



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

Cátedra de Inmunología. Departamento de Microbiología, Inmunología y Biotecnología — Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral "Prof. Dr. R. A. Margni (IDEHU, UBA-CONICET)

***Modulación dopaminérgica del sistema inmune cutáneo. Efectos de sustancias disruptoras endócrinas***

**Lic. Andrea Cecilia Parrado**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

**Directora:** Dra. Estela B. Rey

**Directora Adjunta:** Dra. Andrea Canellada

2018

Algunos de los resultados de este trabajo de tesis forman parte de las siguientes publicaciones:

- ☞ **Dopamine agonists upregulates IL-6 and IL-8 production in keratinocytes cell line. Implication of beta adrenergic and dopaminergic receptors.** Parrado AC, Canellada A, Gentile T, Rey-Roldán EB. *Neuroimmunomodulation*. 2012; 19 (6):359-66.
  
- ☞ **Agonistas dopaminérgicos y su impacto en la secreción de IL-6 e IL-8 en queratinocitos.** Parrado AC, Canellada A, Gentile T, Rey-Roldán Estela B. *Revista Saegre*. 2013; 20 (3): 5-11.
  
- ☞ **Differential response of dopamine mediated by  $\beta$ -adrenergic receptors in human keratinocytes and macrophages: potential implication in wound healing.** Parrado AC, Salaverry LS, Mangone FM, Apicella CE, Gentile T, Canellada A, Rey-Roldán E. *Neuroimmunomodulation*. 2017;24(4-5):282-289.

*A mi hijo Valentín*

*“La satisfacción radica en el esfuerzo, no en el logro. El esfuerzo total es una victoria completa”*

*Mahatma Gandhi*

A la Dra. Estela Rey-Roldán, quien confió en mí desde un principio, primero para realizar mi tesis de licenciatura y, luego con la tesis de doctorado. Gracias por darme la oportunidad de conocer y querer el mundo de la neuroinmunoendocrinología. Gracias por el apoyo brindado en momentos muy difíciles

A la Dra. Andrea Canellada, que sin sus aportes y consejos esta tesis y el desarrollo de la misma durante todos estos años no hubiera sido posible. Gracias por dejarme ser una más del grupo.

A la Dra. Teresa Gentile, aunque hoy en día ya no forma parte del grupo, gracias por haberme abierto las puertas hace muchos años, por sus consejos y su continuo cariño.

Al Dr. Emilio Malchiodi, director del IDEHU, gracias por permitirme trabajar cómodamente en el instituto, algo que no ocurre muchas veces.

A la Facultad de Farmacia y Bioquímica, por aceptarme como doctorando y, en particular, a la Cátedra de Inmunología por aceptarme y permitirme desarrollar mi trabajo diario de investigación y docencia, una parte de mí que no conocía. Gracias a los docentes que pertenecen a la cátedra por haberme inspirado en el lindo mundo de la docencia.

A mis compañeros y amigos de laboratorio, a Lu, Franco, Agus (*peque*), quienes fueron un gran apoyo durante y parte de esta tesis, por su paciencia, su amistad y ayuda en la realización de muchos experimentos. Gracias por las largas horas que compartimos en el laboratorio.

A la Maru, Ailen, Brenda, y Mati Molina, gracias por haber estado presentes para un consejo, un mate o algún reactivo. Gracias porque su compañía hizo que ir al laboratorio todos los días sea un placer.

A Lu, Ailen, Pri, Mari, July, Marian, Mati y el Lime, algunos que están y otros que no, gracias por sus consejos experimentales, por prestarme muchas veces reactivos y por haber estado incondicional al lado mío en momentos muy complicados y que si no hubiera sido por sus charlas, consejos, ayuda y amistad dentro y fuera del laboratorio, todo hubiera más difícil.

A todos los becarios del IDEHU: Por las charlas y mates, las risas y todos los afters compartidos.

A mis amigos de exactas y naturales, con quienes compartí largas horas de estudio y charlas y continua la amistad.

A mis tíos, Cristina y Oscar, por brindarme su apoyo continuamente en todas las etapas de la carrera y de la vida.

A mi madrina, sé que estarías muy orgullosa de mi, siempre estás conmigo.

A mis primos, por haberme apoyado en la elección de mi carrera.

A Marcelo, que desde siempre estuvo a mi lado, apoyándome y comprendiendo esta loca carrera que elegí hace muchos años. Gracias por haber compartido cada paso que fui dando, con los éxitos y los fracasos en todos los aspectos de la vida. Gracias porque junto a Valentin, formamos una hermosa familia. Gracias por ayudarme en esta última etapa de escritura que fue bastante complicada con Valen estando en el medio. Simplemente Gracias.

A mis suegros, Maria Rosa y Pichi, gracias por haber estado presente en muchos momentos de la vida y por querer y cuidar a Valentin.

A mi padres, Alicia Y Quique, quienes desde un principio me permitieron vivir esta experiencia siempre apoyándome y guiándome. Gracias por sus consejos en el estudio y en la vida,

son mi ejemplo a seguir. Gracias por ser excelentes padres, pero sobretodo por ser increíbles abuelos.

A mi hijo Valentin, que es la luz de mis ojos, gracias por hacerme descubrir la mejor profesión, el de ser mama. Todo vale la pena al tuyo.

Muchas Gracias a Todos

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABREVIATURA</b> .....	5
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	7
<b>1. EL SISTEMA NEURO-INMUNO-ENDOCRINO</b> .....	8
<b>2. DOPAMINA: FUNCIONES CENTRALES</b> .....	11
<b>3. EL SISTEMA DOPAMINÉRGICO Y LA RESPUESTA INMUNE</b> .....	13
<b>4. EL SISTEMA INMUNE CUTÁNEO</b> .....	15
4.1. Queratinocitos. El rol de los TLRs en la cicatrización de heridas.....	18
4.2. Macrófagos.....	20
4.3. Mediadores inflamatorios. Su rol en la reparación tisular.....	21
4.3.1. Interleuquina-6.....	21
4.3.2. Interleuquina-8. ....	22
4.3.3. Interleuquina-1 $\beta$ .....	23
4.3.4. Metaloproteasas de matriz (MMPs).....	23
<b>5. EL SISTEMA CATECOLAMINÉRGICO EN LA PIEL</b> .....	24
<b>6. DIRSRUPTORES ENDOCRINOS</b> .....	27
<b>6.1 BISFENOL A</b> .....	28
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	32
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	34
1. Cultivos celulares .....	35
1.1. Línea celular HaCaT.....	35
1.2. Línea celular THP-1 .....	35
2. Aplicación de estímulos.....	36
3. Evaluación de diferentes parámetros celulares y moleculares sobre queratinocitos y macrófagos en respuesta a distintos estímulos.....	37
3.1. Ensayos de viabilidad y proliferación celular.....	37
3.1.1. Determinación de viabilidad celular por el método de WST-1.....	37
3.1.2. Ensayo de viabilidad celular por medición de la liberación de Lactato deshidrogenasa.....	37
3.1.3. Determinación de la proliferación celular.....	38.
3.2. Determinación de la producción de citoquinas.....	38
3.3. Medición de la expresión del factor de transcripción NF $\kappa$ B.....	38

3.4. Análisis de la actividad enzimática de MMPs.....	39
3.5. Ensayo de la herida <i>in vitro</i> .....	40.
3.6. Preparación de medios condicionados .....	40
3.7. Evaluación de la producción de Especies Reactivas del Oxígeno y Oxido Nítrico.....	41
4. Análisis estadístico.....	42

## RESULTADOS

### I. Efecto inmunomodulador de agonistas dopaminérgicos sobre queratinocitos

<b>HaCaT y macrófagos THP-1.....</b>	<b>44</b>
I.A. Estudio del efecto modulador de agonistas dopaminérgicos sobre la línea celular humana de queratinocitos HaCaT.....	45
1. Efecto de agonistas dopaminérgicos sobre la producción de citoquinas en queratinocitos humanos.....	45
2. Participación de receptores dopaminérgicos y $\beta$ -adrenérgicos en respuesta a la dopamina en queratinocitos humanos.....	48
2.1. Efecto del antagonista dopaminérgico sulpirida sobre la producción de IL-6 e IL-8 inducida por agonistas dopaminérgicos .....	48
2.2. Efecto del antagonista $\beta$ -adrenérgico propranolol sobre la producción de IL-6 e IL-8 inducida por agonistas dopaminérgicos.....	49
3. Efecto de dopamina sobre la expresión del factor NF $\kappa$ B. ....	50
4. Efecto de dopamina sobre la migración de queratinocitos humanos.....	51
5. Participación de las MMPs en la respuesta a dopamina en queratinocitos humanos.....	53
IB. Estudio del efecto modulador de dopamina sobre la línea celular humana de macrófagos THP-1 .....	54
1. Efecto de dopamina sobre la producción de citoquinas en macrófagos THP-1. ....	54
2. Efecto de dopamina sobre la expresión de NF $\kappa$ B en macrófagos. THP-1.....	56
3. Efecto de dopamina sobre la actividad de MMPs en macrófagos THP-1. ....	57
4. Efecto de dopamina sobre la producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno en macrófagos THP-1. ....	58
4.1. Efecto de dopamina sobre la producción de anión superóxido en macrófagos THP-1 .....	59

4.2. Efecto de dopamina sobre la producción de nitritos macrófagos	
THP-1 .....	60
<b>CONCLUSIONES I .....</b>	<b>61</b>
<b>II. Estudio del efecto de dopamina sobre la interacción entre queratinocitos</b>	
<b>HaCaT y macrófagos THP-1.....</b>	<b>62</b>
II.1. Evaluación de la migración de queratinocitos en presencia del MC	
de macrófagos THP-1. ....	63
II.2. Efecto de los MC de macrófagos THP-1 sobre la producción de mediadores	
proinflamatorios en queratinocitos humanos.....	64
<b>CONCLUSIONES II.....</b>	<b>67</b>
<b>III. Participación de los receptores tipo Toll (TLRs) en respuesta a dopamina</b>	
<b>en queratinocitos HaCaT.....</b>	<b>68</b>
III.1. Efecto de dopamina sobre la migración de queratinocitos en presencia	
un agonista de TLR3 .....	69
III.2. Efecto de dopamina sobre la actividad de la MMP-9 en presencia de un	
agonista de TLR3 en queratinocitos HaCaT.....	70
III.3. Efecto de dopamina sobre la producción de citoquinas en presencia de	
un agonista de TLR3 en queratinocitos HaCaT .....	71
<b>CONCLUSIONES III.....</b>	<b>73</b>
<b>IV. Estudio del efecto inmunomodulatorio del disruptor endócrino BPA sobre</b>	
<b>queratinocitos y macrófagos, en ausencia y presencia de dopamina.....</b>	<b>74</b>
<b>IV.A. Efectos de BPA en queratinocitos humanos HaCaT.....</b>	<b>75</b>
A.1.1. Efecto de BPA 24 hs sobre la producción de IL-6 e IL-8 en	
queratinocitos humanos .....	75
A.1.2. Efecto de BPA sobre la producción de IL-6 e IL-8 por queratinocitos	
humanos, en presencia de dopamina.....	76
A. 2. Efecto de BPA 10 días sobre la acción de dopamina en queratinocitos	
humanos .....	78
A.2.1. Efecto de dopamina sobre la producción de IL-6 e IL-8 en queratinocitos	
humanos previamente cultivados con BPA durante 10 días .....	78
A.2.2. Efecto de dopamina sobre la expresión de NFκB en queratinocitos	
humanos previamente cultivados con BPA 10 días .....	79
A.2.3. Efecto de dopamina sobre la actividad de MMPs en queratinocitos	
humanos previamente cultivados con BPA 10 días .....	80
<b>IV.B. Efectos de BPA en macrófagos THP-1.....</b>	<b>81</b>

B.1.1 Efecto de BPA 24 hs sobre la producción de citoquinas proinflamatorias en macrófagos THP-1.....	81
B.1.2. Efecto de BPA sobre la producción de IL-8 e IL-1 $\beta$ en los macrófagos THP-1, en presencia de dopamina.....	83
B.2. Efecto de BPA 10 días sobre la acción de dopamina en macrófagos humanos THP-1 .....	84
B.2.1. Efecto de dopamina sobre la producción de citoquinas proinflamatorias en macrófagos THP-1 cultivados con BPA durante 10 días .....	84
B.2.2. Efecto de dopamina sobre la expresión de NF $\kappa$ B en macrófagos THP-1 previamente cultivados con BPA 10 días.....	85
B.2.3. Efecto de dopamina sobre la actividad de MMPs en macrófagos THP-1 previamente cultivados con BPA 10 días .....	86
<b>CONCLUSIONES IV.....</b>	<b>88</b>
<b>DISCUSION.....</b>	<b>89</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>	<b>107</b>

# ***RESUMEN***

En los últimos años se revalorizó la idea de que el estado de salud se logra cuando hay un equilibrio psico-neuro-inmuno-endocrino. Células de los sistemas nerviosos, endocrino e inmune pueden sintetizar neurotransmisores, hormonas y citoquinas, así como sus respectivos receptores. Entre los neurotransmisores, la catecolamina dopamina no solo tiene un importante rol a nivel del sistema nervioso central regulando la actividad locomotora, cognitiva y comportamental, sino que puede modular funciones de glándulas endócrinas centrales. Además, se lo ha considerado un neurotransmisor clave entre el sistema nervioso y el sistema inmune, así como un mediador producido y liberado por las propias células inmunes, que, junto con las catecolaminas adrenalina y noradrenalina, puede modular diferentes procesos inmunológicos.

La piel constituye la primera barrera inmunológica contra agentes microbianos y químicos ambientales. En la piel, los queratinocitos, fibroblastos y células inmunes residentes como los macrófagos, son capaces de reconocer noxas o señales de daño internas y externas, a través de receptores de reconocimiento de patrones (ejemplo, TLRs) desencadenando vías de señalización que permiten promover una respuesta inmune a nivel cutáneo. Por otro lado, los disruptores endocrinos, como el Bisfenol A (BPA), son sustancias presentes en el medio ambiente capaces de alterar el equilibrio hormonal.

Considerando que: 1) la piel se encuentra ricamente inervada por nervios simpáticos productores de catecolaminas; 2) que el denominado "sistema inmune de la piel" se compone de una compleja red de células inmunes y no inmunes, entre ellas los queratinocitos y los macrófagos; y 3) que el BPA puede entrar en contacto con la piel y ser absorbido por la misma, se propuso como objetivo de esta Tesis doctoral, en el marco de las interacciones bidireccionales entre los sistemas inmune y neuroendócrino, evaluar la influencia de agonistas dopaminérgicos sobre los mecanismos moleculares que llevan a la activación de células del sistema inmune cutáneo, como queratinocitos y macrófagos e investigar los efectos de un tóxico ambiental disruptor endócrino -BPA- sobre estas células y su interacción con la vía dopaminérgica.

Los resultados obtenidos sugieren que, en queratinocitos humanos, los agonistas dopaminérgicos pueden estimular la producción de IL-6 e IL-8, efectos

mediados por receptores dopaminérgicos,  $\beta$ -adrenérgicos y la intervención de mecanismos oxidativos independientes de receptores. El aumento observado sobre la producción de citoquinas se acompañó con la activación del factor de transcripción nuclear NF $\kappa$ B. Además, la dopamina disminuyó la migración de los queratinocitos concordante con la disminución en la actividad MMP-9, acciones que serían mediadas en parte por receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Además, se demostró, en macrófagos humanos, que la dopamina estimuló la producción de IL-8, sin modificación de IL-1 $\beta$ , acción mediada parcialmente por receptores  $\beta$ -adrenérgicos, y la actividad de MMP-9, sin involucrar la activación del factor de transcripción NF $\kappa$ B. Resultados obtenidos con los medios condicionados de los macrófagos indicarían que el efecto estimulante de dopamina sobre la producción de IL-8 en los macrófagos THP-1 favorecería la migración de los queratinocitos, efecto que se vería inhibido en presencia de altos niveles de IL-6, sugiriendo un efecto modulador del neurotransmisor en la interacción entre ambas células en relación con el proceso de cicatrización. También, se estudió la participación de receptores de la inmunidad innata, TLR3, en la neuromodulación de la respuesta inmune cutánea, demostrando que la disminución en la producción de IL-8 por parte de dopamina, estaría relacionada con una menor actividad de MMP-9 y un retraso en la migración celular inducida por el ligando de TLR3 luego de producirse la herida en los queratinocitos.

Por último, se demostró que el disruptor endocrino, a tiempos cortos, no modificó la producción de citoquinas ni la respuesta a dopamina en los queratinocitos HaCaT. Con una estimulación prolongada del BPA, no se observaron cambios en los niveles de IL-6 ni en la activación de NF $\kappa$ B inducidos por dopamina, pero si sobre la producción de IL-8 y la actividad de MMP-9, a diferencia de lo obtenido en ausencia del disruptor endocrino. En cuanto a los macrófagos humanos, se observó que el BPA, a tiempos cortos, no modificó los niveles de IL-8 ni la respuesta a dopamina. La estimulación prolongada de BPA sobre los macrófagos modificó los niveles de IL-8 a diferencia de lo observado en ausencia de BPA. Además, no se indujo la activación de la vía de NF $\kappa$ B en ausencia o presencia de dopamina, pero si favoreció la actividad de MMP-9. Estos resultados sugieren que el BPA, a tiempos cortos, solo o en combinación con dopamina no modificaría la producción de citoquinas en nuestros modelos de queratinocitos y macrófagos

humanos. Por otro lado, pudimos inferir de los resultados obtenidos, que las células cultivadas con BPA por tiempos prolongados pueden afectar la respuesta a dopamina en queratinocitos y macrófagos humanos.

En conjunto estos resultados, proponen que la dopamina es un neurotransmisor importante en las interacciones neuro-inmuno-endocrino a nivel de la piel, sugiriendo un rol que podría ser desfavorable en procesos fisiológicos como la cicatrización. Estos resultados, serían de interés desde el punto de vista de los tratamientos de enfermedades neurodegenerativas y/o dermatológicas, ya que existen fármacos utilizados en la clínica para tratar estos desórdenes que poseen acción neuroinmunoendocrina. Además, se estableció una interacción entre los disruptores endocrinos y las acciones dopaminérgicas a nivel de células del sistema inmune cutáneo, un área de estudio novedosa que podría ser útil para estudios inmunotoxicológicos.