



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

**INDICE**

**RESUMEN**..... 1

**ABREVIATURA**..... 5

**INTRODUCCIÓN**..... 7

**1. EL SISTEMA NEURO-INMUNO-ENDOCRINO**..... 8

**2. DOPAMINA: FUNCIONES CENTRALES** ..... 11

**3. EL SISTEMA DOPAMINÉRGICO Y LA RESPUESTA INMUNE**..... 13

**4. EL SISTEMA INMUNE CUTÁNEO** ..... 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

**5. EL SISTEMA CATECOLAMINÉRGICO EN LA PIEL** .....24

**6. DIRSRUPTORES ENDOCRINOS**..... 27

**6.1 BISFENOL A** ..... 28

**HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**..... 32

**MATERIALES Y MÉTODOS**..... 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 NFκB.....	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> .....	44
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 β-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 β-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 NFκB. ....	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 NFκB 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 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 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 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> .....	81
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> .....	88
<b>DISCUSION</b> .....	89
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</b> .....	107

# ***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 sí 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 sí 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.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**CRH:** *corticotropin-releasing hormone*

**ACTH:** *adrenocorticotropic hormone*

**LTh:** linfocito T *helper*

**Tfh:** linfocito T *follicular helper*

**IL:** interleuquina

**PAMPs:** *pathogen-associated molecular patterns* o patrones moleculares asociados a patógenos

**LPS:** lipopolisacárido

**NK:** *natural killer*

**NFκB:** *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

**TNF-α:** tumor-necrosis factor α o factor de necrosis tumoral α

**EROS:** especies reactivas del oxígeno

**PRRs:** *pattern recognition receptors* o receptores de reconocimiento de patrones

**TLR:** *toll-like receptor* o receptores de tipo Toll

**DAMPs:** *damage-associated molecular pattern* o patrones moleculares asociados a daño

**RNA:** *ribonucleic acid* o ácido ribonucleico

**AMPc:** adenosín monofosfato cíclico

**MCP-1:** *monocyte chemoattractant protein 1*

**ICAM-1:** *intercellular dhesion molecule 1*

**VCAM-1:** *vascular cell adhesion molecule 1*

**ERN:** especies reactivas del oxígeno

**MMPs:** *matrix metalloproteinases* o metaloproteasa de matriz

**iNOS:** inducible nitric oxide synthase

**COX-2:** ciclooxigenasa-2

**DCs:** *dendritic cells* o células dendríticas

**NLRP3:** *NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3*

**TGF- $\beta$ :** *transforming growth factor  $\beta$*

**poly (I:C):** *polyinosinic: polycytidylic acid* o ácido poli-inosínico : poli-citidílico

**ADCC:** *antibody dependent cellular cytotoxicity* o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo

**EGF:** *epithelial growth factor*

**VEGF:** vascular endothelial growth factor

**MT-MMPs:** *membrane-type matrix metalloproteases*

**BPA:** *Bisphenol A*

**ER:** *estrogen receptor* o receptor de estrógeno

**DMEM:** *dulbecco's modified eagle medium*

**SFB:** suero fetal bovino

**EDTA:** *ethylenediaminetetra-acetic acid* o ácido etilendiaminotetraacético

**PMA:** *phorbol-12-myristate-13-acetate* o forbol-12-miristato-13-acetato

**BrdU:** *5-bromo-2'-deoxyuridine*

**LDH:** lactato deshidrogenasa

# ***INTRODUCCIÓN***



## 1. EL SISTEMA NEURO-INMUNO-ENDOCRINO

Tradicionalmente los **sistemas nervioso, endocrino e inmune** fueron tratados, en la mayoría de los organismos, como sistemas independientes. Sin embargo, hace casi 100 años, estudios pioneros de Ernst y Berta Scharrer comenzaron a elaborar el concepto de neurosecreción, demostrando que las neuronas hipotalámicas secretan péptidos, por ejemplo la hormona liberadora de corticotrofina (CRH), los cuales a través del sistema porta-hipofisario alcanzan la glándula pituitaria estimulando la producción de hormonas hipofisarias, como adrenocorticotrofina (ACTH), las cuales regulan funciones específicas en glándulas periféricas (Scharrer, B y Scharrer, E, 1963). Se establecieron entonces las bases de la **neuroendocrinología**.

De la misma forma, se pensó que el **sistema inmune** -cuya función fisiológica es la defensa del organismo frente a agentes patógenos y daños físicos y químicos- podía ser regulado por mecanismos neuroendócrinos.

El **sistema inmune** está constituido por una red interactiva de órganos linfoides, células y factores humorales, organizados para reaccionar mediante mecanismos innatos y adaptativos contra los diferentes agresores. Sus diferentes mecanismos efectores actúan sinérgicamente para generar una respuesta inmune efectiva. Entre los componentes de la **respuesta inmune innata** se encuentran las barreras epiteliales -cuya integridad es crucial en la preservación del organismo- células fagocíticas (macrófagos y neutrófilos), linfocitos (ILCs, del inglés *innate lymphoid cells*), proteínas sanguíneas mediadoras de inflamación (quemoquinas y citoquinas proinflamatorias, proteínas del complemento) que coordinan la respuesta innata y preparan la respuesta adaptativa. La **inmunidad adaptativa** constituye un mecanismo de defensa sumamente especializado para hacer frente a un agresor específico y sus variadas funciones son llevadas a cabo por un amplio espectro de poblaciones linfocitarias, citoquinas y anticuerpos. La célula que inicia esta respuesta es la célula presentadora de antígeno (célula dendrítica) que a través de la presentación del antígeno al linfocito T (LT) desencadenará una serie de eventos moleculares y celulares que incluyen la activación y expansión clonal del LT, y su diferenciación hacia los diferentes perfiles de la respuesta LT helper (Th1-Th2-Th17-Tfh). Esta respuesta se autocontrola por diferentes mecanismos, entre los que juegan un rol fundamental las diferentes subpoblaciones de linfocitos T reguladores (Tregs) (Abbas et al., 2018).

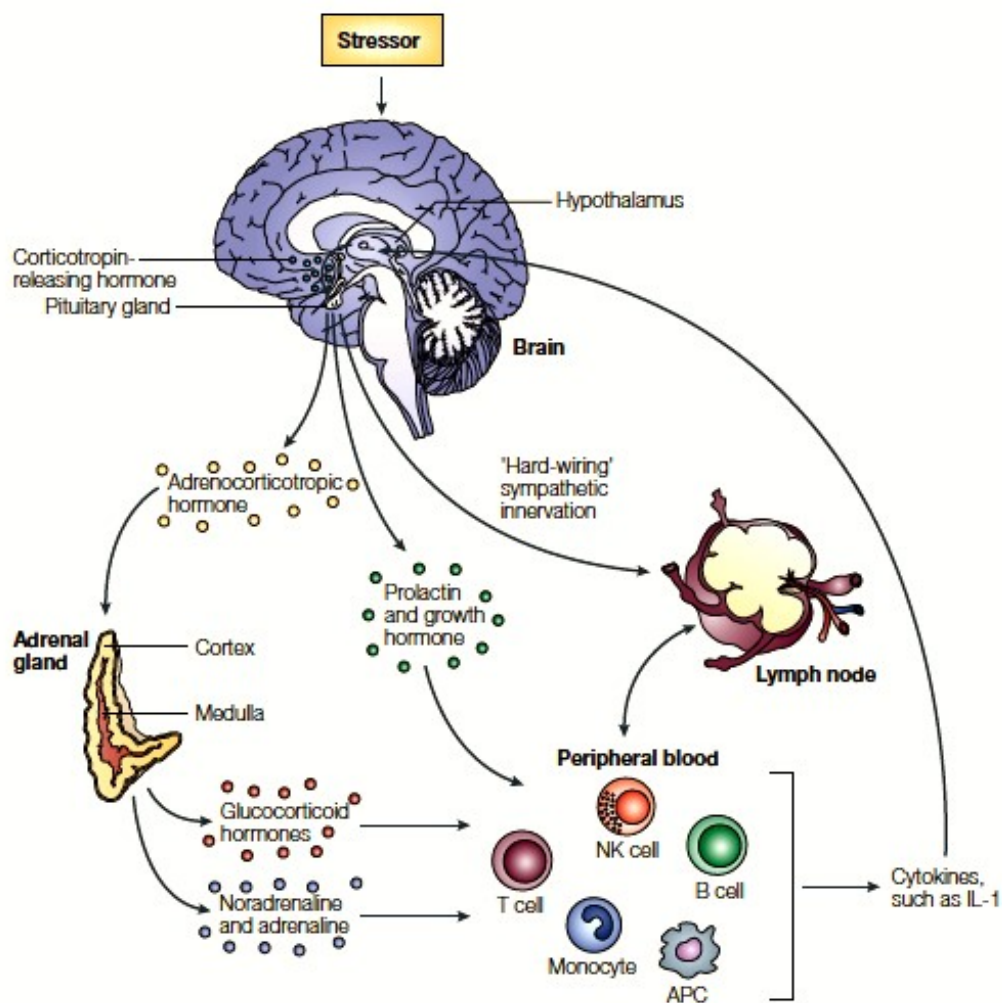
Fue el investigador argentino Hugo O. Besedovsky junto con sus colaboradores, quienes en los años '70 demostraron que la acción coordinada entre el sistema nervioso simpático y eje hipotálamo hipófiso adrenal, resultaban ser fundamentales para la regulación de la respuesta inmune (Besedovsky y Sorkin, 1977). Estos trabajos dejaron en claro que los procesos inmunes podían ser regulados por el sistema nervioso junto con la activación del sistema endocrino, dando lugar a la participación de un gran sistema neuro-inmuno-endocrino capaz de regular las funciones del organismo con el fin de preservar la integridad del mismo.

Los sistemas nervioso, endócrino e inmune se encuentran relacionados anatómica y funcionalmente, formando una compleja red de interconexiones. (Besedovsky y Rey, 2007). La comunicación bidireccional existente entre los sistemas implica la intervención de mediadores químicos que incluyen neurotransmisores y neuropéptidos, hormonas y citoquinas, como también la presencia de sus respectivos receptores (Blalock, 1994). Estos ligandos son compartidos y utilizados como un lenguaje químico común con el fin de responder frente a perturbaciones de la homeostasis causada por estrés, inflamación o infección y, en última instancia, mantener la salud de los individuos (Haddad, 2008).

Entre la década de 1987 y 1997 han surgido numerosos trabajos que describen la interacción bidireccional entre los sistemas nervioso, endócrino e inmune. En este sentido se estableció que las **citoquinas**, moléculas propias de la comunicación entre células del sistema inmune, podían participar en mecanismos que implican circuitos neuronales tales como la termorregulación, el consumo de comida, los patrones de sueño, o el comportamiento. Así se demostró que la producción de las citoquinas proinflamatorias interleuquina (IL)-1 e IL-6 en el sistema nervioso central en respuesta a la activación de macrófagos por patrones asociados a patógenos (PAMPs), como el lipopolisacárido bacteriano (LPS), impactan directamente en el cerebro modificando la plasticidad sináptica, lo que podría afectar el aprendizaje y la memoria (Pitossi et al., 1997). Esto permite considerar al sistema inmune como un órgano periférico *receptor* de estímulos externos e internos capaz de transmitir información al sistema nervioso central (Blalock y Smith, 2007).

El **sistema nervioso** puede regular la respuesta inmune sistémicamente a través de la liberación de hormonas y neuropéptidos, y a nivel regional o local, a través de la activación del sistema nervioso autónomo (simpático y parasimpático) mediante la

liberación de neurotransmisores. El sistema nervioso simpático, el mayor componente del sistema autónomo, se encarga de preparar al cuerpo para la acción, a través de la respuesta simpático-adrenal o respuesta de pelea o escape (del inglés *fight or flight response*). Además, es el principal componente que inerva los órganos linfoides, siendo las **catecolaminas** los principales productos que ejercen en mayor proporción la modulación nerviosa de la respuesta inmune (Bellinger et al., 2002; Elenkov, 2008; Procaccini et al., 2014) (**Esquema 1**).



**Esquema 1: Comunicación neuroinmunoendocrina frente a estímulos estresantes.** Una situación de estrés, percibida por el sistema nervioso central, puede estimular el eje hipotálamo hipófisis adrenal estimulando la liberación de ACTH, y hormonas de crecimiento, lo que puede conducir a la producción de glucocorticoides. La activación del eje simpático adrenal o del sistema nervioso simpático que inerva los órganos linfoides libera **catecolaminas**, las cuales junto a las demás hormonas pueden modular las funciones de las células inmunes en circulación o dentro de los órganos linfoides, respectivamente. La unión de las hormonas o catecolaminas a sus respectivos receptores, presentes en la superficie de las células inmunes, puede llevar a la producción de citoquinas, las cuales pueden ser capaces a su vez de modular la actividad del hipotálamo. La presencia de mediadores químicos en común es lo que permiten las interacciones

bidireccionales entre los tres sistemas. APC (antigen-presenting cell-célula presentadora de antígeno); IL-1 (interleuquina-1); NK cell (natural killer cell- célula asesina natural); monocyte (monocito); T cell (célula T). (Glaser y Kiecolt-Glaser, 2005).

Se ha descrito la regulación catecolaminérgica de mecanismos inmunológicos como la presentación antigénica, la expresión de moléculas de adhesión y la quimiotaxis, la proliferación y activación linfocitaria, la producción de citoquinas, y la producción de anticuerpos (Besedovsky y Rey, 2007; Elenkov et al., 2000). Las acciones del sistema catecolaminérgico sobre el sistema inmune dependen en gran medida de los receptores que están siendo activados por el neurotransmisor (Cosentino et al., 2015). Se ha establecido que la estimulación de receptores  $\beta$  adrenérgicos dará lugar a la inhibición de respuestas pro-inflamatorias, mientras que la estimulación de receptores  $\alpha$  adrenérgicos producen los efectos contrarios (Oberbeck, 2006).

## 2. DOPAMINA: FUNCIONES CENTRALES

Las **catecolaminas: dopamina, noradrenalina y adrenalina**, son neurotransmisores que se sintetizan y secretan en las terminales axónicas de las células nerviosas. Presentan importantes funciones en el sistema nervioso central, que incluyen la regulación de la motricidad, el control cognitivo y emocional, el procesamiento de la memoria y la respuesta al estrés. No obstante, a nivel periférico, son capaces de modular diferentes actividades viscerales indispensables para mantener la homeostasis funcional de varios sistemas del organismo, como cardiovascular, respiratorio, digestivo y renal (Tank y Wong, 2014).

Los neurotransmisores actúan a través de receptores de siete pasos transmembrana acoplados a proteína G (Gurevicha et al., 2016; O'Dell et al., 2015; Vallone et al., 2000). La noradrenalina y adrenalina median sus efectos a través de receptores  $\alpha$ - y  $\beta$ -adrenérgicos. Los receptores  $\alpha_1$  están acoplados a proteína Gq/11 movilizándolo el calcio intracelular (Luo et al., 2015), mientras que los  $\alpha_2$  están acoplados a proteínas Gi/o inhibiendo la vía adenil ciclasa-AMPc-PKA y modulando la vía de señalización de MAPK/ERK (Xu YM y col, 2015,). En cambio, los receptores  $\beta$ -adrenérgicos que se dividen en  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$ , se encuentran asociados a proteínas Gs activando la vía adenil ciclasa-AMPc-PKA (Luczak et al., 2017). Por otro lado, la dopamina actúa a través de receptores dopaminérgicos, los cuales se dividen en dos

grandes grupos: receptores de clase D1 (D1 y D5) y receptores de clase D2 (D2, D3 y D4) según sus propiedades bioquímicas y farmacológicas a nivel central (Beaulieu y Gainetdinov, 2011; Missale et al., 1998). Los receptores de la clase D1 se encuentran acoplados a proteínas Gs aumentando los niveles de AMPc y favoreciendo la activación de la vía de ERK (Chen et al., 2004, 2017; Wang et al., 2018) . Por el contrario, los receptores de clase D2 están generalmente asociados a proteínas G $\alpha$ i/o regulando negativamente la producción de AMPc y por lo tanto la actividad de PKA. La acción de la dopamina sobre la vía de MAPK/ERK es contradictoria dado que algunos estudios demuestran un aumento en la activación de esta vía (Jin et al., 2013), mientras que otros indican una inhibición de la misma (Kim, 2006; Luessen et al., 2016).

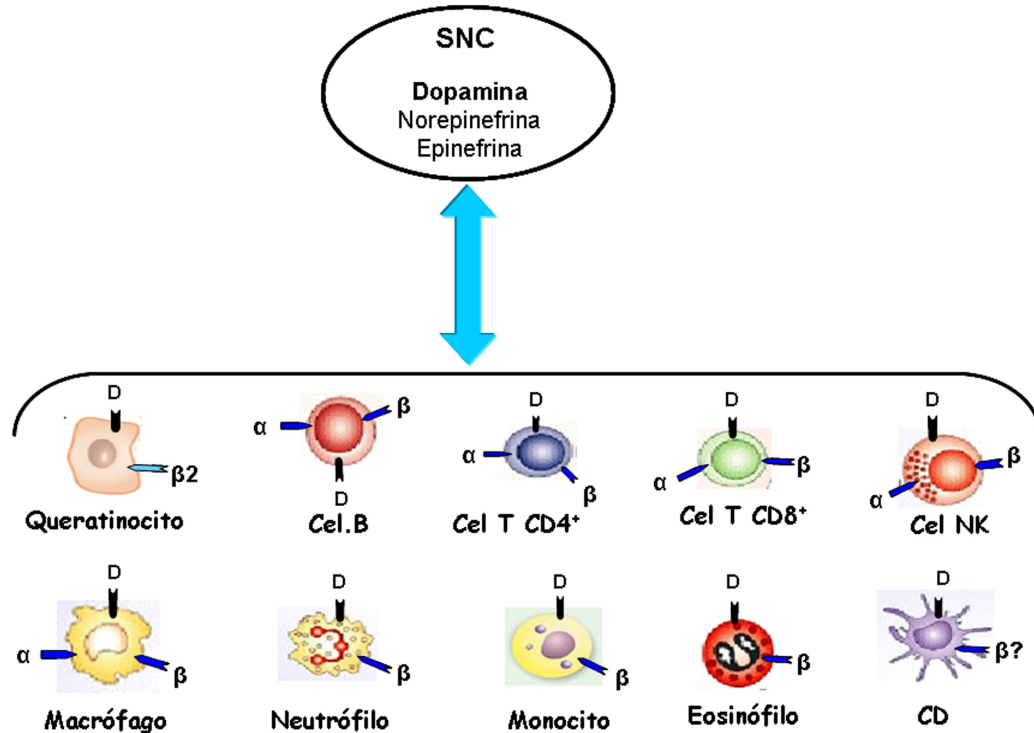
Las funciones centrales de **DOPAMINA** en el sistema nervioso regulan la actividad locomotora, cognitiva, comportamental, además de modular funciones de glándulas endócrinas centrales. La mayoría de las neuronas productoras de dopamina se localizan en la sustancia nigra, hipotálamo y el área ventral tegmental, liberando el neurotransmisor en distintas áreas del cerebro mediante tres vías principales: nigroestriatal (regulación conductual, control del impulso), mesocortical/mesolímbica (regulación de la actividad locomotora) y tuberoinfundibular (regulación hipofisaria) (Basu y Dasgupta, 2000; Cave y Baker, 2009; Rangel-Barajas et al., 2015) siendo esta última la que relaciona al sistema nervioso con el endocrino.

El sistema dopaminérgico ha sido foco de gran interés debido a que alteraciones en las vías de transmisión dopaminérgica están asociadas a enfermedades neurodegenerativas y a desórdenes psiquiátricos, entre ellos enfermedad de Parkinson, esquizofrenia, dependencia a drogas, entre otros (Molteni y Rossetti, 2017). Por otro lado, la activación de la vía dopaminérgica tuberoinfundibular, mediante su regulación de la función hipofisaria, va a tener efectos endócrinos. Como ejemplo podemos mencionar la inhibición de la secreción de prolactina a través de esta vía. Como se ha mencionado en párrafos anteriores, la regulación endócrina tiene un efecto directo sobre la función inmune (inmunosupresión frente al estrés crónico). En el mismo sentido, niveles mayores o menores a los fisiológicos de la hormona prolactina puede afectar la respuesta inmune (Ben-Jonathan y Hnasko, 2001).

### 3. EL SISTEMA DOPAMINÉRGICO Y LA RESPUESTA INMUNE

Dado que en desórdenes neuroendócrinos la respuesta inmune puede verse afectada, los investigadores comenzaron a preguntarse acerca del rol de la dopamina sobre el sistema inmune. Estudios de Bergquist y colaboradores, demostraron por primera vez la existencia de **dopamina endógena en linfocitos** de sangre periférica (Bergquist et al., 1994), al mismo tiempo que se revelaba la presencia de **receptores dopaminérgicos D5** en linfocitos murinos y humanos (Ricci et al., 1994). En la actualidad se conoce un sistema completo de síntesis, almacenamiento, liberación, recaptación y degradación intracelular del neurotransmisor, similar a las vías metabólicas clásicas de las catecolaminas de los sistemas nervioso y endócrino (Cosentino et al., 2018; Jiang et al., 2006; Pacheco et al., 2014).

Del mismo modo, se ha demostrado la expresión de diferentes clases de receptores catecolaminérgicos en células inmunes (**Esquema 2**). En particular los receptores dopaminérgicos se expresan en granulocitos neutrófilos y eosinófilos; linfocitos B y células asesinas naturales (NK, del inglés *natural killer*) (McKenna et al., 2002); células dendríticas (Nakano et al., 2008); y monocitos/macrófagos (Peter J Gaskill et al., 2012). La activación de estos receptores es similar a la comentado previamente a nivel del sistema nervioso central, donde la vía de señalización activada depende del acoplamiento a proteínas G (Arreola et al., 2016). Se sugiere que la activación de los receptores catecolaminérgicos, puede llevar a la modulación de la vía de señalización del **factor nuclear  $\kappa$ B** (**NF $\kappa$ B**, *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), un importante regulador de la inmunidad innata y adaptativa y de la respuesta inflamatoria (Flierl et al., 2009). Se han descritos efectos contradictorios en cuanto a la activación del factor NF $\kappa$ B mediado por receptores catecolaminérgicos en células del sistema inmune. La activación de receptores dopaminérgicos de clase D2 (Yamamoto et al., 2016) así como también la estimulación de receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Lorton y Bellinger, 2015), puede inducir o inhibir la activación de esta vía de transcripción dependiendo del sistema celular involucrado. No obstante, otras vías de activación también estarían implicadas en la activación de los receptores adrenérgicos, como MAPK, ERK y PI-3-K (Basu et al., 2004; Evans et al., 2010; Shome et al., 2012). Esta respuesta conduciría a una regulación diferencial en la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune.



**Esquema 2:** Las catecolaminas liberadas por el sistema nervioso central (SNC) pueden modular las funciones de diferentes células, actuando a través de receptores dopaminérgicos (D),  $\beta$ -adrenérgicos ( $\beta$ ) y/o  $\alpha$ -adrenérgicos ( $\alpha$ ) que se encuentran expresados sobre la superficie celular. Cel: células; NK: natural killer; CD: célula dendrítica.

A nivel del sistema inmune, la respuesta dopaminérgica va a estar determinada por el tipo de receptor estimulado, la concentración del neurotransmisor, y del estado de activación celular (Pacheco et al., 2014). Del análisis de la bibliografía existente relacionada con este tema surge que la mayoría de las investigaciones sobre los efectos de la dopamina en el sistema inmune se han realizado sobre diferentes poblaciones de LT, probablemente debido a que es en este tipo celular (LT) en el que se ha descrito por primera vez la presencia de receptores dopaminérgicos en este sistema. En este tipo celular se reportó que dopamina estimuló la producción de la citoquina proinflamatoria TNF- $\alpha$  a través de la activación de receptores dopaminérgicos D1/D5 y D3, mientras que la estimulación de receptores D2 y D1/5 indujo en estas células la producción de la citoquina reguladora IL-10 (Besser et al., 2005). Además, la acción de bajas concentraciones de dopamina sobre linfocitos T activados (CD4<sup>+</sup>) produjo un desvío de la respuesta celular hacia un perfil Th1 (respuestas celulares), a través de la estimulación de receptores D3, mientras que a altas concentraciones, actuando a nivel

del receptor D5 produjo una inhibición de la funcionalidad celular (Pacheco et al., 2009). Estas respuestas diferenciales pueden tener efectos en el desarrollo y evolución de patologías del sistema inmune. En enfermedades autoinmunes, como esclerosis múltiple, lupus y artritis reumatoidea, se han observado distorsiones en la expresión de receptores dopaminérgicos en linfocitos de sangre periférica. El tratamiento con agonistas o antagonistas de diferentes receptores dopaminérgicos arrojó resultados benéficos sobre modelos animales de la enfermedad y pacientes (Pacheco et al., 2014).

Es de relevancia tener en cuenta que existen mecanismos independientes de receptores que pueden ser activados por las catecolaminas, y en particular la dopamina, fuera del sistema nervioso central. Se ha descrito que la auto-oxidación de estas aminas debido a la inestabilidad del grupo catecol origina un microambiente oxidativo intracelular, dado especialmente por la formación de especies reactivas del oxígeno (EROS), que puede activar señales intracelulares. Bajas concentraciones de EROS pueden mantener la homeostasis redox de las células, mientras que altas concentraciones de los metabolitos oxidativos puede conducir a la citotoxicidad de las mismas. Ambas situaciones dependen de la concentración de la dopamina y del sistema celular involucrado (Bukowska et al., 2015; Cosentino et al., 2004).

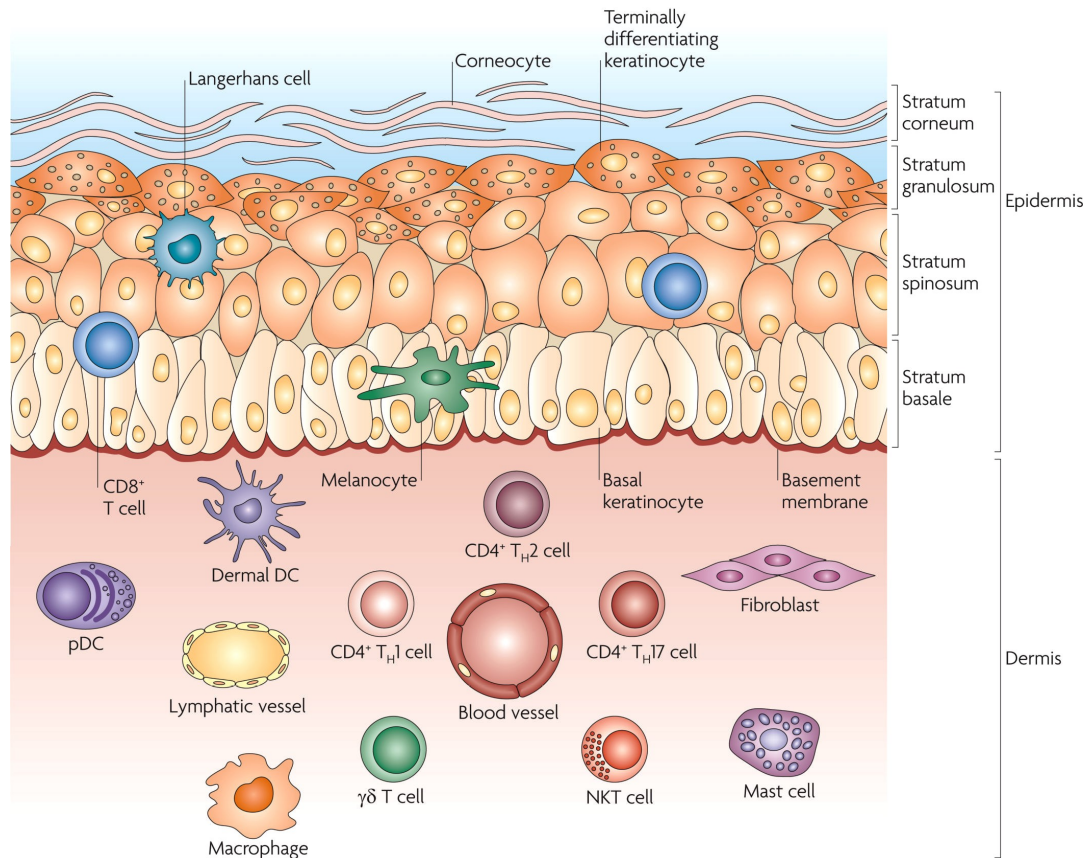
Se han descrito acciones de dopamina sobre células del sistema inmune (linfocitos y macrófagos) que están mediadas por mecanismos independientes de receptores dopaminérgicos, que involucran los mecanismos oxidativos, así como la acción del neurotransmisor sobre **receptores adrenérgicos** (Haskó et al., 2002; Jiang et al., 2006; Oberbeck et al., 2006).

#### **4. EL SISTEMA INMUNE CUTÁNEO**

La piel es el órgano más extenso del cuerpo y constituye una barrera física entre el medio externo (microbiano, físico, químico) y el interno. Anatómicamente se encuentra organizada en dos grandes compartimentos, cada uno de ellos con funciones específicas. La **epidermis**, la capa más externa, está compuesta en un 90% por células epiteliales especializadas -los **queratinocitos**-, y en otro 10% por células derivadas de la sangre, de localización intraepitelial, como macrófagos (células de Langerhans), células dendríticas, y linfocitos; la **dermis**, se encuentra constituida por fibroblastos, macrófagos, mastocitos, linfocitos, y células dendríticas de localización dérmica



**(Esquema 3).** (Nestle et al., 2009; Urmacher, 1990). La acción coordinada entre las células epiteliales y las células inmunes residentes genera la respuesta apropiada y necesaria para mantener la homeostasis local o global del organismo, (Abdallah et al., 2017; Zmijewski y Slominski, 2011).



**Esquema 3: Componentes de la piel humana.** La estructura organizada de la piel refleja la complejidad de sus funciones como barrera protectora, en el mantenimiento de la temperatura corporal, en comunicar la información desde el medio externo y en participar de la respuesta inmune. Se encuentra organizada en dos grandes compartimentos, epidermis y dermis. La epidermis, está compuesta principalmente por queratinocitos (Keratinocytes) diferenciados a lo largo de los distintos estratos, además de melanocitos, células de Langerhans, y linfocitos. La dermis, se encuentra formada por fibras de elastina y colágeno, además de células especializadas que incluyen, células dendríticas dermales (Dermal DC) y plasmocitoides (pDC), linfocitos T CD4+ colaboradores (CD4+ TH1, TH2 y TH17), células Tγδ y células asesinas naturales T (NKT), macrófagos (Macrophage), mastocitos (Mast cell) y fibroblastos. También se encuentra inervada por vasos sanguíneos (Blood vessel) y linfáticos (Lymphatic vessel). (Nestle et al., 2009)

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, y desencadenar vías de señalización que promueven la producción de moléculas, como citoquinas y péptidos antimicrobianos, que forman parte del sistema de defensa innato contra la noxa y que regulan la respuesta inmune. El reconocimiento se realiza a través de receptores de reconocimiento de patrones, los PRRs, entre los que se encuentran los receptores de tipo **Toll** (TLR): algunos son expresados en la membrana celular (TLRs 1, 2, 4, 5, 6 y 10) y otros en compartimientos intracelulares (TLRs 3, 7, 8, 9, 11, 12 y 13) (Kawasaki y Kawai, 2014). Asimismo, las células del sistema inmune cutáneo son capaces de reconocer moléculas endógenas liberadas por las células dañadas conocidas como patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) (Midwood y Piccinini, 2010). PAMPs y DAMPs son reconocidos por diferentes TLRs.

La unión de PAMPs o DAMPs a los TLR desencadena la activación de varias vías de señalización, siendo uno de los principales factores de transcripción activados el factor **NFκB**. Este factor de transcripción, es activado por una amplia variedad de PAMPs y DAMPs, entre los que se incluyen moléculas de origen bacteriano como el LPS, de origen viral como el RNA doble cadena, así como sustancias oxidantes, nucleótidos como AMPc, y citoquinas (IL-1, TNF-α) (Barnes y Karin, 1997). Su activación regula la transcripción de genes implicados en la respuesta inmune inflamatoria, tales como citoquinas y quemoquinas (**IL-6**, TNF-α, **IL-1β**, IL-12, **IL-8**, MCP-1), péptidos antimicrobianos (β-defensinas), moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1), **metaloproteinasas (MMPs)**, y otras moléculas pro-inflamatorias como iNOS y COX-2 (Kawasaki y Kawai, 2014). Este ambiente inflamatorio induce en las células vecinas residentes la producción de más mediadores inflamatorios y el reclutamiento de células inmunes (neutrófilos y macrófagos) al sitio activado, con el fin de erradicar la infección y contribuir a la reparación del tejido dañado. Estas células poseen diversos mecanismos intracelulares para destruir al patógeno fagocitado, siendo el de mayor relevancia la producción de EROS y ERN (Kupper y Fuhlbrigge, 2004). Esta respuesta innata en la piel es necesaria en última instancia, para la activación y maduración de las células dendríticas (DCs) que dará inicio a la respuesta inmune adaptativa.

#### **4.1. Queratinocitos. El rol de los TLRs en la cicatrización de heridas**

Los **queratinocitos** constituyen más del 90% de las células epidérmicas, aportando la estructura necesaria para asegurar la integridad de la piel. Son los primeros sensores frente a señales exógenas y endógenas, y suelen ser llamados “centinelas inmunes” (Nestle et al., 2009). Los queratinocitos expresan de forma constitutiva e inducible una amplia variedad de PRRs: los subtipos extracelulares de TLRs 1 a 6, y los subtipos intracelulares de TLRs 3, 7, 9 y otros receptores de localización citoplasmática, como NLRP3 (**Esquema 4**). La expresión y activación de estos receptores frente a diversos estímulos infecciosos, inflamatorios o estresantes, induce la producción de moléculas que contribuyen a la destrucción directa del agente extraño (péptidos antimicrobianos como  $\beta$ -defensinas, catelicidinas), al reclutamiento y/o la activación de otras células inmunes residentes de la piel (citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , quemoquinas como IL-8, y MCP-1), como así de moléculas que favorecen la reparación del tejido (TGF- $\beta$ , MMPs) (Miller, 2008).

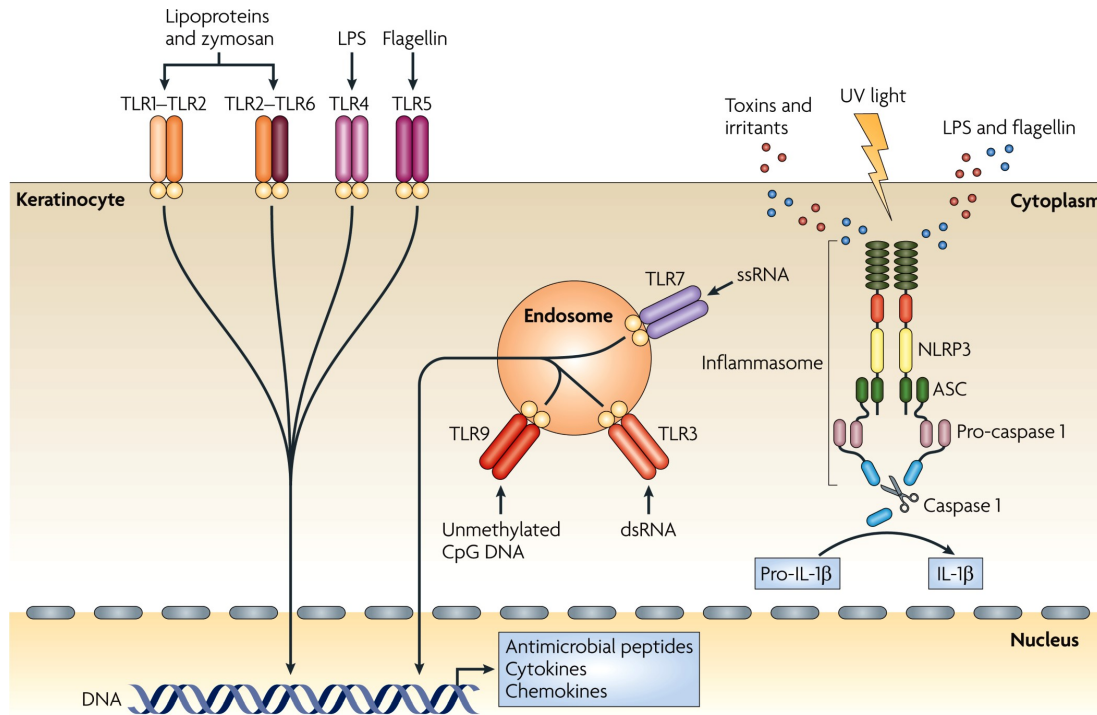
La activación de TLRs en queratinocitos ha sido implicada en la patogénesis de varias enfermedades de la piel como así también en los procesos fisiológicos de homeostasis (Donetti et al., 2017; Lai et al., 2009). Existen estudios que indican que algunos tipos de TLRs, como TLR2/4 y TLR3/9, se encuentran implicados en la proliferación y migración de queratinocitos, sugiriendo su rol en la reparación tisular.

El proceso de reparación de la piel es un proceso complejo que involucra tres fases: una fase inflamatoria, que se caracteriza por la agregación plaquetaria e infiltrado de neutrófilos y macrófagos; una fase proliferativa, que está dominada por la reepitelización, angiogénesis y síntesis de colágeno; y finalmente, una fase de remodelación, donde la dermis responde a la injuria produciendo más colágeno y MMPs, con el fin de restaurar el tejido dañado. La inducción de una respuesta inflamatoria a través de la activación de los TLRs es un elemento clave necesario para promover este proceso. Se ha reportado que el TLR4 se expresa diferencialmente en queratinocitos en el borde de una herida y que su activación sería necesaria en el proceso de reparación temprana (Chen et al., 2013). Este proceso es altamente dependiente del nivel de expresión de los receptores y del grado de inflamación. La activación de TLR4 por altas concentraciones de LPS puede suprimir la regeneración hepática, sugiriendo que la señalización a través del TLR puede modular la regeneración en ambas direcciones

dependiendo del grado de activación del receptor (Kluwe et al., 2009). Se ha descrito que el LPS, a través de la estimulación de TLR2 y TLR4, inhibe la migración de queratinocitos de manera dosis dependiente en un modelo de ratones diabéticos, de modo que un aumento en la expresión de los TLRs 2/4 y de su señalización por LPS, contribuiría a una fase inflamatoria prolongada y al deterioro de la reparación tisular (Dasu et al., 2010).

Hay distintos mecanismos activados por TLRs implicados en el cierre de heridas o reparación tisular, entre ellos pueden mencionarse la inducción de señales anti-apoptóticas, y la proliferación epitelial, la angiogénesis, y la inducción de señales profibrogénicas. En condiciones de extremo estrés, los TLRs (2/4) pueden inducir injuria a través de la activación de señales pro-apoptóticas (Kluwe et al., 2009; Strbo et al., 2014).

La activación de TLR3 por el ligando (poly (I:C), ácido poli-inosínico:poli-citidílico) también ha sido implicada en la reparación tisular, en piel humana y murina (Lin et al., 2012). Si bien es aceptado que TLR3 se activa con RNA de doble cadena proveniente de una infección o replicación viral, estudios más recientes indican que fuentes endógenas de RNA también pueden activar al receptor. En particular se describió que la liberación de RNA producida por queratinocitos dañados induce la inflamación necesaria para promover la reparación tisular a través de la activación de TLR3 (Nelson et al., 2015). Se ha descrito una participación clave del TLR3 en la detección del daño tisular, y en la promoción de la expresión de genes en los queratinocitos necesarios para la reparación del tejido y para su función como barrera epidérmica (Borkowski et al., 2013).



**Esquema 4: Reconocimiento por parte de los queratinocitos de señales externas e internas.** Los queratinocitos (Keratinocyte) son los llamados centinelas centrales de la piel y pueden reconocer a través de los TLRs, agentes extraños o noxas, como PAMPs de origen microbiano o DAMPs, como irritantes o toxinas. Los TLRs pueden encontrarse en la membrana celular o en compartimentos endosómicos. El LPS estimula el TLR4; las lipoproteínas bacterianas o zimosan fúngico estimulan TLR1-TLR2 y el heterodímero TLR2-TLR6; la flagelina bacteriana activa TLR5; los motivos CpG no metilados activan TLR9; RNA doble cadena (dsRNA) activa TLR3 y el RNA simple cadena (ssRNA) el TLR7. La activación de cualquiera de estos TLRs conduce a la activación de vías de señalización con la subsecuente producción de citoquinas, quemoquinas, péptidos antimicrobianos. Los queratinocitos también expresan los complejos de inflammasoma, NLRP3. Estas proteínas pueden reconocer también PAMPs (como LPS y flagelina), DAMPs y luz ultravioleta (UV), activando el complejo de inflammasoma lo que conduce en última instancia a la activación de la caspasa-1 y de IL-1 $\beta$ . (Nestle et al., 2009)

#### 4.2. Macrófagos

Los macrófagos son células del sistema fagocítico mononuclear especializadas. Clásicamente se caracterizan por sus funciones fagocíticas en la inmunidad innata y poseen un rol relevante como presentadoras de antígenos a linfocitos efectores durante la fase adaptativa de la respuesta inmune. Se generan a partir de precursores hematopoyéticos, circulan en el torrente sanguíneo como monocitos y se diferencian en los tejidos a macrófagos.

Los macrófagos reconocen al patógeno a través de PRRs, como hemos mencionado anteriormente. Dependiendo del tipo de microorganismo, los macrófagos

ponen en marcha distintos mecanismos citotóxicos para eliminar al agente agresor. Estos mecanismos incluyen, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), y la producción de EROS y ERN, que contribuyen a la destrucción de los microorganismos fagocitados. La activación de estas células por el reconocimiento de la noxa genera la producción y liberación de citoquinas inflamatorias y quemoquinas (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8, MCP-1), que contribuyen al reclutamiento de otras células del sistema inmune innato, para favorecer la destrucción del agente agresor. Paralelamente, esta activación induce la producción de IL-12 e IL-18, que participarán en la activación de las células dendríticas residentes para el inicio de la respuesta inmune adaptativa.

A estas células se les ha asignado un papel relevante en la integridad de la piel, ya que se ha descrito su participación en la cicatrización heridas y reparación tisular, y en la respuesta al estrés (Yanez et al., 2017). Frente a una condición de estrés, como es la generada por un daño tisular, los monocitos pueden ser reclutados en la piel por sustancias liberadas por los queratinocitos. Los monocitos en el sitio dañado se diferencian a macrófagos lo cuales pueden presentar fenotipos funcionalmente distintos dependiendo del microambiente generado, que modularán las diferentes fases del proceso de cicatrización (Klar et al., 2018; Rodero y Khosrotehrani, 2010). En una primera fase inflamatoria, los macrófagos de fenotipo M1 serían necesarios para eliminación de restos celulares y posibles patógenos, a través de la liberación de mediadores inflamatorios. Por otro lado, en la fase de reepitelización/remodelación del tejido, el fenotipo M2 tendría un rol preponderante. Los macrófagos M2 inducirían la producción de citoquinas y quemoquinas, factores de crecimiento (EGF, del inglés *Epithelial Growth Factor*, TGF- $\beta$ ) y factores angiogénicos (VEGF, del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*) y MMPs, que pueden regular la proliferación y migración de los queratinocitos, fibroblastos y células endoteliales, favoreciendo así el proceso de reepitelización (Lucas et al., 2010).

### **4.3. Mediadores inflamatorios. Su rol en la reparación tisular**

#### **4.3.1. Interleuquina-6**

La **IL-6** es una citoquina pleiotrópica que es producida por diferentes tipos celulares, incluyendo las células del sistema inmune cutáneo, en respuesta a la agresión

por patógenos o sustancias químicas, radiaciones, etc., y se le ha asignado un rol importante en la patogénesis de varias enfermedades inflamatorias. Alteraciones en las vías de señalización activadas por esta citoquina se han relacionado con procesos inflamatorios y proliferativos anormales (Ghazizadeh, 2007). Por ejemplo, en queratinocitos o fluidos formados sobre la piel lesionada y no lesionada de pacientes con psoriasis, se observaron niveles de IL-6 mayores que en lo examinado en pacientes sanos (Pietrzak et al., 2008). Se ha demostrado que en ratones deficientes de IL-6 o inmunosuprimidos, la aplicación exógena de la interleuquina puede mejorar el proceso de cicatrización de las heridas (Lin et al., 2003a) Esto último podría estar relacionado con el rol que se ha demostrado de la IL-6 en la inducción de la proliferación y diferenciación de queratinocitos (Hernández-Quintero et al., 2006). IL-6 podría ejercer este rol a través de la inducción de factores de crecimiento o de la expresión de sus receptores, como ha sido demostrado en (McFarland-Mancini et al., 2010). Por lo tanto, es importante tener en cuenta el rol de espada de doble filo de esta interleuquina durante la respuesta inflamatoria (Kuhn et al., 2014).

#### **4.3.2. Interleuquina-8**

**IL-8** pertenece a la familia de quemoquinas CXC con una función importante en la regulación del tráfico de distintas poblaciones leucocitarias al sitio de inflamación; en especial neutrófilos, pero también macrófagos, eosinófilos, y linfocitos, contribuyendo al desarrollo de una respuesta inmune. Además de ejercer su rol como leucoquimioattractante, estudios *in vitro* han demostrado que IL-8 puede favorecer la proliferación y migración de queratinocitos. Precisamente por ser un inductor de la migración celular es que se sugiere su participación en el proceso de cicatrización, donde el reclutamiento de células al sitio dañado sería fundamental para la re-epitelización y reparación tisular (Jiang et al., 2012). Sin embargo, del mismo modo que IL-6, los niveles elevados de IL-8 se encuentran asociados a enfermedades inflamatorias de la piel, como psoriasis, habiéndose demostrado que los queratinocitos son el principal tipo celular productor de esta quemoquina (Jun et al., 2017; Pietrzak et al., 2008).

### **4.3.3. Interleuquina-1 $\beta$**

La **IL-1 $\beta$**  pertenece a la familia de IL-1 y es también una citoquina con efectos pro-inflamatorios, y con un amplio rango en actividades biológicas entre las cuales se incluyen la activación de células dendríticas y LT colaboradores, y la maduración y expansión clonal de LB. La IL-1 también participa en la inducción de la producción de moléculas de adhesión, quemoquinas, citoquinas, y MMPs por parte de queratinocitos, fibroblastos y células endoteliales (Garlanda et al., 2013). Esta citoquina es producida principalmente por macrófagos, monocitos, células de Langerhans y células dendríticas, en respuesta a la activación por patógenos y otros estímulos. La activación de la caspasa-1, necesaria para el clivaje de pro-IL-1 $\beta$  en la forma activa IL-1 $\beta$ , ocurre dentro de un complejo proteico citosólico llamado inflamasoma. Uno de los complejos mejor caracterizados es el NRLP3, el cual puede ser activado por PAMPs o DAMPs (Lopez-Castejon y Brough, 2011).

IL-1 presenta un rol fundamental en la homeostasis de la piel, sin embargo, su expresión exacerbada o de manera crónica se ha asociado con enfermedades inflamatorias. En la piel, ha sido asociada a patologías como lupus eritematoso cutáneo, psoriasis y dermatitis atópica (Artlett, 2013; Bou-Dargham et al., 2017). Se ha descrito también la participación de IL-1 en la respuesta dependiente de caspasa-1 frente a la irradiación de queratinocitos humanos con luz UV, indicando que los queratinocitos son células inmunológicamente importantes (Sand et al., 2018).

### **4.3.4. Metaloproteasas de matriz (MMPs)**

Las **MMPs** pertenecen a una familia de endopeptidasas dependientes de zinc y calcio que están involucradas en la degradación de la matriz extracelular y por lo tanto en procesos inmunológicos, cicatrización, y también en diversas condiciones patológicas, como la inflamación, enfermedades autoinmunes y carcinogénesis (Rohani y Parks, 2015). Los miembros de la familia de MMPs comparten una región altamente conservada en el amino terminal llamada pro-dominio (o péptido señal) y una región catalítica que incluye los sitios de unión a zinc y calcio. Basado en el tipo de sustrato y en la organización del dominio se pueden clasificar en: (1) colagenasas (MMP-1, MMP-8, MMP-13, MMP-1), (2) gelatinasas (MMP-2, MMP-9), (3) estromalinas (MMP-3, MMP-



10, MMP-11), (4) matrilisinas (MMP-7, MMP-26), (5) metaloelastases, (6) MMPs asociadas a membrana (MT-MMPs, *del inglés membrane-type matrix metalloproteases*), y (7) otras MMPs (Caley et al., 2015).

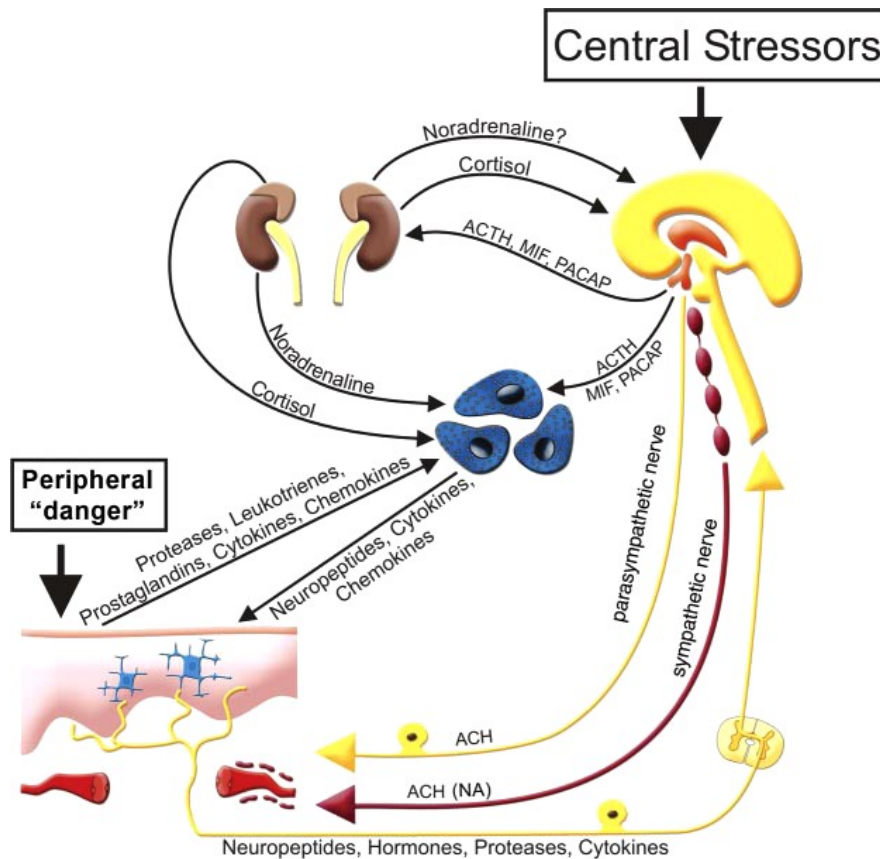
Diferentes señales externas o internas, que incluyen citoquinas, hormonas y el contacto con otros tipos celulares, pueden favorecer la expresión de las MMPs por distintos tipos celulares. En la piel la expresión de estas proteasas por distintos tipos celulares (queratinocitos, fibroblastos, células endoteliales, monocitos, linfocitos y macrófagos), resulta ser de importancia en el proceso de cicatrización. La expresión y activación de determinadas MMPs participan en fases específicas durante este proceso remodelando la matriz extracelular y permitiendo la migración celular, con la consecuente reparación del tejido. La MMP-9 (gelatinasa B) se encuentra expresada en varios epitelios dañados, como la piel, los ojos, pulmón e intestino. En particular, se encuentra altamente expresada en el borde de la herida en queratinocitos permitiendo la migración celular y la angiogénesis, etapas necesarias durante la cicatrización de heridas (Caley et al., 2015). No obstante, ha sido descrito, en un modelo murino de cicatrización, un efecto perjudicial sobre la misma cuando la expresión de MMP-9 es elevada y continua, interfiriendo con la formación de la membrana basal, la migración de queratinocitos y el restablecimiento de la epidermis (Reiss et al., 2010).

## **5. EL SISTEMA CATECOLAMINÉRGICO EN LA PIEL.**

En la última década, se ha comenzado a dar mayor relevancia a la piel desde un punto de vista clínico, como órgano clave en la interacción entre la respuesta periférica y sistémica al estrés (Paus et al., 2006). En este sentido, Denda y colaboradores 2015, proponen considerar a la epidermis como el "tercer cerebro" debido a que contiene múltiples sensores ambientales, los sistemas para procesarlos, y la maquinaria para sintetizar una variedad de neurotransmisores y hormonas con potencial influencia en las emociones y el estado general del cuerpo (Denda, 2015).

La piel se encuentra inervada por fibras nerviosas sensoriales y autonómicas, principalmente simpáticas, que se distribuyen en todas las capas cutáneas (Roosterman et al., 2006). No solamente se liberan neurotransmisores en las terminaciones nerviosas cutáneas, sino que las mismas células epiteliales e inmunes producen neuropéptidos, citoquinas y hormonas, que actúan de forma autócrina o parácrina, conformando el

denominado sistema neuro- inmuno- endócrino cutáneo (Brazzini et al., 2003; Zmijewski y Slominski, 2011) (**Esquema 5**).



**Esquema 5:** La piel como un órgano neuroinmunoendocrino. La producción de varios mediadores en común permite la comunicación bidireccional existente entre la piel y el sistema nervioso central, sistema inmune y endocrino. La piel se encuentra asociada con el sistema nervioso simpático sensorial (PNS), con el sistema nervioso autónomo (ANS), y con el sistema nervioso central (CNS). Varios agentes estresantes pueden activar el hipotálamo/hipófisis dentro del CNS, lo que resulta en la liberación de neuromediadores, por ejemplo, hormona liberadora de corticotrofina (CRH) y hormona estimulante de melanocito (MSH). Ellos pueden estimular las células inmunes a través de los receptores presentes en estas células o mediante la liberación de noradrenalina y cortisol de la glándula adrenal. La adrenalina y cortisol afectan varias células inmunes, que incluye linfocitos, granulocitos, y macrófagos liberando citoquinas, quemoquinas y neuropéptidos que pueden modular la respuesta inflamatoria de la piel. Además, la piel se encuentra inervada principalmente por nervios simpáticos y menos frecuentemente por nervios parasimpáticos, que pueden mantener y regular la homeostasis de la piel frente a un agente extraño o estrés. (Roosterman et al., 2006)

Entre las células de la piel, se ha propuesto que los queratinocitos, poseen un sistema catecolaminérgico semejante al del sistema nervioso central cuya activación modularía el funcionamiento de dichas células (Jiang et al., 2006). Se ha demostrado que los queratinocitos son capaces de producir adrenalina (Pullar et al., 2006) y dopamina (Ramchand et al., 1995) presentando las enzimas necesarias para su síntesis y degradación. Se ha demostrado que las catecolaminas pueden participar y modular procesos fisiológicos de la piel, como es la cicatrización. Niveles elevados de adrenalina en el sitio de una herida, liberados por las fibras nerviosas o secretados por queratinocitos, disminuirían su migración y por lo tanto perjudicarían el proceso de reparación tisular. Estos efectos, de la misma forma que en células del sistema inmune, pueden ser mediados a través de receptores catecolaminérgicos. Los queratinocitos epidérmicos humanos expresan receptores dopaminérgicos (Fuziwara et al., 2005),  $\alpha$ - y  $\beta$ -adrenérgicos (Pullar et al., 2006). El subtipo  $\beta_2$  es el único receptor  $\beta$  adrenérgico presente en los queratinocitos humanos (Steinkraus et al., 1991). La activación de los receptores a nivel de la piel involucra vías de señalización similares a las observadas en las células inmunes y células del sistema nervioso. También se ha reportado el rol de los receptores dopaminérgicos en el mantenimiento de la homeostasis de la barrera epidérmica y en la proliferación celular. Se demostró que la activación de receptores D2, junto con una disminución en los niveles de AMPc, disminuye la proliferación de queratinocitos favoreciendo la recuperación de la barrera epidérmica (Fuziwara et al., 2005). Del mismo modo, se ha asociado a los receptores adrenérgicos con la diferenciación y proliferación de queratinocitos, habiéndose reportado que catecolaminas y receptores  $\beta$ -adrenérgicos presentan un importante rol en la cicatrización de la piel. Anormalidades en su expresión y en las vías de señalización se encuentran implicados en varios desórdenes cutáneos (dermatitis atópica, psoriasis, vitiligo) (Sivamani et al., 2007).

Como se ha mencionado anteriormente, los macrófagos son uno de los tipos celulares reclutados durante la reparación de tejido. Estas células poseen la maquinaria enzimática para sintetizar y los receptores para responder a las catecolaminas, y se sugiere que el efecto de estas aminas sobre los macrófagos depende del tipo de receptor utilizado (Barnes et al., 2015; Gaskill et al., 2014). Por lo tanto, la activación de estos receptores y las respuestas generadas por los macrófagos en el sitio de la herida podría modular el proceso de cicatrización.

Además de actuar a través de los receptores catecolaminérgicos, la dopamina puede ejercer sus efectos sobre queratinocitos y macrófagos, a través de la producción de especies reactivas del oxígeno generadas por auto-oxidación de la amina, es decir independientemente de la activación de receptores (Slominski et al., 2012). La producción de especies reactivas del oxígeno y metabolitos oxidativos por acción de la monoamino oxidasa de la membrana mitocondrial (MAO), parte del sistema de degradación de la amina luego de la receptación del neurotransmisor, puede tener efectos tóxicos a altas concentraciones e inducir apoptosis. Sin embargo, debido a su rol como primera línea de defensa, la piel ha desarrollado una compleja red de antioxidantes (ácido ascórbico, glutatión, vitamina E) que protegen a las células de daños oxidativos generados por factores ambientales (Catani et al., 2005).

## **6. DIRSRUPTORES ENDOCRINOS**

El estudio de la toxicidad de algunos componentes frente a los cuales la población humana y animal se encuentran cotidianamente expuestos se remonta a los años '40, y fue creciendo con el desarrollo de la industria. En los años 90, algunos científicos propusieron que ciertos productos químicos podían interrumpir el normal funcionamiento del sistema endocrino en los seres humanos y en la fauna silvestre. En base a los estudios científicos la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos junto con la Organización Mundial de la Salud y la Sociedad de Endocrinología, definieron a los disruptores endocrinos como componentes exógenos naturales o sintéticos que tienen la habilidad de interferir en las funciones endocrinas alterando el equilibrio hormonal, y por lo tanto la salud de las personas y/o sus descendientes (Kavlock et al., 1996; Zoeller et al., 2012). Estos perturbadores endocrinos pueden imitar a las hormonas o bloquear la producción de las mismas y sus receptores, aumentando o disminuyendo los niveles hormonales. Inicialmente se pensó que podían actuar principalmente a través de receptores nucleares de hormonas, como receptores de estrógenos, andrógenos, etc. Sin embargo, hoy se sabe que sus mecanismos de acción son más amplios, por lo cual, determinar los efectos de estas sustancias en la salud es complejo. Ha sido reportado que pueden actuar a través de receptores para hormonas nucleares y no nucleares, receptores para neurotransmisores (serotonina, dopamina, adrenalina), y receptores de hidrocarburos de arilo (Diamanti-Kandarakis et al., 2009).

Las fuentes de exposición a los disruptores endocrinos son diversas, se encuentran en el medio ambiente que nos rodea y varían a lo largo del mundo. Se pueden dividir en dos grupos según su origen. Sustancias químicas naturales como drogas derivadas de hormonas naturales (anticonceptivos) y fitoestrógenos provenientes de plantas y hongos, que a pesar de que se sugiere tienen baja afinidad por receptores estrogénicos, son ampliamente consumidos, encontrándose, por ejemplo, en la leche de fórmula a base de soja para infantes (Bar-El y Reifen, 2010). Un segundo grupo son las sustancias derivadas de productos industriales. Entre ellas se incluyen componentes utilizados en la agricultura (pesticidas, fungicidas, insecticidas) y componentes sintéticos usados en la fabricación de plásticos (bisfenoles) y plastificantes (ftalatos), material de embalaje, de construcción, pinturas, material de aislamiento (bifenilos policlorados, metales como arsénico), además de productos de consumo como arreglos dentales, productos de limpieza, protectores solares, etc. (Hampl et al., 2016).

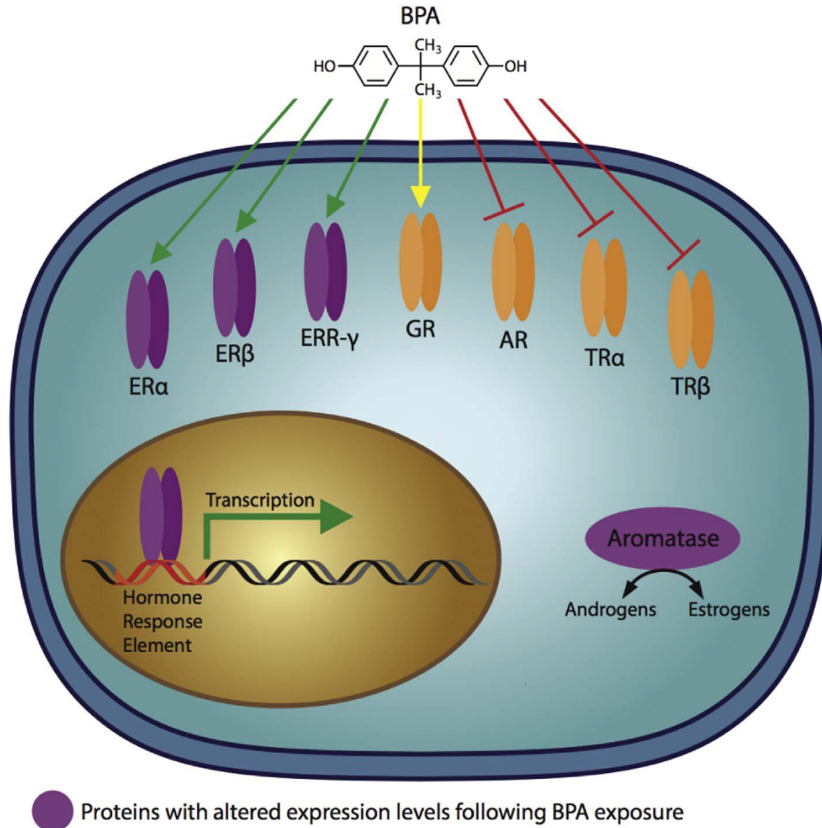
Muchos de estos compuestos presentan efectos adversos y la mayoría de los estudios sobre los mismos se centra en la interacción con estrógenos, andrógenos y hormonas tiroideas, sugiriendo un rol en las disfunciones reproductivas como aborto recurrente, enfermedad trofoblástica, síndrome de ovario poliquístico, y endometriosis (Rattan et al., 2017). Sin embargo, también han sido asociados a la patogenia de la obesidad, diabetes de tipo 2 y síndrome metabólico (Casals-Casas y Desvergne, 2011). El estudio de los efectos de estas sustancias sobre el sistema inmune sólo ha sido abordado en este siglo. Estudios *in vitro* y en animales sugieren que la exposición a algunos disruptores endocrinos puede llevar a una disminución en la respuesta inmune resultando en la susceptibilidad a infecciones, o un aumento patológico de la misma, lo que conduce a desórdenes autoinmunes o alérgicos (Kuo et al., 2012).

### **6.1 Bisfenol A**

El Bisfenol A (BPA, del inglés *Bisphenol A*), ha sido utilizado desde mediados de los años '60 para la fabricación de plásticos duros de policarbonatos y resinas epoxi. La exposición al BPA es generalizada, ya que puede hallarse en botellas, mamaderas, tazas reutilizables, juguetes, etc. De esta manera la exposición al tóxico ambiental es continua y el efecto sobre la salud humana lo hace uno de los disruptores más estudiados. Ha sido foco de gran interés y se ve reflejada en la atención brindado por las diferentes

organizaciones relacionadas con la salud: fue catalogado como químico de “mayor control” por la Agencia de protección ambiental de Estados Unidos (2014), como una “sustancia química” por el gobierno de Canadá (2017) y más recientemente fue considerado una “sustancia de muy alta preocupación” por la Unión Europea (2017) (Nesan et al., 2018).

El BPA es un conocido disruptor que puede regular varias señales de los receptores de hormonas. Puede unirse a receptores de estrógenos (ER)  $-\alpha$  o  $-\beta$ , con menor afinidad que el  $17\beta$ -estradiol (E2), funcionando como un agonista favoreciendo la vía de señalización de la hormona endógena por imitarla, pero también puede unirse como un antagonista sobre receptores androgénicos (Lee et al., 2003) y receptores de hormona tiroidea (Moriyama et al., 2002), bloqueando la unión de las moléculas endógenas. Esto propone la existencia de varios mecanismos de acción del BPA y que sus efectos son altamente dependientes de la dosis. Del mismo modo que los estrógenos endógenos, el BPA contiene una estructura de dos anillos aromáticos los que serían responsables de sus efectos estrogénicos (**Esquema 6**). Clásicamente, el BPA se une a los receptores de estrógenos (ER)  $-\alpha$  o  $-\beta$ , llevando a la dimerización y translocación al núcleo donde interactúa con elementos de respuesta para regular la actividad de genes regulados por estrógeno. Por otro lado, se ha propuesto que puede actuar sobre receptores estrogénicos acoplados a membrana a través de vías no genómicas (Tohmé et al., 2014). Recientemente se ha propuesto un mecanismo de acción sobre la desregulación epigenética en varios modelos y tejidos (Mileva et al., 2014), modificando la metilación del DNA y acetilación de histonas. Por lo tanto, se propone que la desregulación de genes específicos durante el desarrollo embrionario puede alterar su expresión o actividad en la vida adulta, conduciendo a predisposición a ciertas enfermedades como el cáncer (Chiam et al., 2009). Además, se ha observado alteraciones en la expresión de la metiltransferasa a nivel de sistema nervioso, alterando la metilación y expresión de receptores (ER)  $-\alpha$  (Kundakovic et al., 2013).



**Esquema 6: Mecanismos de acción de BPA.** EL disruptor endocrino puede actuar por varios mecanismos de señalización funcionando como agonistas (en verde) sobre receptores de estrógenos ( $ER\alpha$ ,  $ER\beta$ ) y receptores relacionados con estrógenos ( $ERR\gamma$ ), o antagonistas (en rojo) sobre receptores androgénicos (AR) o receptores de hormona Tiroidea ( $TR\alpha$ ,  $TR\beta$ ) o mecanismo desconocidos sobre receptores asociados a membrana (en amarillo). Estas acciones pueden modular la expresión de genes, como la proteína aromatasa, la cual se encuentra involucrada en el metabolismo esteroide. (Nesan et al., 2018).

Es sabido que los principales efectos de estas sustancias ocurren sobre el sistema endocrino, y en particular, ha sido bien descrito su efecto sobre la reproducción: pueden disminuir la fecundidad y aumentar la prevalencia de algunas enfermedades como endometriosis. Los estudios proponen una asociación entre la exposición al BPA y la incidencia de numerosas patologías (Rubin, 2011). Alteraciones en el desarrollo fetal y desórdenes reproductivos (Mínguez-Alarcón et al., 2016; Sifakis et al., 2017), en la función tiroidea (Moriyama et al., 2002), obesidad y enfermedad metabólica (Mirmira y Evans-Molina, 2014; Ruiz et al., 2018), desórdenes neurológicos (Inadera, 2015) y cáncer (Shafei A y col, 2018), han sido asociados a la exposición a este disruptor endócrino. A nivel del sistema inmune los datos de la literatura son muchas veces

contradictorios. Se postula que estas sustancias podrían interferir con mecanismos de la inmunidad innata, en la respuesta inflamatoria y también podrían alterar la respuesta inmune específica Th1 y/o Th2 (Rogers et al., 2013; Wetherill et al., 2007). En particular ha sido asociada su exposición a un aumento de los niveles de citoquinas y quemoquinas de perfil Th2 en linfocitos y células dendríticas, relacionado con enfermedades alérgicas (Robinson y Miller, 2015). Además, se demostró que la exposición al BPA o sus análogos como el BPB puede modular la producción de citoquinas por parte de los macrófagos, obteniéndose resultados contradictorios. Algunos autores observaron un incremento en la producción de citoquinas proinflamatorias por macrófagos humanos (Couleau et al., 2015a; Kuan et al., 2012; Liu et al., 2014a), mientras que otros autores, en contraposición, han encontrado niveles disminuidos de citoquinas proinflamatorias y óxido nítrico luego de la exposición a BPA (Kim y Jeong, 2003).

La exposición dérmica es la segunda ruta de absorción más estudiada para el BPA. Además, dado que el BPA es comúnmente utilizado para el desarrollo de papel térmico, los estudios a nivel de la piel han comenzado a tener relevancia. La bibliografía reciente propone que el nivel de penetración del BPA en la piel es insignificante cuando ésta es expuesta al disruptor proveniente de los papeles térmicos. Por otro lado, a pesar de que el BPA o sus derivados que se encuentran en las plantas de tratamiento de aguas residuales no produjeron citotoxicidad de células de la piel a corto plazo, si pudo observarse que la exposición crónica los disruptores podía generar la citotoxicidad de las mismas (Son et al., 2018).

Por otro lado, se postula que el BPA podría funcionar como un neurotóxico. Si bien los estudios son escasos, ha sido asociado a perturbaciones en el desarrollo del sistema nervioso central, en particular relacionado con el comportamiento. Se demostró en ratones que la exposición prenatal al disruptor endocrino podía alterar el desarrollo de neuronas dopaminérgicas, lo cual estaría asociado al desarrollo de enfermedades neurológicas (Elsworth et al., 2013; Masuo y Ishido, 2011), con un aumento en la susceptibilidad al abuso de drogas. En este sentido, existen evidencias de que esa alteración dopaminérgica, se debe a modificaciones en la síntesis, liberación y recaptación de DA, así como a una activación del receptor en el sistema nervioso central (Jones y Miller, 2008; Suzuki et al., 2003). A pesar de estos antecedentes, no existe adecuada información sobre el efecto de este disruptor endocrino sobre la acción dopaminérgica en tejidos periféricos.



# ***HIPÓTESIS Y OBJETIVOS***

## **HIPOTESIS**

En este trabajo de Tesis postulamos que los agonistas dopaminérgicos modulan la actividad de células del sistema inmune cutáneo, queratinocitos y macrófagos, implicadas en la respuesta inflamatoria y en la cicatrización de las heridas. Asimismo, proponemos que el disruptor endócrino bisfenol-A interacciona con vías dopaminérgicas periféricas alterando la funcionalidad de los queratinocitos y los macrófagos.

## **OBJETIVO GENERAL**

El **Objetivo general** de la presente tesis doctoral, en el marco de las interacciones bidireccionales entre los sistemas inmune y neuroendocrino, consistió en 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.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Para cumplir con el objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- I. Estudiar el efecto modulador de agonistas dopaminérgicos sobre líneas celulares humanas de queratinocitos y macrófagos. Investigar la participación de mecanismos dependientes e independientes de receptores catecolaminérgicos.
- II. Investigar el efecto de dopamina sobre la interacción entre queratinocitos y macrófagos.
- III. Evaluar el efecto de dopamina sobre la reparación de una herida in vitro en una monocapa de queratinocitos humanos, y la implicancia de receptores de la inmunidad innata.
- IV. Estudiar el efecto inmunomodulatorio del disruptor endocrino BPA sobre queratinocitos y macrófagos, en ausencia y presencia de dopamina

# ***MATERIALES Y MÉTODOS***

## **1. Cultivos celulares**

### **1.1. Línea celular HaCaT**

Los queratinocitos HaCaT constituyen una línea celular humana establecida, no tumorigénica, y fueron proporcionadas por Prof. N.E. Fusening del German Cancer Research Center (Heidelberg, Germany). La línea conserva gran parte de los receptores presentes en queratinocitos y funcionalidad normal en cuanto a la producción de factores tales como citoquinas, catecolaminas, etc, y a la presencia de receptores de neurotransmisores, citoquinas, hormonas, resultando un excelente modelo para estudios fisiológicos.

Por lo tanto, las células se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB), 100 IU/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin, 2mM de piruvato y 2mM de glutamina, a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> en una estufa humidificada. Los repiques se realizaron cada 48 horas por tratamiento de los cultivos con Tripsina-EDTA a 37°C durante 2 minutos deteniendo la reacción con SFB (10 a 15%). Finalmente, las células fueron cosechadas por centrifugación a 1200 rpm durante 10 minutos y cultivadas hasta alcanzar un 70-80% de confluencia, por no más de 10 generaciones, y sembradas en distintas placas según correspondiera para cada ensayo.

### **1.2. Línea celular THP-1**

Los monocitos TPH-1 son una línea celular humana derivada de pacientes con leucemia monocítica aguda, constituyendo una línea monocítico-macrófágica (ATCC TM TIB-202TM, Rockville, MD, USA). Estas células pueden ser diferenciadas hacia distintos tipos celulares según el tratamiento que se les aplique. En presencia de esteres de forbol, como el forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), los monocitos THP-1 se diferencian a macrófagos con características morfológicas y funcionales comparables a la de los macrófagos derivados de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) (Chanput et al., 2013). La línea posee gran parte de los receptores presentes en monocitos y macrófagos humanos y muestra una funcionalidad normal en cuanto a la producción de factores tales como citoquinas y neurotransmisores (catecolaminas).

De esta manera, la línea celular THP-1 se cultivó en medio RPMI 1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB), 100 IU/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina, 2mM de piruvato y 2mM de glutamina, a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> en una estufa humidificada. Posteriormente, y para todos los experimentos, las células se diferenciaron a macrófagos por la estimulación con PMA (40ng/ml) por un período de 72hs, seguido de 24 hs de incubación con medio sin PMA (tiempo de *resting*), antes de realizar la aplicación de los estímulos. Luego, las células fueron cosechadas por centrifugación a 1200 rpm durante 10 minutos y sembradas en distintas placas según correspondiera para cada ensayo. Las células obtenidas luego de este tratamiento serán denominadas durante la tesis como macrófagos THP-1.

## **2. Aplicación de estímulos**

Para evaluar el efecto modulador de catecolaminas, los queratinocitos fueron estimulados con distintas concentraciones de los agonistas dopaminérgicos dopamina ( $1 \times 10^{-7}$  M a  $1 \times 10^{-4}$  M) y cabergolina ( $1 \times 10^{-5}$  M y  $1 \times 10^{-4}$  M), en presencia o ausencia de antagonistas de receptores dopaminérgicos (sulpirida  $1 \times 10^{-5}$  M y  $1 \times 10^{-4}$  M),  $\beta$ -adrenérgicos (propranolol,  $1 \times 10^{-5}$  M), y ligando de TLR3 (poly (I:C), 1µg/ml). Los estímulos se realizaron en presencia o ausencia de ácido ascórbico (0,1mM) para evaluar los mecanismos dependientes de oxidación según corresponda. Por otro lado, los macrófagos fueron estimulados con dopamina ( $1 \times 10^{-6}$  M a  $1 \times 10^{-4}$  M), en presencia o ausencia de antagonista de receptores  $\beta$ -adrenérgicos (propranolol,  $1 \times 10^{-5}$  M). En todos los casos, los agentes bloqueantes se agregaron 1h antes de los estímulos y posteriormente con los mismos se incubaron durante distintos tiempos de acuerdo con el tipo de estudio a realizar.

Se evaluó el efecto de la exposición al tóxico ambiental BPA a distintos tiempos (24 hs y 10 días) y diferentes concentraciones ( $1 \times 10^{-7}$  M a  $1 \times 10^{-5}$  M), teniendo en cuenta que, para experimentos *in vitro*, se considera dosis de relevancia fisiológica (dosis de exposición ambiental) a concentraciones  $\leq 1 \times 10^{-7}$  M (Wetherill et al., 2007). Para evaluar la interacción con la vía dopaminérgica, los queratinocitos y macrófagos THP-1 estimulados con las distintas concentraciones de BPA fueron incubadas con DA ( $1 \times 10^{-7}$  M a  $1 \times 10^{-5}$  M) durante 24 hs. Por otro lado, las células cultivadas con BPA  $1 \times 10^{-7}$  M durante 10 días fueron incubadas distintas con DA ( $1 \times 10^{-5}$  M) en presencia/ausencia del

antagonista de receptores  $\beta$ -adrenérgicos (propranolol,  $1 \times 10^{-5}$  M) durante el tiempo adecuado según el ensayo a realizar.

Al finalizar las incubaciones se realizaron ensayos de viabilidad (WST-1), proliferación celular (BrdU) y citotoxicidad (LDH). Luego las células fueron cosechadas para ensayos de proteínas (western blot) y especies reactivas del oxígeno (citometría de flujo), y en los sobrenadantes se evaluó la producción de citoquinas (ELISA de captura), óxido nítrico (Ensayo de Griess) y actividad de metaloproteasas (Zimografía). Estos ensayos se realizaron como se describe a continuación.

### **3. Evaluación de diferentes parámetros celulares y moleculares sobre queratinocitos y macrófagos en respuesta a distintos estímulos**

#### **3.1. Ensayos de viabilidad y proliferación celular**

##### **3.1.1. Determinación de viabilidad celular por el método de WST-1**

Se estimó la viabilidad celular de los queratinocitos por medio de una cuantificación no radioactiva de la actividad metabólica celular. Las células fueron incubadas con la sal de tetrazolio, 4-[3-(4-iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolium-1,3-benzendisulfonate (WST-1) luego de la incubación adecuada con los diferentes estímulos. Luego de 1 hora de incubación con el reactivo colorimétrico se cuantificó la producción de formazán obtenida por clivaje mitocondrial (succinato tetrazolium reductasa) de la sal de tetrazolium, en un espectrofotómetro a 450-600nm. Se tuvo en cuenta que la Densidad Óptica (DO) se correlaciona directamente con el número de células metabólicamente activas.

##### **3.1.2. Ensayo de viabilidad celular por medición de la liberación de Lactato deshidrogenasa**

La citotoxicidad de la dopamina sobre los macrófagos fue determinada midiendo la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) como una función de la integridad de la membrana, utilizando el kit comercial CytoTox 96® de detección no radioactiva. Una alícuota del sobrenadante de cada tratamiento se transfirió a una placa de 96 pocillos y se incubó con el mismo volumen del reactivo colorimétrico CytoTox 96 del kit. Luego de 30 minutos se detuvo la reacción y se midió la absorbancia a 490nm.

La liberación de LDH se mide mediante un ensayo enzimático acoplado al clivaje de la sal de tetrazolio (violeta) para obtener producto rojo de formazán y la DO medida es proporcional al número de células lisadas. Se utilizó un control de máxima liberación de LDH, obtenido de la medición de la absorbancia de células lisadas, para determinar el % de citotoxicidad celular para cada tratamiento.

### **3.1.3. Determinación de la proliferación celular**

La proliferación de los queratinocitos y macrófagos se evaluó mediante un ensayo de quimioluminiscencia, basado en la medición de la incorporación de bromo-deoxiuridina (BrdU) durante la síntesis de ADN, siguiendo las recomendaciones del fabricante (Roche). Para ello, las células estimuladas se marcaron con BrdU durante 24 hs. Posteriormente, la incorporación del nucleótido en las células se determinó mediante un ensayo de inmunoenzimático, en el que se utilizó un anticuerpo anti-BrdU marcado con peroxidasa.

### **3.2. Determinación de la producción de citoquinas**

La concentración de citoquinas (IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$ ) fue determinada en los sobrenadantes de cultivo de las células tratadas con los diferentes estímulos, a distintos tiempos según correspondiera para cada citoquina, mediante un ensayo de ELISA de captura utilizando kits comerciales (R&D Systems para IL-6 e IL-1 $\beta$ ; BD OptEIA, Bioscience, para IL-8) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. La absorbancia se midió a 450-540nm en un lector de ELISA. Las concentraciones fueron obtenidas a partir de la curva estándar realizada a partir de la interleuquina recombinante estándar proporcionada por el kit. El límite de detección de cada una de las determinaciones fue: 4,6 pg/ml para IL-6; 3,1 pg/ml para IL-8; 3,9 pg/ml para IL-1 $\beta$ .

### **3.3. Medición de la expresión del factor de transcripción NF $\kappa$ B**

Se determinó la expresión del factor de transcripción NF $\kappa$ B en extractos proteicos nucleares y citoplasmáticos de queratinocitos y macrófagos humanos cultivados durante 1 hora con medio de cultivo (control) o con dopamina  $1 \times 10^{-5}$  M en ausencia/presencia de propranolol  $1 \times 10^{-5}$  M. Se utilizó para los queratinocitos una combinación de PMA 40

ng/ml e ionóforo de calcio A23187  $1\mu\text{M}$  (Plo) y para los macrófagos THP-1 el lipopolisacárido bacteriano (LPS,  $1\mu\text{g/ml}$ ) como controles positivos de activación de la vía. Los extractos fueron obtenidos como se describiera previamente (Cano et al., 2005). Resumidamente, las células se cosecharon y se lavaron dos veces con solución de PBS. Luego el pellet celular se resuspendió en el buffer de lisis A (10 mM HEPES, pH 7.6, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 10 mM KCl, 0.5 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo/PMSF, 1 mM ditioneitol/DTT, y  $2\mu\text{g/mL}$  de cada uno de los inhibidores de proteasas leupeptina, aprotinina, and pepstatina) y 10% NP-40. Los extractos nucleares se obtuvieron por incubación con el buffer de lisis C hipertónico (20 mM HEPES, pH 7.6, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 10 mM  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ /molibdato de sodio, y  $2\mu\text{g/mL}$  cada uno de los inhibidores de proteasas leupeptina, aprotinina, and pepstatina). La concentración total de proteínas en ambos extractos fue determinada mediante el ensayo colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976). Iguales cantidades de proteína se corrieron en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 10%, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante 60 minutos, y fueron detectados con los anticuerpos correspondientes (Santa Cruz Biotechnology/Tecnolab, Argentina): anti-NFk $\text{B}$ p65 (para la subunidad p65), anti-I $\text{kB}\alpha$  (para el inhibidor), anti-actina (control interno de expresión citosólica) y anti-histona 1 (control interno de expresión nuclear). Los anticuerpos fueron detectados con el correspondiente anticuerpo secundario marcado con peroxidasa. Luego la actividad de la enzima se detectó mediante el agregado de peroxidasa y un reactivo quimioluminiscente (ECL). Las imágenes obtenidas luego del revelado fueron escaneadas y semicuantificadas por análisis densitométrico, utilizando el Programa ImageJ (NIH de dominio público, disponible en <http://imagej.nih.gov/ij/>).

### **3.4. Análisis de la actividad enzimática de MMPs**

Se analizó la actividad de las gelatinasa B (MMP-9) en los sobrenadantes de cultivo de células no estimuladas (control) o estimuladas con dopamina  $1 \times 10^{-5}$  M, en ausencia o presencia de propranolol  $1 \times 10^{-5}$  M por 24 hs, mediante la técnica de zimografía según el protocolo descrito por (Quesada et al., 1997). Para llevar a cabo el procedimiento, las células se incubaron en un medio libre de suero (DMEM o RPMI suplementado con Glucosa 0,1 %, BSA 0,02 %, antibióticos, 2mM de piruvato y 2mM de glutamina). Los sobrenadantes de cada uno de los tratamientos fueron diluidos en buffer de muestra 5X



y se analizaron en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 7,5%, en condiciones no reductoras, conteniendo 2mg/ml de gelatina como sustrato de las enzimas, en el gel de resolución.

En el caso de los macrófagos, luego de la electroforesis el gel fue lavado con 2,5% de Tritón X-100 durante 1 hora para remoción del SDS y renaturalización de las enzimas, y se incubó con el buffer enzimático (25 mM Tris, pH 7.5, 0.9% NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>) a 37°C por 24 hs para favorecer la actividad gelatinolítica. Para los queratinocitos, los geles fueron lavados con tres buffers distintos durante 1 h: buffer A (2,5% de Tritón X-100, 5mM Tris pH 7.5), buffer B (5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1μM ZnCl<sub>2</sub>), buffer C (25 mM Tris, pH 7.5, 0.9% NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 2,5% de Tritón X-100). Se realizaron lavados de 30 minutos cada uno de los buffers.

Luego los geles fueron teñidos con 0,05% de Azul Brillante de Coomassie R-250 por 1h y decolorados con una mezcla de ácido acético:metanol:agua (50:10:40). La actividad proteolítica se observó como bandas claras de degradación de la gelatina sobre un fondo uniformemente azul. Los geles fueron escaneados y analizados con el Programa ImageJ (NIH de dominio público, disponible *en* <http://imagej.nih.gov/ij/>).

### **3.5. Ensayo de la herida *in vitro***

Para realizar el ensayo de la herida, las células HaCaT se cultivaron hasta alcanzar el 100% de confluencia y luego fueron incubadas con DMEM sin SFB durante 24 hs antes de la estimulación. Posteriormente, se realizaron las heridas según se describiera previamente (Liang et al., 2007). Con un tip estéril de 10 μl se realizaron las heridas en la monocapa de queratinocitos (3 heridas/pocillo de 2 cm<sup>2</sup>) y luego se lavó con PBS 1X para eliminar los restos de células muertas producidas cuando se hizo la herida. Las células fueron tratadas con medio de cultivo (control) y con los diferentes estímulos durante 24 hs en ausencia de suero. Se tomaron imágenes de la herida a tiempo 0 y 24 hs luego de producirse la misma. Las imágenes se analizaron con el Programa ImageJ (NIH de dominio público, disponible *en* <http://imagej.nih.gov/ij/>). La tasa de migración se determinó como el porcentaje de cierre de la herida al comparar las imágenes a 24 hs respecto del tiempo 0 para cada uno de los tratamientos.

### **3.6. Preparación de medios condicionados**

Los medios condicionados (MC) utilizados en el ensayo de migración (objetivo II), fueron obtenidos a partir de macrófagos THP-1. Las células se incubaron en placas de 24 pocillos a una densidad de  $5 \times 10^{-5}$  células/pocillo y se estimularon con medio de cultivo (control) o con dopamina ( $1 \times 10^{-5}$  y  $1 \times 10^{-4}$  M) en presencia o ausencia del antagonista  $\beta$ -adrenérgico propranolol ( $1 \times 10^{-5}$  M) durante 24 hs. Luego de colectar el medio de cultivo (medio con estímulos), las células fueron incubadas con medio de cultivo fresco durante 24 hs más. El sobrenadante obtenido fue recogido, centrifugado para remover el debrís celular, y utilizado como medio condicionado (MC) sobre los queratinocitos en monocapa para la posterior medición de los diferentes parámetros. Al medio condicionado de macrófagos THP-1 estimulados con dopamina  $1 \times 10^{-5}$  M y  $1 \times 10^{-4}$  M se lo llamó MC (DA  $10^{-5}$  M) y MC (DA  $10^{-4}$  M), respectivamente. Al medio condicionado de macrófagos THP-1 estimulados con propranolol  $1 \times 10^{-5}$  M y DA  $1 \times 10^{-5}$  M/ propranolol  $1 \times 10^{-5}$  M se lo llamó MC (prop  $10^{-5}$  M) y MC (DA/prop  $10^{-5}$  M), respectivamente.

### **3.7. Evaluación de la producción de Especies Reactivas del Oxígeno y Oxido Nítrico**

Se determinó en macrófagos THP-1 estimulados con dopamina durante 24 hs la presencia de especies reactivas del oxígeno, y en los sobrenadantes de células estimuladas con dopamina durante 48-72 hs, los niveles de óxido nítrico.

Los niveles de óxido nítrico (NO) producidos en el medio de cultivo se determinaron por la cuantificación de nitrito ( $\text{NO}_2$ ), uno de los productos estables de la oxidación de NO, utilizando un ensayo colorimétrico basado en la reacción de Griess. Para ello una alícuota del sobrenadante de cultivo y el mismo volumen del reactivo de Griess fueron incubados durante 15-30 minutos y los niveles de nitrito se midieron a una absorbancia de 540nm. La concentración de nitrito fue obtenida utilizando una curva estándar preparada con nitrito de sodio ( $\text{NaNO}_2$ ).

Por otro lado, se evaluó la producción de ROS utilizando las sondas 2,7-diclorodihidro fluoresceína diacetato (DCFH-DA) y di-hidroetidio (DHE) mediante la técnica de citometría de flujo, según el protocolo descrito por Lombardo T y colaboradores, (Lombardo et al., 2012). Las células fueron incubadas con las sondas correspondientes durante 30 minutos en estufa a  $37^\circ\text{C}$  y 5%  $\text{CO}_2$ . Se utilizaron como control positivo el desacoplante de cadena respiratoria CCCP (carbonyl cyanide mchlorophenyl hydrazone) y controles de autofluorescencia y basales (solo con las sondas). Los niveles de ROS

fueron inmediatamente analizados en un citómetro de flujo PARTEC PAS III. Los análisis de los resultados fueron realizados utilizando el programa WinMDI.

#### **4. Análisis estadístico**

Todos los ensayos fueron realizados 3 veces como mínimo, por duplicado, expresando los valores como promedio  $\pm$  error estándar (ES), independientemente del experimento. Se utilizó el programa de procesamiento de datos y estadística Graph Pad PRISM (San Diego, CA, EEUU) y se realizó el test de ANOVA de comparaciones múltiples para establecer el grado de significancia de los resultados entre grupos experimentales. Los resultados experimentales obtenidos fueron procesados estadísticamente de acuerdo con los test a posteriori apropiados para cada experimento. Para el análisis de datos obtenidos por citometría de flujo utilizamos el programa WinMDI seguido del test no paramétrico Kruskal-Wallis ya que en este caso se establece el grado de significancia entre las medianas de los grupos experimentales.

# ***RESULTADOS***

## **OBJETIVO I**

---

Estudiar el efecto modulador de agonistas dopaminérgicos sobre líneas celulares humanas de queratinocitos y macrófagos. Investigar la participación de mecanismos dependientes e independientes de receptores catecolaminérgicos.

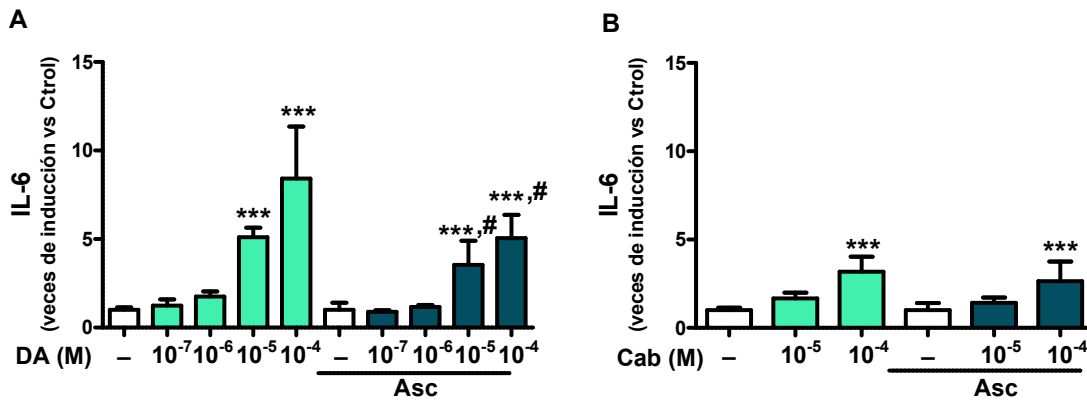
## A. Estudio del efecto modulador de agonistas dopaminérgicos sobre la línea celular humana de queratinocitos HaCaT

### 1. Efecto de agonistas dopaminérgicos sobre la producción de citoquinas en queratinocitos humanos

Teniendo en cuenta el impacto que poseen las catecolaminas adrenalina y noradrenalina sobre la producción de citoquinas en neutrófilos, monocitos, y queratinocitos (Dasu et al., 2014; M. H. Kim et al., 2014), se decidió evaluar el efecto de la catecolamina dopamina y el agonista dopaminérgico cabergolina, sobre la producción de las citoquinas IL-6 e IL-8 en queratinocitos humanos. Para llevar a cabo la primera parte del objetivo I, las células HaCaT fueron estimuladas con distintas concentraciones de dopamina ( $1 \times 10^{-7}$  a  $1 \times 10^{-4}$  M) y cabergolina ( $1 \times 10^{-5}$  y  $1 \times 10^{-4}$  M) durante 24 hs. Debido a que las catecolaminas pueden ejercer efectos en el sistema inmune como consecuencia de su propia oxidación, los estudios fueron realizados en presencia y ausencia del antioxidante ácido ascórbico 0,1mM.

Cuando se analizaron los niveles de IL-6 en el sobrenadante de cultivo de las células HaCaT, observamos un aumento dosis-dependiente de la citoquina, siendo significativo con las dosis  $1 \times 10^{-5}$  y  $1 \times 10^{-4}$  M respecto del control en ausencia de dopamina. Dicho efecto fue reducido en presencia de ácido ascórbico como se observa en la **Figura 1A**. No se observaron diferencias significativas en los niveles basales de IL-6 en presencia o ausencia del antioxidante ( $23.83 \pm 1.49$  y  $34.07 \pm 3.69$  pg/ml, respectivamente).

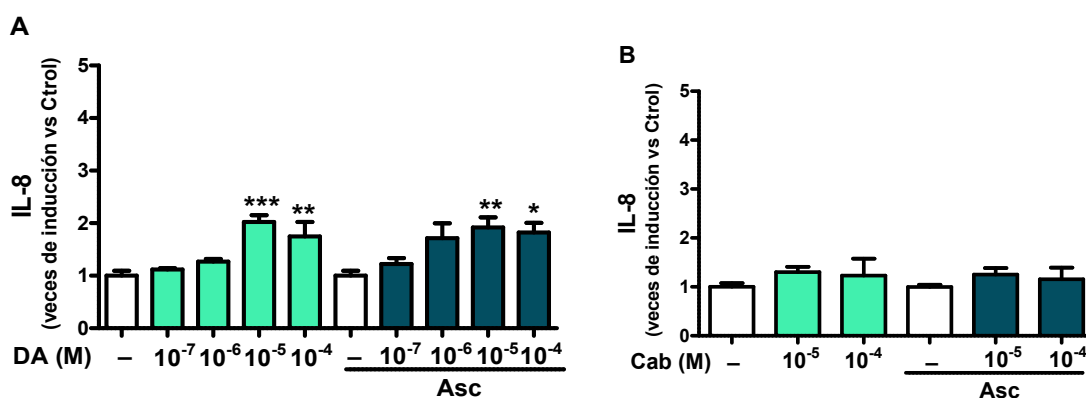
De la misma manera, se evidenció un aumento de los niveles de IL-6, en forma dosis-dependiente, cuando las células HaCaT fueron estimuladas con cabergolina, un agonista dopaminérgico de alta afinidad por receptores dopaminérgicos tipo D2. Los niveles fueron significativamente diferentes del control cuando se empleó cabergolina  $1 \times 10^{-4}$  M; sin embargo, el efecto máximo alcanzado fue menor que el obtenido con DA. A diferencia del estímulo con el neurotransmisor dopamina, el ácido ascórbico no modificó los niveles de IL-6 (**Figura 1B**).



**Figura 1: Efecto de agonistas dopaminérgicos sobre la producción de IL-6 en queratinocitos HaCaT.** Las células fueron estimuladas con dopamina (DA,  $1 \times 10^{-7}$  a  $1 \times 10^{-4}$  M) y cabergolina (Cab,  $1 \times 10^{-5}$  y  $1 \times 10^{-4}$  M) durante 24 hs, en ausencia/presencia de ácido ascórbico. Los niveles de citoquinas se midieron mediante un ensayo de ELISA como se describió en materiales y métodos. Los datos provenientes de las concentraciones obtenidas (pg/ml) se expresan como veces de inducción respecto del control (media  $\pm$  ES). \*\*\*:  $p < 0.001$  vs control; #:  $p < 0.05$  vs dopamina. (n= 4 a 5 experimentos).

Al estudiar el patrón de secreción de IL-8, se observó un aumento significativo en los niveles de la quemoquina en respuesta a concentraciones de dopamina  $1 \times 10^{-5}$  y  $1 \times 10^{-4}$  M cuando se lo comparó con el control en ausencia del neurotransmisor. Si bien este incremento fue menos pronunciado que el de IL-6, los niveles de IL-8 duplicaron los valores basales. Además, el incremento de IL-8 no fue reducido por el ácido ascórbico (**Figura 2A**). Nuevamente, los niveles basales de IL-8 fueron similares en presencia o ausencia del antioxidante ( $69.02 \pm 4.36$  y  $78.28 \pm 3.66$  pg/ml, respectivamente).

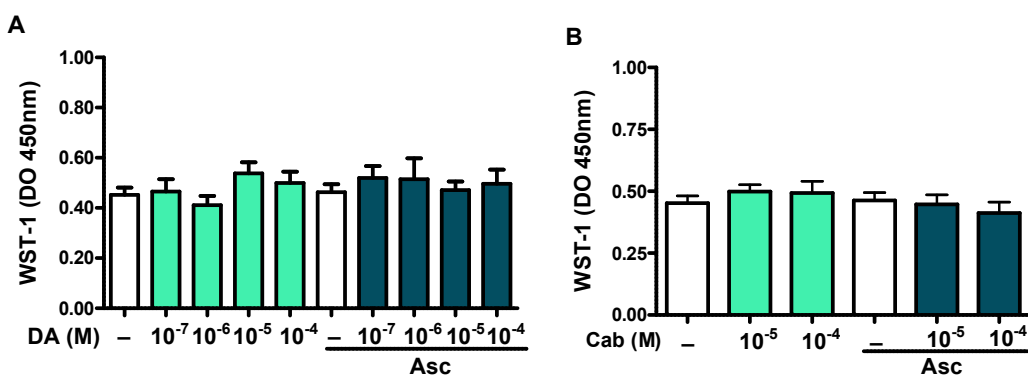
Por el contrario, cuando se analizó el efecto del agonista dopaminérgico D2, cabergolina, sobre la producción de IL-8, no se observó un incremento significativo en la producción de la citoquina estudiada (**Figura 2B**). Asimismo, no se observaron diferencias significativas en la producción de IL-8 cuando las células fueron tratadas con el ácido ascórbico 0.1mM



**Figura 2: Efecto de agonistas dopaminérgicos sobre la producción de IL-8 en queratinocitos HaCaT.** Las células fueron estimuladas con (A) dopamina (DA,  $1 \times 10^{-7}$  a  $1 \times 10^{-4}$  M) y (B) cabergolina (Cab,  $1 \times 10^{-5}$  y  $1 \times 10^{-4}$  M) durante 24 hs, en ausencia/presencia de ácido ascórbico. Los niveles de citoquinas se midieron mediante un ensayo de ELISA como se describió en materiales y métodos. Los datos provenientes de las concentraciones (pg/ml) se expresan como veces de inducción respecto del control (media  $\pm$  ES). \*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*:  $p < 0,05$  vs control. (n= 4 a 5 experimentos).

Con el fin de determinar si los efectos observados en la liberación de las citoquinas por las células HaCaT eran dependientes de la viabilidad celular, se evaluó la misma en las células tratadas o no con los agonistas dopaminérgicos.

Como observamos en la **Figura3**, la viabilidad celular medida con el reactivo colorimétrico WST-1 no fue modificada por ninguno de los agonistas dopaminérgicos (**A**, **B**) en las concentraciones y condiciones estudiadas. Además, el ácido ascórbico en concentración 0.1 mM tampoco modificó la viabilidad celular de los queratinocitos estimulados con agonistas o antagonistas catecolaminérgicos.



**Figura 3: Efecto de agonistas dopaminérgicos sobre la viabilidad celular en los queratinocitos HaCaT.** Las células fueron tratadas con distintas concentraciones de (A) DA ( $1 \times 10^{-7}$  a  $1 \times 10^{-4}$  M) y (B) cabergolina (Cab,  $1 \times 10^{-5}$  y  $1 \times 10^{-4}$  M) durante 24 horas, en ausencia/presencia de ácido ascórbico. Se evaluó la viabilidad celular utilizando el reactivo colorimétrico WST-1 como se describe en materiales y



métodos. Los datos se representan como media  $\pm$  ES de las densidades ópticas (DO) a 450-600nm. (n= 4 a 5 experimentos).

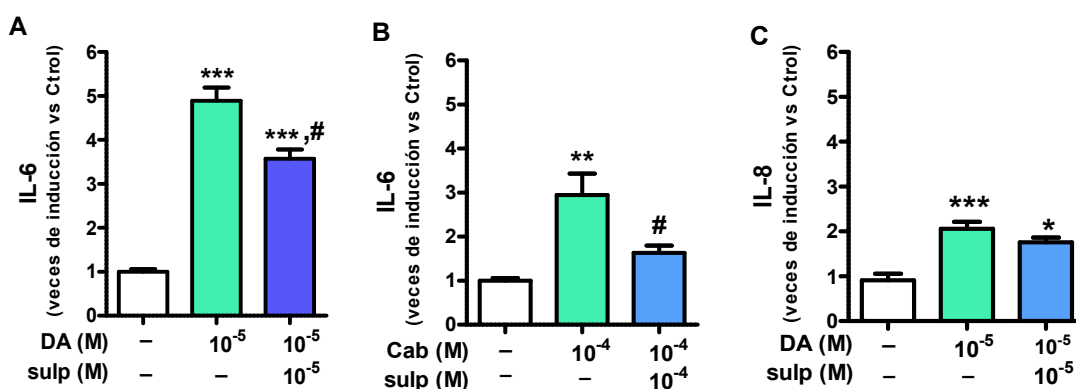
## 2. Participación de receptores dopaminérgicos y $\beta$ -adrenérgicos en respuesta a la dopamina en queratinocito humanos

Con el fin de evaluar si los receptores catecolaminérgicos están involucrados en la producción de citoquinas inducida por los agonistas dopaminérgicos, se emplearon drogas antagonistas de los receptores dopaminérgicos de tipo D2 (sulpirida) y  $\beta$ -adrenérgicos (propranolol).

### 2.1. Efecto del antagonista dopaminérgico sulpirida sobre la producción de IL-6 e IL-8 inducida por agonistas dopaminérgicos

Para evaluar la participación de receptores dopaminérgicos, los queratinocitos fueron estimulados con agonistas dopaminérgicos en presencia de sulpirida (antagonista selectivo D2), y se evaluó la producción de citoquinas. Como se muestra en la **Figura 4**, los niveles de IL-6 estimulados por dopamina  $1 \times 10^{-5}$  M (**Figura 4A**) y cabergolina  $1 \times 10^{-4}$  M (**Figura 4B**) disminuyeron significativamente en presencia de sulpirida  $1 \times 10^{-5}$  y  $1 \times 10^{-4}$  M respectivamente. El efecto antagonista de sulpirida fue mayor en presencia de cabergolina, agonista D2, que en presencia de dopamina.

Por el contrario, no observamos diferencias significativas sobre los niveles de IL-8 inducidos por dopamina (**Figura 4C**).



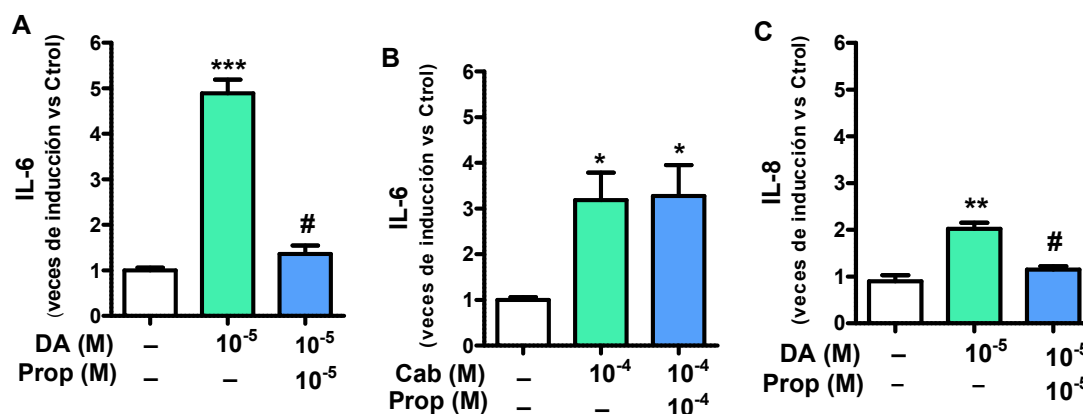
**Figura 4:** Efecto de sulpirida (Sulp, antagonista D2) sobre la producción de IL-6 luego de la estimulación con dopamina (A) y cabergolina (B) y sobre IL-8 luego del tratamiento con dopamina (C). Se

evaluó la producción de las citoquinas luego de 24 hs de incubación mediante un ensayo de ELISA como se describió en materiales y métodos. Los datos provenientes de las concentraciones (pg/ml) se expresan como veces de inducción respecto del control (media  $\pm$  ES). \*\*\*:  $p < 0.001$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*:  $p < 0,05$  vs control; #:  $p < 0.05$  vs droga. (n= 4 a 5 experimentos).

## 2.2. Efecto del antagonista $\beta$ -adrenérgico propranolol sobre la producción de IL-6 e IL-8 inducida por agonistas dopaminérgicos

Con el fin de determinar si el efecto de los agonistas dopaminérgicos sobre la producción de citoquinas puede ser mediado por receptores  $\beta$ -adrenérgicos, los queratinocitos humanos fueron tratados con propranolol, bloqueante selectivo de estos receptores. Como se muestra en la **Figura 5 (A y C)**, el antagonista propranolol ( $1 \times 10^{-5}$  M) disminuyó significativamente el efecto estimulador de la dopamina sobre la producción de IL-6 e IL-8 en los sobrenadantes de queratinocitos humanos.

Por otro lado, y como era de esperar, el efecto de cabergolina  $1 \times 10^{-4}$  M (de mínima afinidad por receptores  $\beta$ -adrenérgicos) sobre IL-6 no fue modificado por el antagonista  $\beta$ -adrenérgico  $1 \times 10^{-4}$  M (**Figura 5B**). Cabe mencionar, que, en ausencia de agonistas dopaminérgicos, el propranolol no modificó los niveles de citoquinas liberados.



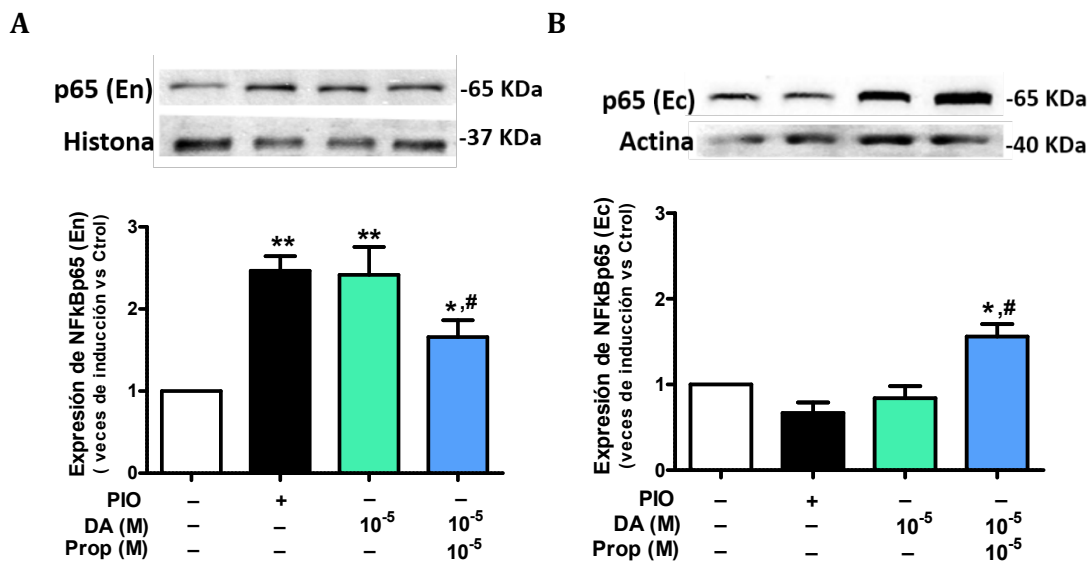
**Figura 5: Efecto de propranolol (Prop, antagonista  $\beta$ -adrenérgico) sobre la producción de IL-6 luego de la estimulación con dopamina (A) y cabergolina (B) y sobre IL-8 (C) luego del tratamiento con dopamina. Se evaluó la producción de las citoquinas luego de 24 hs de incubación mediante un ensayo de ELISA como se describió en materiales y métodos. Los datos provenientes de las concentraciones (pg/ml) se expresan como veces de inducción respecto del control (media  $\pm$  ES). \*\*\*:  $p < 0.001$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*:  $p < 0,05$  vs control; #:  $p < 0.05$  vs dopamina. (n= 4 a 5 experimentos).**

### 3. Efecto de dopamina sobre la expresión de NFκB.

Como hemos observado, la dopamina estimuló la producción de IL-6 e IL-8 en los queratinocitos principalmente por mecanismos mediados por la activación de receptores β-adrenérgicos. Se ha descrito que los receptores β-adrenérgicos pueden activar señales intracelulares que modulan la activación de factores de transcripción como el NFκB (Flierl et al., 2009). La fosforilación y la degradación de IκB induce la translocación nuclear de NFκB y la inducción de la transcripción de genes blanco. Debido a que este factor juega un rol clave en la regulación de vías de señalización proinflamatorias, como es la producción de citoquinas, se decidió evaluar el efecto de DA sobre la activación de la vía NFκB/IκBα. Para ello, los queratinocitos HaCaT fueron estimulados con dopamina  $1 \times 10^{-5}$  M en ausencia o presencia del antagonista β-adrenérgico (Propranolol  $1 \times 10^{-5}$  M) y con Plo como control positivo.

Los resultados obtenidos muestran un aumento significativo en los niveles de la subunidad p65 de NFκB en las fracciones nucleares de los queratinocitos tratados con dopamina, efecto que fue reducido en presencia del antagonista β-adrenérgico (**Figura 6A**). Estos resultados se correlacionan con el incremento en los niveles de la subunidad p65 en los extractos citosólicos obtenidos de las células tratadas con ambas drogas (**Figura 6B**).

Estos resultados sugieren que el tratamiento con dopamina estimula la translocación de NFκB al núcleo vía receptores β-adrenérgicos en los queratinocitos HaCaT.



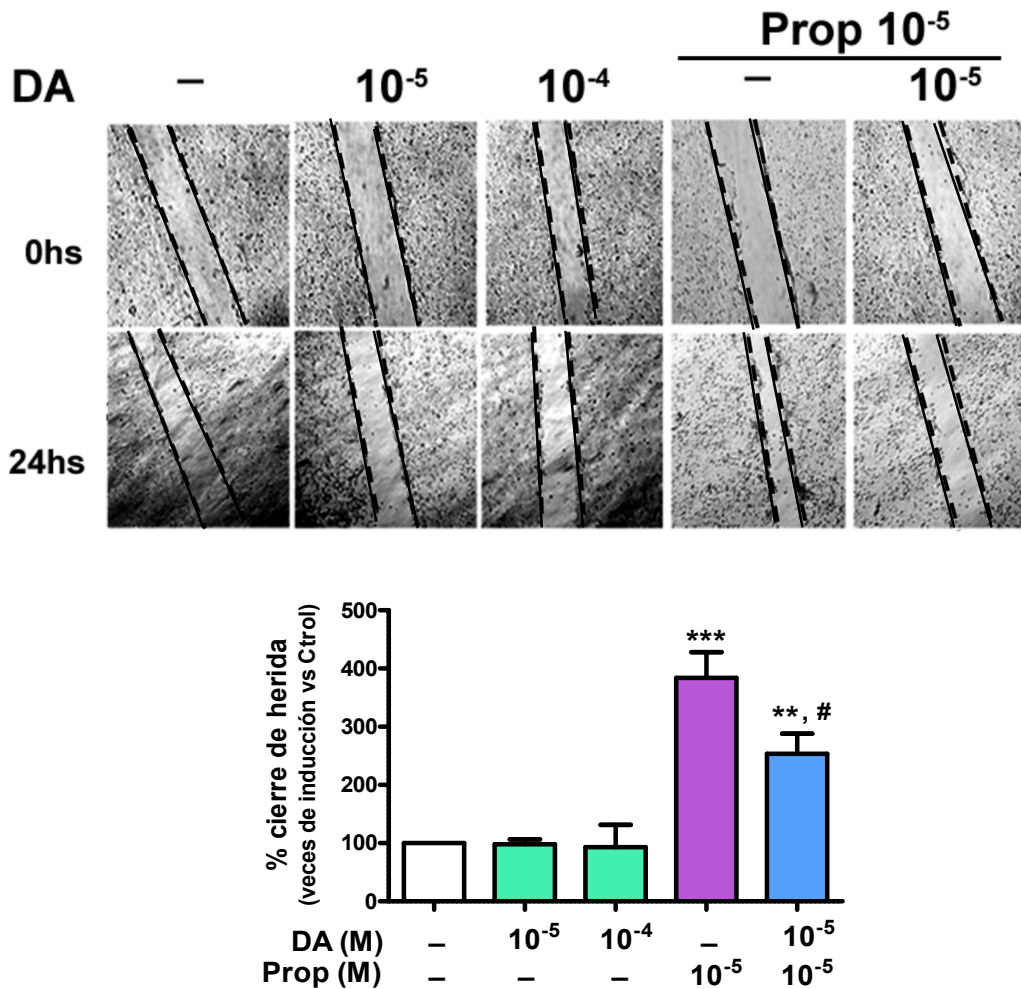
**Figura 6: Efecto de dopamina sobre la expresión de NFκB en queratinocitos HaCaT.** Las células fueron cultivadas en medio de cultivo (Control) o tratadas con PIO, dopamina (DA) en ausencia o en presencia propranolol (Prop) por 1 h a 37° C. Después del tratamiento se obtuvieron los extractos nucleares (A) y citosólicos (B) y la expresión de NFκB se determinó mediante *western blot* como se describió en materiales y métodos. Los datos fueron promediados, analizados estadísticamente. Los valores se expresan como veces de inducción respecto del control (media ± ES). \*: p<0,05; \*\*: p<0,01 vs control; #: p<0,05 vs dopamina (n = 3 experimentos).

#### 4. Efecto de dopamina sobre la migración de queratinocitos humanos humanos.

Ha sido sugerido que los receptores catecolaminérgicos estarían involucrados en el proceso de cicatrización de las heridas (Denda et al., 2003; Le Provost y Pullar, 2015; Pullar et al., 2012; Shome et al., 2012). Por lo tanto, nos propusimos evaluar si la dopamina podría tener un rol funcional en este proceso. Dado que la migración de los queratinocitos en el borde de una herida es un paso crítico en el proceso de cicatrización, abordamos el estudio realizando un ensayo de herida *in vitro*. Luego de realizar la herida sobre las células HaCaT en confluencia, las mismas fueron estimuladas con dopamina 1x10<sup>-5</sup> y 1x10<sup>-4</sup> M. Los resultados obtenidos muestran que la dopamina, en las concentraciones ensayadas, no modificó significativamente el cierre de la herida luego de 24 hs de tratamiento con respecto al control (98,12 ± 8,407% y 128,6 ± 44,60% vs 100 %) en queratinocitos HaCaT (**Figura 7**).

Si bien dopamina no modificó la migración de los queratinocitos, y el antagonista β-adrenérgico propranolol no tuvo un efecto per-se sobre la producción de citoquinas, quisimos evaluar la implicancia de los receptores β-adrenérgicos en el cierre de la

herida. Para ello, los queratinocitos fueron estimulados con el antagonista  $\beta$ -adrenérgico (propranolol  $1 \times 10^{-5}$  M), en presencia o no de dopamina  $1 \times 10^{-5}$  M durante las 24 hs posteriores a la herida. Como se observa en la **Figura 7**, el antagonista aumentó significativamente el cierre de la herida respecto del control ( $384,2 \pm 43,86\%$  vs  $100\%$ ). Este efecto fue disminuido cuando las células se incubaron con el antagonista en presencia de dopamina (**Figura 7**).



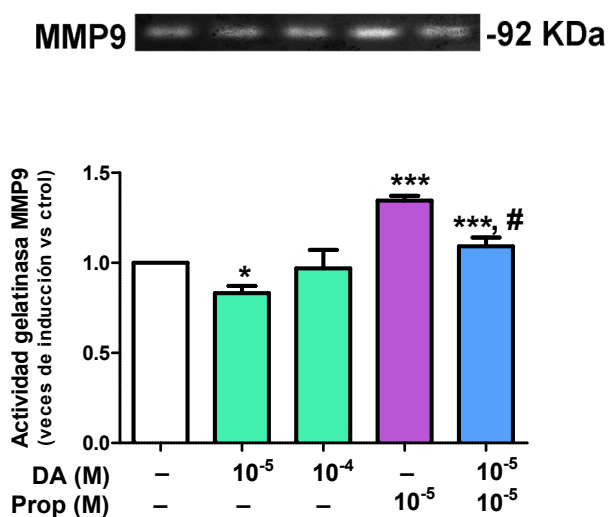
**Figura 7: Ensayo de migración de queratinocitos HaCaT en respuesta a DA.** La monocapa de células fue tratada con dopamina (DA,  $1 \times 10^{-5}$  M y  $1 \times 10^{-4}$  M) o Propranolol (Prop,  $1 \times 10^{-5}$  M) y se realizaron las heridas como se describe en materiales y métodos. Las zonas definidas fueron fotografiadas a tiempo 0 y 24 horas después de realizar la herida. Los valores representan el porcentaje de cierre de la herida para cada condición como media  $\pm$  ES. \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$  vs control; #:  $p < 0,05$  vs propranolol. (n=3 experimentos).

## 5. Participación de las MMPs en la respuesta a dopamina en queratinocitos HaCaT.

Las MMPs participan en todas las etapas de la cicatrización mediante la modificación de la matriz de la herida permitiendo la migración celular y la remodelación del tejido. En particular la MMP-9, expresada por los queratinocitos que migran durante la cicatrización, presenta un rol importante en la migración de estas células y en la respuesta inflamatoria luego del daño. En consecuencia, evaluamos el efecto de dopamina y los receptores  $\beta$ -adrenérgicos sobre la actividad de la gelatinasa inducible MMP-9, para lo cual las células HaCaT fueron estimuladas con dopamina ( $1 \times 10^{-5}$  y  $1 \times 10^{-4}$  M) y/o con propranolol ( $1 \times 10^{-5}$  M).

En los queratinocitos, la concentración de dopamina  $1 \times 10^{-5}$  M disminuyó significativamente la actividad de MMP-9 cuando se lo comparó con los niveles basales, no observándose modificaciones con concentraciones  $1 \times 10^{-4}$  M del agonista. El tratamiento con el antagonista  $\beta$ -adrenérgico propranolol aumentó significativamente la actividad de la MMP-9, efecto que fue reducido en presencia de dopamina (**Figura 8**).

Estos resultados muestran una correlación directa con los observados en el ensayo de cicatrización de la herida.



**Figura 8: Actividad de la MMP9 en queratinocitos HaCaT.** Las células fueron tratadas con dopamina (DA  $1 \times 10^{-5}$ - $1 \times 10^{-4}$ M) y/o con Propranolol (Prop,  $1 \times 10^{-5}$ M), y luego se evaluó la actividad de las metaloproteinasas mediante la técnica de zimografía como se describe en materiales y métodos. Los datos provenientes del análisis densitométrico se representan como veces de inducción versus el control (media  $\pm$  ES). \*:  $p < 0,05$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$  vs control; #:  $p < 0,05$  vs propranolol. (n=4 experimentos).

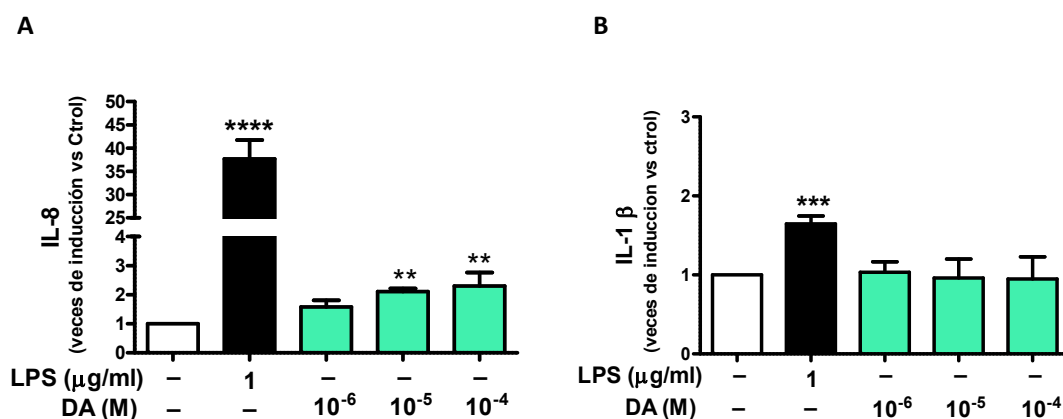
## B. Estudio del efecto modulador de dopamina sobre la línea celular humana de macrófagos THP-1.

### 1. Efecto de dopamina sobre la producción de citoquinas en macrófagos THP-1.

Ya demostramos que la dopamina y el agonista D2 cabergolina modulan la producción de IL-6 e IL-8 en queratinocitos y que dopamina actúa principalmente a través de receptores  $\beta$ -adrenérgicos para producir este efecto. A continuación, decidimos evaluar el efecto de dopamina sobre la producción de las citoquinas proinflamatorias IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  por macrófagos, diferenciados a partir monocitos THP-1 por acción del éster de forbol PMA durante 72 horas.

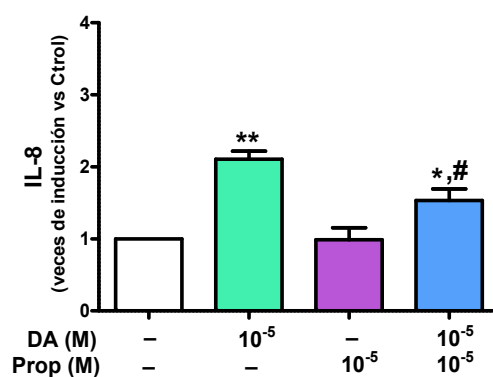
Los macrófagos THP-1 fueron estimulados con dopamina ( $1 \times 10^{-6}$  M a  $1 \times 10^{-4}$  M) durante 24 horas. Los resultados muestran que la dopamina  $1 \times 10^{-6}$  M no modificó los niveles de IL-8. Sin embargo, el tratamiento con dopamina  $1 \times 10^{-5}$  M y  $1 \times 10^{-4}$  M aumentó significativamente los niveles de IL-8 en los sobrenadantes de cultivo (**Figura 9A**). No se observaron efectos de DA sobre los niveles de IL-1 $\beta$  producidos por estas células (**Figura 9B**).

Cabe destacar, que no se han podido detectar las citoquinas IL-6 y TNF- $\alpha$  en el sobrenadante de cultivo de los macrófagos THP-1 en las condiciones ensayadas.



**Figura 9: Efecto de dopamina sobre la producción de IL-8 (A) e IL-1 $\beta$  (B) en macrófagos THP-1.** Las células fueron tratadas con DA ( $1 \times 10^{-6}$  a  $1 \times 10^{-4}$  M) y los niveles de citoquinas se midieron mediante un ensayo de ELISA como se describió en materiales y métodos. Los datos provenientes de las concentraciones (pg/ml) se representan como veces de inducción versus el control (media  $\pm$  ES). \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ , \*\*\*:  $p < 0.001$  vs control, \*\*:  $p < 0.01$  vs control. (n=6 experimentos).

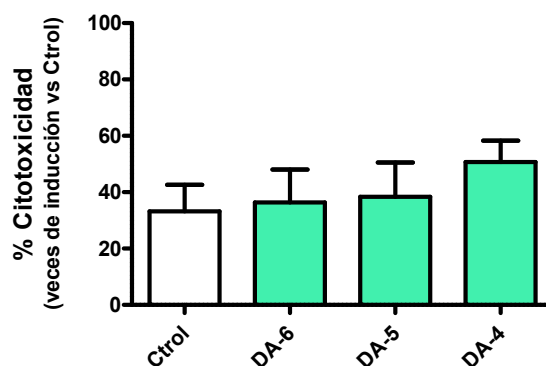
Posteriormente, con el fin de evaluar la participación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos en el efecto de dopamina sobre la producción de citoquinas, los macrófagos THP-1 fueron estimulados con dopamina  $1 \times 10^{-5}$  M en ausencia o presencia del antagonista  $\beta$ -adrenérgico (propranolol  $1 \times 10^{-5}$  M). Como se puede observar en la **Figura 10**, el propranolol no modificó los niveles basales de IL-8 en los macrófagos THP-1. Sin embargo, los niveles de IL-8 inducidos por dopamina fueron reducidos en presencia del antagonista  $\beta$ -adrenérgico propranolol.



**Figura 10: Efecto del antagonista  $\beta$ -adrenérgico propranolol (Prop)** sobre la producción de IL-8 en macrófagos THP-1 luego de la estimulación con dopamina  $1 \times 10^{-5}$  M. Los niveles de citoquinas fueron medidos mediante ensayo de ELISA como se describió en materiales y métodos. Los datos provenientes de las concentraciones (pg/ml) se representan como veces de inducción versus el control (media  $\pm$  ES). \*\*:  $p < 0.01$ , \*:  $p < 0,05$  vs control; #:  $0,05$  vs dopamina ( $n=6$  experimentos).

Luego con el objetivo de determinar si el efecto observado en la producción de citoquinas se debía a cambios en la viabilidad celular inducidos por las drogas, se evaluó la citotoxicidad de la dopamina ( $1 \times 10^{-6}$  M a  $1 \times 10^{-4}$  M) sobre los macrófagos THP-. Como se observa en la **Figura 11**, la liberación de la enzima LDH, utilizada como un indicador de muerte celular, no difiere significativamente entre las distintas concentraciones de dopamina cuando se las comparó con el basal.

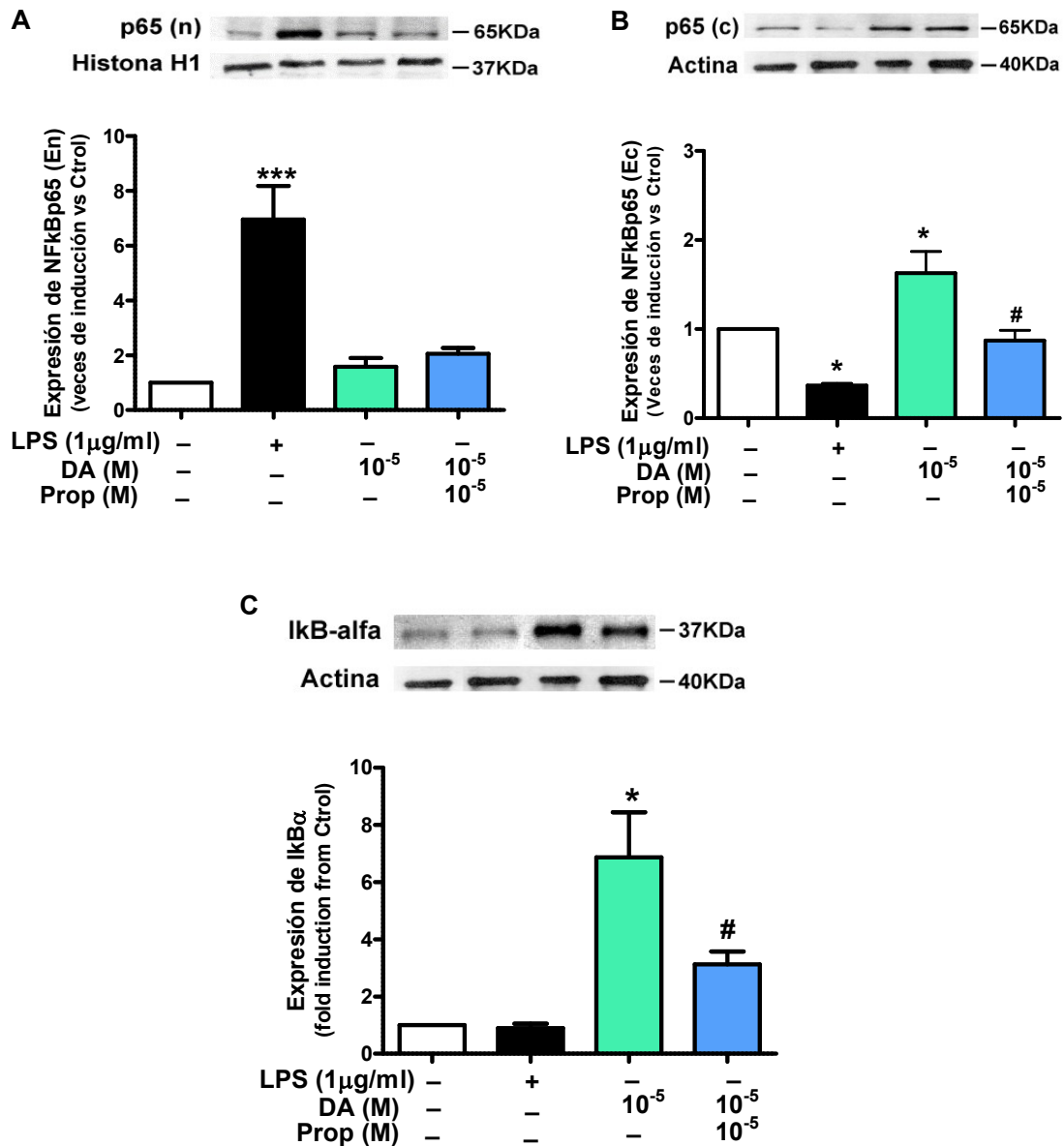




**Figura 11: Ensayo de citotoxicidad en respuesta a dopamina en los macrófagos THP-1.** Las células fueron tratadas con distintas concentraciones de DA  $1 \times 10^{-6}$  M a  $1 \times 10^{-4}$  M durante 24 horas. Se evaluó la citotoxicidad determinando la liberación de LDH según como se describe en materiales y métodos. Los datos se representan como media  $\pm$  ES de las densidades ópticas (DO) a 490nm. (n= 3 experimentos). La palabra celular es redundante en este caso.

## 2. Efecto de dopamina sobre la expresión de NF $\kappa$ B en macrófagos THP-1

Posteriormente evaluamos el efecto de dopamina ( $1 \times 10^{-5}$  M) sobre la vía de señalización de NF $\kappa$ B en los macrófagos THP-1. Como se muestra en la **Figura 12**, la dopamina no modificó los niveles de la subunidad p65 de NF $\kappa$ B en la fracción nuclear (**Figura 12A**). Sin embargo, se observó un aumento significativo de la unidad p65 (**Figura 12B**) y del inhibidor de su activación I $\kappa$ B $\alpha$  (**Figura 12C**) en la fracción citosólica. Cuando las células fueron tratadas con dopamina y propranolol simultáneamente, no se observaron cambios en los niveles de la subunidad p65 de NF $\kappa$ B en la fracción nuclear. No obstante, los niveles de p65 y de su inhibidor I $\kappa$ B $\alpha$  fueron reducidos en la fracción citosólica cuando se los compara con los niveles observados cuando las células fueron tratadas sólo con la dopamina. Estos resultados indican que la DA no está activando esta vía de señalización en los macrófagos THP-1, bajo las condiciones de estudio.



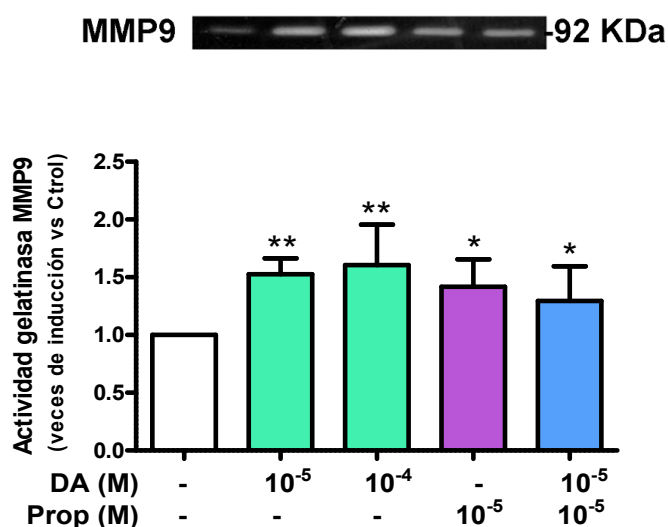
**Figura 12: Efecto de dopamina sobre la expresión de NFκB en macrófagos THP-1.** Las células fueron no tratadas (Control) o tratadas con LPS (1µg/ml) o dopamina (DA), en ausencia o en presencia de propranolol (Prop) por 1 h a 37° C. Después del tratamiento se obtuvieron los extractos nucleares (A) y citosólicos (B, C) y la expresión de NFκB se determinó mediante *western blot* como se describió en materiales y métodos. Los datos obtenidos del análisis densitométrico se expresan como veces de inducción respecto del control (media ± ES). \*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*:  $p < 0,05$  vs control; #:  $p < 0,05$  vs dopamina ( $n = 3$  experimentos).

### 3. Efecto de dopamina sobre la actividad de MMPs en macrófagos THP-1.

A continuación, se decidió evaluar el efecto de dopamina y la implicancia de los receptores β-adrenérgicos sobre la actividad de MMP-9 en macrófagos THP-1, para lo

cual las células fueron tratadas con dopamina ( $1 \times 10^{-5}$  y  $1 \times 10^{-4}$  M) y/o con Propranolol ( $1 \times 10^{-5}$  M) durante 24 hs.

A diferencia de lo observado en los queratinocitos, el tratamiento de los macrófagos THP-1 con dopamina incrementó significativamente la actividad de la enzima MMP-9. El antagonista  $\beta$ -adrenérgico propranolol también aumentó la actividad MMP-9. Además, el efecto estimulante de propranolol sobre la actividad de MMP-9 no fue modificado cuando las células fueron tratadas con propranolol y dopamina simultáneamente (**Figura 13**).



**Figura 13: Efecto de dopamina sobre la actividad de la MMP-9 en macrófagos THP-1.** Las células fueron tratadas con dopamina (DA,  $1 \times 10^{-5}$  y  $1 \times 10^{-4}$  M) y/o con Propranolol (Prop,  $1 \times 10^{-5}$  M), y luego se evaluó la actividad de las MMP-9 mediante la técnica de zimografía como se describe en materiales y métodos. Los datos provenientes del análisis densitométrico se representan como veces de inducción versus el control (media  $\pm$  ES). \*\*:  $p < 0,01$ ; \*:  $p < 0,05$  vs control (n=4 experimentos).

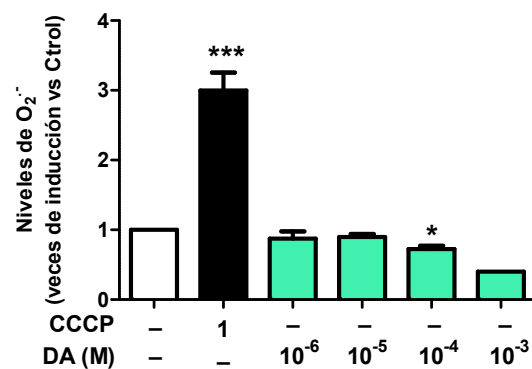
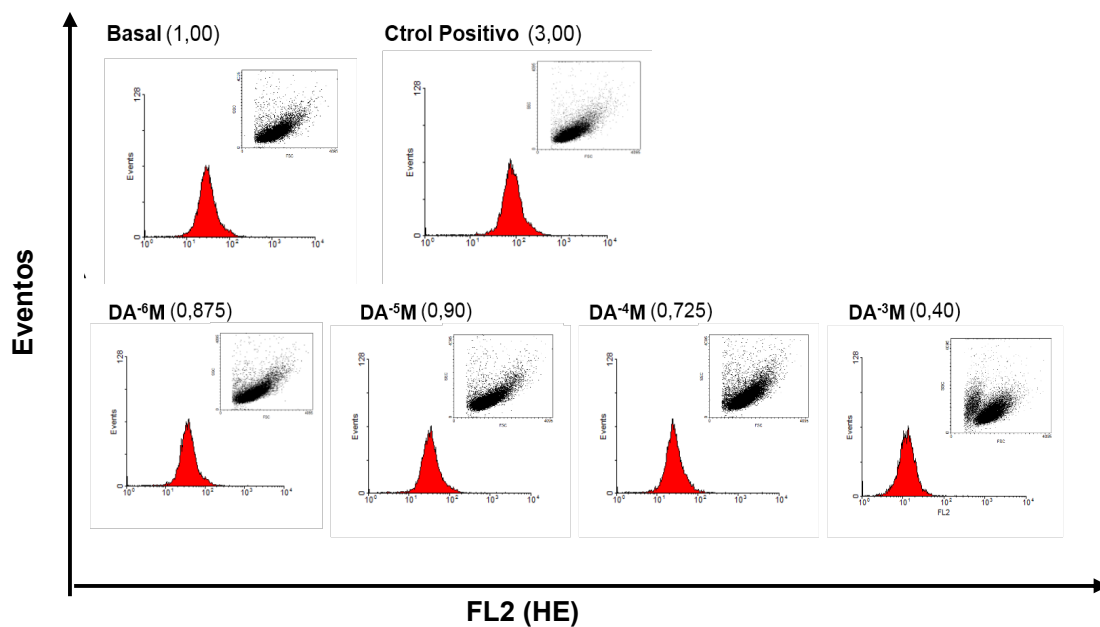
#### 4. Efecto de dopamina sobre la producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno en macrófagos THP-1.

Ya que una función fundamental de los macrófagos durante la respuesta inmune es fagocitar y destruir microorganismos a través de la generación de EROS y de ERN, y que se ha relacionado causalmente el metabolismo intracelular de la DA con el estrés oxidativo y nitrosativo en neuronas dopaminérgicas (Tsang y Chung, 2009), estudiamos

el efecto de DA sobre la producción de anión superóxido y de nitritos en macrófagos THP-1.

#### 4.1. Efecto de dopamina sobre la producción de anión superóxido en macrófagos THP-1

Para llevar a cabo esto, las células fueron estimuladas con distintas concentraciones de DA ( $1 \times 10^{-6}$  a  $1 \times 10^{-3}$  M) durante 24 hs. En la **Figura 14** se puede observar que altas concentraciones de dopamina ( $1 \times 10^{-4}$  M) disminuyen la producción de anión superóxido. Una concentración de dopamina ( $1 \times 10^{-3}$  M) provocó la muerte de las células.

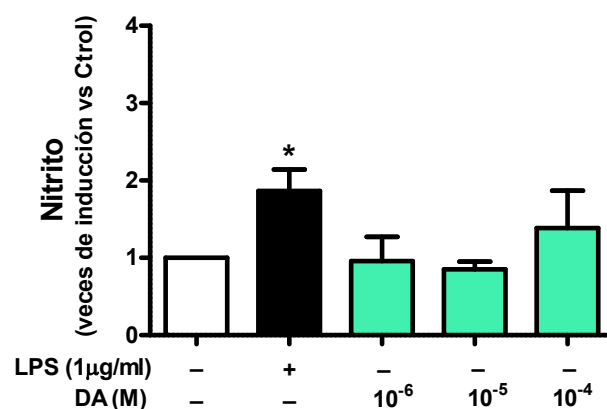


**Figura 14:** Efecto de dopamina sobre producción de especies reactivas del oxígeno en macrófagos THP-1. Las células fueron tratadas con dopamina ( $1 \times 10^{-6}$  a  $1 \times 10^{-3}$  M) o CCCP (1 $\mu$ M) como control positivo

y luego se evaluaron los niveles de anión superóxido mediante la técnica de citometría de flujo como se describe en materiales y métodos. Los datos provenientes del análisis se representan como veces de inducción versus el control (media  $\pm$  ES). \*:  $p > 0,05$  vs control (n=3 experimentos).

#### 4.2. Efecto de dopamina sobre la producción de nitritos en macrófagos THP-1

Los macrófagos THP-1 fueron estimulados con dopamina ( $1 \times 10^{-6}$  M a  $1 \times 10^{-4}$  M) y los niveles de nitrito fueron medidos mediante un ensayo colorimétrico. Como se puede observar en la **Figura 15**, si bien ninguna de las concentraciones de dopamina utilizadas produjo un efecto significativo sobre la producción de nitrito, bajo las condiciones de estudio, se observa una tendencia de DA  $1 \times 10^{-4}$  M a incrementar los niveles de la especie reactiva.



**Figura 15: Efecto de dopamina sobre producción de nitritos en macrófagos THP-1.** Las células fueron tratadas con dopamina ( $1 \times 10^{-6}$  a  $1 \times 10^{-4}$  M) o LPS ( $1 \mu\text{g/ml}$ ), y luego se evaluaron los niveles de nitrito mediante un ensayo colorimétrico como se describe en materiales y métodos. Los datos provenientes del análisis se representan como veces de inducción versus el control (media  $\pm$  ES). \*:  $p < 0,05$  vs control. (n=3 experimentos).

## **CONCLUSIONES I:**

- La dopamina aumentó la concentración de IL-6 e IL-8, efectos mediados por receptores dopaminérgicos,  $\beta$ -adrenérgicos y la intervención de mecanismos oxidativos independientes de receptores en queratinocitos HaCaT. Este aumento observado en la producción de citoquinas se acompañó con la activación del factor de transcripción nuclear NF $\kappa$ B.
- El agonista dopaminérgico D2 cabergolina estimuló la producción de IL-6 en los queratinocitos vía receptores dopaminérgicos sin involucrar a los receptores  $\beta$ -adrenérgicos. La cabergolina no modificó los niveles de IL-8.
- 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.
- La dopamina estimuló la concentración de IL-8 en macrófagos THP-1, acción mediada parcialmente por receptores  $\beta$ -adrenérgicos, sin involucrar la activación del factor de transcripción nuclear NF $\kappa$ B. La dopamina no modificó la producción de IL-1 $\beta$  en macrófagos y la citoquina IL-6 no fue detectable.
- La dopamina incrementó la actividad MMP-9 en los macrófagos, efecto que no sería mediado por los receptores  $\beta$ -adrenérgicos.
- La dopamina ( $1 \times 10^{-6}$  y  $1 \times 10^{-5}$  M) no alteró la producción de anión superóxido ni los niveles de nitrito en los macrófagos. La dopamina ( $1 \times 10^{-4}$  M) disminuyó la producción de anión superóxido e indujo un leve incremento en la producción de nitritos.

## **OBJETIVO II**

---

Investigar el efecto de dopamina sobre la interacción entre queratinocitos y macrófagos humanos

## II. Estudio del efecto de dopamina sobre la interacción entre queratinocitos HaCaT y macrófagos THP-1

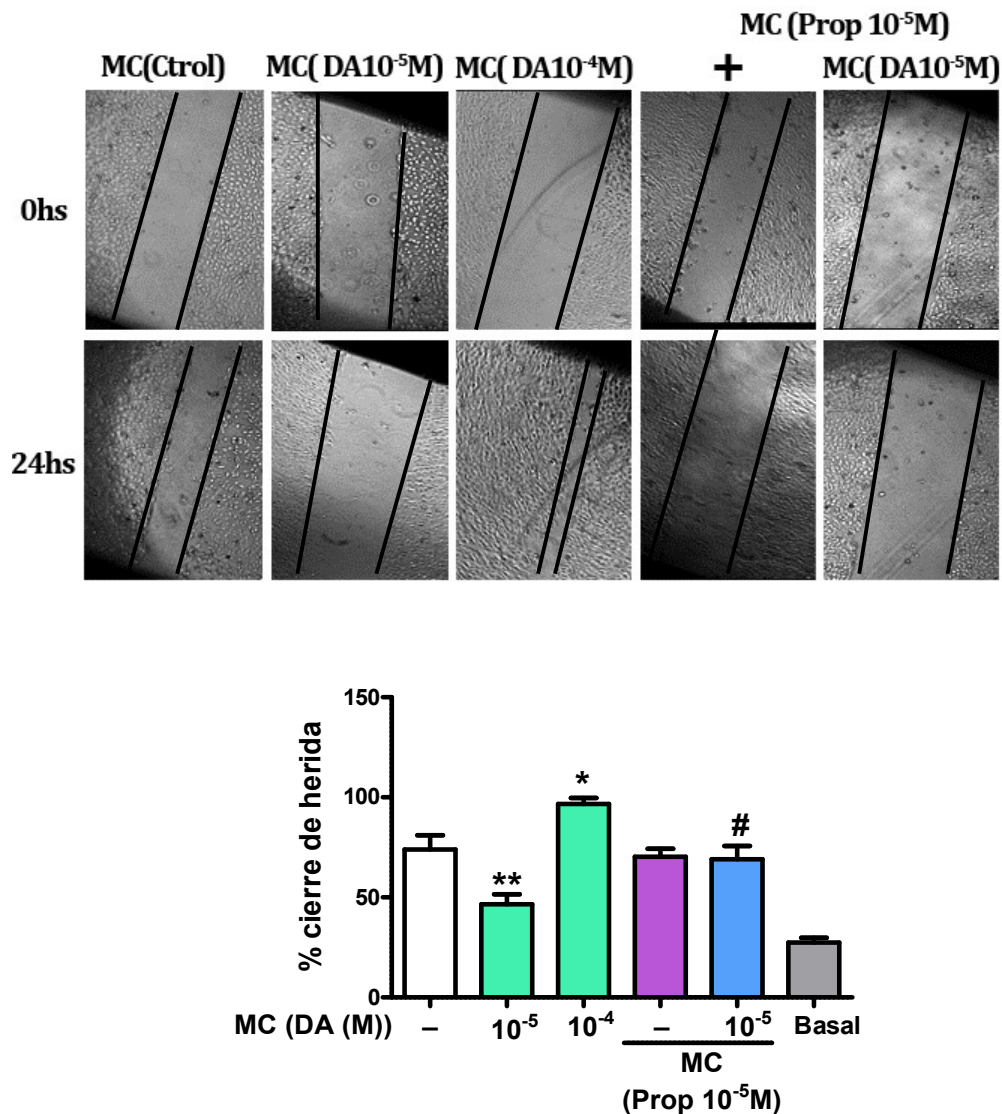
La capacidad que tienen las células del sistema inmune innato de comunicarse con células propias de la piel permite una respuesta inmune efectiva y es la principal característica del sistema inmune cutáneo, (SIC) (Abdallah et al., 2017). Además, teniendo en cuenta el **efecto diferencial** del neurotransmisor dopamina, ejercido a través de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, que se observó sobre las dos líneas celulares estudiadas en el objetivo I, se decidió evaluar la interacción entre estas células en respuesta al efecto de dopamina.

### 1. Evaluación de la migración de queratinocitos en presencia del MC de macrófagos THP-1.

Los macrófagos tienen varias funciones en respuesta al daño tisular, entre ellas favorecer la migración de los queratinocitos y en consecuencia inducir la reparación de heridas (Koh y DiPietro, 2011).

Con el fin de determinar si los MC de macrófagos THP-1 generados previamente podían ejercer algún efecto sobre la migración de los queratinocitos, se realizó un ensayo de herida *in vitro* sobre la monocapa de los queratinocitos y se los incubó con los diferentes MC de macrófagos TPH-1 durante 24 hs. Como se observa en la **Figura 16**, el cierre de la herida fue disminuido significativamente por el MC (DA  $10^{-5}$  M) mientras que el MC (DA  $10^{-4}$  M) la aumentó significativamente comparado con el MC control, sugiriendo la presencia de factores liberados por los macrófagos en presencia del neurotransmisor que modularían la migración de los queratinocitos. Por otro lado, el MC proveniente de los macrófagos pretratados con propranolol ( $10^{-5}$  M) y posteriormente incubados con dopamina ( $10^{-5}$  M) no modificó el cierre de la herida respecto del control, revirtiendo el efecto inhibitorio sobre el cierre de la herida observado con el MC DA  $10^{-5}$  M.





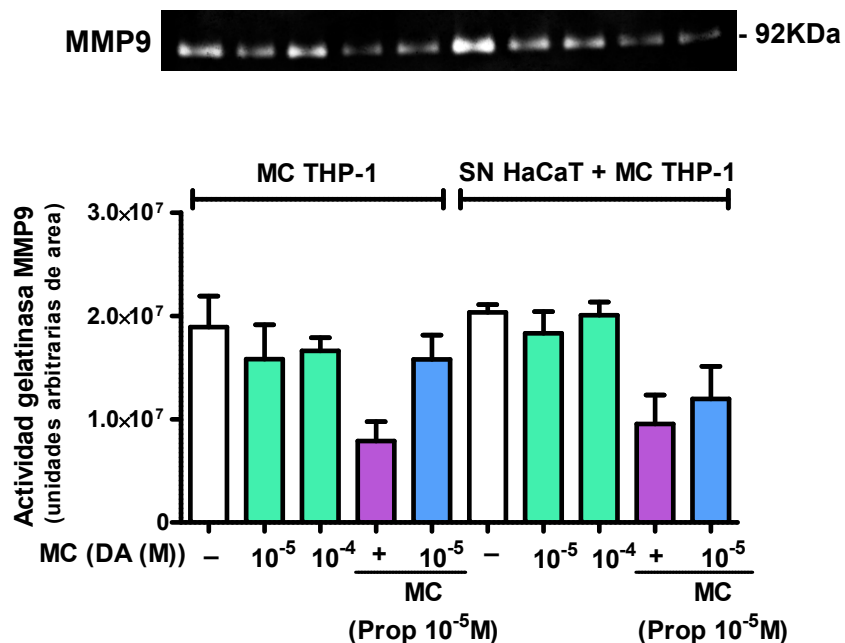
**Figura 16: Ensayo de migración de queratinocitos HaCaT en respuesta a los MC de THP-1.** La monocapa de células fue tratada con medio de cultivo (Basal) o con los diferentes MC THP-1 previamente estimulados con dopamina (DA  $1 \times 10^{-5}$  y  $1 \times 10^{-4}$  M) y/o propranolol (Prop  $1 \times 10^{-5}$  M) y se realizaron las heridas como se describe en materiales y métodos. Las zonas definidas fueron fotografiadas a tiempo 0 y 24 horas después de realizar la herida. Los valores representan el porcentaje de cierre de la herida para cada condición (media  $\pm$  ES). (n= 4 experimentos). \*  $p < 0.05$  respecto al MC control, \*\*  $p < 0.01$  respecto al MC control, #  $p < 0.05$  respecto al MC (DA  $1 \times 10^{-5}$  M).

## 2. Efecto de los MC de macrófagos THP-1 sobre la producción de mediadores proinflamatorios en queratinocitos HaCaT

Para evaluar si los MC de macrófagos THP-1 podían regular la producción de citoquinas proinflamatorias y MMPs por los queratinocitos HaCaT, se determinó la

presencia de los mismos en los sobrenadantes de queratinocitos tratados con estos MC y se los comparó con los niveles medidos en los medios condicionados de THP-1.

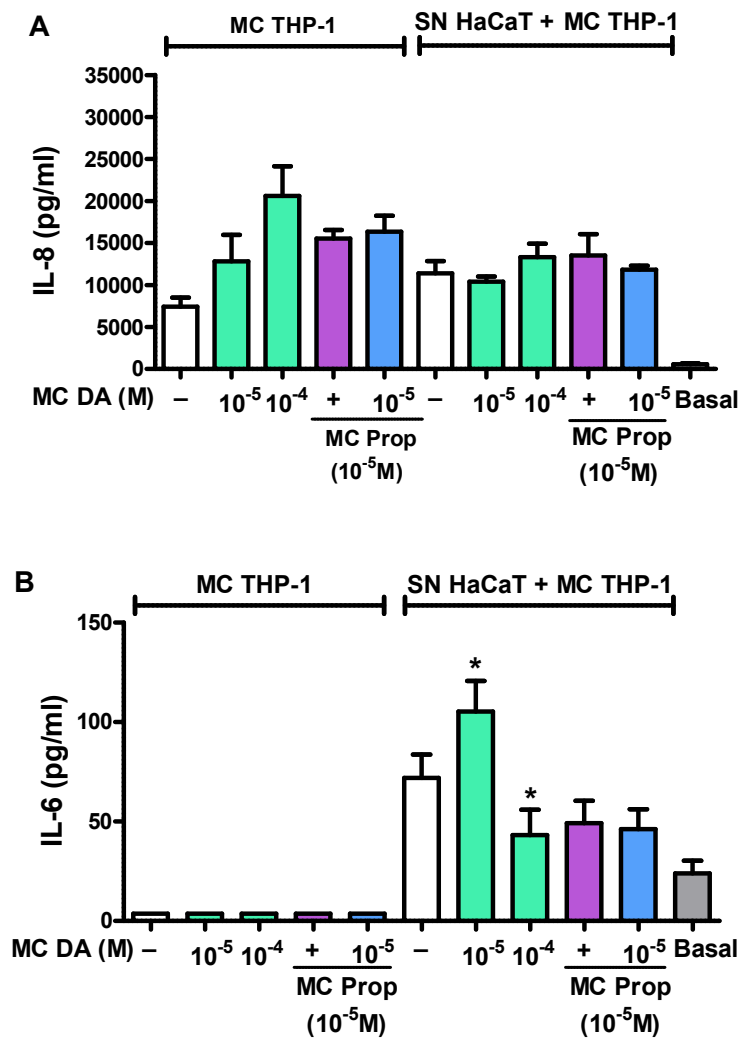
En la **Figura 17** se puede observar que no existen diferencias significativas en la actividad de MMP-9 medida en los sobrenadantes de HaCaT tratados con MC respecto a la medida en los correspondientes MC.



**Figura 17: Actividad de la MMP-9 en queratinocitos HaCaT en respuesta a los MC de THP-1.** La monocapa de células fue tratada con medio de cultivo y con los diferentes MC THP-1 previamente estimulados con dopamina (DA  $1 \times 10^{-5}$  y  $1 \times 10^{-4}$  M) y/o propranolol (Prop  $1 \times 10^{-5}$  M). Luego se evaluó la actividad de las MMPs mediante la técnica de zimografía en los sobrenadantes de queratinocitos estimulados con MC como se describe en materiales y métodos. Los datos provenientes del análisis densitométrico se representan como unidades arbitrarias de área (media  $\pm$  ES). (n= 4 experimentos).

Del mismo modo se analizó la producción de IL-8 e IL-6 en el medio de cultivo de queratinocitos estimulados con los MC (**Figura 18**). Cuando se analizó la producción de IL-8 (**Figura 18A**), los niveles detectados en los sobrenadantes de las células HaCaT tratadas con los MC fueron menores que los observados en los MC, de modo que no se pudo evaluar la influencia de los MC sobre la producción de esta quemoquina por los queratinocitos. Sin embargo, al analizar los niveles de IL-6 (**Figura 18B**) en los sobrenadantes de HaCaT pudo observarse una clara inducción de la producción de esta citoquina cuando las células fueron estimuladas con los MC de THP-1, los cuales

mostraron niveles despreciables de IL-6, permitiendo inferir que la IL-6 medida en los sobrenadantes fue efectivamente liberada por los queratinocitos. Puede observarse además que el MC (DA  $10^{-5}$  M) indujo significativamente la producción de IL-6 en los queratinocitos humanos cuando se lo comparó con su correspondiente MC control y que este efecto no fue observado con los MC de los macrófagos que fueron tratados con la DA en presencia de propranolol.



**Figura 18: Modulación de la producción de IL-6 (A) e IL-8 (B) en queratinocitos HaCaT** tratados con medio de cultivo (basal) o estimulados con MC de THP-1 estimulados previamente con dopamina (DA  $1 \times 10^{-5}$  y  $1 \times 10^{-4}$  M) en presencia/ausencia propranolol (Prop  $1 \times 10^{-5}$  M). Luego los queratinocitos fueron estimulados con los distintos MC de THP-1 y se midió la producción de citoquinas mediante un ensayo de ELISA como se describió en materiales y métodos. Los datos se representan como pg/ml (media  $\pm$  ES). (n= 4 experimentos). \*  $p < 0.05$  respecto al sobrenadante HaCaT (MC control).

## **CONCLUSIONES II:**

- los MC de macrófagos THP-1 tratados con dopamina ( $10^{-4}$  M) presentaron niveles incrementados de IL-8 no así de IL-6 ni de la MMP-9, en comparación con MC de macrófagos no tratados.
  
- Los MC provenientes de macrófagos tratados con dopamina ( $10^{-5}$  M) indujeron sobre los queratinocitos un aumento en la producción de IL-6. No se observaron diferencias en los niveles de IL-8 y MMP-9 presentes en los sobrenadantes de los queratinocitos, en comparación con los medidos en los correspondientes MC. Estos MC ejercieron un efecto inhibitorio sobre la migración de los queratinocitos.
  
- Los MC provenientes de macrófagos tratados con dopamina ( $10^{-4}$  M) indujeron sobre los queratinocitos una disminución de los niveles de IL-6. No se observaron diferencias en los niveles de IL-8 y MMP-9 presentes en los sobrenadantes de los queratinocitos, en comparación con los medidos en los correspondientes MC. Estos MC indujeron un incremento de la migración de los queratinocitos.
  
- Los MC provenientes de macrófagos tratados con propranolol y DA ( $10^{-5}$  M) presentaron niveles de IL-6 significativamente menores a los medidos en los MC provenientes de macrófagos estimulados con DA  $10^{-5}$  M, incluso menores a los observados con los MC control. No se observaron variaciones en los niveles de IL-8 ni MMP-9. Estos MC indujeron un incremento de la migración de los queratinocitos en comparación con la inducida por los MC (DA  $10^{-5}$  M).

### **OBJETIVO III**

---

Evaluar el efecto de dopamina sobre la reparación de una herida *in vitro* en una monocapa de queratinocitos humanos y la implicancia de receptores de la inmunidad innata.

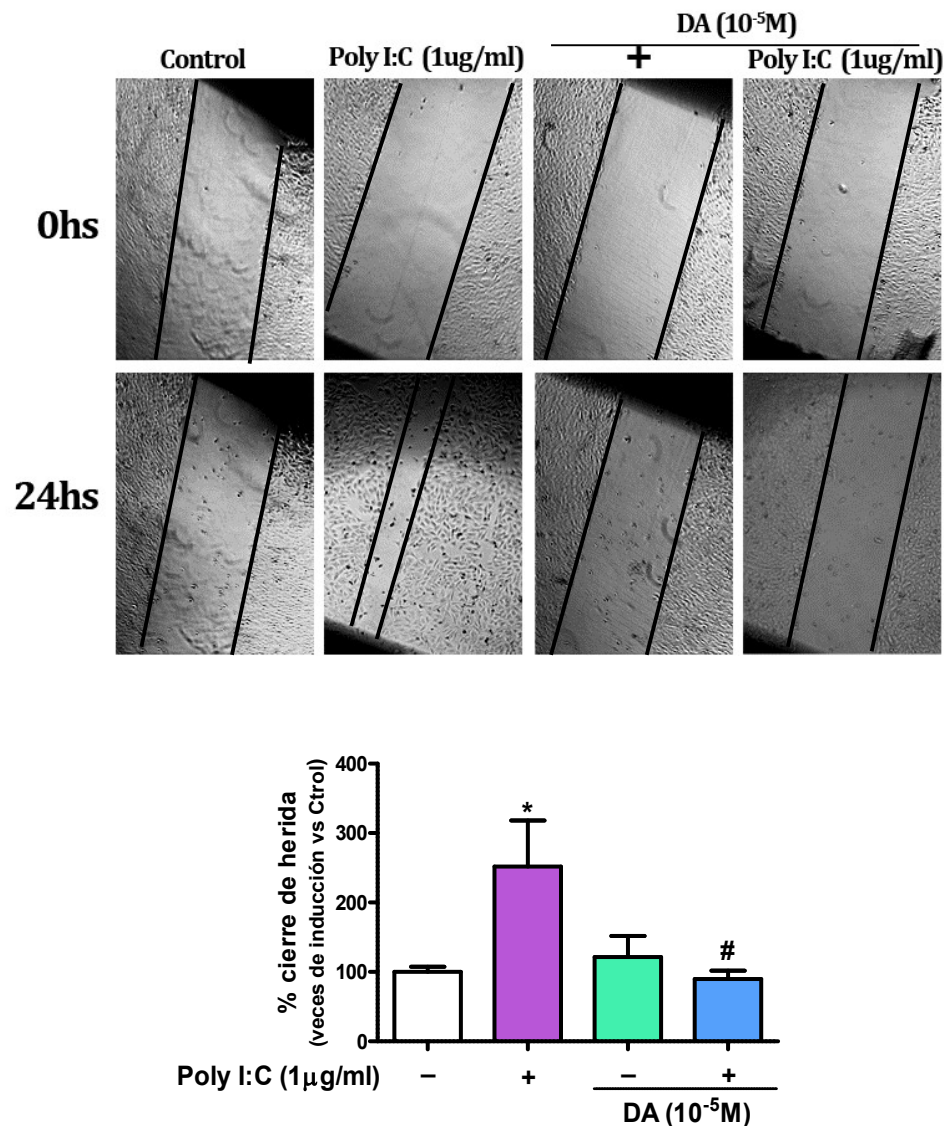
## Participación de los receptores tipo Toll (TLRs) en respuesta a dopamina en queratinocitos HaCaT

Los TLRs cumplen un papel fundamental en la defensa temprana contra la invasión de patógenos. En particular TLR2 y TLR3 son importantes en la detección de daño tisular y en la reparación de heridas. Por lo tanto, su expresión y activación, que resulta en un incremento en la producción de mediadores inflamatorios, se encuentra implicada en procesos fisiológicos de la piel (Dasu et al., 2014). Considerando que una condición de estrés, como la que ocurre luego de un daño tisular, puede llevar a la activación de los TLRs y a la liberación de catecolaminas localmente, decidimos estudiar la participación de ambos subtipos en respuesta a la dopamina en la línea celular HaCaT.

### 1. Efecto de dopamina sobre la migración de queratinocitos en presencia de un agonista de TLR3

Teniendo en cuenta los resultados previamente demostrados en los objetivos I y II, donde la dopamina pudo modificar la migración celular, y conociendo que los TLRs pueden modular el proceso de cicatrización, fue interesante evaluar el efecto de DA sobre la migración de queratinocitos y la participación de los TLR mediante un ensayo de cierre de la herida *in vitro*. Para ello, las células HaCaT fueron estimuladas con dopamina  $1 \times 10^{-5}$  M durante 24 hs en ausencia o presencia de un ligando de TLR3 (poly (I:C),  $1 \mu\text{g/ml}$ ) utilizado, en este caso, como un control positivo que favorece la migración de queratinocitos (Lin et al., 2012).

La **Figura 19** muestra, de la misma forma que lo observado en el objetivo I, que la DA basal no modificó significativamente el cierre de la herida en comparación con el control. Por otro lado, y confirmando los antecedentes de la bibliografía, el ligando de poly (I:C) fue capaz de inducir significativamente el cierre de la herida. Cuando las células fueron tratadas con la combinación de ambos estímulos, se observó que la dopamina disminuyó en forma significativa el cierre de la herida inducido por poly (I:C) a niveles similares a los controles.

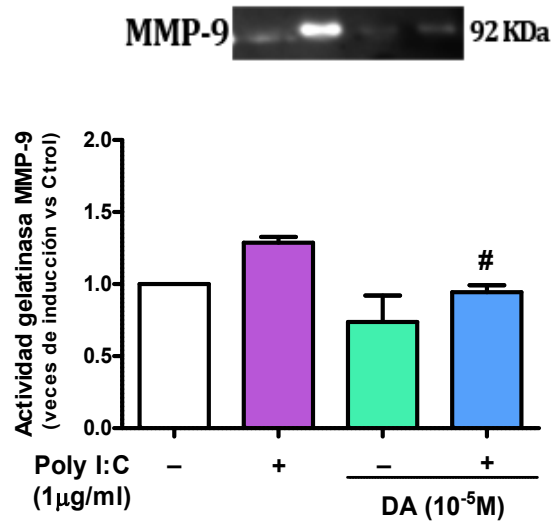


**Figura 19: Efecto de DA sobre el cierre de una herida en queratinocitos HaCaT estimulados con poly (I:C).** La monocapa de células fue tratada con dopamina (DA,  $1 \times 10^{-5}$  M) en ausencia o presencia del ligando de TLR3 (poly (I:C), 1μg/ml) durante 24 hs y se realizaron las heridas como se describe en materiales y métodos. Las zonas definidas fueron fotografiadas a tiempo 0 y 24 hs después de realizar la herida. Los valores representan el porcentaje de cierre de la herida para cada condición como media  $\pm$  ES. \*:  $p < 0,05$  vs control; #:  $p < 0,001$  vs poly I:C (n=4 experimentos).

## 2. Efecto de dopamina sobre la actividad de MMP-9 en presencia de un agonista de TLR3 en queratinocitos HaCaT

Luego, considerando los resultados obtenidos en el ensayo de la herida de la **Figura 19** y teniendo en cuenta que, durante la reparación de las heridas, las MMPs cumplen un rol fundamental en la migración celular (Caley et al., 2015), se analizó la actividad de la MMP-9 en los sobrenadantes que provienen del ensayo de la herida sobre

las células HaCaT, luego de 24 hs de estimulación con dopamina ( $1 \times 10^{-5}$  M) y/o  $1 \mu\text{g/ml}$  de poly (I:C). Los resultados se muestran en la **Figura 20**.



**Figura 20: Actividad de la MMP-9 en queratinocitos HaCaT y su modulación por DA en presencia de un agonista de TLR3.** Las células fueron tratadas con dopamina (DA,  $1 \times 10^{-5}$  M) y/o con el ligando de TLR3 (Poly I:C,  $1 \mu\text{g/ml}$ ), y luego se evaluó la actividad gelatinolítica de las MMPs mediante la técnica de zimografía como se describió en materiales y métodos. Los datos provenientes del análisis densitométrico se representan como veces de inducción versus el control de la actividad enzimática (media  $\pm$  ES). #:  $P < 0.05$  vs poly (I:C) (n= 4 experimentos).

De la **Figura 20** observamos que la dopamina no modificó de forma significativa la actividad enzimática de MMP-9 en los queratinocitos HaCaT, respecto de la producción basal. Sin embargo, el tratamiento de las células con dopamina ( $10^{-5}$ M) inhibió significativamente el incremento de MMP-9 inducido por el agonista TLR3, poly (I:C).

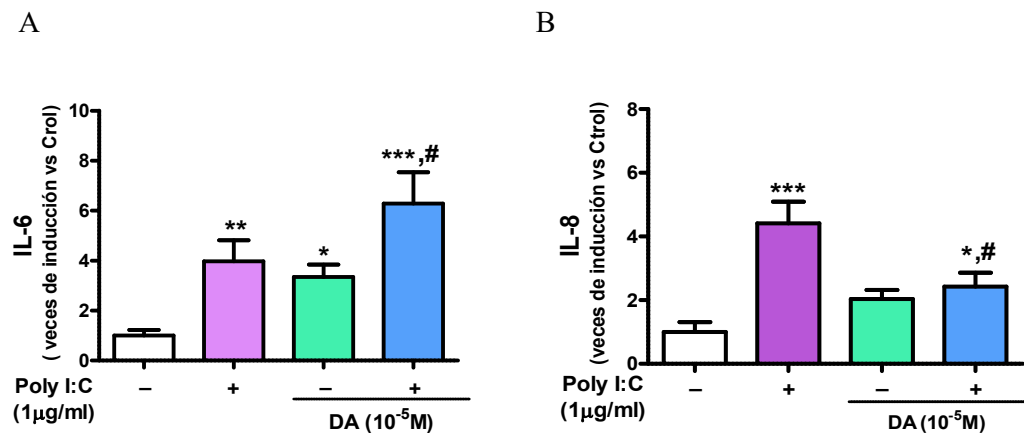
### 3. Efecto de dopamina sobre la producción de citoquinas en presencia de un agonista de TLR3 en queratinocitos humanos

Se ha descrito que las citoquinas proinflamatorias IL-6 e IL-8 favorecen la migración de diferentes tipos celulares, sin embargo, una respuesta inflamatoria exacerbada puede provocar efectos contrarios sobre dicho proceso (McFarland-Mancini et al., 2010). Frente a estos antecedentes, nos preguntamos si la dopamina podía modular la producción de citoquinas inducidas por la activación de TLR3 durante el



proceso de migración celular. Para ello, se evaluaron los niveles de citoquinas en los sobrenadantes obtenidos del ensayo de la herida sobre los queratinocitos HaCaT luego de ser estimulados durante 24 hs con dopamina ( $1 \times 10^{-5}M$ ) en ausencia o presencia de  $1\mu g/ml$  poly (I:C). La **Figura 21**, muestra que tanto la dopamina basal, como el ligando de TLR3 aumentaron significativamente los niveles de la IL-6 en los sobrenadantes de queratinocitos sobre los cuales se realizó el ensayo de la herida. La combinación de poly (I:C) y dopamina incrementó significativamente la producción de IL-6, respecto de la inducida por dopamina. De similar modo, esta combinación indujo un incremento de los niveles de IL-6 respecto a la inducida por el agonista poly (I:C), a pesar de que este incremento no resultó ser significativo.

La producción de la quemoquina IL-8 no fue aumentada significativamente por la dopamina. A diferencia de lo obtenido sobre los niveles de IL-6, la dopamina disminuyó significativamente la producción de IL-8 inducida por poly (I:C) en las células HaCaT.



**Figura 21: Efecto de dopamina y poly (I:C) sobre la producción de IL-6 (A) e IL-8 (B) en queratinocitos HaCaT.** Las células fueron tratadas con dopamina (DA  $1 \times 10^{-5}M$ ) en presencia o ausencia de  $1\mu g/ml$  de poly (I:C) y los niveles de citoquinas fueron medidos mediante un ensayo de ELISA como se describió en materiales y métodos. Los datos provenientes de las densidades ópticas se representan como veces de inducción versus el control (media  $\pm$  ES). \*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*:  $p < 0,05$  vs control; #:  $p < 0,05$  vs poly (I:C). (n=4 experimentos)

### **CONCLUSIONES III:**

En queratinocitos HaCaT:

- Dopamina disminuyó la migración celular inducida por un agonista de TLR3 (poly (I:C))
- Dopamina inhibió la actividad de MMP-9 inducida por poly (I:C)
- Dopamina disminuyó significativamente los niveles de IL-8 inducidos por poly (I:C).
- Dopamina ejerció un efecto sinérgico con poly (I:C) sobre la producción de IL-6.

## **OBJETIVO IV**

---

Estudiar el efecto inmunomodulatorio del disruptor endócrino BPA sobre queratinocitos y macrófagos, en ausencia y presencia de dopamina

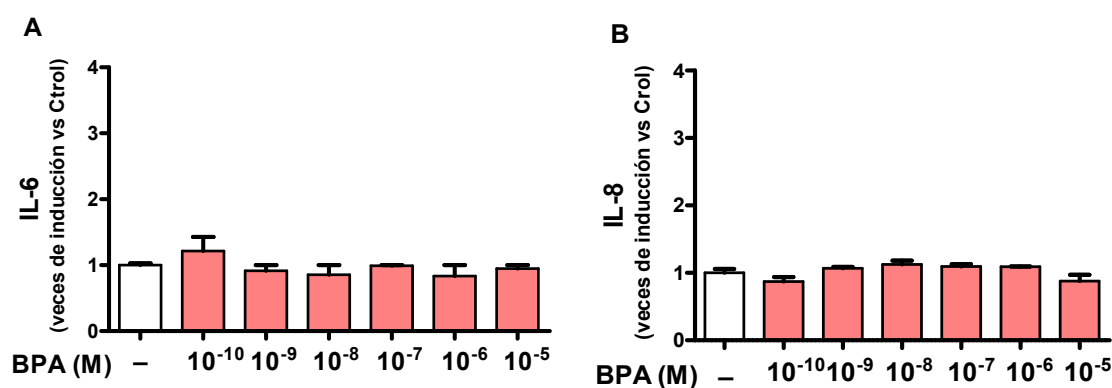
#### IV. Estudio del efecto inmunomodulatorio del disruptor endocrino BPA sobre queratinocitos y macrófagos, en ausencia y presencia de dopamina

Además de los efectos que tienen los disruptores endocrinos sobre la función endocrina, ha sido demostrado más recientemente que pueden afectar la función del sistema inmune (Bansal et al., 2018). Teniendo en cuenta que ha sido demostrado que la exposición temprana al BPA puede interferir a distintos niveles sobre las vías dopaminérgicas centrales (Inadera, 2015) se planteó como cuarto objetivo de esta tesis evaluar el efecto inmunomodulatorio del disruptor endocrino BPA, sobre la acción del neurotransmisor dopamina en queratinocitos y macrófagos humanos.

##### A. Efectos de BPA en queratinocitos humanos HaCaT

###### A.1.1. Efecto de BPA 24 hs sobre la producción de IL-6 e IL-8 en queratinocitos humanos

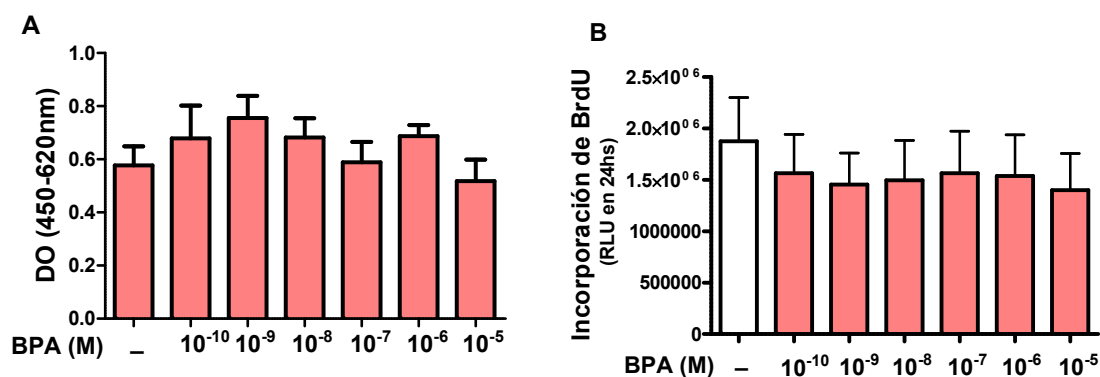
En primer lugar, se evaluó el efecto del disruptor endocrino, BPA, sobre la producción de citoquinas en queratinocitos humanos. Para llevar a cabo esto, se midió la producción de IL-6 e IL-8 en los sobrenadantes de cultivo de queratinocitos HaCaT estimulados durante 24 hs con diferentes concentraciones de BPA. Como se muestra en la **Figura 22**, la producción de IL-6 (**Figura 22A**) e IL-8 (**Figura 22B**) por los queratinocitos humanos no fue modificada en respuesta a las concentraciones de BPA utilizadas.



**Figura 22: Efecto de BPA sobre la producción de IL-6 (A) e IL-8 (B) en queratinocitos HaCaT.** Las células fueron tratadas con BPA ( $1 \times 10^{-5}$  a  $1 \times 10^{-10}$  M) durante 24hs y los niveles de citoquinas fueron medidos mediante un ensayo de ELISA como se describió en materiales y métodos. Los datos provenientes

de las concentraciones (pg/ml) se representan como veces de inducción versus el control (media  $\pm$  ES). (n=3 experimentos).

Posteriormente, se evaluó la viabilidad y la proliferación celular de los queratinocitos HaCaT tratados con distintas concentraciones de BPA con el fin de determinar si los efectos observados en la liberación de las citoquinas eran dependientes de la proliferación. Como se observa en la **Figura 23**, la viabilidad celular (**A**) y la proliferación (**B**) no mostraron diferencias significativas para ninguna de las concentraciones utilizadas del disruptor endocrino cuando se las comparó con el basal (**Figura 23 A y B**).

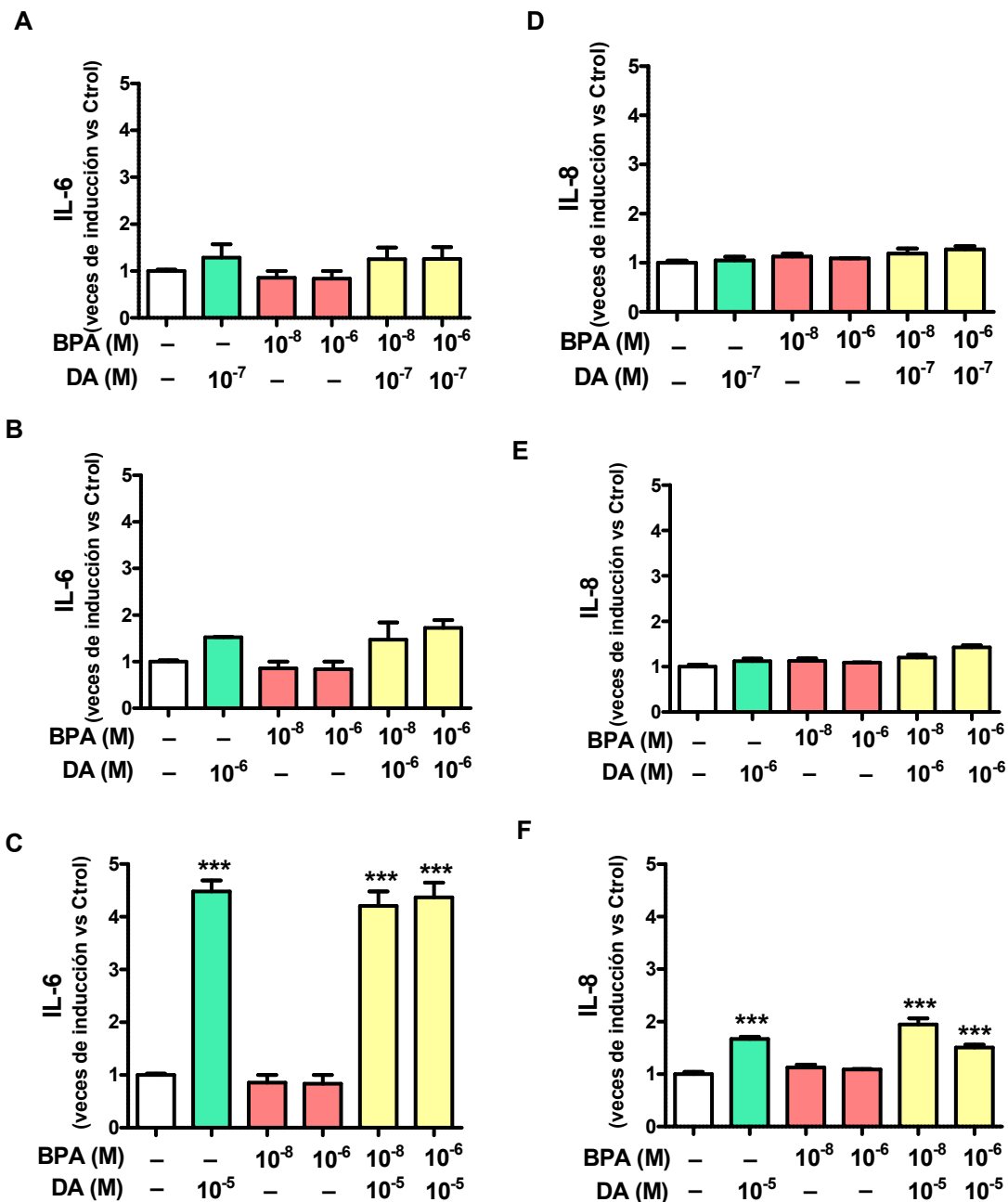


**Figura 23: Efecto sobre la viabilidad y proliferación en los queratinocitos HaCaT.** Las células fueron tratadas con BPA durante 24 hs y se evaluó la viabilidad utilizando el reactivo colorimétrico WST-1 y la proliferación a través de la incorporación de BrdU como se describe en materiales y métodos. Los datos se representan como media  $\pm$  ES. (n= 3 experimentos).

### A.1.2. Efecto de BPA sobre la producción de IL-6 e IL-8 por queratinocitos humanos, en presencia de dopamina.

Si bien algunos disruptores endocrinos, como el BPA, han sido descritos como neurotóxicos al alterar la función dopaminérgica central (Jones y Miller, 2008), no hay datos acerca de la posible interferencia con las vías dopaminérgicas a nivel periférico. Nos propusimos evaluar a continuación la acción de BPA sobre el efecto de dopamina en la producción de IL-6 e IL-8 por los queratinocitos humanos. Para ello, las células HaCaT fueron incubadas con distintas concentraciones de BPA (1x10<sup>-8</sup> y 1x10<sup>-6</sup> M) en presencia del neurotransmisor dopamina (1x10<sup>-7</sup> a 1x10<sup>-5</sup> M) y se evaluó, luego de 24 hs de incubación, la producción de IL-6 e IL-8 secretada en los sobrenadantes de cultivo. Como se mencionó en la sección de Materiales y Métodos, las concentraciones de BPA

utilizadas tuvieron como objetivo evaluar el efecto de dosis superiores e inferiores de la concentración establecida como dosis de exposición ambiental ( $1 \times 10^{-7}$  M). Como se muestra en la **Figura 24**, ninguna de las combinaciones de concentraciones de BPA utilizadas produjo alguna modificación en la producción de IL-6 (**Figura 24 A, B y C**) e IL-8 (**Figura 24 D, E y F**), incluso cuando los niveles de las citoquinas fueron estimulados con DA  $1 \times 10^{-5}$  M.



**Figura 24:** Efecto de BPA sobre la producción de IL-6 (A) e IL-8 (B) en queratinocitos HaCaT. Las células fueron tratadas con BPA ( $1 \times 10^{-6}$  y  $1 \times 10^{-8}$  M) en ausencia y presencia de dopamina (DA  $1 \times 10^{-7}$ - $1 \times 10^{-5}$  M) durante 24hs y los niveles de citoquinas fueron medidos mediante un ensayo de ELISA como se

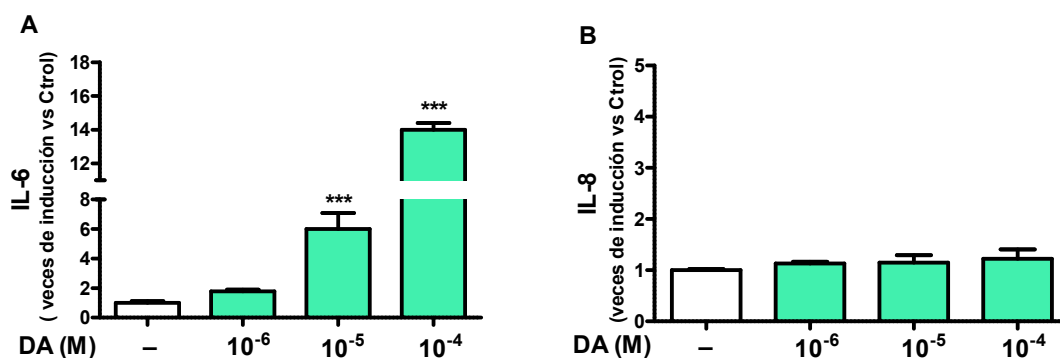
describió en materiales y métodos. Los datos provenientes de las concentraciones (pg/ml) se representan como veces de inducción versus el control (media  $\pm$  ES). \*\*\*:  $p < 0.001$  vs control. (n= 3 experimentos).

## **A.2. Efecto de BPA 10 días sobre la acción de dopamina en queratinocitos humanos**

Considerando que no se obtuvieron resultados significativos cuando las células fueron incubadas con el disruptor endocrino BPA durante 24 hs, y teniendo en cuenta que la exposición a este tipo de disruptor se produce de manera crónica en la vida cotidiana, decidimos evaluar el efecto de BPA sobre los queratinocitos humanos para lo cual fueron cultivados durante 10 días en presencia de disruptor ( $1 \times 10^{-7}$  M). En esta serie de estudios las células fueron luego estimuladas con dopamina durante 24 hs y se evaluaron diferentes parámetros inflamatorios.

### **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.**

Como se observa en la **Figura 25A**, luego de la incubación con BPA, los niveles de IL-6 aumentaron significativamente cuando los queratinocitos fueron estimulados con dopamina ( $1 \times 10^{-5}$  y  $1 \times 10^{-4}$  M), sin observarse modificaciones con dopamina  $1 \times 10^{-6}$  M. Estos resultados presentan el mismo patrón de expresión de IL-6 observado en la **Figura 1A** (ausencia de BPA), sugiriendo en este caso que el BPA no modificaría la acción de dopamina sobre la producción de IL-6 en los queratinocitos HaCaT. Por el contrario, como se observa en la **Figura 25B**, en presencia de BPA, la dopamina  $1 \times 10^{-6}$  a  $1 \times 10^{-4}$  M no modificó los niveles de IL-8 respecto del control. Al comparar este resultado con el mostrado en la **Figura 2A** (ausencia de BPA), en el que se observó una inducción de la citoquina a concentraciones de  $10^{-5}$  M de dopamina, podemos observar un perfil de expresión diferente, sugiriendo que el BPA estaría alterando el efecto de dopamina sobre la producción de IL-8 en los queratinocitos humanos.

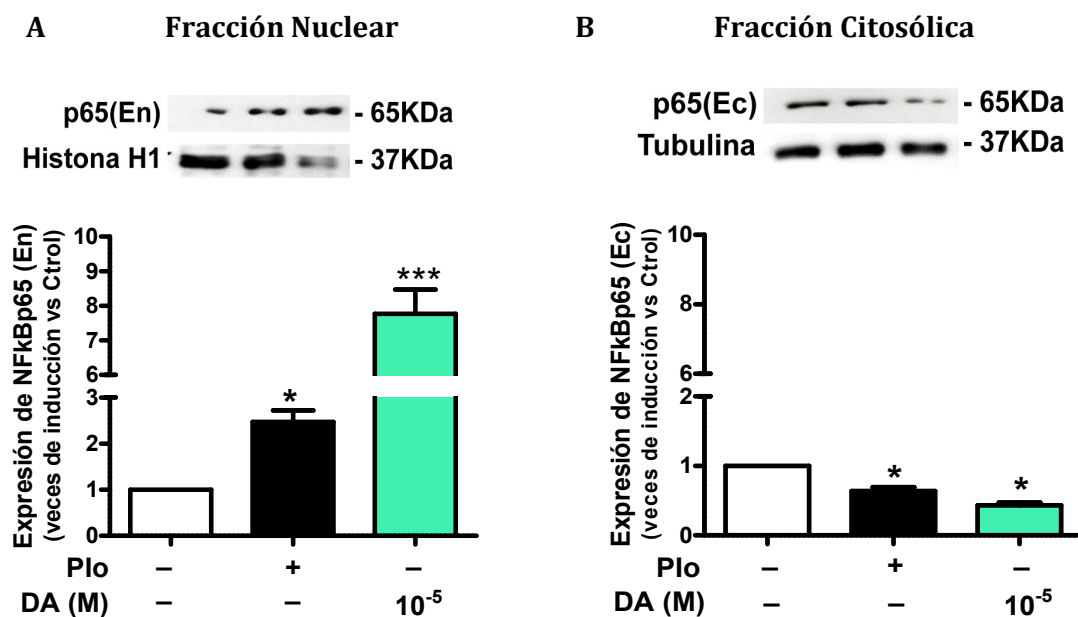


**Figura 25: Efecto de dopamina sobre la producción de IL-6 (A) e IL-8 (B) en queratinocitos HaCaT tratados con BPA durante 10 días.** Las células fueron cultivadas con BPA ( $1 \times 10^{-7}$  M) durante 10 días y luego estimuladas con dopamina (DA  $1 \times 10^{-6}$  M a  $1 \times 10^{-4}$  M). Los niveles de citoquinas fueron medidos mediante ensayo de ELISA como se describió en materiales y métodos. Los datos provenientes de las concentraciones (pg/ml) se representan como veces de inducción versus el control (error  $\pm$  ES). \*\*\*:  $p < 0.001$  vs control. (n=4 experimentos).

#### **A.2.2. Efecto de dopamina sobre la expresión de NF $\kappa$ B en queratinocitos humanos previamente cultivados con BPA 10 días.**

A continuación, se evaluó la translocación al núcleo del factor de transcripción NF $\kappa$ B en presencia del disruptor endocrino. Para ello, los queratinocitos HaCaT fueron cultivados en presencia de BPA durante 10 días y luego incubados con dopamina  $1 \times 10^{-5}$  M. Como se observa en la **Figura 26 A y B**, en las células cultivadas en presencia de BPA, la dopamina aumentó significativamente la translocación del factor NF $\kappa$ B al núcleo, efecto que no difiere del observado en células cultivadas en ausencia del disruptor (**Figura 6 A y B**).

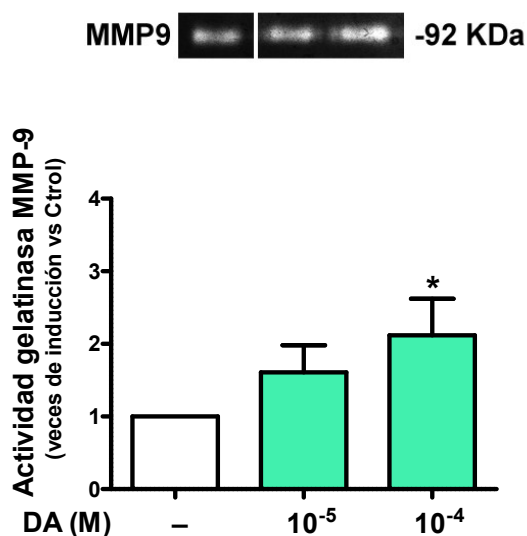




**Figura 26: Efecto de dopamina sobre la expresión de NFκB en queratinocitos HaCaT cultivados con BPA durante 10 días.** Las células, estimuladas con BPA por 10 días, fueron luego cultivadas en medio de cultivo (Control) o tratadas con Plo o dopamina (DA  $1 \times 10^{-5}$  M) por 1h a  $37^{\circ}$  C. Después del tratamiento se obtuvieron los extractos nucleares (A) y citosólicos (B) y la expresión de NFκB se determinó mediante western blot como se describió en materiales y métodos. Los datos provenientes del análisis densitométrico se representan como veces de inducción versus el control (media  $\pm$  ES). \*\*\*:  $p < 0,00$ ; \*:  $p < 0,05$  vs control. (n= 3 experimentos).

### A.2.3. Efecto de dopamina sobre la actividad de MMPs en queratinocitos humanos previamente cultivados con BPA 10 días.

Posteriormente se analizó el efecto del neurotransmisor dopamina ( $1 \times 10^{-5}$  y  $1 \times 10^{-4}$  M) sobre la actividad de MMPs en queratinocitos cultivados en presencia de BPA  $1 \times 10^{-7}$  M durante 10 días. En la **Figura 27** se observa que la dopamina incrementó de manera dosis dependiente la actividad de MMP-9 en los queratinocitos previamente expuestos a BPA, alcanzando valores significativos a la concentración de dopamina  $1 \times 10^{-4}$  M. Estos resultados difieren de los observados en ausencia del disruptor, que mostraron que dopamina ( $1 \times 10^{-5}$  M) produjo una inhibición de la activación de MMP-9 (**Figura 8**). Estos resultados sugieren un cambio en el efecto de dopamina sobre la actividad de MMP-9 cuando los queratinocitos están expuestos al disruptor endocrino.



**Figura 27: Efecto de DA sobre la actividad de la MMP-9 en queratinocitos HaCaT cultivados con BPA.** Las células fueron tratadas con BPA ( $1 \times 10^{-7}$  M) durante 10 días y luego incubadas con dopamina (DA  $1 \times 10^{-5}$  y  $1 \times 10^{-4}$  M). Se evaluó la actividad de la MMP-9 mediante la técnica de zimografía como se describe en materiales y métodos. Los datos provenientes del análisis densitométrico se representan como veces de inducción versus el control (mean  $\pm$  ES). \*:  $p < 005$  vs control. (n=4 experimentos).

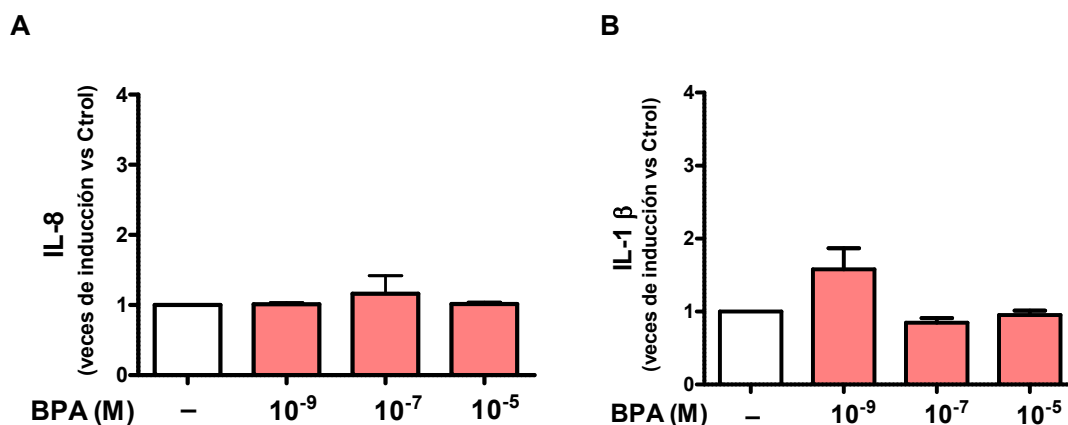
## B. Efectos de BPA en macrófagos THP-1

### B.1.1 Efecto de BPA 24 hs sobre la producción de citoquinas proinflamatorias en macrófagos THP-1

A nivel del sistema inmune, varios estudios describen efectos contradictorios en cuanto a las acciones de BPA sobre la producción de citoquinas y de óxido nítrico en macrófagos. Por lo tanto, teniendo en cuenta la relevancia de estas células en la respuesta inmune y en particular en la piel, se decidió estudiar el efecto de BPA sobre la producción de IL-6, IL-8 e IL-1 $\beta$  por macrófagos THP-1. Considerando que en queratinocitos no observamos efectos a las 24 hs con las concentraciones de BPA utilizadas ( $10^{-8}$  M y  $10^{-6}$  M) se decidió utilizar en esta oportunidad concentraciones de un orden de magnitud por encima y un orden de magnitud por debajo de las utilizadas previamente. Los macrófagos fueron estimulados entonces con las siguientes concentraciones del disruptor ( $1 \times 10^{-9}$  M,  $1 \times 10^{-7}$  M y  $1 \times 10^{-5}$  M) durante 24 hs.

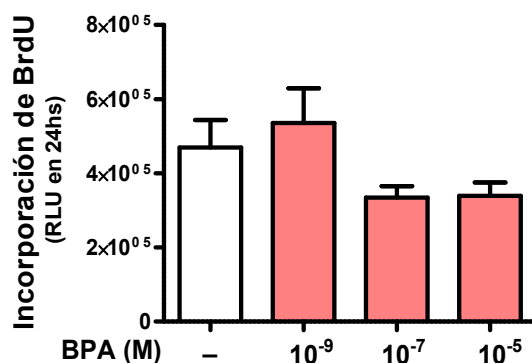
Los resultados muestran, como se observa en la **Figura 28**, que el tratamiento con el disruptor endocrino no modificó significativamente los niveles de IL-8 (**A**) y de IL-1 $\beta$  (**B**) en los sobrenadantes de cultivo de macrófagos THP-1 cultivados en ausencia de

un estímulo inductor de su producción, aunque pudo observarse una tendencia del disruptor a incrementar la producción de IL-1 $\beta$  a la concentración de 10<sup>-9</sup> M. No fue posible detectar la presencia de IL-6 en los sobrenadantes de los macrófagos incubados en presencia o ausencia de BPA.



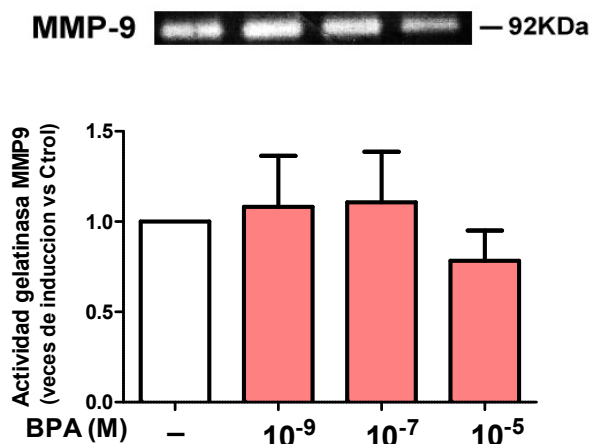
**Figura 28: Efecto de BPA sobre la producción de IL-8 (A) e IL-1 $\beta$  (B) en macrófagos THP-1.** Las células fueron tratadas con BPA (1x10<sup>-9</sup>, 1x10<sup>-7</sup> y 1x10<sup>-5</sup> M) durante 24 hs y los niveles de citoquinas fueron medidos mediante un ensayo de ELISA como se describió en materiales y métodos. Los datos provenientes de concentraciones (pg/ml) se representan como veces de inducción versus el control (media  $\pm$  ES). (n= 4 experimentos).

Luego se evaluó la proliferación de los macrófagos THP-1 incubados con las diferentes concentraciones de BPA utilizadas. La **Figura 29**, muestra una tendencia de BPA, en las concentraciones de 1x10<sup>-7</sup> y 1x10<sup>-5</sup> M, a disminuir la proliferación de estas células, aunque no alcanzaron diferencias significativas respecto del control.



**Figura 29: Efecto de BPA sobre la proliferación de los macrófagos THP-1.** Las células fueron tratadas con BPA durante 24 hs y se evaluó la proliferación a través de la incorporación de BrdU como se describe en materiales y métodos. Los datos se representan como media  $\pm$  ES. (n= 3 experimentos).

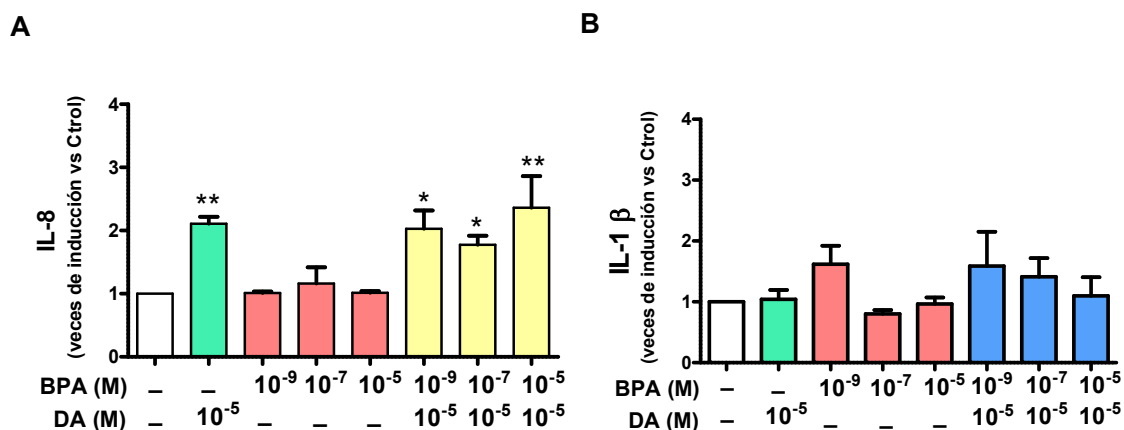
A continuación, evaluamos el efecto del BPA sobre la actividad de las MMPs en los macrófagos THP-1. Para ello incubamos las células con BPA ( $1 \times 10^{-9}$ ,  $1 \times 10^{-7}$  y  $1 \times 10^{-5}$  M) durante 24 hs. La **Figura 30** muestra una tendencia del disruptor endocrino a disminuir la actividad de las MMPs cuando las células se incuban con BPA  $1 \times 10^{-5}$  M, no mostrando ningún efecto con las otras dos concentraciones.



**Figura 30: Efecto de BPA sobre la actividad de la MMP9 en macrófagos THP-1.** Las células fueron incubadas con BPA ( $1 \times 10^{-9}$ ,  $1 \times 10^{-7}$  y  $1 \times 10^{-5}$  M) durante 24 hs y luego se evaluó la actividad de las MMPs mediante la técnica de zimografía como se describe en materiales y métodos. Los datos provenientes del análisis densitométrico se representan como veces de inducción versus el control (mean  $\pm$  ES). (n=6 experimentos).

### 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.

Con el fin de estudiar la posible interacción entre el disruptor endocrino y la dopamina en los macrófagos THP-1, evaluamos el efecto de distintas concentraciones del BPA ( $1 \times 10^{-9}$ ,  $1 \times 10^{-7}$  y  $1 \times 10^{-5}$  M), sobre la producción de IL-8 e IL-1 $\beta$ , al cabo de 24 hs de incubación con el disruptor en presencia de dopamina ( $1 \times 10^{-5}$  M). Como se observa en la **Figura 31**, la dopamina  $1 \times 10^{-5}$  M estimuló significativamente la producción de IL-8 sin modificar la de IL-1 $\beta$ , mientras que el BPA no modificó la producción de IL-8 inducida por dopamina, al igual que observamos en los queratinocitos. Si bien el BPA ( $1 \times 10^{-9}$  M) indujo un leve incremento, aunque no significativo, sobre la producción de IL-1 $\beta$ , no se observaron cambios significativos en presencia de dopamina.



**Figura 31: Efecto de BPA sobre la producción de IL-8 (A) e IL-1β (B) en macrófagos THP-1.** Las células fueron cultivadas en medio de cultivo (control) o con BPA ( $1 \times 10^{-9}$ ,  $1 \times 10^{-7}$  y  $1 \times 10^{-5}$  M) en ausencia y presencia de DA ( $1 \times 10^{-5}$  M) durante 24 hs y los niveles de citoquinas fueron medidos mediante un ensayo de ELISA como se describió en materiales y métodos. Los datos provenientes de las concentraciones (pg/ml) se representan como veces de inducción versus el control (media  $\pm$  error). \*\*:  $p < 0.01$  vs control, \*:  $p < 0.01$  vs control.

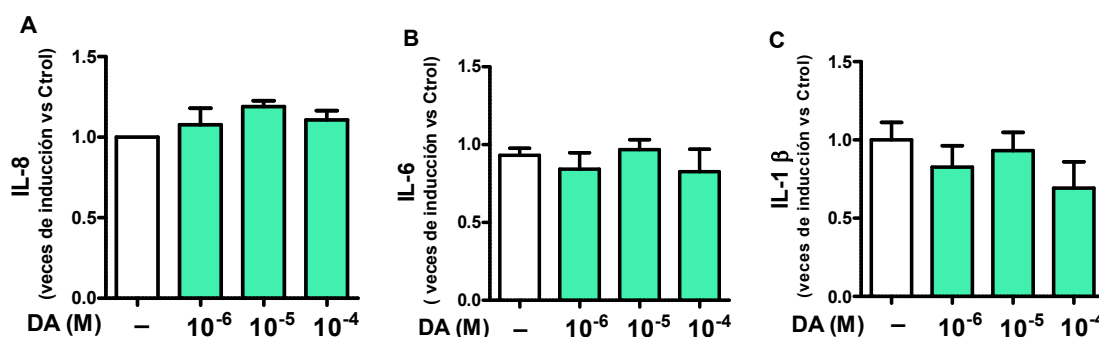
## B.2. Efecto de BPA 10 días sobre la acción de dopamina en macrófagos humanos THP-1.

### B.2.1. Efecto de dopamina sobre la producción de citoquinas proinflamatorias en macrófagos THP-1 previamente cultivados con BPA durante 10 días.

De la misma forma que para los queratinocitos, los macrófagos THP-1 fueron cultivados en presencia de BPA  $1 \times 10^{-7}$  M durante 10 días. Luego se incubaron durante 24 hs con dopamina ( $1 \times 10^{-6}$  a  $1 \times 10^{-4}$  M), y se cuantificaron los niveles de IL-6, IL-8, e IL-1β, en los sobrenadantes de cultivo.

A diferencia de lo observado en ausencia de BPA, o cuando las células se trataron con BPA por 24 hs, donde los niveles de IL-6 producidos por los macrófagos THP-1 no alcanzaron niveles detectables al ser analizados, cuando las células fueron cultivadas en presencia del disruptor durante 10 días se observó que las células THP-1 sintetizaron IL-6, pero dopamina no ejerció efectos en ninguna de las concentraciones analizadas ( $1 \times 10^{-6}$  a  $1 \times 10^{-4}$  M) (**Figura 32A**). Cuando se analizó la producción de IL-8, no puedo observarse que en las células cultivadas en presencia de BPA por 10 días la dopamina ejerciera efectos sobre la producción de esta quemoquina (**Figura 32B**). Estos

resultados difieren de los observados en ausencia del disruptor (**Figura 9A**) o cuando los macrófagos se cultivaron presencia de BPA por 24 hs, en los que se observó que la producción de IL-8 era incrementada en presencia de dopamina. Asimismo, los niveles de IL-1 $\beta$  no fueron modificados significativamente con la dopamina en presencia de BPA (**Figura 32 C**), efectos que no difieren de los observados en ausencia de BPA (**Figura 9B**). Los resultados sobre IL8, sugieren una modulación de los niveles de citoquinas en respuesta a la dopamina, cuando los macrófagos THP-1 se encuentran expuestos al disruptor endocrino.

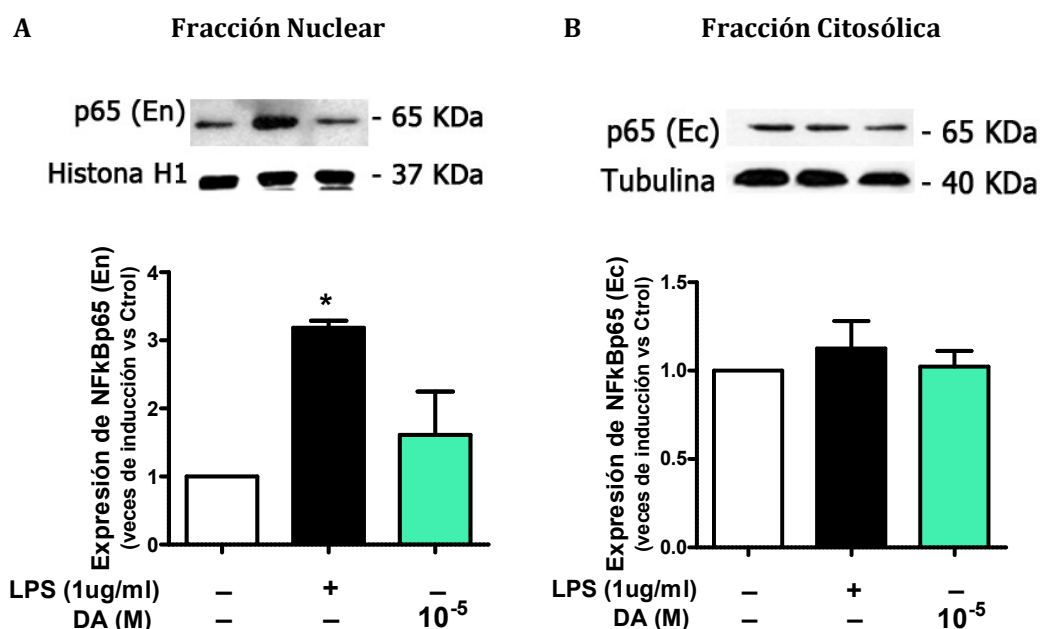


**Figura 32: Efecto de dopamina sobre la producción de IL-6 (A), IL-8 (B) e IL-1 $\beta$  (C) en macrófagos THP-1 cultivados con BPA.** Las células fueron cultivadas con BPA ( $1 \times 10^{-7}$  M) durante 10 días y luego estimuladas con dopamina ( $1 \times 10^{-6}$  a  $1 \times 10^{-4}$  M). Los niveles de citoquinas fueron medidos mediante ensayo de ELISA como se describió en materiales y métodos. Los datos provenientes de las concentraciones (pg/ml) se representan como veces de inducción versus el control (mean  $\pm$  ES). (n=3 experimentos).

### B.2.2. Efecto de dopamina sobre la expresión de NF $\kappa$ B en macrófagos THP-1 previamente cultivados con BPA 10 días

Posteriormente se decidió evaluar la translocación al núcleo del factor de transcripción NF $\kappa$ B en los macrófagos THP-1 cultivados durante 10 días en presencia de BPA. Para ello, las células previamente cultivadas en presencia de BPA  $1 \times 10^{-7}$  M durante 10 días se incubaron con dopamina  $1 \times 10^{-5}$  M, o con LPS como control positivo, durante 1h y se evaluó los niveles del factor NF $\kappa$ B en las fracciones nucleares y citosólicas. La **Figura 33 A y B** muestra que el tratamiento con dopamina no indujo la translocación al núcleo del factor NF $\kappa$ B cuando se lo compara con el control basal y con las células tratadas con LPS. Este resultado es similar al obtenido al evaluar la translocación del factor de transcripción en ausencia del disruptor (**Figura 12**), en el que se observó que

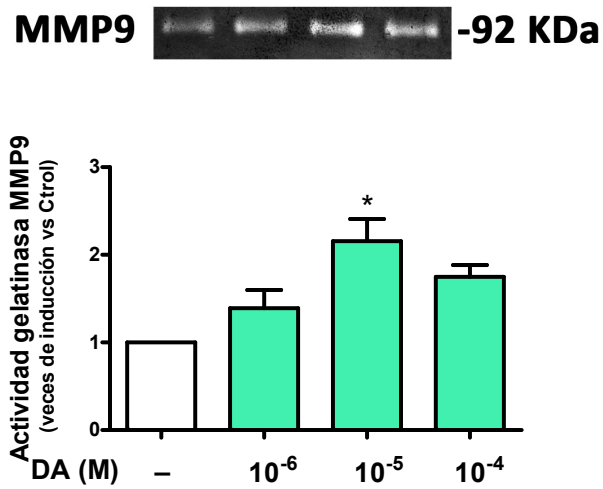
dopamina no indujo un incremento significativo de la translocación de este factor en los macrófagos.



**Figura 33: Efecto de dopamina sobre la expresión de NFκB en macrófagos THP-1 cultivados con BPA durante 10 días.** Las células, cultivadas con BPA  $1 \times 10^{-7}$  M por 10 días, fueron luego incubadas en medio de cultivo (Control), LPS (1  $\mu$ g/ml), o dopamina (DA  $1 \times 10^{-5}$  M) por 1 h a 37° C. Después del tratamiento se obtuvieron los extractos nucleares (A) y citosólicos (B) y la expresión de NFκB se determinó mediante *western blot* como se describió en materiales y métodos. Los datos fueron promediados y analizados estadísticamente. Los datos obtenidos del análisis densitométrico se expresan como veces de inducción respecto del control (media  $\pm$  ES). \*:  $p < 0.05$  vs control. (n= 3 experimentos).

### B.2.3. Efecto de dopamina sobre la actividad de MMPs en macrófagos THP-1 previamente cultivados con BPA 10 días.

Por último, evaluamos el efecto de dopamina ( $1 \times 10^{-6}$  a  $1 \times 10^{-4}$  M) sobre la actividad de MMPs en macrófagos THP-1 expuestos a BPA  $1 \times 10^{-7}$  M durante 10 días. Como se puede observar en la **Figura 34**, la dosis de dopamina  $1 \times 10^{-5}$  M aumentó significativamente la actividad de la MMP-9 cuando se comparó con el control. Este resultado es similar al obtenido al evaluar la actividad de MMP-9 en ausencia del disruptor (**Figura 13**), en el que se observó que dopamina  $10^{-5}$  M indujo un incremento de la actividad metaloproteasa.



**Figura 34: Efecto de dopamina sobre la actividad de la MMP9 en macrófagos THP-1 cultivados con BPA por 10 días.** Las células fueron tratadas con BPA ( $1 \times 10^{-7}$  M) durante 10 días y luego incubadas con DA ( $1 \times 10^{-6}$  a  $1 \times 10^{-4}$  M). Se evaluó la actividad de la MMP-9 mediante la técnica de zimografía como se describe en materiales y métodos. Los datos provenientes del análisis densitométrico se representan como veces de inducción versus el control (mean  $\pm$  ES). \*:  $p < 005$  vs control. (n=5 experimentos).



## **CONCLUSIONES IV:**

- BPA no modificó los niveles de IL-6 ni de IL-8 ni la respuesta a dopamina en queratinocitos HaCaT luego de 24 hs de estimulación.
- El cultivo de queratinocitos HaCaT con BPA durante 10 días no modificó el aumento en la concentración de IL-6 y la activación de la vía de NFκB inducidos por dopamina en ausencia del disruptor. Sin embargo, la presencia de BPA revirtió el efecto inductor de IL-8 y de la actividad MMP-9 ejercido por la dopamina en los queratinocitos en ausencia del disruptor.
- BPA no modificó los niveles de las citoquinas IL-8 ni la respuesta a dopamina en macrófagos THP-1 luego de 24 hs de estimulación, si bien observamos una leve inducción no significativa de IL-1β con la concentración  $1 \times 10^{-9}$  M de BPA.
- El cultivo de los macrófagos con BPA durante 10 días revirtió el efecto inductor de IL-8 ejercido por dopamina en ausencia del disruptor. Asimismo, se pudo detectar la producción basal de IL-6, a diferencia de lo observado en macrófagos en ausencia de BPA. La dopamina no modificó los niveles de IL-1β, resultados similares a los obtenidos en ausencia de BPA. Sin embargo, BPA no inhibió el incremento en la actividad de MMP-9 que ejerció la dopamina en ausencia del disruptor. La presencia del disruptor endocrino no indujo la translocación del factor NFκB al núcleo en ausencia o presencia de dopamina.

# ***DISCUSIÓN***

La dopamina es un neurotransmisor clave entre el sistema nervioso y el sistema inmune, así como también, un mediador producido y liberado por las propias células inmunes (Pacheco et al., 2014; Pinoli et al., 2017) que, así como las catecolaminas adrenalina y noradrenalina, puede modular diferentes procesos inmunológicos (Cosentino y Marino, 2013; Lorton y Bellinger, 2015; Sarkar et al., 2010).

La piel constituye la primera barrera inmunológica contra agentes microbianos y químicos ambientales. 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, sobre los cuales realizamos este trabajo. Ambos tipos celulares producen citoquinas proinflamatorias (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6), quimiocinas (IL-8, MCP-1) y MMPs en respuesta a agentes externos para promover una respuesta inmune (Mann et al., 2014; Nestle et al., 2009).

Considerando que la piel se encuentra ricamente inervada por nervios simpáticos productores de catecolaminas (Roosterman et al., 2006), nos preguntamos si la dopamina o agonistas de receptores dopaminérgicos, podrían tener un efecto modulador sobre la respuesta inmune en células propias de la piel y residentes. Para ello, en una primera etapa, decidimos evaluar los efectos de agonistas dopaminérgicos sobre diferentes parámetros en una línea celular de queratinocitos humanos, HaCaT, un excelente modelo para realizar estudios, dado que conservan características fenotípicas similares a los queratinocitos normales (Boukamp et al., 1988; Yoshizumi et al., 2008).

Teniendo en cuenta estas consideraciones evaluamos, en primer lugar, el efecto de la dopamina sobre los queratinocitos, analizando la secreción de mediadores como son las citoquinas IL-6 e IL-8. Como antecedente debemos citar que Yang et al., 2009 observaron en células de melanoma que la catecolamina norepinefrina induce la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-6, IL-8 y el factor de crecimiento VEGF, relacionando este hallazgo con la progresión tumoral.

Nuestros resultados demuestran que la dopamina ( $1 \times 10^{-5}$  y  $1 \times 10^{-4}$  M) estimula la producción de IL-6 e IL-8 en queratinocitos HaCaT, siendo interesante notar que el efecto sobre IL-6 es de mayor magnitud que sobre IL-8 (4-8 veces vs el doble del basal, respectivamente). Cuando estimulamos las células con cabergolina, un potente agonista dopaminérgico de tipo D2, observamos que estimuló la producción de IL-6 pero no de IL-8, siendo el primer reporte del efecto de cabergolina sobre la producción de

citoquinas a nivel cutáneo. Este derivado del ergot es utilizado en el tratamiento de la hiperprolactinemia, tumores hipofisarios y en menor proporción en la enfermedad de Parkinson. Nuestros resultados están en línea con reportes previos en los que se ha descrito un efecto estimulador de agonistas dopaminérgicos sobre IL-6 en diferentes tipos celulares (células adrenales, (Ritchie y Noble, 1996); monocitos, (Peter J. Gaskill et al., 2012), adipocitos; (X. Wang et al., 2018a)), siendo más escasos los reportes sobre el efecto de estos agonistas sobre la producción de IL-8, habiéndose reportado su estimulación por dopamina en células endoteliales de pulmón (Beck et al., 2001).

Es de destacar que el efecto estimulador de dopamina sobre la producción de IL-6 en los queratinocitos disminuyó notablemente en presencia del antioxidante ácido ascórbico, acción que no se observó sobre la producción de IL-8. Es sabido que en estas células, la vitamina C contribuye a contrarrestar el estrés oxidativo (Catani et al., 2005) disminuyendo, por ejemplo, la producción de IL-6 exacerbada por el estímulo inflamatorio de luz UV (Tebbe et al., 1997). Otros autores describieron que la vitamina C disminuyó la producción de las citoquinas proinflamatorias IL-6 y TNF- $\alpha$  sin afectar la secreción de IL-8 en monocitos obtenidos de sangre periférica de individuos adultos tratados con LPS (Härtel et al., 2004). En línea con estas últimas observaciones Kang et al., 2007, empleando luz UV como estímulo inflamatorio, demostraron que concentraciones de ácido ascórbico 2.5 M (una concentración mayor a la empleada en nuestro estudio) disminuyeron los niveles de IL-8 y MCP-1 a través de la supresión de la subunidad p38 MAPK, regulando de esta manera la respuesta inflamatoria. Si bien, Beck et al., 2001, demostraron en células endoteliales de pulmón que la vitamina C y otros antioxidantes pueden suprimir el efecto estimulador de dopamina sobre la producción de IL-8, en una concentración similar a la empleada en nuestro trabajo (0.1 mM) no observaron efecto alguno. Estos resultados nos permiten sugerir que la dopamina actúa en parte por mecanismos dependientes de la oxidación en la inducción de IL-6, mientras que sobre IL-8 sólo se observa un efecto que no pudo ser inhibido con antioxidantes. Sin embargo, el agonista D2 cabergolina incrementó la producción de IL-6, no así de IL-8, lo que indicaría que la producción de IL-8 no dependería de la acción sobre receptores D2 ni de mecanismos oxidativos, que sí participan en la activación de la expresión de IL-6, lo que podría explicar que el efecto observado sobre la IL-6 fuera de mayor magnitud que el observado sobre la IL-8.

Algunos trabajos sugieren que la cabergolina posee propiedades antioxidantes en el sistema nervioso central, incluso podría actuar sinérgicamente con antioxidantes endógenos como la vitamina E y el ácido ascórbico (Lombardi et al., 2002; Odaka et al., 2014; Sohmiya et al., 2004; Yoshida et al., 2002). Esto podría explicar en parte por qué cabergolina ejerció un efecto de menor magnitud que DA sobre la producción de IL-6, ya que esta droga podría estar inhibiendo los mecanismos dependientes de oxidación que participan en la producción de esta citoquina, y explicarían en parte por qué no se ven diferencias al realizar la estimulación en presencia de ácido ascórbico.

Mediante el empleo de sulpirida, antagonista de receptores D2, pudimos confirmar la participación de este receptor en el efecto de dopamina sobre la producción de IL-6 e IL-8. La sulpirida, disminuyó parcialmente la producción de IL-6 inducida por dopamina y bloqueó el efecto del agonista de cabergolina, agonista de los receptores D2. Estos efectos no se debieron a una acción tóxica de las drogas a alta concentración ya que la viabilidad celular no fue alterada. Estos resultados van en línea con reportes previos (Ritchie y Noble, 1996; X. Wang et al., 2018b), quienes describieron en células de la zona glomerulosa adrenal y recientemente en adipocitos, que la dopamina incrementa la liberación de IL-6 a través de receptores dopaminérgicos de tipo D2.

Nuestros estudios demuestran que el incremento en los niveles de IL-6 e IL-8 observados en queratinocitos luego de los estímulos con agonistas dopaminérgicos no serían consecuencia de cambios en la viabilidad celular. Se ha demostrado que concentraciones elevadas de dopamina pueden ejercer efectos antiproliferativos, acciones que serían mediadas por receptores dopaminérgicos en linfocitos y vías oxidativas en macrófagos (Brown et al., 2003; Oberbeck et al., 2006).

Sin embargo, nuestros resultados nos obligan a considerar la participación de otros mecanismos además de la activación de receptores D2 y mecanismos oxidativos para explicar los efectos observados. Existen evidencias de que dopamina también puede activar receptores adrenérgicos en distintos tipos celulares: macrófagos murinos (Haskó et al., 2002), adipocitos de rata (Lee et al., 1998; Mukherjee y Yun, 2013). Mediante el empleo de un antagonista de receptores  $\beta$ -adrenérgicos (propranolol) demostramos que el efecto estimulador de dopamina sobre la producción de IL-6 e IL-8 en queratinocitos involucraría a estos receptores. En nuestro estudio, el propranolol disminuyó significativamente el efecto estimulador de dopamina sobre la producción de IL-6 e IL-8. Asimismo, como era de esperar, el efecto estimulador de cabergolina

sobre IL-6, agonista dopaminérgico de baja afinidad por receptores adrenérgicos, no fue alterado cuando los receptores  $\beta$ -adrenérgicos fueron bloqueados. También demostramos que estos efectos también fueron independientes de una acción del antagonista sobre la viabilidad celular.

Reichmann, 2009 reportó que agonistas dopaminérgicos aplicados por vía transdérmica, en forma de parches, produjeron efectos nocivos en la piel. Si bien nuestros hallazgos fueron realizados en un modelo *in vitro*, permitirían sugerir que el efecto adverso de esta forma de aplicación de agentes antiparkinsonianos podría en parte deberse a la inducción en la piel de citoquinas proinflamatorias.

Si bien se ha reportado que los receptores catecolaminérgicos activan principalmente vías de señalización que involucran aumento o disminución de niveles de AMPc y de activación de PKA y de MAPKs, existen algunos reportes que indican que estos receptores pueden activar la ruta de NF $\kappa$ B. Farmer and Pugin, 2000 describieron la activación de este factor de transcripción en monocitos en respuesta a diferentes agonistas  $\beta$  adrenérgicos. Panet et al., 2001 sugieren que el factor NF $\kappa$ B estaría involucrado en la apoptosis inducida por dopamina en la línea celular neuronal PC12. Sin embargo, en linfocitos T activados se ha demostrado que dopamina y noradrenalina disminuyen la expresión de IL-2 inhibiendo la activación de NF $\kappa$ B (Panet et al., 2001; Strell et al., 2009). Considerando el rol de este factor de transcripción en la inducción de la respuesta inflamatoria y nuestros resultados sobre el efecto de los agonistas dopaminérgicos en la producción de IL-6 e IL-8 en los queratinocitos, decidimos evaluar el efecto de dopamina en la activación de esta vía de señalización.

Al analizar los resultados, comprobamos que la dopamina aumentó los niveles de expresión de la subunidad p65 del factor de transcripción en las fracciones nucleares, con la concomitante disminución en las citosólicas. Este incremento fue reducido cuando los queratinocitos fueron tratados con el antagonista  $\beta$ -adrenérgico, a la vez que aumentó la expresión de NF $\kappa$ B en las fracciones citosólicas. Estos resultados sugieren que el tratamiento con dopamina estimula la translocación de NF $\kappa$ B al núcleo a través de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos en la línea celular estudiada, siendo ésta una de las posibles vías de señalización utilizada por las células HaCaT en estas condiciones.

Ha sido demostrado que IL-6 e IL-8 están implicadas en la proliferación de queratinocitos humanos y su sobreexpresión está relacionada con desórdenes

inflamatorios e hiperproliferativos de la piel (Grossman et al., 1989; Hernández-Quintero et al., 2006; Pietrzak et al., 2008). Sabemos, además, que las catecolaminas pueden modular la migración de diferentes tipos celulares, como linfocitos (Elenkov et al., 2000) y células madres mesenquimales (Hajifathali et al., 2014). Ha sido descrito que la activación de receptores adrenérgicos por catecolaminas liberadas en el sitio de una herida perjudica la migración de los queratinocitos y que la activación de receptores  $\beta$ -2-adrenérgicos inhibe la movilización de queratinocitos *in vitro* e *in vivo* (Sivamani et al., 2009; Steenhuis et al., 2011) y promueve el reclutamiento de polimorfonucleares perjudicando la cicatrización por un mecanismo mediado por el aumento en la producción de IL-6 (M.-H. Kim et al., 2014). Por otro lado, investigaciones *in vitro* de Shome et al., 2012, sugieren que el neurotransmisor dopamina regularía negativamente la movilización de células progenitoras mesenquimales murinas al lecho de una herida, inducida por VEGF, a través de un mecanismo mediado por receptores dopaminérgicos de tipo D2 (Shome et al., 2012). Por lo tanto, estudiamos si dopamina podía afectar la migración de queratinocitos *in vitro*.

Los resultados indicaron que la dopamina ( $1 \times 10^{-5}$  y  $1 \times 10^{-4}$  M) no modificó significativamente el cierre de una herida en queratinocitos humanos. Sin embargo, cuando los queratinocitos fueron tratados con el bloqueante  $\beta$ -adrenérgico (propranolol) el cierre de la herida se incrementó 4 veces. Dicho efecto disminuyó en presencia de la dopamina en los queratinocitos en confluencia en nuestro modelo *in vitro*. Otros estudios han descrito que antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos favorecen la migración de los queratinocitos *in vitro*, la re-epitelización *in vivo* y la recuperación de la barrera epitelial (Denda et al., 2003; Pullar et al., 2012; Romana-Souza y Monte-Alto-Costa, 2009). Estos resultados indicarían que, de manera similar a lo ejercido por otros agonistas catecolaminérgicos, dopamina ejercería un efecto inhibitorio de la migración de queratinocitos que sería en parte mediado a través de su acción sobre receptores  $\beta$ -adrenérgicos.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, decidimos estudiar la implicancia de la dopamina sobre la actividad de las MMPs ya que participan en todas las etapas de la cicatrización mediante la modificación de la matriz de la herida permitiendo la migración celular y la remodelación del tejido.

Observamos que la dopamina ( $1 \times 10^{-5}$  M) disminuyó significativamente la actividad basal de la MMP-9. Estos resultados se correlacionan con antecedentes en un modelo de ratón tumorigénico, en el cual la dopamina inhibe la expresión y actividad de MMP-9 en la médula ósea y por ende la movilización de células precursoras endoteliales vía receptor D2, de esta manera reduce la neovascularización y el crecimiento del tumor (Chakroborty et al., 2008). Nosotros observamos que los receptores  $\beta$ -adrenérgicos están involucrados en la acción de dopamina sobre la producción de MMP-9 por los queratinocitos, del mismo modo que en la inhibición de la migración de estas células. Se ha descrito que los antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos pueden alterar la actividad de las enzimas MMPs. Recientemente se demostró que la aplicación tópica de propranolol en heridas de ratones diabéticos induce un aumento en la expresión de MMP9 favoreciendo la reepitelización de la misma en etapas tempranas de la cicatrización (Zheng et al., 2017).

Considerando todos los resultados, podemos sugerir hasta el momento que en queratinocitos HaCaT, 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.

A continuación, analizamos los efectos de dopamina sobre macrófagos humanos. Los monocitos THP-1 tratados con PMA son diferenciados a macrófagos que presentan características biológicas comparables a los macrófagos diferenciados a partir de monocitos de sangre periférica (Chanput et al., 2013). En ausencia de estímulos inflamatorios, como lipopolisacáridos bacterianos, producen las citoquinas IL-8 e IL-1- $\beta$ .

Cuando los macrófagos (diferenciados con PMA) fueron estimulados con dopamina ( $1 \times 10^{-5}$  y  $1 \times 10^{-4}$  M) los niveles de IL-8 se incrementaron significativamente, de forma similar a lo observado por Gaskill en macrófagos derivados de células mononucleares humanas estimuladas con LPS (Peter J. Gaskill et al., 2012).



Nosotros observamos que el efecto estimulador de dopamina  $1 \times 10^{-5}$  M sobre IL-8, fue parcialmente revertido por el bloqueante  $\beta$ -adrenérgico propranolol, de la misma manera que hemos descrito en queratinocitos. En células epiteliales de vaginales, (Brosnahan et al., 2013) demostraron que la catecolamina noradrenalina, vía receptores  $\beta$ -adrenérgicos, incrementa los niveles de IL-8 inducidos por superantígenos y peptidoglicano de *Staphylococcus aureus*.

No observamos efecto de dopamina sobre la producción de la citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$ . Otros autores demostraron en macrófagos activados que la dopamina puede disminuir los niveles de esta citoquina inducidos por LPS, a través de la inhibición de la activación del inflammasoma NLRP3, sugiriendo un efecto antiinflamatorio de la monoamina en esta condición patológica (Yan et al., 2015).

Peter J Gaskill et al., 2012 reportan que el efecto de dopamina sobre la producción de citoquinas en macrófagos dependerá del estado de activación celular. La ausencia de un estímulo inflamatorio en nuestras condiciones de trabajo explicaría estas diferencias. Estos autores observaron que en ausencia de estimulación la dopamina indujo la expresión de IL-6 en macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica. Nosotros, utilizando la línea de monocitos THP-1 diferenciados *in vitro* con PMA no fuimos capaces de detectar la síntesis de esta citoquina.

A continuación, estudiamos la activación de la vía de NF $\kappa$ B y observamos que la dopamina no aumentó los niveles de NF $\kappa$ B en las fracciones nucleares de los macrófagos THP-1, efecto que fue correlacionado con el aumento significativo tanto del factor de transcripción como del inhibidor I $\kappa$ B $\alpha$  en las fracciones citosólicas, a diferencia de lo observado en queratinocitos.

Hemos mencionado que la activación de receptores catecolaminérgicos modula diferentes acciones de las células inmunes implicando, entre otros, la activación de factores de transcripción como NF $\kappa$ B. Existen reportes que revelan que la adrenalina y noradrenalina inducen la producción de citoquinas proinflamatorias en neutrófilos y macrófagos por vías dependientes (Cosentino y Marino, 2013) e independientes de NF $\kappa$ B. En concordancia con nuestros resultados, Brosnahan et al., 2013, demostraron en células epiteliales que la catecolamina noradrenalina, vía receptores  $\beta$ -adrenérgicos, incrementa los niveles de IL-8 por mecanismos independientes de NF $\kappa$ B, implicando entre otros, la activación de adenilato ciclasa, de MAPK (mitogen-associated proteína kinase), de la vía PI3K (Brosnahan et al., 2013). Por lo tanto, podemos sugerir la

participación de otras vías de señalización en el efecto de dopamina sobre IL-8 en macrófagos.

A continuación, evaluamos el efecto de dopamina sobre la actividad de la MMP-9 en los macrófagos THP-1. Los resultados obtenidos, mostraron que la dopamina fue capaz de aumentar la actividad de la MMP-9 bajo las condiciones utilizadas, sugiriendo que los macrófagos podrían estar interviniendo en el inicio de la remodelación del tejido dañado en presencia de catecolaminas. Evaluamos luego la participación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Al igual que en nuestro modelo de queratinocitos humanos, observamos un efecto estimulador del  $\beta$ -bloqueante (propranolol) sobre la actividad de la MMPs. Sin embargo, cuando los macrófagos fueron estimulados con dopamina y el  $\beta$ -bloqueante, no observamos una disminución de la actividad de la MMP-9, es más dopamina estimuló la producción de esta MMP-9, a diferencia de lo observado en los queratinocitos. Estos resultados sugieren que el efecto inductor sobre la producción de MMP-9 ejercido por DA no estaría mediado por receptores  $\beta$ -adrenérgicos en estas células. Otros autores también observaron, en un modelo de herida *in vivo*, que el propranolol incrementa la actividad de MMP-9 (Romana-Souza et al., 2015). Por otro lado, se ha descrito que la norepinefrina favorece la angiogénesis incrementando, entre otros factores, la producción de MMP-9 a través de receptores adrenérgicos en macrófagos asociados a tumores (Lutgendorf et al., 2008). Esto indicaría que los efectos de las catecolaminas pueden ser diferentes de acuerdo con el tipo celular y contexto en el cual actúen.

Posteriormente decidimos evaluar la producción de especies reactivas del oxígeno (EROS) e intermediarios del nitrógeno (ERN), ya que son importantes productos de la respuesta de los macrófagos en el sitio dañado. La bibliografía sugiere que las EROS pueden modular la polarización de los macrófagos M1/M2, donde la activación de macrófagos M2 lleva a la disminución de EROS y ERN, lo que puede ser de gran interés en la regulación de los pasos en el proceso de cicatrización, (Tan et al., 2016). Nuestros resultados mostraron que concentraciones de dopamina de  $1 \times 10^{-6}$  y  $1 \times 10^{-5}$ M no tuvieron un efecto sobre la producción de anión superóxido (como medida de EROS), ni sobre los niveles de nitrito, utilizado como medida de ERN. Concentraciones más altas ( $1 \times 10^{-4}$ M) disminuyeron la producción de anión superóxido, pero indujeron un leve incremento de la producción de nitritos. La producción de óxido nítrico en el sitio

dañado puede presentar un efecto positivo sobre la cicatrización (Witte y Barbul, 2002). Chi et al., 2003, demostraron que la producción de óxido nítrico inducida por LPS es aumentada por catecolaminas, epinefrina, norepinefrina o dopamina en macrófagos murinos RAW 264.7.

De esta manera, y considerando lo dicho en la primera parte de este objetivo, podemos proponer que el neurotransmisor dopamina puede presentar efectos diferentes en distintas células sobre los mismos parámetros y en consecuencia sobre el mismo proceso, indicando que su efecto puede variar dependiendo del tipo celular involucrado y del estado de activación del mismo.

Durante el proceso de cicatrización, ha sido descrita tanto la participación de diferentes células inmunes y no inmunes residentes de la piel como la presencia de citoquinas, quemoquinas, y MMPs. Dentro de las poblaciones celulares involucradas, los macrófagos tienen un rol fundamental en la reparación tisular y el mantenimiento de la integridad de la piel produciendo citoquinas y mediadores inflamatorios que pueden regular directa o indirectamente la migración de los queratinocitos (Qing, 2017).

Teniendo en cuenta que demostramos previamente en esta tesis que la dopamina aumenta la producción de IL-8 y MMPs en macrófagos THP-1, decidimos evaluar la influencia de factores solubles provenientes de macrófagos estimulados por dopamina (MC de macrófagos THP-1) sobre la migración de los queratinocitos humanos. Demostramos que altas concentraciones de dopamina ( $10^{-4}$  M) inducen en macrófagos THP-1 un aumento de los niveles de IL-8 respecto del control que puede detectarse en los MC sin observarse modificaciones a nivel de IL-6 o de las MMPs, y que en los sobrenadantes de cultivo de los queratinocitos tratados con este MC se detectaron menores niveles de IL-6 a la vez que se observó un aumento de la migración de estas células, respecto de los queratinocitos tratados con MC de macrófagos control. Por otro lado, los MC de macrófagos TPH-1 cultivados con concentraciones de dopamina ( $10^{-5}$  M) presentaron menores niveles de IL-8 y MMPs que los MC de macrófagos control, pero indujeron un aumento en el nivel de IL-6 producida por los queratinocitos, observándose en estas condiciones un incremento en el cierre de la herida. Nuestros resultados indicarían que el efecto estimulante de dopamina  $10^{-4}$  M sobre la producción de IL-8 en macrófagos THP-1 podría jugar un rol estimulante de la migración de los queratinocitos, mientras que la dopamina  $10^{-5}$  M induciría una disminución de los

niveles de IL-8 en los macrófagos, pero estos a su vez inducirían un incremento en la producción de IL-6 por los queratinocitos, generando en estas condiciones un ambiente que desfavorece la migración y el cierre de la herida. Si bien se ha descrito que IL-6 e IL-8 son las citoquinas más abundantes en el sitio de una herida (Boink et al., s. f.; Chen et al., 2014) su participación en la modulación de la cicatrización es algo controvertida (Grimstad et al., 2011). A pesar de que algunos trabajos indican que un aumento en IL-8 puede ser perjudicial para la cicatrización (Iocono et al., 2000; Tian et al., 2016), otros autores, y en concordancia con nuestros resultados, demostraron que la presencia de IL-8 sería fundamental para la migración de los queratinocitos humanos, dado que el bloqueo de la quemoquina o su receptor reduce la cicatrización (Jiang et al., 2012; Takada et al., 2017). Del mismo modo, se describió que IL-6 induce la reparación de las heridas ya que modelos murinos deficientes en esta citoquina resultaron en un menor reclutamiento de células al sitio dañado y una menor re-epitelización (Kuhn et al., 2014; Lin et al., 2003b). Sin embargo, también se demostró que niveles elevados de IL-6 podrían resultar inhibitorios en la migración de los queratinocitos por un exceso en el reclutamiento de polimorfonucleares (M.-H. Kim et al., 2014). Además, se observó, que el efecto perjudicial sobre la reparación de la herida por parte de los MC de macrófagos estimulados con concentraciones de dopamina  $10^{-5}$  M se revirtió cuando los macrófagos se cultivaron en presencia del propranolol, indicando el efecto de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos en el rol de la dopamina sobre los macrófagos. En resumen, estos resultados nos permiten sugerir 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.

Como se ha comentado anteriormente, los queratinocitos no funcionan únicamente como una barrera física entre el medio externo e interno, sino que también pueden participar en la respuesta inmune cutánea respondiendo a agentes extraños y señales de daño y activando, en consecuencia, receptores de la inmunidad innata como los TLRs. Es conocido el papel crítico de los TLRs en la defensa temprana contra la invasión de patógenos. Sin embargo, en la última década se los ha involucrado en la neuroinflamación, tanto a nivel del sistema nervioso periférico como central, revelando su participación en la neurofisiología y en el desarrollo de neuropatologías. Ha sido reportado a nivel del sistema nervioso central, que la activación de TLR3 inducida por su ligando poly (I:C) favorece la producción de moléculas inflamatorias contribuyendo a la

degeneración de neuronas dopaminérgicas. De esta manera podría considerarse al TLR3 como un nuevo blanco para la terapia antiinflamatoria en enfermedades neurodegenerativas como es la enfermedad de Parkinson (Deleidi M y col, 2010).

Los TLRs expresados en células del sistema inmune cutáneo, en particular los queratinocitos, han sido foco de estudio en procesos fisiológicos y patológicos a nivel de la piel. Reportes previos demostraron una relación entre la activación de los TLRs y las respuestas inflamatorias frente a isquemia, shock hemorrágico, lesiones por quemaduras y heridas quirúrgicas de la piel. Recientemente, se describió que la expresión y activación de estos receptores podrían modular la cicatrización de las heridas dependiendo de cómo sea la respuesta inflamatoria generada (Dasu y col, 2010; Lin y col, 2012).

En base a estos antecedentes, se planteó como objetivo III de esta tesis, estudiar el efecto de la dopamina sobre la activación de TLR3 en los queratinocitos humanos. En reportes previos se ha demostrado en modelos murinos que la deficiencia en TLR3 disminuye la migración celular, mientras que la aplicación tópica del agonista de TLR3 (poly (I:C)) induce la reepitelización, indicando que la activación de TLR3 tiene un rol positivo en la cicatrización de heridas (Lin et al., 2016). En concordancia con estos resultados, observamos que el agonista de TLR3 favoreció la migración de los queratinocitos HaCaT. Remarcablemente, demostramos que la dopamina  $10^{-5}$  M disminuyó la migración celular inducida por (poly (I:C), revelando una interacción entre la catecolamina y los TLR sobre la reparación de la herida *in vitro*. Asimismo, observamos en el sitio de la herida que la actividad de la MMP-9, encargada de degradar la matriz y promover la migración celular (Caley et al., 2015) y previamente inducida por poly (I:C), fue disminuida por el neurotransmisor, confirmando su participación en el retraso de la reparación de la herida *in vitro* ejercido por la dopamina.

Como se comentó anteriormente, la participación de IL-6 (Lin et al., 2003b) y de IL-8 (Jiang et al., 2012), es crucial para la migración celular en el proceso de cicatrización del tejido dañado. Se ha demostrado en estudios *in vivo* que la activación de TLR3 induce el aumento de IL-6 favoreciendo la cicatrización de heridas (Lai y Gallo, 2008; Lin et al., 2012). Por el contrario, en esta tesis demostramos que la dopamina  $10^{-5}$  M aumentó la producción de IL-6 y disminuyó la producción de IL-8, inducidas por poly (I:C) en el sitio de la herida al tiempo que disminuyó el cierre de la herida inducido por el agonista TLR3. Nuestros resultados van en línea con los trabajos de (M.-H. Kim et al.,

2014) que reportan que un aumento de IL-6 sería perjudicial para la cicatrización de heridas, y de (Takada et al., 2017) que describen que la activación del TLR3 por poly (I:C) en queratinocitos incrementa su migración a través de IL-8. En esta tesis reportamos que la dopamina  $10^{-5}$  M disminuye la migración de queratinocitos inducida por TLR3 al mismo que tiempo que disminuye la IL-8. Asimismo, como IL-8 se encuentra relacionada con la regulación de la actividad de las MMP-9 (Chakrabarti y Patel, 2005), podemos sugerir que la disminución de la producción de IL-8 y de la actividad de MMP9 en respuesta a la activación del TLR3 en presencia del neurotransmisor, podrían estar implicadas en el retraso de la migración celular observada en estas condiciones. Estos resultados nos permiten inferir la participación de estos receptores de la inmunidad innata en la neuromodulación de la respuesta inmune cutánea.

Considerando la continua exposición a los disruptores endocrinos y a pesar de los estudios realizados sobre la acción del BPA a nivel de los sistemas endocrino, nervioso e inmune, todavía existe incertidumbre acerca de los efectos producidos por la exposición a los perturbadores endocrinos sobre la salud humana. Teniendo en consideración que el BPA puede entrar en contacto y ser absorbido por la piel (Zalko et al., 2011), nos preguntamos en el último objetivo de esta tesis si el BPA podría tener algún efecto sobre la funcionalidad de queratinocitos y macrófagos humanos, lo que podría considerarse un campo de estudio novedoso y de importancia en la inmunotoxicología. Dado que muchos de los efectos contradictorios que se describen en la bibliografía sobre las acciones del disruptor suelen deberse a la dosis de BPA utilizada en los estudios (Vandenberg et al., 2009), es fundamental que tanto estudios *in vitro* como *in vivo* sean realizados con lo que se denominan “bajas dosis” lo que equivaldría a los niveles de exposición relevantes fisiológicamente. Por lo tanto, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US-EPA de sus siglas en inglés) tomó como criterio la utilización de dosis de 50  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  para estudios *in vivo* y concentraciones  $\leq 1 \times 10^{-7}$  M para estudios *in vitro* (Wetherill et al., 2007).

En la primera parte del objetivo IV, los resultados revelaron que ninguna de las concentraciones de BPA utilizadas modificó los niveles de IL-6 e IL-8 en los queratinocitos humanos incubados con el disruptor endocrino durante 24 hs. Se ha reportado que concentraciones de BPA en el orden de  $10^{-12}$  a  $10^{-4}$  M no modificaron los niveles de IL-6, mientras que aumentaron los niveles de IL-8 y TNF- $\alpha$ , en células del

hígado (Huc et al., 2012). Recientemente, otros autores han observado un efecto inflamatorio, mediante el aumento de IL-6 y de  $INF\gamma$  en adipocitos (Ariemma et al., 2016). En cuanto a las diferencias observadas en la producción de citoquinas pensamos que pueden deberse a las dosis utilizadas y a los tiempos de exposición al disruptor endocrino.

Estudios previos han demostrado que el BPA *in vivo* puede aumentar los niveles de epinefrina, GABA y glutamato en varias regiones del sistema nervioso lo que se traduciría en alteraciones en el comportamiento (Ogi et al., 2015). Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos preguntamos si podría haber una interacción entre el sistema dopaminérgico y el BPA a nivel periférico. A pesar de que existe evidencia de que la exposición prenatal y neonatal al BPA puede potenciar la neurotransmisión dependiente del receptor dopaminérgicos D1 (Suzuki et al., 2003), luego de analizar los resultados, observamos que el disruptor endocrino no modificó la respuesta de dopamina en queratinocitos humanos incubados con distintas concentraciones de BPA durante 24 hs. Esto nos sugiere que el BPA no estaría interfiriendo con la vía dopaminérgica bajo las condiciones de estudio, y que tal vez estas no sean las condiciones óptimas para evaluar el efecto de esta droga.

Teniendo en cuenta esto, y que la exposición a los perturbadores ambientales es continua, decidimos evaluar el efecto de BPA sobre los queratinocitos humanos cultivados durante 10 días con el disruptor endocrino, y determinar si el tiempo de cultivo con el BPA podría afectar la respuesta de los queratinocitos a la dopamina. Cuando se analizaron los resultados, observamos que aún cultivando las células con el disruptor durante 10 días, éste no alteró el efecto estimulante que dopamina presentó sobre IL-6 en los queratinocitos humanos en ausencia del disruptor endocrino. Por el contrario, a pesar de no observarse modificaciones de dopamina sobre los niveles de IL-8 en presencia de BPA, este perfil fue diferente respecto del obtenido en ausencia del disruptor endocrino, en el que dopamina ( $10^{-5}$  M) sí indujo un aumento de la producción de esta citoquina. Esto nos permite inferir que el BPA en los queratinocitos humanos alterarían la producción de citoquinas en respuesta a dopamina. Luego, cuando evaluamos la activación de la vía  $NF\kappa B$ , observamos que, en las células cultivadas en presencia de BPA, la dopamina aumentó la translocación del factor  $NF\kappa B$  al núcleo, del mismo modo en que lo habíamos observado previamente en ausencia del disruptor. Esto es esperable, ya que los resultados que hemos mostrado en esta tesis sugieren que los

efectos de dopamina sobre la expresión de IL-8 no estarían relacionados con el efecto sobre la activación de este factor de transcripción, a diferencia de los efectos sobre IL-6. A pesar de que se ha demostrado que el BPA puede alterar la respuesta a dopamina en neuronas y astrocitos modificando la plasticidad sináptica (Miyatake et al., 2006), estos autores no observaron efectos sobre la producción de citoquinas y la activación del factor NF-kB. No lo hemos analizado en esta tesis pero ha sido reportado que BPA puede de por sí activar este factor de transcripción y estimular la producción de citoquinas proinflamatorias en un línea celular de microglía, (Zhu et al., 2015), y en hepatocitos HepG2 (Geng S y col, 2017).

Cuando evaluamos el efecto de dopamina sobre la actividad de MMP-9 observamos un aumento de la actividad enzimática medida en los queratinocitos humanos incubados con BPA a diferencia de lo observado en ausencia del disruptor endocrino. En concordancia con nuestros resultados, se ha demostrado que la administración de BPA puede inducir la activación de la MMP-9 en un modelo *in vivo* (Elswefy et al., 2016). Concentraciones nanomolares de BPA inducen aumento de MMP-9 y MMP-2 en líneas de cáncer de mama altamente metastásicas, incrementando su migración e invasión *in vitro* (Y. Wang et al., 2018).

En resumen, la bibliografía reporta efectos proinflamatorios y proinvasivos de BPA. En queratinocitos tratados durante 10 días con el disruptor observamos que dopamina mantuvo su rol pro-inflamatorio, a nivel de la producción de IL-6, MMP-9 y la activación de NF-kB. Sin embargo, el aumento de IL-8 que provoca este neurotransmisor deja de observarse en presencia de BPA. Dado el rol que podría tener esta citoquina en la migración de queratinocitos, que se desprende de los resultados previamente mostrados en esta tesis, será importante analizar en futuros experimentos el efecto de BPA en este proceso.

A continuación, evaluamos el efecto del BPA en los macrófagos THP-1.

Al igual que lo observado en el caso de los queratinocitos la incubación de los macrófagos con BPA durante 24 hs no modificó significativamente los niveles de citoquinas. Sin embargo, pudimos observar un leve aumento que no resultó significativo, sobre IL-1 $\beta$  con la concentración de BPA 10<sup>-9</sup> M. Couleau N y colaboradores, observaron un leve aumento de la producción de IL-8, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en respuesta al tratamiento con BPA durante 24 hs, sin embargo, estos efectos fueron realizados en macrófagos THP-1 estimulados con LPS (Couleau et al., 2015b). También en macrófagos se describió un



aumento en citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$  e IL-6) cuando las células fueron tratadas durante 24 hs con el disruptor en concentraciones de 10 y 100 nM (Liu et al., 2014b). Estos resultados sin embargo se obtuvieron en macrófagos primarios y en células THP-1 diferenciadas con PMA 320 nM durante 48 hs, mientras que nuestros estudios se realizaron en células diferenciadas durante 72 hs con una concentración cinco veces menor del PMA (65 nM), lo que puede explicar las diferencias obtenidas. En nuestras condiciones de estudio, no observamos niveles detectables de IL-6 en los macrófagos THP-1 en presencia o ausencia de BPA. Bodin y colaboradores, 2015 demostraron que la exposición al BPA disminuye los niveles de citoquinas (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-4) en cultivo de esplenocitos (una suspensión celular rica en linfocitos) proveniente de animales diabéticos (Bodin et al., 2015). Esto nos permite nuevamente pensar que los efectos de los perturbadores endocrinos pueden ser variados dependiendo el tiempo de exposición, la concentración y las condiciones de estudio, de allí surgen las contradicciones entre los distintos trabajos sobre la regulación del sistema inmune.

Del mismo modo que para los queratinocitos, quisimos evaluar si el BPA podía interferir con la respuesta de dopamina sobre la producción de citoquinas en los macrófagos THP-1. Luego de analizar los resultados, pudimos observar que no se observaron modificaciones en los niveles de IL-8 en respuesta a la dopamina en presencia del disruptor. Sin embargo, observamos una leve inducción no significativa de IL-1 $\beta$  con la concentración  $10^{-9}$  M de BPA. Estos resultados indican que el disruptor podría interferir con la vía dopaminérgica en los macrófagos, aunque el tratamiento a 24 hs, al igual que con los queratinocitos, resultó no ser el tiempo ideal para estudiar el efecto del disruptor.

Por lo tanto, estudiamos el efecto de BPA en la respuesta a dopamina por parte de los macrófagos THP-1 cultivados con el disruptor endocrino durante 10 días. Observamos que en presencia del BPA durante 10 días se revirtió el efecto inductor que ejerció dopamina sobre la producción de IL-8 en ausencia del disruptor endocrino, de forma similar a lo observado en queratinocitos. Por otro lado, en presencia de BPA la dopamina no modificó la producción de IL- $\beta$ , resultados similares a los obtenidos en ausencia del disruptor endocrino. En presencia de BPA fue posible detectar la producción basal de IL-6 en los macrófagos, que no era medible en ausencia del

disruptor, o cuando las células fueron tratadas con BPA por 24 hs. A pesar de ello, a diferencia de lo observado en los queratinocitos, en presencia de BPA no se observó una inducción de IL-6 en respuesta a la dopamina. Finalmente, cuando evaluamos en los macrófagos THP-1 la activación de NF- $\kappa$ B, observamos que la dopamina, en presencia del disruptor endocrino, no indujo la translocación al núcleo del factor de transcripción, del mismo modo que no lo hizo en ausencia del mismo. Ya hemos mencionado que, a diferencia de nuestros resultados, ha sido reportado que BPA puede de por sí activar este factor de transcripción y estimular la producción de citoquinas proinflamatorias en una línea celular de microglía, (Zhu et al., 2015), que son considerados como los “macrófagos” del SNC. Estas diferencias pueden ser nuevamente atribuidas a nuestro modelo experimental. Además, nuestro diseño experimental sólo nos permite analizar si el disruptor afecta la translocación inducida por la dopamina, no así si el BPA es capaz en sí mismo de activar la translocación en los macrófagos. Sin embargo, tampoco observamos que el BPA indujera la translocación en presencia de la dopamina que por sí sola no lo hace. Por último, cuando analizamos el efecto de dopamina sobre la actividad de MMP-9 observamos una inducción de la actividad gelatinolítica en presencia del BPA, del mismo modo en que lo habíamos observado en ausencia del disruptor. Estos resultados van en línea con el rol inductor de esta actividad enzimática que se le ha adjudicado al BPA en distintos estudios, como ya hemos mencionado (Elswefy et al., 2016, Zhang et al., 2016)) y a los resultados que tuvimos en los queratinocitos, en los que observamos que en presencia de BPA la dopamina indujo la producción de MMP9, a diferencia de lo que se observaba en ausencia del disruptor. También podemos mencionar el trabajo realizado por Kasneci A y colaboradores, donde se describió que la exposición al BPA de macrófagos murinos reclutados en un sitio de herida post isquémica puede favorecer una respuesta inflamatoria y un aumento de la actividad de MMP-9 (Kasneci et al., 2017).

En conclusión, los estudios realizados en modelos de queratinocitos y macrófagos humanos sugieren que a tiempos cortos de incubación el BPA solo o en combinación con dopamina no modificaría la producción de citoquinas. Sin embargo, cuando el disruptor endocrino se encuentra presente por varios días en el cultivo celular, es capaz de alterar la funcionalidad de los queratinocitos y macrófagos en respuesta a dopamina.

En conjunto los resultados obtenidos en este trabajo de tesis proponen que el neurotransmisor dopamina puede ejercer efectos inmunomoduladores sobre el sistema inmune cutáneo, actuando sobre queratinocitos y macrófagos, principalmente a través de receptores  $\beta$ -adrenérgicos pero también a través de receptores dopaminérgicos y de mecanismos oxidativos. Estos efectos consistieron en la modulación de la producción de citoquinas proinflamatorias, la activación de metaloproteasas de matriz, y de especies reactivas del oxígeno y el nitrógeno, y de la actividad de la vía de señalización del factor de transcripción NF-kB. Esta modulación afectó la capacidad migratoria de los queratinocitos, efecto en el cual pueden estar involucrados también receptores Toll de la inmunidad innata. Asimismo, este trabajo de tesis permitió demostrar que una sustancia disruptora endócrina como el bisfenol A, cuando está presente por varios días en el cultivo celular, es capaz de alterar la funcionalidad de los queratinocitos y macrófagos.

Los resultados mostrados en este trabajo permiten postular que alteraciones de la transmisión dopaminérgica pueden afectar la homeostasis del sistema inmune cutáneo. 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, la interacción propuesta entre los disruptores endocrinos y las acciones dopaminérgicas a nivel de células del sistema inmune cutáneo, podría ser un área de interés para estudios inmunotoxicológicos.

# ***REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

- Abbas, A., Lichtman, A., Pillai, S., 2018. Cellular and Molecular Immunology, Elsevier.
- Abdallah, F., Mijouin, L., Pichon, C., 2017. Skin Immune Landscape: Inside and Outside the Organism. *Mediators Inflamm.* <https://doi.org/10.1155/2017/5095293>
- Ariemma, F., D'Esposito, V., Liguoro, D., Oriente, F., Cabaro, S., Liotti, A., Cimmino, I., Longo, M., Beguinot, F., Formisano, P., Valentino, R., 2016. Low-Dose Bisphenol-A Impairs Adipogenesis and Generates Dysfunctional 3T3-L1 Adipocytes. *PLoS One* 11, e0150762. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150762>
- Arreola, R., Alvarez-Herrera, S., Pérez-Sánchez, G., Becerril-Villanueva, E., Cruz-Fuentes, C., Flores-Gutierrez, E.O., Garcés-Alvarez, M.E., De La Cruz-Aguilera, D.L., Medina-Rivero, E., Hurtado-Alvarado, G., Quintero-Fabián, S., Pavón, L., 2016. Immunomodulatory Effects Mediated by Dopamine. *J. Immunol. Res.* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/3160486>
- Artlett, C.M., 2013. Inflammasomes in wound healing and fibrosis. *J. Pathol.* <https://doi.org/10.1002/path.4116>
- Bansal, A., Henao-Mejia, J., Simmons, R.A., 2018. Immune system: An emerging player in mediating effects of endocrine disruptors on metabolic health. *Endocrinology.* <https://doi.org/10.1210/en.2017-00882>
- Bar-El, D.S., Reifen, R., 2010. Soy as an endocrine disruptor: cause for caution? *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 23, 855–61.
- Barnes, M.A., Carson, M.J., Nair, M.G., 2015. Non-traditional cytokines: How catecholamines and adipokines influence macrophages in immunity, metabolism and the central nervous system. *Cytokine* 72, 210–219. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.01.008>
- Barnes, P.J., Karin, M., 1997. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N. Engl. J. Med.* 336, 1066–71. <https://doi.org/10.1056/NEJM199704103361506>
- Basu, S., Dasgupta, P.S., 2000. Dopamine, a neurotransmitter, influences the immune system. *J. Neuroimmunol.* 102, 113–124. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(99\)00176-9](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(99)00176-9)
- Basu, S., Sarkar, C., Chakroborty, D., Nagy, J., Mitra, R.B., Dasgupta, P.S., Mukhopadhyay, D., 2004. Ablation of peripheral dopaminergic nerves stimulates malignant tumor growth by inducing vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis. *Cancer Res.* 64, 5551–5555. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1600>
- Beaulieu, J.-M., Gainetdinov, R.R., 2011. The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. *Pharmacol. Rev.* 63, 182–217. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002642>
- Beck, G.C., Oberacker, R., Kapper, S., Von Zabern, D., Schulte, J., Van Ackern, K., Van der Woude, F.J., Yard, B.A., 2001. Modulation of chemokine production in lung microvascular endothelial cells by dopamine is mediated via an oxidative mechanism. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 25, 636–643.
- Bellinger, D., Tran, L., Kang, J.I., Lubahn, C., Felten, D.L., Lorton, D., 2002. Age-Related Changes in Noradrenergic Sympathetic Innervation of the Rat Spleen Is Strain Dependent. *Brain. Behav.*

- Immun. 16, 247–261. <https://doi.org/10.1006/brbi.2001.0626>
- Ben-Jonathan, N., Hnasko, R., 2001. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr. Rev.* <https://doi.org/10.1210/er.22.6.724>
- Bergquist, J., Tarkowski, A., Ekman, R., Ewing, A., 1994. Discovery of endogenous catecholamines in lymphocytes and evidence for catecholamine regulation of lymphocyte function via an autocrine loop. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 12912–12916. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.26.12912>
- Besedovsky, H.O., Rey, A. del, 2007. Physiology of psychoneuroimmunology: A personal view. *Brain. Behav. Immun.* 21, 34–44. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2006.09.008>
- Besedovsky, H.O., Sorkin, E., 1977. Network of immune-neuroendocrine interactions. *Clin. Exp. Immunol.* 27, 1–12.
- Besser, M.J., Ganor, Y., Levite, M., 2005. Dopamine by itself activates either D2, D3 or D1/D5 dopaminergic receptors in normal human T-cells and triggers the selective secretion of either IL-10, TNF $\alpha$  or both. *J. Neuroimmunol.* 169, 161–171. <https://doi.org/10.1016/J.JNEUROIM.2005.07.013>
- Blalock, J.E., 1994. The syntax of immune-neuroendocrine communication. *Immunol. Today* 15, 504–511. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(94\)90205-4](https://doi.org/10.1016/0167-5699(94)90205-4)
- Blalock, J.E., Smith, E.M., 2007. Conceptual development of the immune system as a sixth sense. *Brain. Behav. Immun.* 21, 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2006.09.004>
- Bodin, J., Stene, L.C., Nygaard, U.C., 2015. Can exposure to environmental chemicals increase the risk of diabetes type 1 development? *Biomed Res. Int.* <https://doi.org/10.1155/2015/208947>
- Boink, M.A., Roffel, S., Nazmi, K., Van Montfrans, C., Bolscher, J.G.M., Gefen, A., Veerman, E.C.I., Gibbs, S., s. f. The Influence of Chronic Wound Extracts on Inflammatory Cytokine and Histatin Stability.
- Borkowski, A.W., Park, K., Uchida, Y., Gallo, R.L., 2013. Activation of TLR3 in keratinocytes increases expression of genes involved in formation of the epidermis, lipid accumulation, and epidermal organelles. *J. Invest. Dermatol.* 133, 2031–40. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.39>
- Bou-Dargham, M.J., Khamis, Z.I., Cognetta, A.B., Sang, Q.X.A., 2017. The Role of Interleukin-1 in Inflammatory and Malignant Human Skin Diseases and the Rationale for Targeting Interleukin-1 Alpha. *Med. Res. Rev.* <https://doi.org/10.1002/med.21406>
- Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., Fusenig, N.E., 1988. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* 106, 761–771. <https://doi.org/10.1083/jcb.106.3.761>
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brazzini, B., Gherstich, I., Hercogova, J., Lotti, T., 2003. The neuro-immuno-cutaneous-endocrine network: Relationship between mind and skin. *Dermatol. Ther.* <https://doi.org/10.1046/j.1529->

8019.2003.01621.x

- Brosnahan, A.J., Vulchanova, L., Witta, S.R., Dai, Y., Jones, B.J., Brown, D.R., 2013. Norepinephrine potentiates proinflammatory responses of human vaginal epithelial cells. *J. Neuroimmunol.* 259, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2013.03.005>
- Brown, S.W., Meyers, R.T., Brennan, K.M., Rumble, J.M., Narasimhachari, N., Perozzi, E.F., Ryan, J.J., Stewart, J.K., Fischer-Stenger, K., 2003. Catecholamines in a macrophage cell line. *J. Neuroimmunol.* 135, 47–55. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(02\)00435-6](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(02)00435-6)
- Bukowska, B., Michałowicz, J., Marczak, A., 2015. The effect of catechol on human peripheral blood mononuclear cells (in vitro study). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 39, 187–193. <https://doi.org/10.1016/J.ETAP.2014.11.017>
- Caley, M.P., Martins, V.L.C., O'Toole, E.A., 2015. Metalloproteinases and Wound Healing. *Adv. wound care* 4, 225–234. <https://doi.org/10.1089/wound.2014.0581>
- Cano, E., Canellada, A., Minami, T., Iglesias, T., Redondo, J.M., 2005. Depolarization of neural cells induces transcription of the Down syndrome critical region 1 isoform 4 via a calcineurin/nuclear factor of activated T cells-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 280, 29435–29443. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506205200>
- Casals-Casas, C., Desvergne, B., 2011. Endocrine Disruptors: From Endocrine to Metabolic Disruption. *Annu. Rev. Physiol.* 73, 135–162. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-012110-142200>
- Catani, M.V., Savini, I., Rossi, A., Melino, G., Avigliano, L., 2005. Biological role of vitamin C in keratinocytes. *Nutr. Rev.* <https://doi.org/10.1301/nr.2005.mar.000-000>
- Cave, J.W., Baker, H., 2009. Dopamine systems in the forebrain. *Adv. Exp. Med. Biol.* 651, 15–35. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0322-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0322-8_2)
- Chakrabarti, S., Patel, K.D., 2005. MATRIX METALLOPROTEINASE-2 (MMP-2) AND MMP-9 IN PULMONARY PATHOLOGY. *Exp. Lung Res.* 31, 599–621. <https://doi.org/10.1080/019021490944232>
- Chakroborty, D., Chowdhury, U.R., Sarkar, C., Baral, R., Dasgupta, P.S., Basu, S., 2008. Dopamine regulates endothelial progenitor cell mobilization from mouse bone marrow in tumor vascularization. *J. Clin. Invest.* 118, 1380. <https://doi.org/10.1172/JCI33125DS1>
- Chanput, W., Mes, J.J., Savelkoul, H.F.J., Wichers, H.J., 2013. Characterization of polarized THP-1 macrophages and polarizing ability of LPS and food compounds. *Food Funct.* 4, 266–276. <https://doi.org/10.1039/c2fo30156c>
- Chen, J., Rusnak, M., Luedtke, R.R., Sidhu, A., 2004. D1 dopamine receptor mediates dopamine-induced cytotoxicity via the ERK signal cascade. *J. Biol. Chem.* 279, 39317–39330. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403891200>
- Chen, L., Guo, S., Ranzer, M.J., DiPietro, L.A., 2013. Toll-like receptor 4 plays an essential role in early skin wound healing. *J. Invest. Dermatol.* 133, 258. <https://doi.org/10.1038/JID.2012.267>
- Chen, L., Xu, Y., Zhao, J., Zhang, Z., Yang, R., Xie, J., Liu, X., Qi, S., 2014. Conditioned medium

- from hypoxic bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhances wound healing in mice. *PLoS One* 9, e96161. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096161>
- Chen, S., Wen, X., Liang, H., Li, Y., Chen, X., Zhang, D., Shi, R., Ma, W., 2017. The Regulation of SKF38393 on the signaling pathway of dopamine D1 receptor in hippocampus during chronic sleep deprivation. *Neurosci. Lett.* <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.05.072>
- Chi, D.S., Qui, M., Krishnaswamy, G., Li, C., Stone, W., 2003. Regulation of nitric oxide production from macrophages by lipopolysaccharide and catecholamines. *Nitric Oxide* 8, 127–132. [https://doi.org/10.1016/S1089-8603\(02\)00148-9](https://doi.org/10.1016/S1089-8603(02)00148-9)
- Chiam, K., Tilley, W.D., Butler, L.M., Bianco-Miotto, T., 2009. The dynamic and static modification of the epigenome by hormones: A role in the developmental origin of hormone related cancers. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* 1795, 104–109. <https://doi.org/10.1016/J.BBCAN.2008.12.001>
- Cosentino, M., Ferrari, M., Kustrimovic, N., Rasini, E., Marino, F., 2015. Influence of dopamine receptor gene polymorphisms on circulating T lymphocytes: A pilot study in healthy subjects. *Hum. Immunol.* 76, 747–752. <https://doi.org/10.1016/J.HUMIMM.2015.09.032>
- Cosentino, M., Kustrimovic, N., Ferrari, M., Rasini, E., Marino, F., 2018. cAMP levels in lymphocytes and CD4<sup>+</sup> regulatory T-cell functions are affected by dopamine receptor gene polymorphisms. *Immunology* 153, 337–341. <https://doi.org/10.1111/imm.12843>
- Cosentino, M., Marino, F., 2013. Adrenergic and dopaminergic modulation of immunity in multiple sclerosis: Teaching old drugs new tricks? *J. Neuroimmune Pharmacol.* 8, 163–179. <https://doi.org/10.1007/s11481-012-9410-z>
- Cosentino, M., Rasini, E., Colombo, C., Marino, F., Blandini, F., Ferrari, M., Samuele, A., Lecchini, S., Nappi, G., Frigo, G., 2004. Dopaminergic modulation of oxidative stress and apoptosis in human peripheral blood lymphocytes: Evidence for a D1-like receptor-dependent protective effect. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 1233–1240. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.02.065>
- Couleau, N., Falla, J., Beillerot, A., Battaglia, E., D’Innocenzo, M., Plançon, S., Laval-Gilly, P., Bennisroune, A., 2015a. Effects of Endocrine Disruptor Compounds, Alone or in Combination, on Human Macrophage-Like THP-1 Cell Response. *PLoS One* 10, e0131428. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131428>
- Couleau, N., Falla, J., Beillerot, A., Battaglia, E., D’Innocenzo, M., Plançon, S., Laval-Gilly, P., Bennisroune, A., 2015b. Effects of Endocrine Disruptor Compounds, Alone or in Combination, on Human Macrophage-Like THP-1 Cell Response. *PLoS One* 10, e0131428. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131428>
- Dasu, M.R., Ramirez, S.R., La, T.D., Gorouhi, F., Nguyen, C., Lin, B.R., Mashburn, C., Stewart, H., Peavy, T.R., Nolte, J.A., Isseroff, R.R., 2014. Crosstalk between adrenergic and toll-like receptors in human mesenchymal stem cells and keratinocytes: a recipe for impaired wound healing. *Stem Cells Transl. Med.* 3, 745–59. <https://doi.org/10.5966/sctm.2013-0200>



- Dasu, M.R., Thangappan, R.K., Bourgette, A., Dipietro, L.A., Isseroff, R., Jialal, I., 2010. TLR2 expression and signaling-dependent inflammation impair wound healing in diabetic mice. *Lab. Investig.* 90, 1628–1636. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2010.158>
- Denda, M., 2015. Epidermis as the “Third Brain”? *Dermatologica Sin.* 33, 70–73. <https://doi.org/10.1016/j.dsi.2015.04.011>
- Denda, M., Fuziwara, S., Inoue, K., 2003. Beta2-adrenergic receptor antagonist accelerates skin barrier recovery and reduces epidermal hyperplasia induced by barrier disruption. *J. Invest. Dermatol.* 121, 142–148. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12310.x>
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.-P., Giudice, L.C., Hauser, R., Prins, G.S., Soto, A.M., Zoeller, R.T., Gore, A.C., 2009. Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocr. Rev.* 30, 293–342. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0002>
- Donetti, E., Cornaghi, L., Arnaboldi, F., Ricceri, F., Pescitelli, L., Maiocchi, M., Carriero, F., Baruffaldi Preis, F., Prignano, F., 2017. Epidermal barrier reaction to an in vitro psoriatic microenvironment. *Exp. Cell Res.* 360, 180–188. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.09.004>
- Elenkov, I.J., 2008. Effects of Catecholamines on the Immune Response. *NeuroImmune Biol.* [https://doi.org/10.1016/S1567-7443\(07\)00210-4](https://doi.org/10.1016/S1567-7443(07)00210-4)
- Elenkov, I.J., Wilder, R.L., Chrousos, G.P., Vizi, E.S., 2000. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol. Rev.* 52, 595–638. <https://doi.org/10.1111/j.1111.2015.11111>
- Elswefy, S.E.-S., Abdallah, F.R., Atteia, H.H., Wahba, A.S., Hasan, R.A., 2016. Inflammation, oxidative stress and apoptosis cascade implications in bisphenol A-induced liver fibrosis in male rats. *Int. J. Exp. Pathol.* 97, 369–379. <https://doi.org/10.1111/iep.12207>
- Elsworth, J.D., Jentsch, J.D., VandeVoort, C.A., Roth, R.H., Eugene Redmond, D., Leranath, C., 2013. Prenatal exposure to bisphenol A impacts midbrain dopamine neurons and hippocampal spine synapses in non-human primates. *Neurotoxicology* 35, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2013.01.001>
- Evans, B.A., Sato, M., Sarwar, M., Hutchinson, D.S., Summers, R.J., 2010. Ligand-directed signalling at beta-adrenoceptors. *Br. J. Pharmacol.* 159, 1022–1038. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00602.x>
- Farmer, P., Pugin, J., 2000. Beta-adrenergic agonists exert their “anti-inflammatory” effects in monocytic cells through the IkappaB/NF-kappaB pathway 675–682.
- Flierl, M.A., Rittirsch, D., Nadeau, B.A., Sarma, J.V., Day, D.E., Lentsch, A.B., Huber-Lang, M.S., Ward, P.A., 2009. Upregulation of phagocyte-derived catecholamines augments the acute inflammatory response. *PLoS One* 4. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004414>
- Fuziwara, S., Suzuki, A., Inoue, K., Denda, M., 2005. Dopamine D2-like receptor agonists accelerate barrier repair and inhibit the epidermal hyperplasia induced by barrier disruption. *J. Invest. Dermatol.* 125, 783–789. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2005.23873.x>
- Garlanda, C., Dinarello, C.A., Mantovani, A., 2013. The Interleukin-1 Family: Back to the Future.

- Immunity 39, 1003–1018. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2013.11.010>
- Gaskill, P.J., Carvallo, L., Eugenin, E.A., Berman, J.W., 2012. Characterization and function of the human macrophage dopaminergic system: implications for CNS disease and drug abuse. *J. Neuroinflammation* 9, 203. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-203>
- Gaskill, P.J., Carvallo, L., Eugenin, E.A., Berman, J.W., 2012. Characterization and function of the human macrophage dopaminergic system: Implications for CNS disease and drug abuse. *J. Neuroinflammation* 9. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-203>
- Gaskill, P.J., Yano, H.H., Kalpana, G. V, Javitch, J.A., Berman, J.W., 2014. Dopamine receptor activation increases HIV entry into primary human macrophages. *PLoS One* 9, e108232. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108232>
- Ghazizadeh, M., 2007. Essential role of IL-6 signaling pathway in keloid pathogenesis. *J. Nihon Med. Sch. = Nihon Ika Daigaku zasshi* 74, 11–22. <https://doi.org/10.1272/jnms.74.11>
- Glaser, R., Kiecolt-Glaser, J.K., 2005. Stress-induced immune dysfunction: Implications for health. *Nat. Rev. Immunol.* <https://doi.org/10.1038/nri1571>
- Grimstad, Ø., Sandanger, Ø., Ryan, L., Otterdal, K., Damaas, J.K., Pukstad, B., Espevik, T., 2011. Cellular sources and inducers of cytokines present in acute wound fluid. *Wound Repair Regen.* 19, 337–347. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2011.00668.x>
- Grossman, R.M., Krueger, J., Yourish, D., Granelli-Piperno, A., Murphy, D.P., May, L.T., Kupper, T.S., Sehgal, P.B., Gottlieb, a B., 1989. Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86, 6367–6371. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.16.6367>
- Gurevicha, E. V., Gainetdinov, R.R., Gurevich, V. V., 2016. G protein-coupled receptor kinases as regulators of dopamine receptor functions. *Pharmacol. Res.* 111, 1–16. <https://doi.org/10.1038/bmt.2013.152.Hematopoietic>
- Haddad, J.J., 2008. On the mechanisms and putative pathways involving neuroimmune interactions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 370, 531–535. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.04.012>
- Hajifathali, A., Saba, F., Atashi, A., Soleimani, M., Mortaz, E., Rasekhi, M., 2014. The role of catecholamines in mesenchymal stem cell fate. *Cell Tissue Res.* 358, 651–665. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1984-8>
- HAMPL, R., Kubátová, J., Stárka, L., 2016. Steroids and endocrine disruptors—History, recent state of art and open questions. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 155, 217–223. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.04.013>
- Härtel, C., Strunk, T., Bucskey, P., Schultz, C., 2004. Effects of vitamin C on intracytoplasmic cytokine production in human whole blood monocytes and lymphocytes. *Cytokine* 27, 101–106. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2004.02.004>
- Haskó, G., Szabó, C., Németh, Z.H., Deitch, E.A., 2002. Dopamine suppresses IL-12 p40 production by lipopolysaccharide-stimulated macrophages via a b-adrenoceptor-mediated mechanism. *J. Neuroimmunol.* 122, 34–39. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(01\)00459-3](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(01)00459-3)

- Hernández-Quintero, M., Kuri-Harcuch, W., González Robles, A., Castro-Muñozledo, F., 2006. Interleukin-6 promotes human epidermal keratinocyte proliferation and keratin cytoskeleton reorganization in culture. *Cell Tissue Res.* 325, 77–90. <https://doi.org/10.1007/s00441-006-0173-9>
- Huc, L., Lemarié, A., Guéraud, F., Héliers-Toussaint, C., 2012. Low concentrations of bisphenol A induce lipid accumulation mediated by the production of reactive oxygen species in the mitochondria of HepG2 cells. *Toxicol. Vit.* 26, 709–717. <https://doi.org/10.1016/J.TIV.2012.03.017>
- Inadera, H., 2015. Neurological effects of bisphenol A and its analogues. *Int. J. Med. Sci.* <https://doi.org/10.7150/ijms.13267>
- Iocono, J.A., Colleran, K.R., Remick, D.G., Gillespie, B.W., Ehrlich, H.P., Garner, W.L., 2000. Interleukin-8 levels and activity in delayed-healing human thermal wounds. *Wound Repair Regen.* 8, 216–225. <https://doi.org/10.1046/j.1524-475X.2000.00216.x>
- Jiang, J.-L., Qiu, Y.-H., Peng, Y.-P., Wang, J.-J., 2006. Immunoregulatory role of endogenous catecholamines synthesized by immune cells. *Sheng Li Xue Bao* 58, 309–17. <https://doi.org/16906330>
- Jiang, W.G., Sanders, A.J., Ruge, F., Harding, K.G., 2012. Influence of interleukin-8 (IL-8) and IL-8 receptors on the migration of human keratinocytes, the role of PLC- $\gamma$  and potential clinical implications. *Exp. Ther. Med.* 3, 231–236. <https://doi.org/10.3892/etm.2011.402>
- Jin, M., Min, C., Zheng, M., Cho, D.I., Cheong, S.J., Kurose, H., Kim, K.M., 2013. Multiple signaling routes involved in the regulation of adenylyl cyclase and extracellular regulated kinase by dopamine D2 and D3 receptors. *Pharmacol. Res.* 67, 31–41. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.09.012>
- Jones, D.C., Miller, G.W., 2008. The effects of environmental neurotoxicants on the dopaminergic system: A possible role in drug addiction. *Biochem. Pharmacol.* 76, 569–581. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.05.010>
- Jun, S.H., Lee, J.H., Kim, S.I., Choi, C.W., Park, T.I., Jung, H.R., Cho, J.W., Kim, S.H., Lee, J.C., 2017. Staphylococcus aureus-derived membrane vesicles exacerbate skin inflammation in atopic dermatitis. *Clin. Exp. Allergy* 47, 85–96. <https://doi.org/10.1111/cea.12851>
- Kang, J.S., Kim, H.N., Jung, D.J., Kim, J.E., Mun, G.H., Kim, Y.S., Cho, D., Shin, D.H., Hwang, Y. Il, Lee, W.J., 2007. Regulation of UVB-induced IL-8 and MCP-1 production in skin keratinocytes by increasing vitamin C uptake via the redistribution of SVCT-1 from the cytosol to the membrane. *J. Invest. Dermatol.* 127, 698–706. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700572>
- Kasneji, A., Lee, J.S., Yun, T.J., Shang, J., Lampen, S., Gomolin, T., Cheong, C.C., Chalifour, L.E., 2017. From the Cover: Lifelong Exposure of C57bl/6n Male Mice to Bisphenol A or Bisphenol S Reduces Recovery From a Myocardial Infarction. *Toxicol. Sci.* 159, 189–202. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfx133>
- Kavlock, R.J., Daston, G.P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L.E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster,

- M., Mac, M.J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D.M., Sinks, T., Tilson, H.A., 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ. Health Perspect.* 104 Suppl 4, 715–40.
- Kawasaki, T., Kawai, T., 2014. Toll-like receptor signaling pathways. *Front. Immunol.* <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00461>
- Kim, J.Y., Jeong, H.G., 2003. Down-regulation of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- $\alpha$  expression by bisphenol A via nuclear factor- $\kappa$ B inactivation in macrophages. *Cancer Lett.* 196, 69–76. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(03\)00219-2](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(03)00219-2)
- Kim, M.-H., Gorouhi, F., Ramirez, S., Granick, J.L., Byrne, B.A., Soulika, A.M., Simon, S.I., Rivkah Isseroff, R., 2014. Catecholamine stress alters neutrophil trafficking and impairs wound healing by  $\beta$ 2-adrenergic receptor-mediated upregulation of IL-6. *J. Invest. Dermatol.* 134, 809–817. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.415>
- Kim, M.H., Gorouhi, F., Ramirez, S., Granick, J.L., Byrne, B.A., Soulika, A.M., Simon, S.I., Isseroff, R.R., 2014. Catecholamine stress alters neutrophil trafficking and impairs wound healing by beta2-adrenergic receptor-mediated upregulation of IL-6. *J Invest Dermatol* 134, 809–817. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.415>
- Kim, S.Y., 2006. The Dopamine D2 Receptor Regulates the Development of Dopaminergic Neurons via Extracellular Signal-Regulated Kinase and Nurr1 Activation. *J. Neurosci.* 26, 4567–4576. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5236-05.2006>
- Klar, A.S., Michalak-Mińska, K., Biedermann, T., Simmen-Meuli, C., Reichmann, E., Meuli, M., 2018. Characterization of M1 and M2 polarization of macrophages in vascularized human dermo-epidermal skin substitutes in vivo. *Pediatr. Surg. Int.* 34, 129–135. <https://doi.org/10.1007/s00383-017-4179-z>
- Kluwe, J., Mencin, A., Schwabe, R.F., 2009. Toll-like receptors, wound healing, and carcinogenesis. *J. Mol. Med.* 87, 125–138. <https://doi.org/10.1007/s00109-008-0426-z>
- Koh, T.J., DiPietro, L.A., 2011. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert Rev. Mol. Med.* 13, e23. <https://doi.org/10.1017/S1462399411001943>
- Kuan, Y.H., Huang, F.M., Li, Y.C., Chang, Y.C., 2012. Proinflammatory activation of macrophages by bisphenol A-glycidyl-methacrylate involved NF $\kappa$ B activation via PI3K/Akt pathway. *Food Chem. Toxicol.* 50, 4003–4009. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.08.019>
- Kuhn, K.A., Manieri, N.A., Liu, T.-C., Stappenbeck, T.S., 2014. IL-6 Stimulates Intestinal Epithelial Proliferation and Repair after Injury. *PLoS One* 9, e114195. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114195>
- Kundakovic, M., Gudsnuik, K., Franks, B., Madrid, J., Miller, R.L., Perera, F.P., Champagne, F.A., 2013. Sex-specific epigenetic disruption and behavioral changes following low-dose in utero bisphenol A exposure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 9956–61. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214056110>

- Kuo, C.-H., Yang, S.-N., Kuo, P.-L., Hung, C.-H., 2012. Immunomodulatory effects of environmental endocrine disrupting chemicals. *Kaohsiung J. Med. Sci.* 28, S37–S42.  
<https://doi.org/10.1016/j.kjms.2012.05.008>
- Kupper, T., Fuhlbrigge, R., 2004. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 211–222. <https://doi.org/10.1038/nri1310>
- Lai, Y., Di Nardo, A., Nakatsuji, T., Leichtle, A., Yang, Y., Cogen, A.L., Wu, Z.-R., Hooper, L. V., Von Aulock, S., Radek, K.A., Huang, C.-M., Ryan, A.F., Gallo, R.L., 2009. Commensal bacteria regulate TLR3-dependent inflammation following skin injury HHS Public Access requires TLR3 for normal inflammation after wounding and that the microflora can modulate specific cutaneous inflammatory responses. *Nat Med* 15, 1377–1382. <https://doi.org/10.1038/nm.2062>
- Lai, Y., Gallo, R.L., 2008. Toll-like receptors in skin infections and inflammatory diseases. *Infect. Disord. Drug Targets* 8, 144–55.
- Le Provost, G.S., Pullar, C.E., 2015.  $\beta$ 2-Adrenoceptor Activation Modulates Skin Wound Healing Processes to Reduce Scarring. *J. Invest. Dermatol.* 135, 279–288.  
<https://doi.org/10.1038/jid.2014.312>
- Lee, H.J., Chattopadhyay, S., Gong, E.-Y., Ahn, R.S., Lee, K., 2003. Antiandrogenic Effects of Bisphenol A and Nonylphenol on the Function of Androgen Receptor. *Toxicol. Sci.* 75, 40–46.  
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfg150>
- Lee, T.L., Hsu, C.T., Yen, S.T., Lai, C.W., Cheng, J.T., 1998. Activation of beta3-adrenoceptors by exogenous dopamine to lower glucose uptake into rat adipocytes. *J. Auton. Nerv. Syst.* 74, 86–90.
- Liang, C.-C., Park, A.Y., Guan, J.-L., 2007. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat. Protoc.* 2, 329–333.  
<https://doi.org/10.1038/nprot.2007.30>
- Lin, L.-L., Huang, C.-C., Wu, C.-L., Wu, M.-T., Hsu, W.-M., Chuang, J.-H., 2016. Downregulation of c-Myc is involved in TLR3-mediated tumor death of neuroblastoma xenografts. *Lab. Investig.* 96, 719–730. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2016.57>
- Lin, Q., Wang, L., Lin, Y., Liu, X., Ren, X., Wen, S., Du, X., Lu, T., Su, S.Y., Yang, X., Huang, W., Zhou, S., Wen, F., Su, S.B., 2012. Toll-Like Receptor 3 Ligand Polyinosinic:Polycytidylic Acid Promotes Wound Healing in Human and Murine Skin. *J. Invest. Dermatol.* 132, 2085–2092.  
<https://doi.org/10.1038/jid.2012.120>
- Lin, Z.-Q., Kondo, T., Ishida, Y., Takayasu, T., Mukaida, N., 2003a. Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice. *J. Leukoc. Biol.* 73, 713–21.
- Lin, Z.-Q., Kondo, T., Ishida, Y., Takayasu, T., Mukaida, N., 2003b. Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice. *J. Leukoc. Biol.* 73, 713–721. <https://doi.org/10.1189/jlb.0802397>
- Liu, Y., Mei, C., Liu, H., Wang, H., Zeng, G., Lin, J., Xu, M., 2014a. Modulation of cytokine

- expression in human macrophages by endocrine-disrupting chemical Bisphenol-A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 451, 592–598. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.08.031>
- Liu, Y., Mei, C., Liu, H., Wang, H., Zeng, G., Lin, J., Xu, M., 2014b. Modulation of cytokine expression in human macrophages by endocrine-disrupting chemical Bisphenol-A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 451, 592–598. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.08.031>
- Lombardi, G., Varsaldi, F., Miglio, G., Papini, M.G., Battaglia, A., Canonico, P.L., 2002. Cabergoline prevents necrotic neuronal death in an in vitro model of oxidative stress. *Eur. J. Pharmacol.* 457, 95–98. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(02\)02683-3](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(02)02683-3)
- Lombardo, T., Cavaliere, V., Costantino, S.N., Kornblihtt, L., Alvarez, E.M., Blanco, G.A., 2012. Synergism between arsenite and proteasome inhibitor MG132 over cell death in myeloid leukaemic cells U937 and the induction of low levels of intracellular superoxide anion. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 258, 351–366. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.11.018>
- Lopez-Castejon, G., Brough, D., 2011. Understanding the mechanism of IL-1 $\beta$  secretion. *Cytokine Growth Factor Rev.* 22, 189–95. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.10.001>
- Lorton, D., Bellinger, D.L., 2015. Molecular mechanisms underlying  $\beta$ -adrenergic receptor-mediated cross-talk between sympathetic neurons and immune cells. *Int. J. Mol. Sci.* <https://doi.org/10.3390/ijms16035635>
- Lucas, T., Waisman, A., Ranjan, R., Roes, J., Krieg, T., Muller, W., Roers, A., Eming, S.A., 2010. Differential Roles of Macrophages in Diverse Phases of Skin Repair. *J. Immunol.* 184, 3964–3977. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903356>
- Luczak, V., Blackwell, K.T., Abel, T., Girault, J.-A., Gervasi, N., 2017. Dendritic diameter influences the rate and magnitude of hippocampal cAMP and PKA transients during  $\beta$ -adrenergic receptor activation. *Neurobiol. Learn. Mem.* 138, 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.08.006>
- Luessen, D.J., Hinshaw, T.P., Sun, H., Howlett, A.C., Marrs, G., McCool, B.A., Chen, R., 2016. RGS2 modulates the activity and internalization of dopamine D2 receptors in neuroblastoma N2A cells. *Neuropharmacology* 110, 297–307. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.08.009>
- Luo, F., Tang, H., Cheng, Z. -y., 2015. Stimulation of  $\alpha$ 1-adrenoceptors facilitates GABAergic transmission onto pyramidal neurons in the medial prefrontal cortex. *Neuroscience* 300, 63–74. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.04.070>
- Lutgendorf, S.K., Lamkin, D.M., Jennings, N.B., Arevalo, J.M.G., Penedo, F., DeGeest, K., Langley, R.R., Lucci, J.A., Cole, S.W., Lubaroff, D.M., Sood, A.K., 2008. Biobehavioral influences on matrix metalloproteinase expression in ovarian carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 14, 6839–46. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0230>
- Mann, E.R., Smith, K.M., Bernardo, D., Al-Hassi, H.O., Knight, S.C., Hart, A.L., 2014. Review: Skin and the Immune System. *J. Clin. Exp. Dermatol. Res.* 4. <https://doi.org/10.4172/2155-9554.S2-003>
- Masuo, Y., Ishido, M., 2011. Neurotoxicity of endocrine disruptors: Possible involvement in brain development and neurodegeneration. *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part B Crit. Rev.* 14, 346–369.

- <https://doi.org/10.1080/10937404.2011.578557>
- McFarland-Mancini, M.M., Funk, H.M., Paluch, A.M., Zhou, M., Giridhar, P. V., Mercer, C.A., Kozma, S.C., Drew, A.F., 2010. Differences in Wound Healing in Mice with Deficiency of IL-6 versus IL-6 Receptor. *J. Immunol.* 184, 7219–7228. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901929>
- McKenna, F., McLaughlin, P.J., Lewis, B.J., Sibbring, G.C., Cummerson, J.A., Bowen-Jones, D., Moots, R.J., 2002. Dopamine receptor expression on human T- and B-lymphocytes, monocytes, neutrophils, eosinophils and NK cells: A flow cytometric study. *J. Neuroimmunol.* 132, 34–40. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(02\)00280-1](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(02)00280-1)
- Midwood, K.S., Piccinini, A.M., 2010. DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators Inflamm.* <https://doi.org/10.1155/2010/672395>
- Mileva, G., Baker, S.L., Konkle, A.T.M., Bielajew, C., 2014. Bisphenol-A: Epigenetic reprogramming and effects on reproduction and behavior. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* <https://doi.org/10.3390/ijerph110707537>
- Miller, L.S., 2008. Toll-Like Receptors in Skin. *Adv. Dermatol.* 24, 71–87. <https://doi.org/10.1016/j.yadr.2008.09.004>
- Mínguez-Alarcón, L., Hauser, R., Gaskins, A.J., 2016. Effects of bisphenol A on male and couple reproductive health: a review. *Fertil. Steril.* <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.07.1118>
- Mirmira, P., Evans-Molina, C., 2014. Bisphenol A, obesity, and type 2 diabetes mellitus: Genuine concern or unnecessary preoccupation? *Transl. Res.* <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2014.03.003>
- Missale, C., Nash, R.S., Robinson, S.W., Jaber, M., Caron, M.G., 1998. Dopamine Receptors: From Structure to Function. *Physiol Rev* 78, 189–225.
- Miyatake, M., Miyagawa, K., Mizuo, K., Narita, M., Suzuki, T., 2006. Dynamic Changes in Dopaminergic Neurotransmission Induced by a Low Concentration of Bisphenol-A in Neurones and Astrocytes. *J. Neuroendocrinol.* 18, 434–444. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2006.01434.x>
- Molteni, M., Rossetti, C., 2017. Neurodegenerative diseases: The immunological perspective. *J. Neuroimmunol.* <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.11.002>
- Moriyama, K., Tagami, T., Akamizu, T., Usui, T., Saijo, M., Kanamoto, N., Hataya, Y., Shimatsu, A., Kuzuya, H., Nakao, K., 2002. Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 5185–5190. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-020209>
- Mukherjee, R., Yun, J.W., 2013. Bromocriptine inhibits adipogenesis and lipogenesis by agonistic action on  $\alpha$ 2-adrenergic receptor in 3T3-L1 adipocyte cells. *Mol. Biol. Rep.* 40, 3783–3792. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-2455-5>
- Nakano, K., Higashi, T., Hashimoto, K., Takagi, R., Tanaka, Y., Matsushita, S., 2008. Antagonizing dopamine D1-like receptor inhibits Th17 cell differentiation: Preventive and therapeutic effects on experimental autoimmune encephalomyelitis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 373, 286–291. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.06.012>
- Nelson, A.M., Reddy, S.K., Ratliff, T.S., Hossain, M.Z., Katseff, A.S., Zhu, A.S., Chang, E., Resnik,

- S.R., Page, C., Kim, D., Whittam, A.J., Miller, L.S., Garza, L.A., 2015. dsRNA Released by Tissue Damage Activates TLR3 to Drive Skin Regeneration. *Cell Stem Cell* 17, 139–151. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.07.008>
- Nesan, D., Sewell, L.C., Kurrasch, D.M., 2018. Opening the black box of endocrine disruption of brain development: Lessons from the characterization of Bisphenol A. *Horm. Behav.* <https://doi.org/10.1016/J.YHBEH.2017.12.001>
- Nestle, F.O., Di Meglio, P., Qin, J.-Z., Nickoloff, B.J., 2009. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 679–91. <https://doi.org/10.1038/nri2622>
- O’Dell, T.J., Connor, S.A., Guglietta, R., Nguyen, P. V., 2015.  $\beta$ -Adrenergic receptor signaling and modulation of long-term potentiation in the mammalian hippocampus. *Learn. Mem.* 22, 461–71. <https://doi.org/10.1101/lm.031088.113>
- Oberbeck, R., 2006. Catecholamines: Physiological Immunomodulators During Health and Illness. *Curr. Med. Chem.* 13, 1979–1989. <https://doi.org/10.2174/092986706777584997>
- Oberbeck, R., Schmitz, D., Wilsenack, K., Schüler, M., Husain, B., Schedlowski, M., Exton, M.S., 2006. Dopamine affects cellular immune functions during polymicrobial sepsis. *Intensive Care Med.* 32, 731–739. <https://doi.org/10.1007/s00134-006-0084-y>
- Odaka, H., Numakawa, T., Adachi, N., Ooshima, Y., Nakajima, S., Katanuma, Y., Inoue, T., Kunugi, H., 2014. Cabergoline, dopamine D2 receptor agonist, prevents neuronal cell death under oxidative stress via reducing excitotoxicity. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099271>
- Ogi, H., Itoh, K., Ikegaya, H., Fushiki, S., 2015. Alterations of neurotransmitter norepinephrine and gamma-aminobutyric acid correlate with murine behavioral perturbations related to bisphenol A exposure. *Brain Dev.* 37, 739–46. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2014.12.008>
- Pacheco, R., Contreras, F., Zouali, M., 2014. The dopaminergic system in autoimmune diseases. *Front. Immunol.* 5, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00117>
- Pacheco, R., Prado, C.E., Barrientos, M.J., Bernales, S., 2009. Role of dopamine in the physiology of T-cells and dendritic cells. *J. Neuroimmunol.* 216, 8–19. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2009.07.018>
- Panet, H., Barzilai, a, Daily, D., Melamed, E., Offen, D., 2001. Activation of nuclear transcription factor kappa B (NF-kappaB) is essential for dopamine-induced apoptosis in PC12 cells. *J Neurochem.* 77, 391–398. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00213.x>
- Paus, R., Theoharides, T.C., Arck, P.C., 2006. Neuroimmunoendocrine circuitry of the “brain-skin connection”. *Trends Immunol.* <https://doi.org/10.1016/j.it.2005.10.002>
- Pietrzak, A.T., Zalewska, A., Chodorowska, G., Krasowska, D., Michalak-Stoma, A., Nockowski, P., Osemlak, P., Paszkowski, T., Roliński, J.M., 2008. Cytokines and anticytokines in psoriasis. *Clin. Chim. Acta* 394, 7–21. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2008.04.005>
- Pinoli, M., Marino, F., Cosentino, M., 2017. Dopaminergic Regulation of Innate Immunity: a Review. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 1–22. <https://doi.org/10.1007/s11481-017-9749-2>



- Pitossi, F., Del Rey, A., Kabiersch, A., Besedovsky, H., 1997. Induction of cytokine transcripts in the central nervous system and pituitary following peripheral administration of endotoxin to mice. *J. Neurosci. Res.* 48, 287–298. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19970515\)48:4<287::AID-JNR1>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19970515)48:4<287::AID-JNR1>3.0.CO;2-7)
- Procaccini, C., Pucino, V., De Rosa, V.D., Marone, G., Matarese, G., 2014. Neuro-endocrine networks controlling immune system in health and disease. *Front. Immunol.* <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00143>
- Pullar, C.E., Le Provost, G.S., O’Leary, A.P., Evans, S.E., Baier, B.S., Isseroff, R.R., 2012.  $\beta$ 2AR antagonists and  $\beta$ 2AR gene deletion both promote skin wound repair processes. *J. Invest. Dermatol.* 132, 2076–84. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.108>
- Pullar, C.E., Rizzo, A., Isseroff, R.R., 2006.  $\beta$ -adrenergic receptor antagonists accelerate skin wound healing: Evidence for a catecholamine synthesis network in the epidermis. *J. Biol. Chem.* 281, 21225–21235. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601007200>
- Qing, C., 2017. The molecular biology in wound healing & non-healing wound. *Chinese J. Traumatol.* 20, 189–193. <https://doi.org/10.1016/J.CJTEE.2017.06.001>
- Quesada, A.R., Barbacid, M.M., Mira, E., Fernández-Resa, P., Márquez, G., Aracil, M., 1997. Evaluation of fluorometric and zymographic methods as activity assays for stromelysins and gelatinases. *Clin. Exp. Metastasis* 15, 26–32.
- Ramchand, C.N., Clark, A.E., Ramchand, R., Hemmings, G.P., 1995. Cultured human keratinocytes as a model for studying the dopamine metabolism in schizophrenia. *Med. Hypotheses* 44, 53–7. [https://doi.org/10.1016/0306-9877\(95\)90302-X](https://doi.org/10.1016/0306-9877(95)90302-X)
- Rangel-Barajas, C., Coronel, I., Florán, B., 2015. Dopamine Receptors and Neurodegeneration. *Aging Dis.* 6, 349–68. <https://doi.org/10.14336/AD.2015.0330>
- Rattan, S., Zhou, C., Chiang, C., Mahalingam, S., Brehm, E., Flaws, J.A., 2017. Exposure to endocrine disruptors during adulthood: consequences for female fertility. *J. Endocrinol.* 233, R109–R129. <https://doi.org/10.1530/JOE-17-0023>
- Reichmann, H., 2009. Transdermal delivery of dopamine receptor agonists. *Park. Relat Disord* 15 Suppl 4, S93-6. [https://doi.org/S1353-8020\(09\)70843-0](https://doi.org/S1353-8020(09)70843-0) [pii] \n10.1016/S1353-8020(09)70843-0 [doi]
- Reiss, M.J., Han, Y.-P., Garcia, E., Goldberg, M., Yu, H., Garner, W.L., 2010. Matrix metalloproteinase-9 delays wound healing in a murine wound model. *Surgery* 147, 295–302. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2009.10.016>
- Ricci, A., Collier†, W.L., Amenta, F., 1994. Pharmacological characterization and autoradiographic localization of dopamine receptors in the portal vein. *J. Auton. Pharmacol.* 14, 61–68. <https://doi.org/10.1111/j.1474-8673.1994.tb00590.x>
- Ritchie, T., Noble, E.P., 1996. [ $^3$ H]Naloxone binding in the human brain: Alcoholism and the TaqI A D2dopamine receptor polymorphism. *Brain Res.* 718, 193–197. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(96\)00068-6](https://doi.org/10.1016/0006-8993(96)00068-6)

- Robinson, L., Miller, R., 2015. The Impact of Bisphenol A and Phthalates on Allergy, Asthma, and Immune Function: a Review of Latest Findings. *Curr. Environ. Heal. reports*.  
<https://doi.org/10.1007/s40572-015-0066-8>
- Rodero, M.P., Khosrotehrani, K., 2010. Skin wound healing modulation by macrophages. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 3, 643–653. <https://doi.org/IJCEP1007002>
- Rogers, J.A., Metz, L., Yong, V.W., 2013. Review: Endocrine disrupting chemicals and immune responses: A focus on bisphenol-A and its potential mechanisms. *Mol. Immunol.* 53, 421–430.  
<https://doi.org/10.1016/J.MOLIMM.2012.09.013>
- Rohani, M.G., Parks, W.C., 2015. Matrix remodeling by MMPs during wound repair. *Matrix Biol.* 44–46, 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.03.002>
- Romana-Souza, B., Monte-Alto-Costa, A., 2009. Simultaneous blockade of alpha and beta adrenoceptors impairs cutaneous wound healing in rats. *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.* 24, 349–352. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2009.03376.x>
- Romana-Souza, B., Santos Lima-Cezar, G., Monte-Alto-Costa, A., 2015. Psychological stress-induced catecholamines accelerates cutaneous aging in mice. *Mech. Ageing Dev.* 152, 63–73.  
<https://doi.org/10.1016/j.mad.2015.10.004>
- Roosterman, D., Goerge, T., Schneider, S.W., Bunnett, N.W., Steinhoff, M., 2006. Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoendocrine organ. *Physiol. Rev.* 86, 1309–1379.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2005>
- Rubin, B.S., 2011. Bisphenol A: An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 127, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2011.05.002>
- Ruiz, D., Becerra, M., Jagai, J.S., Ard, K., Sargis, R.M., 2018. Disparities in environmental exposures to endocrine-disrupting chemicals and diabetes risk in vulnerable populations. *Diabetes Care* 41, 193–205. <https://doi.org/10.2337/dc16-2765>
- Sand, J., Haertel, E., Biedermann, T., Contassot, E., Reichmann, E., French, L.E., Werner, S., Beer, H.D., 2018. Expression of inflammasome proteins and inflammasome activation occurs in human, but not in murine keratinocytes article. *Cell Death Dis.* 9, 24.  
<https://doi.org/10.1038/s41419-017-0009-4>
- Sarkar, C., Basu, B., Chakroborty, D., Dasgupta, P.S., Basu, S., 2010. The immunoregulatory role of dopamine: An update. *Brain. Behav. Immun.* 24, 525–528.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2009.10.015>
- Scharrer, B; Scharrer, E., 1963. *Neuroendocrinology*. New York Columbia Univ. Press.
- Shome, S., Dasgupta, P.S., Basu, S., 2012. Dopamine regulates mobilization of mesenchymal stem cells during wound angiogenesis. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031682>
- Sifakis, S., Androutsopoulos, V.P., Tsatsakis, A.M., Spandidos, D.A., 2017. Human exposure to endocrine disrupting chemicals: effects on the male and female reproductive systems. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.02.024>
- Sivamani, R.K., Lam, S.T., Isseroff, R.R., 2007. Beta Adrenergic Receptors in Keratinocytes.

- Dermatol. Clin. 25, 643–653. <https://doi.org/10.1016/j.det.2007.06.012>
- Sivamani, R.K., Pullar, C.E., Manabat-Hidalgo, C.G., Rocke, D.M., Carlsen, R.C., Greenhalgh, D.G., Isseroff, R.R., 2009. Stress-mediated increases in systemic and local epinephrine impair skin wound healing: Potential new indication for beta blockers. *PLoS Med.* 6, 0105–0115. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000012>
- Slominski, A.T., Zmijewski, M.A., Skobowiat, C., Zbytek, B., Slominski, R.M., Steketee, J.D., 2012. Sensing the environment: regulation of local and global homeostasis by the skin's neuroendocrine system. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 212, v, vii, 1-115.
- Sohmiya, M., Tanaka, M., Okamoto, K., Fujisawa, A., Yamamoto, Y., 2004. Synergistic inhibition of lipid peroxidation by vitamin E and a dopamine agonist, cabergoline. *Neurol. Res.* 26, 418–421.
- Son, S., Nam, K.S., Kim, H., Gye, M.C., Shin, I., 2018. Cytotoxicity measurement of Bisphenol A (BPA) and its substitutes using human keratinocytes. *Environ. Res.* 164, 655–659. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.03.043>
- Steenhuis, P., Huntley, R.E., Gurenko, Z., Yin, L., Dale, B. a, Fazel, N., Isseroff, R.R., 2011. Adrenergic signaling in human oral keratinocytes and wound repair. *J. Dent. Res.* 90, 186–92. <https://doi.org/10.1177/0022034510388034>
- Steinkraus, V., Körner, C., Steinfath, M., Mensing, H., 1991. High density of beta 2-adrenoceptors in a human keratinocyte cell line with complete epidermal differentiation capacity (HaCaT). *Arch. Dermatol. Res.* 283, 328–32.
- Strbo, N., Yin, N., Stojadinovic, O., 2014. Innate and Adaptive Immune Responses in Wound Epithelialization. *Adv. wound care* 3, 492–501. <https://doi.org/10.1089/wound.2012.0435>
- Strell, C., Sievers, A., Bastian, P., Lang, K., Niggemann, B., Zänker, K.S., Entschladen, F., 2009. Divergent effects of norepinephrine, dopamine and substance P on the activation, differentiation and effector functions of human cytotoxic T lymphocytes. *BMC Immunol.* 10, 62. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-10-62>
- Suzuki, T., Mizuo, K., Nakazawa, H., Funae, Y., Fushiki, S., Fukushima, S., Shirai, T., Narita, M., 2003. Prenatal and neonatal exposure to bisphenol-A enhances the central dopamine D1 receptor-mediated action in mice: Enhancement of the methamphetamine-induced abuse state. *Neuroscience* 117, 639–644. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00935-1](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00935-1)
- Takada, K., Komine-Aizawa, S., Hirohata, N., Trinh, Q.D., Nishina, A., Kimura, H., Hayakawa, S., 2017. Poly I:C induces collective migration of HaCaT keratinocytes via IL-8. *BMC Immunol.* 18, 19. <https://doi.org/10.1186/s12865-017-0202-3>
- Tan, H.-Y., Wang, N., Li, S., Hong, M., Wang, X., Feng, Y., 2016. The Reactive Oxygen Species in Macrophage Polarization: Reflecting Its Dual Role in Progression and Treatment of Human Diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2016/2795090>
- Tank, A.W., Wong, D.L., 2014. Peripheral and central effects of circulating catecholamines. *Compr. Physiol.* 5, 1–15. <https://doi.org/10.1002/cphy.c140007>
- Tebbe, B., Wu, S., Geilen, C.C., Eberle, J., Kodelja, V., Orfanos, C.E., 1997. L-ascorbic acid inhibits

- UVA-induced lipid peroxidation and secretion of IL-1alpha and IL-6 in cultured human keratinocytes in vitro. *J. Invest. Dermatol.* 108, 302–6. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12286468>
- Tian, M., Qing, C., Niu, Y., Dong, J., Cao, X., Song, F., Ji, X., Lu, S., 2016. The Relationship Between Inflammation and Impaired Wound Healing in a Diabetic Rat Burn Model. *J. Burn Care Res.* 37, e115–e124. <https://doi.org/10.1097/BCR.000000000000171>
- Tohmé, M., Prud'Homme, S.M., Boulahtouf, A., Samarut, E., Brunet, F., Bernard, L., Bourguet, W., Gibert, Y., Balaguer, P., Laudet, V., 2014. Estrogen-related receptor  $\gamma$  is an in vivo receptor of bisphenol A. *FASEB J.* 28, 3124–3133. <https://doi.org/10.1096/fj.13-240465>
- Tsang, A.H., Chung, K.K., 2009. Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 1792, 643–650. [https://doi.org/S0925-4439\(08\)00269-X](https://doi.org/S0925-4439(08)00269-X) [pii]r10.1016/j.bbadis.2008.12.006
- Urmacher, C., 1990. Histology of normal skin. *Am. J. Surg. Pathol.* 14, 671–686. <https://doi.org/10.1097/00000478-199007000-00008>
- Vallone, D., Picetti, R., Borrelli, E., 2000. Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24, 125–132. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(99\)00063-9](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(99)00063-9)
- Vandenberg, L.N., Maffini, M. V., Sonnenschein, C., Rubin, B.S., Soto, A.M., 2009. Bisphenol-A and the Great Divide: A Review of Controversies in the Field of Endocrine Disruption. *Endocr. Rev.* 30, 75–95. <https://doi.org/10.1210/er.2008-0021>
- Wang, X., Villar, V.A., Tiu, A., Upadhyay, K.K., Cuevas, S., 2018a. Dopamine D2 receptor up-regulates leptin and IL-6 in adipocytes. *J. Lipid Res.* 59, jlr.M081000. <https://doi.org/10.1194/jlr.M081000>
- Wang, X., Villar, V.A., Tiu, A., Upadhyay, K.K., Cuevas, S., 2018b. Dopamine D2 receptor up-regulates leptin and IL-6 in adipocytes. *J. Lipid Res.* jlr.M081000. <https://doi.org/10.1194/jlr.M081000>
- Wang, Y., Zhang, H., Cui, J., Zhang, J., Yin, F., Guo, H., Lai, J., Xing, B., 2018. Opiate-associated contextual memory formation and retrieval are differentially modulated by dopamine D1 and D2 signaling in hippocampal–prefrontal connectivity. *Neuropsychopharmacology* 1. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0068-y>
- Wetherill, Y.B., Akingbemi, B.T., Kanno, J., McLachlan, J.A., Nadal, A., Sonnenschein, C., Watson, C.S., Zoeller, R.T., Belcher, S.M., 2007. In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reprod. Toxicol.* <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.05.010>
- Witte, M.B., Barbul, A., 2002. Role of nitric oxide in wound repair. *Am. J. Surg.* 183, 406–412. [https://doi.org/10.1016/S0002-9610\(02\)00815-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9610(02)00815-2)
- Yamamoto, S., Ohta, N., Matsumoto, A., Horiguchi, Y., Koide, M., Fujino, Y., 2016. Haloperidol Suppresses NF-kappaB to Inhibit Lipopolysaccharide-Induced Pro-Inflammatory Response in RAW 264 Cells. *Med. Sci. Monit.* 22, 367–372. <https://doi.org/10.12659/MSM.895739>
- Yan, Y., Jiang, W., Liu, L., Wang, X., Ding, C., Tian, Z., Zhou, R., 2015. Dopamine controls systemic

- inflammation through inhibition of NLRP3 inflammasome. *Cell* 160, 62–73.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.047>
- Yanez, D.A., Lacher, R.K., Vidyarthi, A., Colegio, O.R., 2017. The role of macrophages in skin homeostasis. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* <https://doi.org/10.1007/s00424-017-1953-7>
- Yang, E. V., Kim, S. jae, Donovan, E.L., Chen, M., Gross, A.C., Webster Marketon, J.I., Barsky, S.H., Glaser, R., 2009. Norepinephrine upregulates VEGF, IL-8, and IL-6 expression in human melanoma tumor cell lines: Implications for stress-related enhancement of tumor progression. *Brain. Behav. Immun.* 23, 267–275. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2008.10.005>
- Yoshida, T., Tanaka, M., Suzuki, Y., Sohmiya, M., Okamoto, K., 2002. Antioxidant properties of cabergoline: Inhibition of brain auto-oxidation and superoxide anion production of microglial cells in rats. *Neurosci. Lett.* 330, 1–4. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(02\)00594-3](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)00594-3)
- Yoshizumi, M., Nakamura, T., Kato, M., Ishioka, T., Kozawa, K., Wakamatsu, K., Kimura, H., 2008. Release of cytokines/chemokines and cell death in UVB-irradiated human keratinocytes, HaCaT. *Cell Biol. Int.* 32, 1405–1411. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2008.08.011>
- Zalko, D., Jacques, C., Duplan, H., Bruel, S., Perdu, E., 2011. Viable skin efficiently absorbs and metabolizes bisphenol A. *Chemosphere* 82, 424–430.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.09.058>
- Zhang, X.L., Liu, N., Weng, S.F., Wang, H.S., 2016. Bisphenol A Increases the Migration and Invasion of Triple-Negative Breast Cancer Cells via Oestrogen-related Receptor Gamma. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 119, 389–395. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12591>
- Zheng, Z., Liu, Y., Yang, Y., Tang, J., Cheng, B., 2017. Topical 1% propranolol cream promotes cutaneous wound healing in spontaneously diabetic mice. *Wound Repair Regen.* 1–9.  
<https://doi.org/10.1111/wrr.12546>
- Zhu, J., Jiang, L., Liu, Y., Qian, W., Liu, J., Zhou, J., Gao, R., Xiao, H., Wang, J., 2015. MAPK and NF- $\kappa$ B Pathways Are Involved in Bisphenol A-Induced TNF- $\alpha$  and IL-6 Production in BV2 Microglial Cells. *Inflammation* 38, 637–648. <https://doi.org/10.1007/s10753-014-9971-5>
- Zmijewski, M.A., Slominski, A.T., 2011. Neuroendocrinology of the skin: An overview and selective analysis. *Dermatoendocrinol.* 3, 3–10. <https://doi.org/10.4161/derm.3.1.14617>
- Zoeller, R.T., Brown, T.R., Doan, L.L., Gore, A.C., Skakkebaek, N.E., Soto, A.M., Woodruff, T.J., Vom Saal, F.S., 2012. Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from The Endocrine Society. *Endocrinology* 153, 4097–110.  
<https://doi.org/10.1210/en.2012-1422>