Immunology, 2008.8: 594-606.

Gilmore W., Weiner L. P. y Correale J. **Effect of estradiol on cytokine secretion by proteolip protein-specific T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects**. Journal of Immunology, 1997.158: 446-51.

González, D., Brito B., Rodríguez M., González A., Díaz N. y Cabrera de León A. **Sex hormones and autoimmunity**. Immunology Letters, 2010. 133: 6–13

Guiducci C., Valzasina B., Dislich H. y Colombo M. P. **CD40/CD40L interaction regulates CD4⁺ CD25⁺ Treg homeostasis through dendritic cell-produced IL-2**. European Journal of Immunology, 2005. 35: 557–567.

Guyton, A. y J. Hall. 2001. **Tratado de Fisiología Médica**. 10^a ed. Mc Graw-Hill Interamericana, México. pp. 1122-1125.

Granucci, F., Zanoni I., Feau S. y Ricciardi P. **Dendritic cell regulation of immune responses: a new role for interleukin 2 at the intersection of innate and adaptive immunity**. The EMBO Journal, 2003. 22(11):2546-2551.

Granucci, F. y Zanoni I. **The dendritic cell life cycle**. Cell Cycle, 2009. 8(23):3816-3821.

Grimaldi, C., Michael D. y Diamond B. **Cutting edge: expansion and activation of a population of autoreactive marginal zone B cells in a model of estrogen-induced lupus**. Journal of Immunology, 2001.167:1886-1890.

Grimaldi, C. Cleary J., Dagtas S., Moussai D. y Diamond B. **Estrogen alters thresholds for B cell apoptosis and activation**. Journal of Clinical Investigation, 2002. 109 (12): 1625-1633.

Hammes, S. y Levin E. **Extranuclear steroid receptors: nature and actions**. Endocrine Reviews, 2007. 28(7):726–741.

Hayashi T., Yamada K., Esaki T., Muto E., Chaudhuri G. e Iguchi A. **Physiological concentrations of 17 β -estradiol inhibit the synthesis of nitric oxide synthase in macrophages via a receptor mediated system**. Journal of Cardiovascular Pharmacology, 1998.31: 292–298.

Heldring, N., Pike A., Andersson S., Matthews J., Cheng G., Hartman J., Tujague M., Ström A., Treuter E., Warner M. y Gustafsson J. **Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets**. Physiological Reviews, 2007.87: 905–931.

Herrera, M., Castell A., Lemini C., Ávila M. y Hernández B. **Epidermal Langerhans cell depletion by epicutaneous of 17 β -estradiol**. Enviado, 2013. 1-20.

Hirata, S., Senju S., Matsuyoshi H., Fukuma D., Uemura Y. y Nishimura Y. **Prevention of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by transfer of embryonic stem cell-derived dendritic cells expressing Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein peptide along with TRAIL or Programmed Death-1 Ligand.** Journal of Immunology, 2005.174: 1888-1897.

Huck, B., Steck T., Habersack M., Dietl J. y Kämmerer U. **Pregnancy associated hormones modulate the cytokine production but not the phenotype of PBMC-derived human dendritic cells.** European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology, 2005.122: 85–94

Inaba, K., Inaba M., Romani N. Aya H., Deguchi M., Ikehara S., Muramatsu S. y Steinman R. **Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with Granulocyte/Macrophage Colony-stimulating Factor.** Journal of Experimental Medicine, 1992.176: 1693-1702.

Jiang, B., Sun L., Hao S., Li X., Xu Y. y Hou Y. **Estrogen modulates bone marrow-derived DCs in SLE murine model-(NZBxNZW) F1 female mice.** Immunological Investigations. 2008, 37:227-243.

Kapsenberg, M. **Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization.** Nature Reviews Immunology, 2003. 3: 984-993

Karpuzoglu, E., Fenaux J. B., Phillips R. A., Lengi A. J., Elvinger F. y Ansar S. A. **Estrogen up-regulates inducible nitric oxide synthase, nitric oxide and cyclooxygenase-2 in splenocytes activated with T Cell stimulants: role of interferon- γ .** Endocrinology, 2006.147(2):662–671.

Kooten, C. y Banchereau J. **CD40-CD40 ligand.** Journal of Leucocyte Biology, 2000.67:2-17.

Kovats, S. y Carreras E. **Regulation of dendritic cell differentiation and function by estrogen receptor ligands.** Cellular Immunology, 2008.252: 81-90.

Kumar, R., Zakharov M. N., Khan S. H., Miki R., Jang H., Toraldo G., Singh R., Bhasin S. y Jasuja R. **The dynamic structure of the Estrogen Receptor.** Journal of Amino Acids, 2011. 1-7.

Kurebayashi, S., Miyashita Y., Hirose T., Kasayama S., Akira S., Kishimoto T. **Characterization of mechanisms of interleukin-6 gene repression by estrogen receptor.** Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 1997. 60:11–17.

Kyurkchiev, D., Todorova E., Hayrabedian S., Altankova I. y Kyurkchiev S. **Female sex steroid hormones modify some regulatory properties of monocyte-derived dendritic cells.** American Journal of Reproductive Immunology, 2007.58: 425-433.

Lan, Y., Wang Z., Raimondi G., Wu W., Colvin B. L., Creus A. y Thomson A. W. **"Alternatively Activated" dendritic cells preferentially secrete IL-10, expand Foxp3⁺ CD4⁺ T cells, and induce long-term organ allograft survival in combination with CTLA4-Ig.** Journal of Immunology, 2006. 177:5868-5877.

Lang, T. **Estrogen as an immunomodulator.** Clinical Immunology, 2004. 113: 224-230.

Latchman, Y. Wood C. R., Chernova T., Chaudhary D., Borde M., Chernova I., Iwai Y., Long A. J., Brown J. A., Nunes R., Greenfield E. A., Bourque K., Boussiotis V. A., Carter L., Carreno B., Malenkovich N., Nishimura H., Okazaki T., Honjo T., Sharpe A. y Freeman G. J. **PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation.** Nature Immunology, 2001. 2(3): 261-268.

Lehtonen A., Matikainen S., Miettinen M. y Julkunen I. **Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-induced STAT5 activation and target-gene expression during human monocyte/macrophage differentiation.** Journal of Leukocyte Biology, 2002.71: 511-519.

Leitner, J. Grabmeier K. y Steinberger P. **Receptors and ligands implicated in human T cell costimulatory processes.** Immunology Letters, 2010. 89-97.

Lélu, K., Laffont S., Delpy L., Paulet P., Périnat T., Tschanz S., Pelletier L., Engelhardt B. y Guéry J. **Estrogen receptor α signaling in T lymphocytes is required for estradiol-mediated inhibition of T_H1 and T_H17 cell differentiation and protection against Experimental Autoimmune Encephalomyelitis.** Journal of Immunology, 2011.187: 2386-2393.

Levin, E. **Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen.** Molecular Endocrinology, 2005. 19(8): 1951–1959.

Liang, S., Alard P., Zhao Y., Parnell S., Clark S. y Kosiewicz M. **Conversion of $CD4^+$ $CD25^+$ cells into $CD4^+$ $CD25^+$ regulatory T cells in vivo requires B7 costimulation, but not the thymus.** Journal of Experimental Medicine, 2005. 201 (1): 127-137.

Lipscomb, M. y Masten B. **Dendritic cells: immune regulators in health and disease.** Physiological Reviews, 2002.82: 97–130.

Liu, H., Buenafe A., Matejuk A., Ito A., Zamora A., Dwyer J., Vandenbark A. y Offner H. **Estrogen Inhibition of EAE Involves Effects on Dendritic Cell Function.** Journal of Neuroscience Research, 2002.70: 238–248.

Lutz, M., Kukutsch N., Ogilvie A., Röβner S., Koch F., Romani N. y Schuler G. **An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow.** Journal of Immunological Methods, 1999. 223: 77–92.

Maldonado, R. y Andrian U. **How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells.** Advances in Immunology, 2010. 108:111-165.

Malgor, L.A. y Valsecia, M. **Farmacología Médica. Capítulo 26: Farmacología de las hormonas sexuales femeninas.** 2000a. Recurso electrónico. Disponible en: http://med.unne.edu.ar/catedras/farmacologia/temas_farma/volumen2/cap26_femen.pdf

Malgor, L.A. y Valsecia, M. **Farmacología Médica. Capítulo 3: Farmacología General: Farmacodinamia.** 2000b. Recurso electrónico. Disponible en: http://med.unne.edu.ar/catedras/farmacologia/temas_farma/volumen1/cap3_farmacodinam.pdf

Mao A., Paharkova V., Hardy J., Miller M. y Kovats S. **Estrogen selectively promotes the differentiation of dendritic cells with characteristics of Langerhans cells.** Journal of Immunology, 2005.175: 5146-5151.

Maret A., Coudert J.D., Garidou L., Foucras G., Gourdy P., Krust A., Dupont S., Chambón P., Druet P., Bayard F., Guery J.C. **Estradiol enhances primary antigen-specific CD4⁺ T cell responses and Th1 development in vivo. Essential role of estrogen receptor alpha expression in hematopoietic cells.** European Journal of Immunology, 2003, 33: 512–21.

Masanori, A. y Thomson A. **Influence of immunosuppressive drugs on dendritic cells.** Transplant Immunology, 2003. 11: 357-365.

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

McKay, L. y Cidlowski J. **Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor- κ B and steroid receptor-signaling pathways.** Endocrine Reviews, 1999. 20(4): 435-459.

Menges, M., Rößner S., Voigtländer C., Schindler H., Kukutsch N., Bogdan C., Erb K., Schuler G. y Lutz M. **Repetitive Injections of Dendritic Cells Matured with Tumor Necrosis Factor alfa Induce Antigen-specific Protection of Mice from Autoimmunity.** Journal of Experimental Medicine, 2002. 195 (1): 15-21.

Merad M. y Manz M. **Dendritic cell homeostasis.** Journal of Blood, 2009. 113: 3418-3427.

Morelli, A. y Thomson A. **Tolerogenic dendritic cells and the quest of transplant tolerance.** Nature Reviews Immunology, 2007. 7: 610-621.

Murphy, A., Guyre P. y Pioli P. **Estradiol suppresses NF- κ B activation through coordinated regulation of let-7a and miR-125b in primary human macrophages.** Journal of Immunology, 2010. 1-9.

Naik, S. H. **Demystifying the development of dendritic cell subtypes, a little.** Immunology and Cell Biology, 2008. 1–14.

Nalbandian G., Paharkova-Vatchkova V., Mao A., Nale S., Kovats S. **The selective estrogen receptor modulators, tamoxifen and raloxifene, impair dendritic cell differentiation and activation.** Journal of Immunology, 2005. 175:2666–2675.

Paharkova-Vatchkova, V., R. Maldonado, and S. Kovats. **Estrogen preferentially promotes the differentiation of CD11c⁺ CD11b^(intermediate) dendritic cells from bone marrow precursors.** Journal of Immunology, 2004. 172: 1426–1436.

Papenfuss, T., Powell N., McClain M., Bedarf A., Singh A., Gienapp I., Shawler T. y Whitacre C. **Estriol generates tolerogenic dendritic cell in vivo that protect against autoimmunity.** Journal of Immunology, 2011. 186:1-10.

Parry, R., Chemnitz J. M., Frauwirth K. A., Lanfranco A. R., Braunstein I., Kobayashi S. V., Linsley P. S., Thompson C. B. y Riley J. L. **CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms.** Molecular and Cellular Biology, 2005. 25(21): 9543–9553.

Pettersson A., Ciumasa C., Chirsky V., Linka H., Huang Y. y Xiao B. **Dendritic cells exposed to estrogen in vitro exhibit therapeutic effects in ongoing experimental allergic encephalomyelitis.** Journal of Neuroimmunology, 2004. 156: 58–65.

Polanczyk, M., Jones R., Subramanian S., Afentoulis M., Rich C., Zakroczymski M., Cooke P., Vandenbark A. y Offner H. **T lymphocytes do not directly mediate the protective effect of Estrogen on Experimental Autoimmune Encephalomyelitis.** American Journal of Pathology, 2004a. 165(6): 2069-2077.

Polanczyk, M., Carson B., Subramanian S., Afentoulis M., Vandenbark A., Ziegler S. y Offner H. **Cutting edge: estrogen drives expansion of the CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cell compartment.** Journal of Immunology, 2004b.173:2227-2230

Prossnitz, E., Arterburn, J. y Sklar, L. **GPR30: a G protein-coupled receptor for estrogen.** Molecular Cellular of Endocrinology, 2007. 265-266: 138–142.

Puig-Kröger, A., Relloso M., Fernández O., Zubiaga A., Silva A., Bernabéu C. y Corbi A. **Extracellular signal-regulated protein kinase signaling pathway negatively regulates the phenotypic and functional maturation of monocyte-derived human dendritic cells.** Blood Journal, 2001. 98 (7): 2175-2182

Rescigno, M., Martino M., Sutherland C. L., Gold M. R., y Ricciardi-Castagnoli P. **Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways.** Journal of Experimental Medicine, 1998. 188(11): 2175–2180.

Rivas, A., y García E. **Características e implicaciones terapéuticas de las células dendríticas.** El Residente, 2009. 4(3): 97-104.

Salem, M., Matsuzaki G., Kishihara K., Madkour G. A. y Nomoto K. **β-estradiol suppresses T cell-mediated delayed type hypersensitivity through suppression of antigen-presenting cell function and Th1 induction.** International Archives of Allergy Immunology, 2000.121: 161–9.

Sallusto, F. y Lanzavecchia A. **The instructive role of dendritic cells on T-cells responses.** Arthritis Research, 2002. 4 (3):S127-S132.

Salomon, B., Lenschow D.J., Rhee L., Ashourian N., Singh B., Sharpe A. y Bluestone J.A. **B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes.** Immunity, 2000. 12: 431–440.

Sato, K. y Fujita S. **Dendritic cells-nature and classification.** Allergology International, 2007. 56:183-191.

Satpathy, A., Murphy K. y Wumesh K. **Transcription factor networks in dendritic cell development.** Seminars in Immunology, 2011. 23:388-397.

Segerer, S. E., Müller N., Brandt J., Kapp M., Dietl J., Reichardt H. M., Rieger L. y Kämmerer U. **Impact of Female Sex Hormones on the Maturation and Function of Human Dendritic Cells.** American Journal of Reproductive Immunology, 2009.62: 165-172.

Sharpe, A., Wherry J., Ahmed R. y Freeman G. **The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection.** Nature Immunology, 2007. 8 (3):239-245.

Shi, Y., Liu C., Roberts A., Das J., Xu G., Ren G., Zhang Y., Zhang L., Yuan Z., William H., Das G. y Devadas S. **Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know.** Cell Research, 2006. 16: 126-133.

Simoncini, T. y Genazzani A. **Non-genomic actions of sex steroid hormones.** European Journal of Endocrinology, 2003.148: 281–292.

Simpson, E.R. **Sources of estrogen and their importance.** The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2003. 86(3-5):225-230.

Slawek, A., Maj T. y Chelmonska-Soyta A. **Antigen presenting cells costimulatory signaling during pre-implantation pregnancy.** Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 2012.66: 674-682.

Sousa C. R. **Dendritic cells in a mature age.** Nature Reviews Immunology, 2006.6: 476-483.

Stefano, G. B., Prevot V., Beauvillain J., Fimiani C., Welters I., Cadet P., Breton C., Pestel J., Salzet M. y Bilfinger T. **Estradiol coupling to human monocyte nitric oxide release is dependent on intracellular calcium transients: evidence for an estrogen surface receptor.** Journal of Immunology, 1999.163: 3758-3763.

Stefano, G. B., Cadet P., Breton C., Goumon Y., Prevot V., Dessaint J., Beauvillain J., Roumier A., Welters I. y Salzet M. **Estradiol stimulated nitric oxide release in human granulocytes is dependent on intracellular calcium transients: evidence of a cell surface estrogen receptor.** Blood Journal, 2000.95:3951–3958.

Steinman, R. y Cohn Z. **Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice.** The Journal of Experimental Medicine, 1973. 137: 1142-1162.

Straub, R. **The complex role of estrogens in inflammation.** Endocrine Reviews, 2007. 28(5):521–574.

Thornton, M. J. **The biological actions of estrogens on skin.** Experimental Dermatology, Blackwell Munksgaard, 2002. 11: 487–502.

Togno, C. y Montor J. **Esteroides sexuales e inmunidad: el papel del estradiol sobre las células dendríticas.** Revista de Investigación Clínica, 2009. 61(6):521-532.

Tseng, S., Otsuji M., Gorski K., Huang X., Slansky J., Pai S., Shalabi A., Shin T., Pardoll D., Tsuchiya H. **B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells.** Journal of Experimental Medicine, 2001. 193:839-846.

Uemura, Y., Liu T., Narita Y., Suzuki M. y Matsushita S. **17 β -estradiol (E₂) plus tumor necrosis factor- α induces a distorted maturation of human monocyte-derived dendritic cells and promotes their capacity to initiate T-helper 2 responses.** Human Immunology, 2008.69: 149-157.

Ueno, H., Banchereau J., Klechevsky E., Morita R., Aspod C., Cao T., Matsui T., Di Pucchio T., Connolly J., Fay J. W., Pascual V. y Palucka K. **Dendritic cell subsets in health and disease.** Immunological Reviews, 2007. 219: 118–142.

Villadangos, J. A. y Heath W. R. **Life cycle, migration and antigen presenting functions of spleen and lymph node dendritic cells: Limitations of the Langerhans cells paradigm.** Seminars in Immunology, 2005. 17: 262–272.

Wan, Y. y Flavell R. **How diverse-CD4 effector T cell and their functions.** Journal of Molecular Cell Biology, 2009. 1-16.

Wang, C., Dehghani B., Li Y., Kaler L., Proctor T., Vanderbark A. y Offner H. **Membrane estrogen receptor regulates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis through up-regulation of Programmed Death-1.** Journal of Immunology, 2009.182: 3294-3303.

Whitacre, C., Reingold S., O'Looney P., Blankenhorn E., Brinley F., Collier E., Duquette P., Fox H., Giesser B., Gilmore W., Lahita R., Nelson J., Reiss C., Riskind P. y Voskuhl R. **A gender gap in autoimmunity.** Science, 1999. 283(5406): 1277-8.

Wira, C., Fahey J., Ghosh M., Patel M., Hickey D. y Ochiel D. **Sex hormone regulation of innate immunity in the Female Reproductive Tract: the role of epithelial cells in balancing reproductive potential with protection against sexually transmitted pathogens.** American Journal of Reproductive Immunology, 2010.63:544-565.

Wu, L. y Liu Y. **Development of dendritic-cell lineages.** Immunity Reviews, 2007. 26: 741-750.

Xiao, B. Liu, X. y Link, H. **Antigen-specific T cell functions are suppressed over the estrogen-dendritic cell-indoleamine 2, 3-dioxygenase axis.** Steroids, 2004.69:653-659.

Xie, H., Hua C., Sun L., Zhao X., Fan H., Dou L. y Hou Y. **17 β -estradiol induces CD40 expression in dendritic cells via MAPK signaling pathways in minichromosome maintenance protein 6-dependent manner.** Arthritis and Rheumatism, 2011. 63(8):2425-2435.

Xing, D., Oparil S., Yu H., Gong K., Feng W., Black J., Chen Y. y Nozell S. **Estrogen modulates NF κ B signaling by enhancing I κ B α levels and blocking p65 binding at the promoters of inflammatory genes via Estrogen Receptor- β .** PLOS ONE, 2012. 7(6):1-10.

Xu, Y., Zhan Y., Lew A. M., Naik S. H. y Kershaw M. H. **Differential development of murine dendritic cells by GM-CSF versus Flt3 ligand has implications for inflammation and trafficking.** Journal of Immunology, 2007.179:7577-7584.

Yang, L., Hu Y. y Hou Y. **17 β -estradiol regulates the numbers, endocytosis, stimulative capacity and IL-10 secretion of mouse spleen dendritic cells.** Toxicology Letters, 2005. 155:239–246.

Yang, L., Hu Y. y Hou Y. **Effects of 17 β -estradiol on the maturation, nuclear factor kappa B p65 and functions of murine spleen CD11c-positive dendritic cells.** *Molecular Immunology*, 2006.43:375-366.

Zarnani, A., Moazzeni S., Shokri F., Salehnia M. y Tehrani M. **Kinetics of murine decidual dendritic cells.** *Journal of the Society for Reproduction and Fertility*, 2007. 133: 275–283.

Zhang, Y., Chung Y., Bishop C., Daugherty B., Chute H., Holst P., Kurahara C., Lott F., Sun N., Welcher A. y Dong C. **Regulation of T cell activation and tolerance by PD-L2.** *PNAS Immunology*, 2006. 103 (31): 11695–11700.

Zhu, W., Lu C., Huang Y, Link H. y Xiao B. **A putative mechanism on remission of multiple sclerosis during pregnancy: estrogen-induced indoleamine 2, 3-dioxygenase by dendritic cells.** *Multiple Sclerosis*, 2007. 13: 33-40.

Zhu, Y., Yao S. y Chen L. **Cell surface signaling molecules in the control of immune responses: a tide model.** *Immunity*, 2011. 34: 466-478.

PubMed. Gene. *National Center for Biotechnology Information*. Recurso electrónico. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Fecha de consulta: enero de 2013.