



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**ANÁLISIS DEL PAPEL DEL RECEPTOR DE ARIL HIDROCARBUROS EN LA
POLARIZACIÓN DE LOS MACRÓFAGOS HUMANOS**

TESIS QUE PRESENTA

M. en C. JOSÉ LUIS FLORES SEVILLA

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

BIOMEDICINA MOLECULAR

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MARÍA CARMEN SÁNCHEZ TORRES

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de la Dra. María Carmen Sánchez Torres, en el Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. La optimización de algunas técnicas se realizó en el Laboratorio de Células Mieloides del Dr. Ángel Luis Corbí López, en el Departamento de Microbiología Molecular y Biología de la Infección, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC (Madrid, España).

COMITÉ TUTORIAL

Directora de tesis:

Dra. María Carmen Sánchez Torres

Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV

Asesores:

Dra. Rosaura Hernández Rivas

Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV

Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete

Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV

Dr. Arnulfo Albores Sepúlveda

Departamento de Toxicología, CINVESTAV

Dr. Enrique Ortega Soto

Departamento de Investigación en Ciencias Biomédicas, UNAM

El M. en C. José Luis Flores Sevilla realizó esta tesis de doctorado con una beca otorgada por CONACYT (No. 322167).

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE

ABREVIATURAS	5
RESUMEN EN ESPAÑOL	8
RESUMEN EN INGLÉS	9
INTRODUCCIÓN	10
SISTEMA MONONUCLEAR FAGOCÍTICO: ONTOGENIA Y MADURACIÓN DE LOS MACRÓFAGOS .	10
PLASTICIDAD DE LOS MACRÓFAGOS Y CARACTERÍSTICAS DE LOS DIVERSOS ESTADOS DE ACTIVACION.....	11
DIFERENCIACIÓN DE LOS MONOCITOS HUMANOS CON GM-CSF Y M-CSF	13
EL RECEPTOR DE ARIL HIDROCARBUROS	18
ACTIVACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL AHR MEDIADA POR UNIÓN A LIGANDO	20
EL AHR ES ACTIVADO POR LIGANDOS ENDÓGENOS.....	23
EL AHR ES ACTIVADO DIRECTAMENTE POR INTERMEDIARIOS METABÓLICOS DEL TRIPTÓFANO	24
EL AHR EN EL SISTEMA INMUNITARIO	25
EL AHR REGULA LA EXPRESIÓN DE IL-6 EN DIFERENTES TIPOS CELULARES.....	29
JUSTIFICACIÓN	34
HIPÓTESIS	34
OBJETIVO GENERAL	34
OBJETIVOS PARTICULARES	35
METODOLOGÍA	36
MEDIOS Y REACTIVOS DE CULTIVO	36
AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE MONOCITOS.....	36
GENERACIÓN DE MACRÓFAGOS DE TIPO M1 Y M2	36
ENSAYOS DE WESTERN BLOT.....	37
ENSAYOS DE CITOMETRÍA DE FLUJO.....	38
DETECCIÓN DE CITOCINAS EN LOS SOBRENADANTES DE CULTIVO DE LOS MACRÓFAGOS	38
ENSAYOS DE FAGOCITOSIS	39
ENSAYOS DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO TUMORAL	39
ANÁLISIS COMPUTACIONAL DE LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN DE <i>IL6</i> Y AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DEL PROMOTOR.....	39
CLONACIÓN DE FRAGMENTOS DEL PROMOTOR DE <i>IL6</i>	41
ENSAYOS DE RETARDAMIENTO ELECTROFORÉTICO (EMSA).....	42
ELIMINACIÓN TRANSITORIA DE LA EXPRESIÓN DEL AHR.....	43
EXTRACCIÓN DE RNA A PARTIR DE MACRÓFAGOS M1 Y M2.....	43
REACCIÓN DE RETROTRANSCRIPCIÓN	44
ENSAYOS DE PCR EN TIEMPO REAL.....	44
ENSAYOS DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA CROMATINA	45
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	46
RESULTADOS	47
LOS MACRÓFAGOS PRO- Y ANTI-INFLAMATORIOS EXPRESAN EL AHR	47

INFLUENCIA DE LA INHIBICIÓN DEL AHR SOBRE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES ASOCIADOS A LOS FENOTIPOS POLARIZADOS.....	48
EFFECTO DE LA INHIBICIÓN DEL AHR SOBRE LA CAPACIDAD FAGOCÍTICA DE LOS MACRÓFAGOS	51
INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO TUMORAL	52
LA PRESENCIA DE ANF MODIFICA DE FORMA DIFERENCIAL LA SECRECIÓN DE IL-6 EN LOS MACRÓFAGOS POLARIZADOS	54
LA SUPRESIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL AHR DISMINUYE LA SECRECIÓN DE IL-6 EN LOS GM-M ϕ S ESTIMULADOS CON LPS.....	56
EL AHR SE UNE AL PROMOTOR DEL GEN DE <i>IL6</i> EN LOS MACRÓFAGOS POLARIZADOS	59
DISCUSIÓN.....	65
CONCLUSIONES.....	75
PERSPECTIVAS.....	76
BILIOGRAFÍA	77

ABREVIATURAS

Ab – Anticuerpo

AhR – Receptor de aril hidrocarburos

AHRE – Elemento de respuesta a AhR

AhRR – Represor del receptor de aril hidrocarburos

ANF – α -naftoflavona

ARNT – Translocador nuclear del receptor de aril hidrocarburos

B(a)P – Benzo[a]pireno

BSA – Albúmina sérica bovina

CD – Cluster de diferenciación

ChIP – Inmunoprecipitación de la cromatina

DC – Célula dendrítica

DRE – Elemento de respuesta a dioxina

FICZ – 6-formil-indolo[3,2-b]carbazol

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

GAPDH – Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

GM-CSF – Factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos

GM-M ϕ – Macrófagos generados con GM-CSF

HAH – Hidrocarburo aromático halogenado

HDAC – Desacetilasa de histonas

IDO – Indoleamina 2,3-dioxigenasa

IFN – Interferón

IL – Interleucina

KA – Ácido quinurénico

LPS – Lipopolisacárido bacteriano

mAb – Anticuerpo monoclonal

M-CSF – Factor estimulante de colonias de macrófagos

M-M ϕ – Macrófagos generados con M-CSF

MACS – Separación celular por inmunomagnetismo

MAPK – Proteína cinasa activada por mitógenos

M ϕ – Macrófago

MO – Médula ósea

MPS – Sistema mononuclear fagocítico

mRNA – Ácido ribonucleico mensajero

MTT – Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio

NADPH – Fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido reducido

NF- κ B – Factor nuclear κ B

NQO1 – NADPH quinona oxidoreductasa 1

PAH – Hidrocarburo aromático policíclico

PBMC – Células mononucleares de sangre periférica

PE – Ficoeritrina

RNA – Ácido ribonucleico

RNS – Intermediario reactivo de nitrógeno

ROS – Intermediario reactivo de oxígeno

RT-PCR – Transcripción reversa-Reacción en cadena de la polimerasa

SDS-PAGE – Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio

siRNA – RNA pequeño de interferencia

SN – Sobrenadante

STAT – Transductor de señal y activador de transcripción

TBS-T – Amortiguador salino Tris con polisorbato 20 (tween 20)

TCDD – Dioxina (2,3,7-tetraclorodibenzo-p-dioxina)

TGF – Factor de crecimiento transformante

Th – Linfocito T cooperador

TNF – Factor de necrosis tumoral

Tr1 – Linfocitos T reguladores de tipo 1

Treg – Linfocitos T reguladores

TSS – Sitio de inicio de la transcripción

WB – Western Blot

RESUMEN EN ESPAÑOL

El receptor de aril hidrocarburos (AhR) es un factor de transcripción activado por la unión con ligandos implicado en diversos procesos fisiológicos. El AhR se expresa en una gran variedad de linajes celulares, incluyendo linfocitos, células dendríticas y macrófagos (M ϕ). El AhR ha sido involucrado directamente en la síntesis de algunas citocinas pro- y anti-inflamatorias, aunque su acción es dependiente del tipo celular evaluado. En el presente trabajo demostramos que el AhR se expresa en M ϕ s pro- y anti-inflamatorios generados mediante el cultivo de monocitos CD14⁺ en presencia de GM-CSF (GM-M ϕ s) y M-CSF (M-M ϕ s), respectivamente. El AhR se encontró activo de forma constitutiva en ambos tipos de M ϕ s, debido a que presenta una localización preferente en el núcleo celular. La actividad del AhR en la funcionalidad de los M ϕ s fue analizada mediante la adición del antagonista químico α -naftoflavona (ANF) durante el proceso de diferenciación de los M ϕ s, así como a través de la generación de M ϕ s deficientes de AhR, mediante el empleo de RNA pequeño de interferencia. De forma general, el cultivo continuo de los M ϕ s en presencia de ANF no afectó de manera significativa la expresión de marcadores de superficie asociados a los GM-M ϕ s y M-M ϕ s o la capacidad fagocítica y citotóxica de cada una de las subpoblaciones celulares. Sin embargo, el AhR actuó de forma positiva en la secreción de IL-6 inducida por LPS sólo en los GM-M ϕ s, donde parece estar unido de forma constitutiva al promotor de *IL6* en condiciones basales. En este contexto, los GM-M ϕ s deficientes de la expresión o actividad del AhR incrementaron la transcripción de *IL6*. Tras la estimulación con LPS, el AhR no se encontró unido al promotor de *IL6*, al menos en las regiones de DNA evaluadas, y la transcripción de este gen presentó los mismos niveles en los GM-M ϕ s deficientes de AhR y en los GM-M ϕ s control. Este receptor no parece modular de forma importante la secreción de IL-6 en los M-M ϕ s en respuesta a LPS, si bien se detectó su unión a distintos fragmentos del promotor de *IL6* en estas condiciones y su ausencia tendió a incrementar el nivel de transcritos de *IL6* en estas células. En conjunto, estos datos sugieren que el AhR actúa como un represor transcripcional de *IL6* tanto en los GM- como en lo M-M ϕ s, pero el contexto celular de cada subtipo de M ϕ modifica las condiciones en las cuales realiza esta actividad, lo cual conduce a una secreción incrementada de esta citocina en los GM-M ϕ s dependiente del AhR.

RESUMEN EN INGLÉS

The aryl hydrocarbon receptor (AhR) is a ligand-activated transcription factor implicated in diverse physiological processes. It is expressed by several cell lineages, including lymphocytes, dendritic cells and macrophages (M ϕ). AhR has been directly involved in the synthesis of a number of pro- and anti-inflammatory cytokines, although its role is dependent on the cell type evaluated. Here, we show that AhR is expressed in pro- and anti-inflammatory M ϕ s generated by culture of human CD14⁺ monocytes with GM-CSF (GM-M ϕ s) and M-CSF (M-M ϕ s), respectively. AhR was constitutively active in both GM-M ϕ s and M-M ϕ s since it was located mainly in the cell nucleus. The activity of AhR on M ϕ function was evaluated by adding the AhR antagonist α -naphthoflavone (ANF) and by knocking down the *AHR* gene during the M ϕ differentiation process. Overall, the continuous culture of M ϕ s with ANF did not significantly affect the expression of GM- and M-CSF-associated markers or the phagocytic and cytotoxic ability of GM- and M-M ϕ s. However, AhR was positively involved in the production of LPS-induced IL-6 by GM-M ϕ s, where it seems constitutively recruited at the *IL6* promoter in the steady-state. In this context, AhR-deficient GM-M ϕ s increased *IL6* transcription compared with AhR-sufficient cells. Upon LPS stimulation, AhR occupancy at the *IL6* promoter decreased, at least at the DNA sequences evaluated, and the transcription of this gene was analogous in AhR-deficient and AhR-sufficient GM-M ϕ s. The regulation of LPS-induced IL-6 secretion by AhR did not appear to be relevant in M-M ϕ s, although it was recruited to the *IL6* promoter upon LPS stimulation, and AhR-deficient M-M ϕ s tended to increase their levels of *IL6* mRNA. Taken together, these data suggest that AhR acts as a transcriptional repressor at the *IL6* promoter in both GM- and M-M ϕ s, but the cellular context of each M ϕ subtype modifies the conditions in which AhR performs that activity, leading to an AhR-dependent increase of IL-6 secretion in GM-M ϕ s.

INTRODUCCIÓN

Sistema mononuclear fagocítico: Ontogenia y maduración de los macrófagos

Los macrófagos ($M\phi$) son células de estirpe mieloide que forman parte del sistema inmune innato y que se encuentran a lo largo de la escala filogenética de organismos metazoarios. En mamíferos se encuentran presentes en todos los tejidos, donde se organizan en localizaciones perfectamente delimitadas y despliegan diversas funciones con la finalidad de mantener la homeostasis tisular.¹

Los $M\phi$ s, además de los monocitos y las células dendríticas (DC), se clasifican dentro del Sistema Mononuclear Fagocítico (MPS, *Mononuclear Phagocyte System*), clasificación basada en similitudes morfológicas, funcionales y un origen común de dichas células.² La categorización de los $M\phi$ s dentro del MPS plantea que la ontogenia y diferenciación siguen una línea estrictamente temporal, donde los monocitos de sangre periférica, que han sido diferenciados a partir de progenitores mieloides de médula ósea (MO), migran a través de los vasos sanguíneos hasta los tejidos, donde finalmente maduran y se convierten en $M\phi$ s tisulares residentes.¹⁻⁴ Sin embargo, dichos postulados han sido puestos en duda y actualmente diversos grupos de investigación han demostrado que la mayoría de los progenitores murinos que dan origen a los $M\phi$ s tisulares son diferentes de los precursores de la MO. Por ejemplo, los $M\phi$ s del sistema nervioso (microglia), piel (células de Langerhans), hígado (células de Kupffer), así como los $M\phi$ s alveolares y la mayoría de los $M\phi$ s del bazo, provienen de progenitores del saco vitelino.⁵⁻⁷ Por lo tanto, se ha propuesto que el papel principal de los monocitos de sangre periférica es vigilar la homeostasis capilar y además, en condiciones inflamatorias, migrar a los tejidos para contribuir al desarrollo de una respuesta inmune eficiente.

Los $M\phi$ s son reconocidos como las células del sistema inmune con mayor plasticidad. En condiciones basales presentan una gran diversidad morfológica, fenotípica y funcional, que implica efectos en la evolución, remodelación y reparación de los tejidos.¹ Además, son células con una función crítica en el desarrollo de la respuesta inmunitaria. Actúan como una primera barrera de defensa, al detectar y eliminar diversos microorganismos, macromoléculas tóxicas, así como células propias

dañadas o muertas. Proveen protección al poner en marcha mecanismos inmunes innatos mediante fagocitosis, secreción de enzimas, citocinas, y diversos factores inflamatorios y citotóxicos como los prostanoideos, las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las de nitrógeno (RNS).⁸⁻⁹ Las características que desarrollan dependen totalmente del microambiente que les rodea.

Plasticidad de los macrófagos y características de los diversos estados de activación

La vasta heterogeneidad funcional de los Mφs está condicionada por el microambiente extracelular, de tal forma que las subpoblaciones de Mφs tisulares deben adaptarse a los estímulos que reciben de las células que los rodean y, en consecuencia, modificar su programa de expresión génica de acuerdo a las necesidades específicas de cada tejido.¹⁰⁻¹²

La plasticidad de los Mφs ha quedado de manifiesto en el desarrollo de la respuesta inmune inflamatoria, lo que ha permitido la identificación de diferentes estados funcionales que comprenden un amplio y continuo espectro de activación.

Con la finalidad de simplificar esta variedad de fenotipos macrofágicos, se ha establecido una dicotomía reconocida genéricamente como activación clásica y alternativa, caracterizadas por promover respuestas pro- y anti-inflamatorias, respectivamente. Los Mφs con propiedades pro-inflamatorias se denominan Mφs M1, mientras que aquellos que promueven respuestas anti-inflamatorias son conocidos como Mφs M2.¹³

Actualmente existe evidencia que demuestra que estos estados de polarización se presentan de forma rápida, plástica y reversible, lo que sugiere que la población macrofágica es capaz de resolver procesos de inflamación (Mφs M2) que previamente han desencadenado (Mφs M1).¹³⁻¹⁵

La polarización hacia el fenotipo M1 es inducida por exposición a interferón (IFN)- γ , y ligandos de receptores tipo Toll (TLR), como el lipopolisacárido (LPS). Estos Mφs tienen la capacidad de detonar mecanismos efectores: muerte de microorganismos

intracelulares, lisis de células tumorales, secreción de citocinas inflamatorias [interleucina (IL)-1 β , IL-6 y TNF (factor de necrosis tumoral)] y polarizantes como IL-12 e IL-23, las cuales promueven la polarización de los linfocitos T cooperadores (Th) hacia los fenotipos Th1 y Th17, respectivamente, así como secreción de quimiocinas inflamatorias como CCL3, CXCL9, CXCL10, y la producción de ROS y RNS.

Por otro lado, los M ϕ s M2 o alternativamente activados son una población con una gran heterogenidad, debido a que son inducidos por diferentes mediadores, como citocinas del tipo Th2 (IL-4 e IL-13), factores inmunosupresores [IL-10, factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de crecimiento transformante (TGF)- β , glucocorticoides] o combinaciones de inmunocomplejos y ligandos de TLRs. Los distintos tipos de M ϕ s que se generan tienen en común su elevada secreción de IL-10. Sin embargo, dependiendo de los factores que los activen, adquieren propiedades diversas: inducen respuestas Th2 y antagonizan la generación de respuestas Th1 y Th17, inducen la diferenciación de linfocitos T reguladores (Tr1 y Treg), regulan la inflamación, la remoción de *debris* celular y la regeneración de los tejidos.¹³ Con el afán de generar una nomenclatura que defina los grupos de M ϕ s M2 se han establecido nombres específicos que se refieren a la vía de inducción, de tal forma que los M ϕ s activados por IL-4 e IL-13 se denominan M ϕ s M2a, M ϕ M2b son aquellos que han sido activados mediante inmunocomplejos y agonistas de TLRs, mientras aquellos que han sido activados por acción de factores inmunosupresores se definen como M ϕ s M2c.¹⁴⁻¹⁶

Diversos estudios han demostrado que los M ϕ s generados *in vitro* a partir de monocitos purificados de sangre periférica en presencia del factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF) o de M-CSF adquieren características diferenciales que se asemejan parcialmente a las de los M ϕ s M1 y M ϕ s M2a, respectivamente.¹⁷

Diferenciación de los monocitos humanos con GM-CSF y M-CSF

En conjunto con la IL-3, el GM-CSF y el M-CSF son las principales citocinas que determinan el linaje macrofágico, regulando su supervivencia, diferenciación y quimiotaxis.

El M-CSF es sintetizado por numerosos tipos celulares (células endoteliales, fibroblastos, células estromales de medula ósea, mioblastos, células tímicas epiteliales, queratinocitos, astrocitos, osteoblastos). Se encuentra en el suero en concentraciones de 3-8 ng/ml, y su producción puede ser inducida con GM-CSF, TNF, IL-1 e IFN- γ . La producción del M-CSF se regula de una manera específica de tejido. Por ejemplo, sus niveles se incrementan dramáticamente en el sistema reproductor femenino durante el embarazo en respuesta a esteroides, pero la concentración en sangre permanece relativamente estable durante el mismo periodo. En general, el M-CSF se produce en cantidades elevadas en estados de inmunosupresión, como el embarazo o neoplasias, y juega un papel importante en la tolerancia materna hacia el feto.¹⁷

El GM-CSF es producido también por una gran variedad de tipos celulares, dentro de los que se incluyen linfocitos T y B, M ϕ s, células polimorfonucleares, células estromales, queratinocitos, astrocitos, osteoblastos, células endoteliales y fibroblastos. Su producción requiere normalmente de activación/estimulación de estas células, pero puede ser detectado en suero bajo condiciones homeostáticas (20-100 pg/ml). Aunque su producción es local, tiene efectos importantes sobre la actividad de diversos leucocitos circulantes, y puede actuar de manera parácrina reclutando neutrófilos, monocitos y linfocitos, incrementando sus funciones en la defensa del hospedero. Por lo tanto, además de ser un factor hematopoyético, presenta características de regulador inmunológico. El GM-CSF y el M-CSF modulan de forma cruzada sus respectivas actividades funcionales: M-CSF y bajos niveles de GM-CSF promueven la generación de M ϕ s, mientras que concentraciones más elevadas de GM-CSF inducen una inhibición del crecimiento de los M ϕ s mediado por M-CSF, un efecto que puede ser explicado por la acción inhibitoria de GM-CSF sobre la expresión del receptor de M-CSF (CD115, c-fms).¹⁸⁻²⁰

El papel crítico del M-CSF en el desarrollo mieloide se comprueba en los ratones deficientes de esta citocina, los cuales carecen prácticamente de monocitos, ciertos Mφs tisulares y de osteoclastos, mientras que los ratones deficientes de GM-CSF no exhiben grandes defectos en el linaje macrófago.¹⁸ El sistema hematopoyético de éstos es normal, y los cambios más significativos residen en el desarrollo de una proteinosis alveolar debida a que los Mφs alveolares tienen propiedades surfactantes deficientes. A partir de algunos estudios en ratones se ha postulado que el GM-CSF regula el fenotipo y función de estos Mφs. En contraste, el M-CSF regula el desarrollo de otro tipo de Mφs, como los residentes en el peritoneo, Mφs metalófilos de la zona marginal del bazo, y Mφs subcapsulares de los senos en los nódulos linfáticos. Por lo tanto, los monocitos reclutados a sitios donde predomine alguno de estos CSFs podrían diferenciarse hacia distintos fenotipos de Mφs, y a pesar de que el GM-CSF y el M-CSF han sido utilizados *in vitro* de manera intercambiable para diferenciar monocitos humanos, parece que ambos factores ejercen distintos efectos sobre los monocitos y generan diferentes tipos de Mφs. De acuerdo con esta afirmación, existen trabajos que indican la generación de dos tipos diferentes de Mφs en respuesta al M-CSF (M-Mφs) o al GM-CSF (GM-Mφs), y que el fenotipo de los GM-Mφs se asemeja al de los Mφs “clásicamente activados” o M1, mientras que los M-Mφs comparten muchas características de los Mφs “alternativamente activados” o M2 (Tabla 1).¹⁸⁻²⁰

Tabla 1. Características generales de los macrófagos humanos generados a partir de monocitos sanguíneos CD14⁺ con GM-CSF (GM-Mφs) o M-CSF (M-Mφs).

	GM-Mφs	M-Mφs
Propiedades inflamatorias	Pro-inflamatorios	Anti-inflamatorios,
Propiedades funcionales	Alta capacidad citotóxica	Alta capacidad fagocítica
Morfología	Redonda	Elongada, en forma de huso
Citocinas características	IL-1β, IL-6, TNF, IL-8, IL-12, IL-23	IL-10
Marcadores característicos	CD1a, CD71, CD86, HLA-II, CCR7, IL-18R, PU.1	CD14, CD16, CD163, CD209, c-maf, MAFB

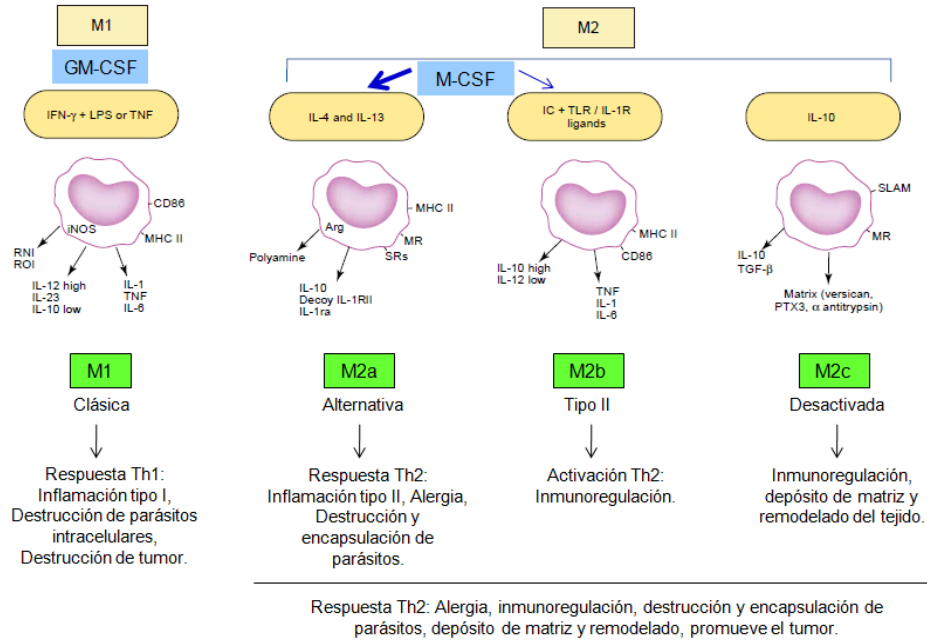


Figura 1. Inductores y propiedades funcionales de diferentes poblaciones polarizadas de los Mφs. Modificada de Mantovani *et al.*¹³

Los Mφs humanos derivados *in vitro* a partir de monocitos diferenciados en presencia de GM-CSF o M-CSF dan lugar a poblaciones funcionalmente diferentes. Así, en presencia de GM-CSF se generan Mφs que producen citocinas pro-inflamatorias y polarizantes (IL-23, IL-12, IL-1β, IL-6, TNF), ROS y RNS, y promueven inmunidad de tipo Th1. Por el contrario, los M-Mφs presentan un perfil anti-inflamatorio, secretan IL-10 en respuesta a ligandos de TLRs, inhiben las respuestas Th1, y se han implicado en la inducción de tolerancia (Fig. 1). Los M-Mφs actúan como moduladores de la autoinmunidad, ya que inducen células T reguladoras (Treg, Tr1) e inhiben la diferenciación de linfocitos Th1 y Th17. Por todo ello, los GM-Mφs y M-Mφs jugarían papeles opuestos durante la respuesta inmunitaria.^{21,22}

Además de presentar estas divergencias en la expresión de citocinas y moléculas citotóxicas, los GM-Mφs y M-Mφs poseen diferencias fenotípicas plenamente identificadas y reportadas por diversos autores. Los M-Mφs desarrollan una morfología elongada y se caracterizan por expresar altos niveles de CD14, CD36,

CD163, CD209, así como los factores de transcripción c-maf y MAFB (familia bZip) y la enzima hemo-oxigenasa 1 (HO-1), mientras que los GM-Mφs expresan en mayor proporción moléculas como CD1a, HLA de clase II, CD71, CD86, CCR7, y el factor transcripción PU.1 (familia Ets); en cuanto a su morfología, son más redondeados y semejan un “huevo estrellado”. Por otro lado se ha descrito que ambas subpoblaciones expresan niveles similares de CD33, CD40, CD54, CD64 y CD80.^{1,8,23,24}

La clasificación de los Mφs dentro del modelo M1 y M2 resulta una herramienta sumamente útil para establecer un marco de referencia e intentar comprender las posibles funciones de los Mφs humanos y su papel en el desarrollo de patologías. La imposibilidad de establecer marcadores fenotípicos absolutos para cada subpoblación dificulta el desarrollo del conocimiento de los mecanismos que rigen la polarización y versatilidad de los Mφs. Recientemente, en un trabajo publicado por el grupo de la Dra. Sánchez Torres, se han descrito con éxito dos marcadores fenotípicos que permiten discriminar entre una subpoblación de Mφs residentes con características M2, presentes mayoritariamente en biopsias de tejidos humanos sanos (el receptor *scavenger* CD163L1) y Mφs con características M1 presentes en biopsias de tejidos inflamados, como el intestino en la enfermedad de Crohn (la lectina CLEC5A).^{25,26} *In vitro*, CLEC5A se expresa preferentemente en los GM-Mφs, mientras que CD163L1 lo hace únicamente en los los M-Mφs.²⁵

Estos descubrimientos son importantes en el camino para comprender los procesos moleculares que conllevan a la polarización de los Mφs, los cuales no están totalmente dilucidados, y resulta imperioso continuar la búsqueda de nuevos marcadores de superficie o factores de transcripción involucrados en procesos de diferenciación y funcionalidad de los Mφs en sus diferentes estados de polarización.

En nuestro laboratorio se ha identificado la expresión diferencial de genes en los GM-Mφs y M-Mφs diferenciados *in vitro* mediante ensayos de microarreglos, como el factor de transcripción *AHR* (receptor de aril hidrocarburos) y algunos de sus genes blanco, *AHRR* (proteína represora de AhR), *IL8*, *PTGS2*, *HES1*, *CXCL12*, *HMOX1* y *BLVRB*, los cuales se observaron expresados preferencialmente en los Mφs M2 (Fig.

2). Así mismo, los genes que codifican para los receptores del factor de crecimiento de endotelios vasculares 1 -*FLT1*- y de transferrina -*TFRC*-, los cuales parecen ser reprimidos por el AhR, se encontraron disminuidos en los Mφs M2 en relación a los M1 (Fig. 2).

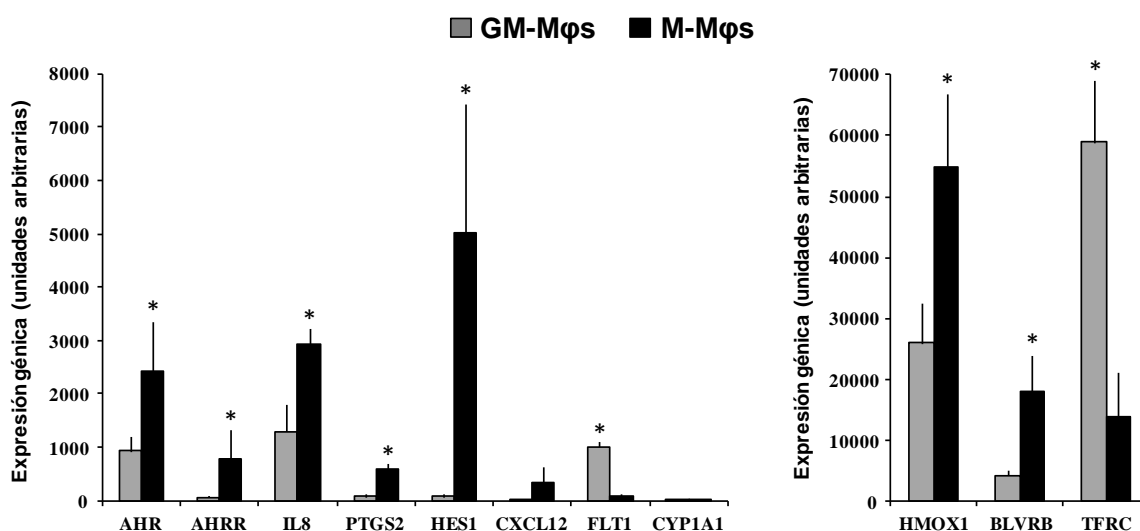


Figura 2. Expresión diferencial del *AHR* y algunos de sus genes blanco en los Mφs M1 (derivados a partir de monocitos con GM-CSF, GM-Mφs) y M2 (derivados con M-CSF, M-Mφs), evaluada por ensayos de microarreglos. *AHR*: receptor de aril hidrocarburos; *AHRR*: proteína represora de AhR; *IL8*: interleucina 8; *PTGS2*: ciclooxigenasa 2; *HES1*: factor de transcripción *Hairy and Enhancer of Split homolog-1*; *CXCL12*: quimiocina CXCL12; *FLT1*: receptor 1 del factor de crecimiento de endotelios vasculares -VEGF-; *CYP1A1*: citocromo P450 1A1; *HMOX1*: hemo-oxigenasa 1; *BLVRB*: biliverdina reductasa B; *TFRC*: receptor de transferrina. La expresión de cada gen está representada en unidades arbitrarias. Los Mφs fueron generados a partir de monocitos CD14⁺, cultivados durante 7 días en presencia de GM-CSF (1000 U/ml) o M-CSF (10 ng/ml). En el día 7° de cultivo las células se recolectaron y se extrajo su RNA para los ensayos de microarreglos. Cada barra representa la media ± SD de 3 donantes independientes. Análisis estadístico: * p < 0.05.

Con estos resultados, en nuestro laboratorio comenzamos un trabajo basado en la caracterización del papel del AhR en la diferenciación y funcionalidad de los GM-Mφs y M-Mφs, lo cual ha representado la parte central del presente trabajo. En estudios previos hemos demostrado que el AhR, a nivel de proteína, se expresa en ambos tipos de Mφs de manera similar (Fig. 3).

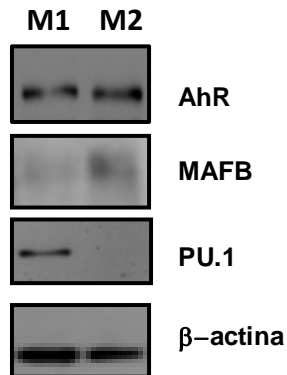


Figura 3. Expresión del AhR en los GM-Mφs y M-Mφs generados *in vitro*. Los GM-Mφs y M-Mφs se obtuvieron a partir del cultivo de monocitos humanos con GM-CSF (M1) o M-CSF (M2). Tras 6 días de diferenciación, los Mφs fueron lisados y se evaluó la expresión de diferentes moléculas por Western blot: AhR, el marcador asociado a los M-Mφs MAFB, y el marcador asociado a GM-Mφs PU.1. β-actina se utilizó como control de carga.

El receptor de aril hidrocarburos

El AhR es un factor de transcripción activado por unión a ligando que se expresa en un gran número de tejidos y organismos. Inicialmente se pensaba que este factor de transcripción tenía como efecto único la respuesta a contaminantes exógenos, ya que regula la expresión de una numerosa batería de genes involucrados en procesos de detoxificación. Entre éstos se incluyen genes de la familia del citocromo P450, responsables del metabolismo de xenobióticos de fase I (*CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1* y *CYP2S1*), así como enzimas de fase II (UDP-glucuronosil transferasa -*UGT1A6*-, quinona oxidoreductasa 1 NADPH-dependiente -*NQO1*-, aldehído deshidrogenasas -*ALD3H1*- y varias glutatión-S-transferasas), las cuales forman parte de las vías de eliminación de sustancias tóxicas.²⁷ Sin embargo, gracias al estudio de los efectos provocados por la deficiencia de AhR en ratones, actualmente es claro que el AhR juega un papel importante en la fisiología de los organismos, y se le ha implicado en procesos tales como la proliferación y diferenciación celular, en la homeostasis del hígado y del sistema inmunitario, así como en el desarrollo de tumores.^{28,29} Estos ratones presentan una baja tasa de supervivencia y retraso en su crecimiento, problemas de fertilidad, patologías hepáticas, hipertrofia cardíaca, y un potencial

metastático disminuido (debido a una disminución en la proliferación y motilidad celular y en la capacidad angiogénica).

Por otro lado, el AhR interacciona y modula directamente la actividad de diversas proteínas que median diferentes vías de señalización, como los receptores de estrógenos y andrógenos, los factores de transcripción NF- κ B, c-maf, STAT (transductor de señal y activador de la transcripción) 1 y STAT3, retinoblastoma, E2F1, y proteínas involucradas en la respuesta a hipoxia.²⁸⁻³⁴ Se considera que las funciones del AhR son muy pleiotrópicas por regular las funciones de una gran variedad de proteínas.³⁰⁻³⁵

El AhR es activado tras su unión con varios ligandos exógenos, tales como los hidrocarburos aromáticos halogenados y policíclicos (HAH, *Halogenated Aromatic Hydrocarbons*; PAH, *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*), los benzoimidazoles y los flavonoides, los cuales tienen propiedades químicas y físicas muy similares entre sí. Los diversos ligandos unen AhR con distintas afinidades. Entre estos ligandos se han identificado los contaminantes medioambientales dioxina (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina o TCDD) y benzo[*a*]pireno [B(*a*)P].³⁶

Los PAHs y HAHs son compuestos altamente tóxicos que se originan a través de la combustión de materia orgánica, en procesos industriales como la fabricación de pasta de papel y la producción de plásticos como el policloruro de vinilo. También forman parte de algunos plaguicidas, refrigerantes industriales y disolventes, y algunos están presentes en el humo del tabaco. Debido a su gran estabilidad química son contaminantes medioambientales persistentes, y debido a su carácter lipofílico tienden a acumularse en el tejido adiposo de los animales.³⁶ TCDD es el miembro prototípico de los HAHs (Fig. 4); es una de las sustancias cancerígenas más potentes que se han utilizado en animales de experimentación, y se ha demostrado que la dioxina tiene un amplio espectro de efectos negativos sobre la salud. Un aumento en la incidencia de distintos tipos de cáncer (hepático, tiroides y fibrosarcomas) y de malformaciones genéticas ha sido asociados con la exposición a dioxina.

En animales, los efectos tóxicos relacionados con la exposición a TCDD o B(*a*)P resultan en un amplio espectro de alteraciones toxicológicas y patológicas, incluyendo hepatotoxicidad, teratogénesis, carcinogénesis o caquexia. El TCDD es un potente

agente teratogénico que, cuando es administrado a hembras de ratón hacia la mitad del periodo de gestación, causa el “síndrome del paladar hendido” e hidronefrosis.²⁹ El TCDD también induce la expresión génica de enzimas detoxificadoras al activar al AhR; sin embargo, al contrario que los PAHs como B(a)P, no tiene efectos genotóxicos, ya que su metabolismo no origina derivados epóxicos capaces de unirse covalentemente al DNA. Sin embargo, la sensibilidad hacia estos compuestos parece ser específica de especie. Además, dentro de determinadas especies como rata y ratón, se han descrito distintos alelos del AhR que confieren diferente sensibilidad a la acción de TCDD, la cual está mediada por la distinta afinidad de cada proteína resultante a TCDD.

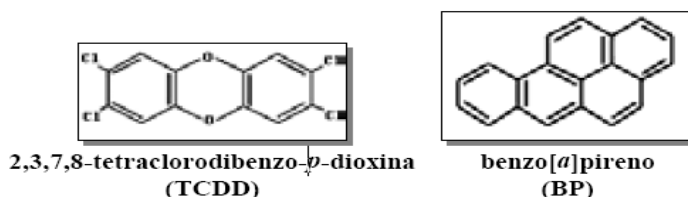


Figura 4. Estructura de dos ligandos del AhR, dioxina (TCDD) y benzo(a)pireno (BP). Modificado de www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov.

Activación transcripcional del AhR mediada por unión a ligando

El AhR pertenece a la familia de factores de transcripción con dominios bHLH/PAS (*basic Helix-Loop-Helix/Period[PER]-Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator[ARNT]-Single Minded[SIM]*). Esta familia de factores de transcripción posee papeles fundamentales en la activación de diversos procesos celulares, tales como el compromiso y diferenciación celular, progresión del ciclo celular, embriogénesis y mecanismos de respuesta a estrés. Algunos miembros adicionales de esta familia son los factores inducidos por hipoxia (HIF): HIF-1 α , HIF-2 α y HIF-3 α .²⁸⁻³⁸

El AhR posee un dominio bHLH localizado en el extremo N-terminal de la proteína. La región básica de este dominio media la unión al DNA, mientras que el dominio HLH es

necesario para la dimerización con otras proteínas (Fig. 5). Hacia el extremo C-terminal presentan un segmento denominado PAS, que también se encuentra en dos proteínas reguladoras de *Drosophila melanogaster*, PER (**P**eriod, una proteína de ritmo circadiano) y SIM (**S**ingle-**m**inded, participa en el desarrollo del sistema nervioso central). El dominio PAS presenta dos copias de una repetición degenerada de unos 110 aminoácidos denominadas PAS-A y PAS-B, separadas entre sí por unos 50 aminoácidos. La región PAS-B contiene parte del dominio de unión al ligando y un dominio necesario para la interacción del AhR con la proteína de choque térmico Hsp90. Estudios recientes de modelación proteica sugieren que el ligando se une preferencialmente al dominio PAS-B, de manera específica con los residuos Leu347 y Ala375. Los extremos C-terminal del AhR, del ARNT (**A**ry-**h**idrocarbon **R**eceptor **N**uclear **T**ranslocator) y de SIM (**S**ingle **M**inded) contienen una región rica en glutamina (Q, Fig. 5), similar a los dominios de transactivación presentes en otros factores de transcripción.^{38,39}

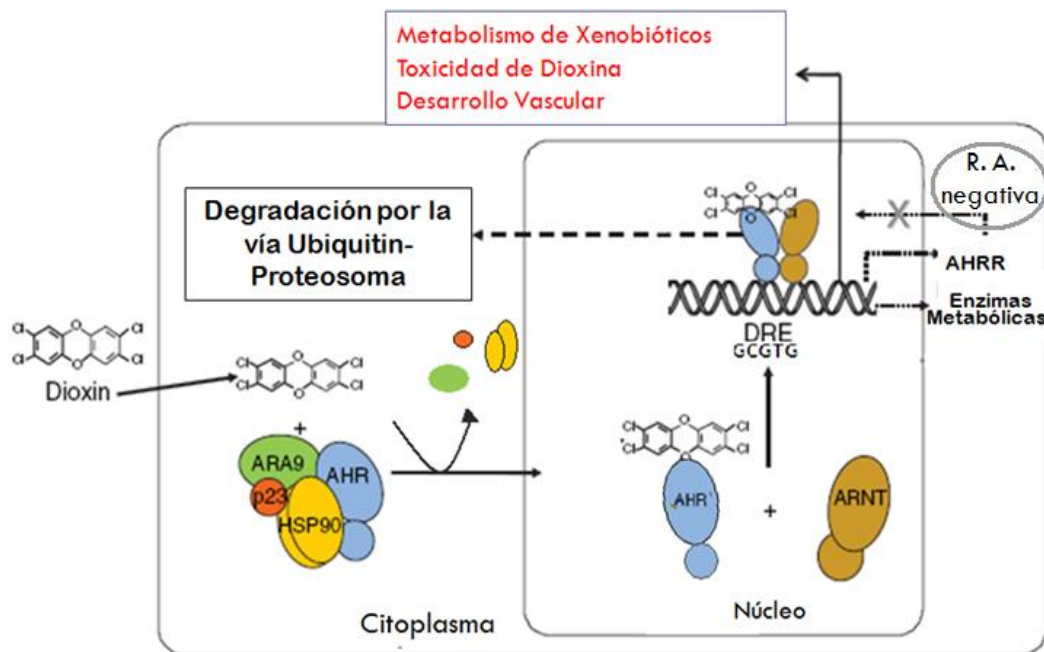


Figura 5. Representación esquemática de la estructura de la proteína AhR. Hacia el extremo amino terminal se puede observar la región básica, seguida de la estructura HLH; que en conjunto conforman el dominio de unión al DNA. Se representa además la ubicación de la región de homología PAS (PER, ARNT, SIM) con los dominios conservados entre los miembros de la familia (A y B). En la región carboxilo-terminal se representa la región rica en glutamina (Q), similar a los dominios de transactivación presentes en otros factores de transcripción. Tomado de Stockinger *et al.*⁴⁰

En ausencia de ligando, el AhR se encuentra formando parte de un complejo proteico citosólico compuesto por dos moléculas de la proteína chaperona Hsp90, la proteína de interacción con Hsp90 p23, y la proteína homóloga a las inmunofilinas XAP2 (también conocida como AIP o ARA9). Tras la unión con su ligando, el complejo se transloca al núcleo, donde el AhR se disocia de las proteínas chaperonas y dimeriza

con el ARNT. El heterodímero AhR-ARNT es capaz de unirse a secuencias consenso de diferentes promotores de sus genes blanco denominadas elementos de respuesta al AhR (AHRE, *Aryl Hydrocarbon Response Elements*, también conocidas como elementos de respuesta a xenobióticos -XRE- y elementos de respuesta a dioxina -DRE-). Además, es capaz de interactuar con varias acetil transferasas de histonas y otros factores remodeladores de la cromatina y, por un mecanismo aún no elucidado totalmente, facilitar el reclutamiento de la RNA polimerasa II para iniciar la transcripción.³⁷⁻³⁹

La señalización a través del AhR está regulada negativamente por dos procesos: 1) el AhR activado es rápidamente exportado al citoplasma, donde es degradado por la vía ubiquitin-proteosoma, y 2) la señalización es bloqueada por un mecanismo de retroalimentación negativa mediado por el represor de AhR (AhRR). Este gen es transcrito en respuesta a la dioxina y su expresión se incrementa con la activación del AhR. El AhRR es estructuralmente similar a AhR, y compite por la unión con el ARNT (Fig. 6).^{38,39}



Modificado de E. A. Stevens et Al . 2009 Blackwell Publishing Ltd, Immunology, 127, 299–311

Figura 6. Esquema de la regulación de la actividad transcripcional del AhR mediada por su unión a ligandos. HSP: proteína de choque térmico; DRE: elementos de respuesta a dioxina; ARNT: translocador nuclear de AhR; AHRR: represor del AhR. Modificado de Stevens *et al.*⁴¹

El AhR es activado por ligandos endógenos

Las investigaciones realizadas para evaluar la funcionalidad del AhR han estado encaminadas principalmente a describir su papel en detoxificación y en el metabolismo de xenobióticos. Sin embargo, más recientemente y gracias al estudio de los ratones deficientes de AhR, ha sido posible establecer nuevas funciones fisiológicas controladas por este factor de transcripción.

Existen reportes que refuerzan la idea de que el AhR posee un papel fisiológico independiente de sus efectos sobre el metabolismo de xenobióticos, ya que los ratones *knock out* (K.O.) para AhR presentan hipertrofia cardiaca, patologías hepáticas, baja fertilidad y déficit de crecimiento. Reportes en la literatura señalan que el AhR juega un papel importante en el desarrollo de las células progenitoras hematopoyéticas, ya que estos ratones presentan cantidades elevadas de éstas en la MO,⁴² y funciones en la regulación de la proliferación, adhesión y migración celular.⁴³ Estas evidencias demuestran que la funcionalidad del AhR como factor de transcripción no solamente está mediada por la acción de ligandos exógenos, sino que existen factores endógenos capaces de activarlo.

Actualmente se han identificado algunos ligandos endógenos que se unen al AhR con distintas afinidades, principalmente algunos derivados del triptófano (6-formil-indol[3,2-b]carbazole [FICZ], 2-(1'H-indol-3'-carbonil)-tiazol-4-ácido carboxílico metil éster [ITE]), e intermediarios catabólicos como el ácido quinurénico (KA), que se obtiene a partir de procesos enzimáticos que conducen finalmente a la obtención de serotonina y vitamina B3 en el metabolismo del triptófano.^{43,44} Otros ligandos reportados son la lipoxina A4, lipoproteínas de baja densidad oxidadas, moléculas que actúan como segundos mensajeros (cAMP, Ca²⁺), fármacos sintéticos (50367, VAF347), sustancias encontradas en la dieta (quercetina, resveratrol), y componentes aún no determinados del suero y de los medios de cultivo celulares.^{36,37}

El AhR es activado directamente por intermediarios metabólicos del triptófano

El triptófano es un aminoácido esencial a partir del cual se sintetizan moléculas de gran importancia para el sistema nervioso, por medio de reacciones enzimáticas de las cuales se obtienen sustancias intermediarias como la quinurenina, el KA, y finalmente neurotransmisores como la serotonina.

La enzima indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) es responsable de iniciar la vía metabólica de síntesis de ácido quinurénico a partir del triptófano. La IDO cataliza la degradación oxidativa del triptófano al romper la unión del doble enlace en posición 2,3 en el anillo indólico, dando lugar a N-formil-quinurenina, que es rápidamente metabolizada a quinurenina (Fig. 7). La IDO se expresa prácticamente de forma ubicua en el ser humano y ha sido asociada con la generación de tolerancia inmunológica, rechazo de aloinjertos, y se ha observado una alta concentración de la enzima en algunas condiciones patofisiológicas, como en el desarrollo tumoral.⁴⁵⁻⁴⁷

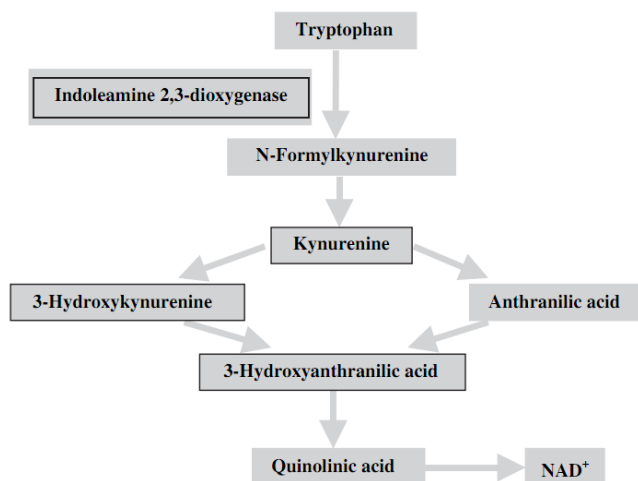


Figura 7. Degradación del triptófano a través de la vía de la quinurenina. Tomado de Bauer *et al.*⁴⁷

Como se mencionó anteriormente, durante la degradación del triptófano se generan metabolitos capaces de activar al AhR. Uno de estos metabolitos es el KA. De forma

muy interesante, DiNatale *et al.* reportaron que la activación del AhR con KA desencadena procesos de señalización diferentes dependiendo del microambiente o de los co-factores involucrados en la activación del AhR en células humanas de cáncer de mama MCF-7.⁴⁸

El AhR en el sistema inmunitario

El AhR se expresa en una gran cantidad de linajes celulares, y las células del sistema inmune no representan una excepción; por el contrario, se han resaltado algunas de ellas como blancos sensibles de la actividad transcripcional mediada por esta molécula.

Existe evidencia considerable que sugiere que la señalización del AhR juega un papel importante en el funcionamiento e incluso en la generación de algunos fenotipos funcionales del sistema inmunitario; sin embargo, su participación en estos procesos no está del todo clara,^{49,50} ya que se han observado efectos discordantes e incluso contrarios al activar al AhR con diferentes ligandos y en distintos tipos celulares. Por ejemplo, la activación del AhR parece tener un papel protector o patogénico en modelos de enfermedades autoinmunes, como la encefalitis autoinmune experimental, dependiendo de los ligandos utilizados para su activación (TCDD vs FICZ, respectivamente).⁴⁹

La activación del AhR con TCDD incrementa la inflamación en modelos animales de artritis reumatoide, y la activación con ligandos endógenos induce la producción de citocinas pro-inflamatorias por parte de linfocitos Th17. Ambos tipos de ligandos son, de hecho, capaces de regular la generación de linajes linfoides con actividades tan opuestas como las células T reguladoras Foxp3⁺ (Treg) y Foxp3⁺IL-10⁺ (Tr1) y las células inflamatorias Th17.⁴⁹⁻⁵²

La exposición a HAHs o PAHs puede disminuir las respuestas proliferativas de los linfocitos T y B, inducir apoptosis en timocitos, inhibir la actividad de las células NK, modular la producción de citocinas, y disminuir la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8⁺. Además, la activación del AhR puede disminuir las respuestas inflamatorias

alérgicas y prolongar la aceptación de aloinjertos, probablemente a través de la inducción de linfocitos Treg. Sin embargo, también se ha involucrado con la aparición y desarrollo de la enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reumatoide, y esclerosis múltiple, por su papel clave en la generación de los linfocitos Th17. Con respecto a las neoplasias, ratones deficientes de AhR desarrollan menores masas tumorales y metástasis que los ratones silvestres, mientras que el TCDD promueve carcinogénesis. Estos resultados contradictorios sugieren que los efectos inmunológicos de la activación del AhR *in vivo* son específicos de tejido, de ligando, o de ambos. Por lo tanto, aunque se desconocen las bases moleculares que controlan las vías de diferenciación T mediadas por distintos ligandos del AhR, se postula que estos ligandos dirigen la naturaleza de las señales del AhR. Así, un estudio realizado en una línea celular de hepatocarcinoma murino nativa y en una línea derivada de la misma que carece del AhR ha demostrado que este receptor se une a más de 750 promotores distintos en ausencia de ligando. Estos promotores no contienen necesariamente elementos AHRE, y esto podría ser debido a que el AhR es capaz de dimerizar con varios factores de transcripción, como miembros de las familias NF- κ B y maf. Además, este perfil de promotores varía en presencia de TCDD o B(a)P. Tras la activación del AhR con estos ligandos, se demostró su unión tanto a promotores específicos de ligando como a promotores comunes.⁵³

Así mismo, se han descrito numerosos defectos hematopoyéticos en ratones deficientes de AhR, incluyendo alteración en el número de linfocitos en bazo, hematopoyesis extramedular en el hígado, esplenomegalia, atrofia tímica e inmunosupresión.⁴³

Con respecto al sistema inmune innato, se han identificado un gran número de genes involucrados en la respuesta de estas células que poseen posibles secuencias AHRE, como los genes que codifican para 9 TLRs murinos.^{54,55} La influencia del AhR mediada por la activación con TCDD en las respuestas inflamatorias ha sido estudiada durante varios años, y se ha descrito principalmente la promoción de respuestas inflamatorias por células del sistema inmune innato. En ratones tratados con TCDD, además de observarse un incremento en la sensibilidad a LPS, también se observa un incremento en la cantidad de neutrófilos en sangre periférica y en la cavidad peritoneal de ratones.^{56,57} así como la promoción de la actividad citotóxica y

liberación de ROS por estas células. En DCs murinas se ha reportado que la activación del AhR con TCDD incrementa la expresión de moléculas como las del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II, CD24, CD40, CD54 y la producción de IL-12. A pesar de estas modificaciones fenotípicas, no se altera la capacidad fagocítica de las DCs ni sus capacidades de presentación antigénica.⁵⁸

Los Mφs expresan altos niveles del AhR, e igual que en otros tipos celulares, se han reportado efectos disímiles según el modelo utilizado. Así, se ha descrito la inducción de moléculas pro-inflamatorias en los Mφs dependiente del AhR, como IL-1β, TNF, IL-8, CCL1, ciclooxigenasa (COX)-2.⁵⁹⁻⁶¹ Sin embargo, otros estudios indican el efecto contrario, como en el caso de los ratones K.O. para AhR, en los que se ha demostrado de forma clara el papel anti-inflamatorio de esta proteína. La ausencia del AhR conlleva a una producción desmedida de citocinas pro-inflamatorias y a un abatimiento de la producción de IL-10 en Mφs peritoneales expuestos a LPS. De hecho, estos ratones perecen rápidamente debido al choque séptico inducido por LPS.^{62,63}

Se han reportado trabajos en los que se describe que el AhR impide de forma selectiva la diferenciación de precursores monocíticos a células de Langerhans⁶⁴ y a Mφs.⁶⁵ Estos fenómenos están completamente ligados a la inhibición de la síntesis de PU.1, un factor de transcripción imprescindible para la diferenciación de los monocitos.^{66,67} En estos trabajos se propone que la activación del AhR no afecta a la maduración de los monocitos. Un solo trabajo describe que la activación del AhR con B(a)P altera negativamente la generación de Mφs adherentes diferenciados en presencia de GM-CSF, así como su funcionalidad (endocitosis y fagocitosis) y la expresión de algunos marcadores fenotípicos como CD11a, CD71, CD80, CD86 o CD64. Además, se describe una clara inhibición de la secreción de TNF al estimular las células tratadas con B(a)P con LPS.⁶⁵

En presencia de un microambiente pro-inflamatorio, la activación del AhR con el ligando endógeno KA promueve la expresión del mRNA de *IL6* en las células MCF-7.⁴⁸ La citocina pro-inflamatoria IL-1β es capaz de inducir la expresión de *IL6* a través de un efecto sinérgico con el AhR (Fig. 8). Cuando se evaluó si la activación con KA era capaz de inducir la expresión de un gen prototipo inducido por AhR, *CYP1A1*, se obtuvieron resultados similares a los observados con *IL6*, es decir, la expresión del

mRNA de *CYP1A1* es dependiente de la dosis de KA; sin embargo, en presencia de IL-1 β , los niveles de transcripción del gen *CYP1A1* fueron mucho menores, tanto en presencia de TCDD como de KA (Fig. 8).

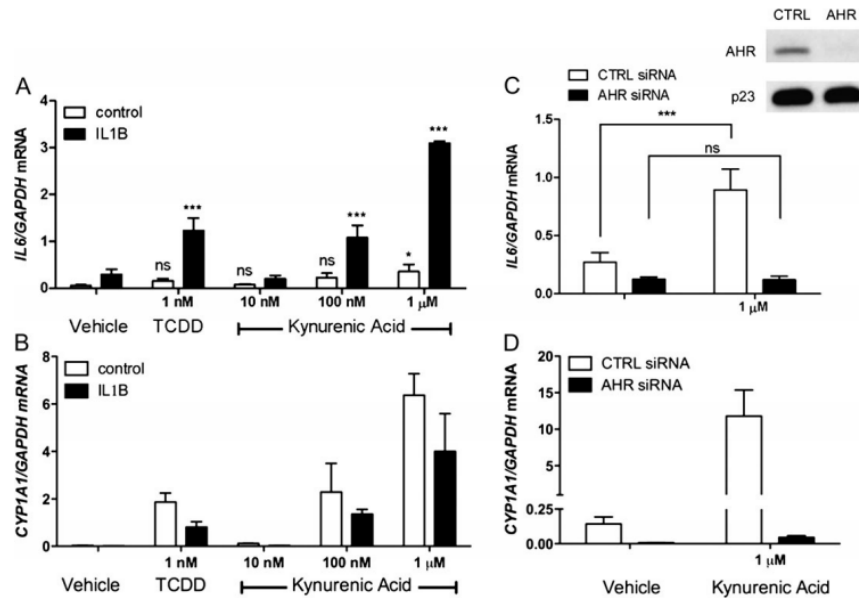


Figura 8. KA e IL-1 β inducen de forma sinérgica la expresión de IL-6 y requieren la activación del AhR. A y B) Células MCF-7 tratadas con dosis crecientes de KA por 2 h en presencia y ausencia de IL-1 β . El mRNA de *CYP1A1* e *IL6* fue cuantificado mediante qRT-PCR. C y D) Células MCF-7 fueron electroporadas con RNA pequeño de interferencia (siRNA) contra AhR. Las células fueron tratadas con IL-1 β en presencia y ausencia de KA, y se evaluó la expresión del mRNA de *IL6* y *CYP1A1* mediante qRT-PCR tras 2h de tratamiento con KA. En el inserto se demuestra la disminución de la expresión del AhR 48 h posteriores al tratamiento de las células con el siRNA contra AhR. Tomado de DiNatale *et al.*⁴⁸

El efecto sinérgico en la expresión de *IL6* depende de la presencia del AhR. En la Fig. 8C se puede observar que en las células MCF-7 deficientes de AhR se abate la expresión de *IL6* aún en presencia de altas concentraciones de KA, lo que demuestra que la inducción de *IL6* mediada por IL-1 β y KA requiere de la activación del AhR. Por otro lado, en la Fig. 8D se puede observar que en ausencia de la IL-1 β la expresión del gen blanco de AhR *CYP1A1* está mediada directamente por el AhR.

El KA ha sido detectado en el colon de cerdos y ratas a una concentración de 1.5-16 μ M, mientras que en humanos se ha detectado en concentraciones de 0.8 μ M en la

bilis. En humanos sanos la concentración sérica de KA es de 30 nM, mientras que se incrementa hasta alrededor de 50 nM en pacientes con patologías renales. Estas observaciones, en conjunto con los resultados previos, sugieren que el AhR podría ser activado por KA en algunos tejidos o quizá de forma sistémica en pacientes con afecciones renales.

Los descubrimientos de DiNatale *et al.*⁴⁸ en cuanto a la implicación del AhR en la inducción de *IL6* en células tumorales amplía el panorama de estudio de este factor de transcripción y su posible papel en la regulación de la respuesta inmune, la síntesis de citocinas pro-inflamatorias, y la generación de la respuesta inmune contra los tumores. Por otro lado, queda de manifiesto que la acción del AhR depende de múltiples factores como el tipo celular, la naturaleza de los ligandos con los que es activado, y de forma muy importante, del microambiente y de los posibles co-factores con los que puede interactuar para activar diversas vías de señalización.

El AhR regula la expresión de IL-6 en diferentes tipos celulares

La IL-6 es el miembro prototípico de la familia de citocinas de su mismo nombre, que comprende además IL-11, LIF (leukemia inhibitory factor), OSM (oncostatin M), CNTF (ciliary neurotrophic factor), CT-1 (cardiotrofina-1) y CLC (citocina tipo cardiotrofina). Estas citocinas activan genes blanco involucrados en diferenciación, supervivencia, apoptosis, proliferación, y poseen propiedades tanto anti- como pro-inflamatorias. La IL-6 es una proteína de fase aguda en la respuesta inflamatoria. Las citocinas del tipo IL-6 se unen a complejos receptores de membrana plasmática, conformados por la glicoproteína gp130 y por una cadena específica. Tras la unión de estos receptores con sus ligandos se inicia la transducción de señales a través de proteínas de la familia JAK (quinasas Janus), promoviendo la activación de factores de transcripción de la familia STAT (principalmente STAT3). Otra vía de señalización activada por las citocinas de la familia de IL-6 es la cascada de las MAPK (proteínas cinasas activadas por mitógenos, Fig. 9).⁶⁸

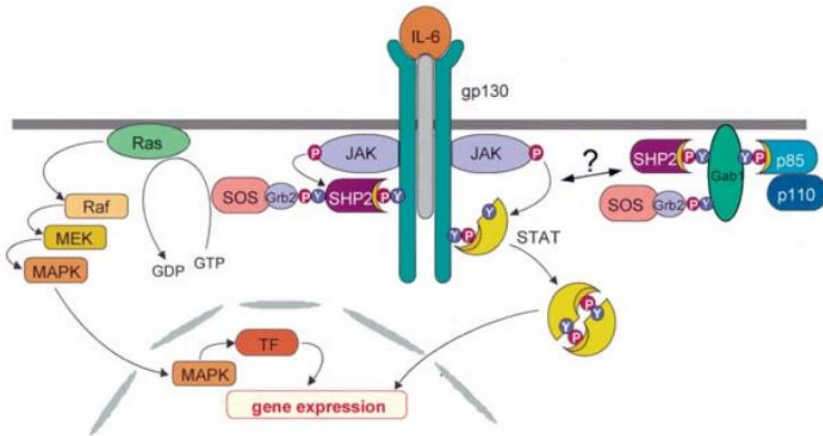


Figura 9. Representación de las dos principales vías de señalización activadas por la IL-6. Tomado de Heinrich *et al.*⁶⁸

Existen diversos reportes en la literatura que relacionan la activación del AhR con la expresión de IL-6 en diversos tipos celulares. Estos reportes muestran efectos discordantes, dependiendo de la línea celular en la que son evaluados.

Como se mencionó anteriormente, en 2010 DiNatale *et al.* reportaron el papel positivo del AhR en la expresión de *IL6* al ser activado con el ligando endógeno KA en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 en presencia de un microambiente pro-inflamatorio.⁴⁸ Previamente, Hollingshead *et al.* reportaron un efecto similar en esta misma línea celular, donde es posible observar un efecto sinérgico en la modulación de la expresión de *IL6* entre el AhR activado con un ligando exógeno (TCDD) y factores pro-inflamatorios (IL-1 β y PMA, Fig. 10).⁶⁹ La activación con ligandos exógenos del AhR induce la expresión de *CYP1A1* y promueve de forma sinérgica la expresión de *IL6* en presencia de un microambiente pro-inflamatorio (Fig. 10).

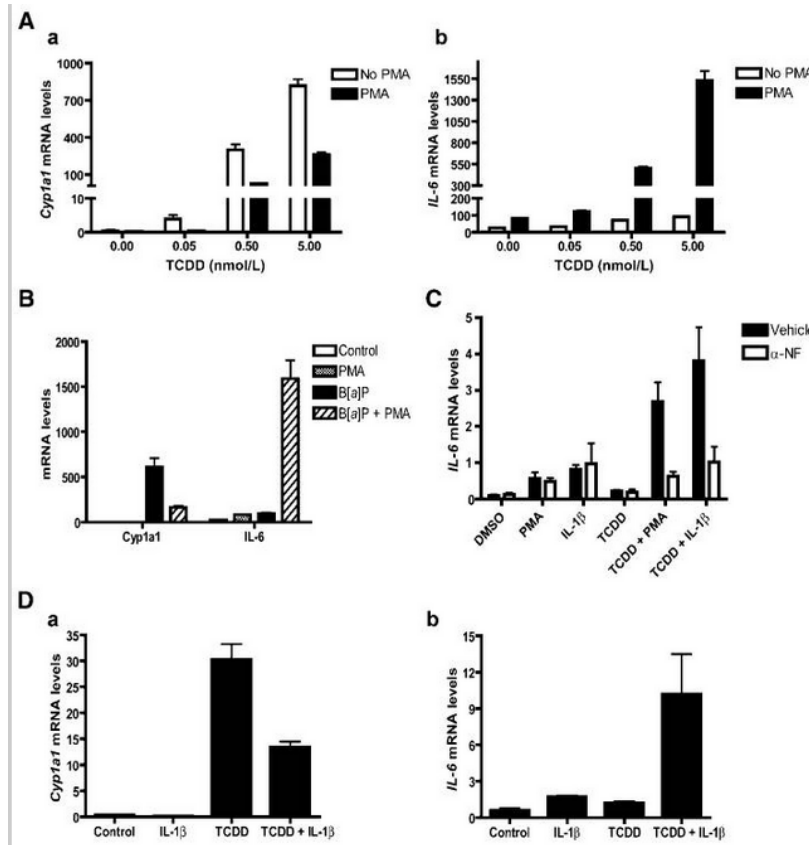


Figura 10. Regulación transcripcional de *IL6* y *CYP1A1* mediada por el AhR en un microambiente pro-inflamatorio. El mRNA de *IL6* y *CYP1A1* se cuantificó mediante qRT-PCR. A) Las células MCF-7 fueron tratadas durante 2 h con concentraciones crecientes de TCDD en presencia y ausencia de PMA (81 nmol/l). B) Las células MCF-7 fueron tratadas con DMSO (vehículo), PMA (81 nmol/l), B(a)P (5 nmol/l), o con PMA y B[a]P por 2 h. C) Las células MCF-7 fueron tratadas con el antagonista de AhR α -naftoflavona (α -NF) o DMSO por 10 min; posteriormente se adicionó DMSO, PMA (10 nmol/l), o IL-1 β (10 ng/ml) sola o en combinación con TCDD (1 nmol/l) por 2 h. D) Las células MCF-7 fueron tratadas con DMSO, IL-1 β (10 ng/ml), TCDD (1 nmol/l), o con TCDD e IL-1 β por 2 h. Tomado de Hollingshead *et al.*⁶⁹

Adicionalmente, DiNatale *et al.*⁷⁰ demostraron que el AhR, tras ser activado con TCDD en la línea celular MCF-7, es capaz de unirse a regiones AHRE no consenso localizadas río arriba del sitio de inicio de la transcripción (TSS) de la *IL6*. Tal unión parece favorecer a su vez la unión de componentes de NF- κ B a secuencias consenso en el mismo promotor, mediada por la acción de IL-1 β . Se ha demostrado que el incremento de la expresión de *IL6* dependiente del AhR involucra procesos de reorganización de complejos represores, ejemplificados por la presencia de las

desacetilasas de histonas HDAC-1 y HDAC-3 (Fig. 11). Además, el reclutamiento del AhR al promotor de *IL6* en presencia de TCDD e IL-1 β está acompañado por un incremento en el reclutamiento de la RNA polimerasa II. Por lo tanto, se propone que AhR juega un papel importante en revertir la represión constitutiva del gen de *IL6* mediada por HDAC-1 y -3 en la línea celular MCF-7.⁷⁰

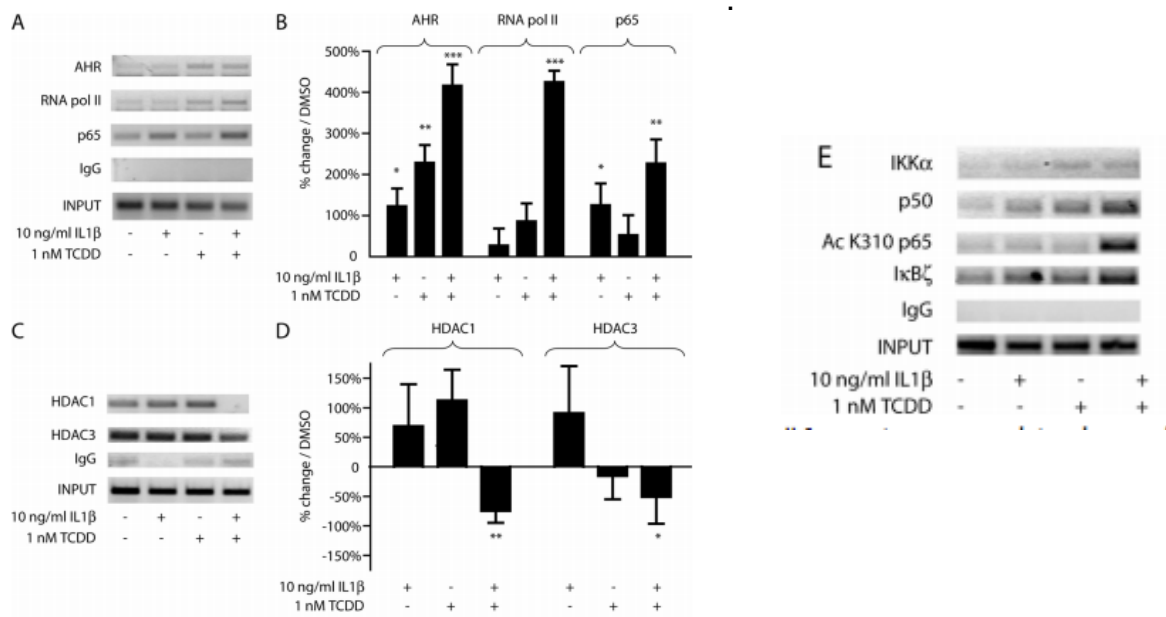


Figura 11. La unión del AhR al promotor de *IL6* se relaciona con la disminución de la presencia de co-represores y el aumento de la presencia de co-activadores. Ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina del promotor de *IL6* (región -500/-1) en células MCF-7 tras el tratamiento por 2 h con vehículo, IL-1 β (10 ng/ml), TCDD (1 nM) o TCDD + IL-1 β . Se realizaron inmunoprecipitaciones para las proteínas especificadas y el DNA fue amplificado por RT-PCR convencional (A, C, E) o qRT-PCR (B, D). Tomado de DiNatale *et al.*⁷⁰

Además de lo anterior, Chen *et al.*⁷¹ demostraron que el AhR, en asociación con el miembro de la familia NF- κ B RelA, promueve la expresión de *IL6* en las líneas celulares de cáncer pulmonar H1355 y BEAS-2B (Fig. 12).

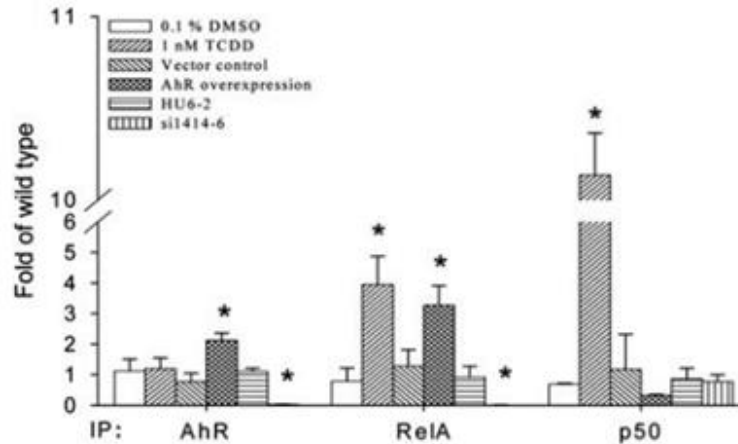


Figura 12. El complejo AhR/RelA es capaz de unirse a elementos κ B en el promotor de *IL6*. Células H1355 fueron tratadas con TCDD (1 nM) por 6 h o sometidas a transfección transitoria con un vector de expresión para AhR por 48h, tras lo cual se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina. Los resultados representan el grado de reclutamiento del AhR y de los miembros de la familia NF- κ B RelA y p50 al promotor de *IL6*. Tomado de Chen *et al.*⁷¹

Otros trabajos han sugerido que el AhR actúa como un represor de la síntesis de IL-6. Takanaga *et al.* reportaron que el AhR inhibe la producción de IL-6 a través de un mecanismo que involucra la inactivación de STAT3 en las células de glioma C6.⁷² Kimura *et al.*⁶² demostraron un papel anti-inflamatorio para el AhR en M ϕ s peritoneales de ratones deficientes de esta proteína, en los cuales la síntesis de IL-6 estaba incrementada en presencia de LPS comparada con los M ϕ s silvestres. Estos autores propusieron un modelo en el cual la transcripción de *IL6* es regulada por la interacción entre el AhR y STAT1 en el promotor del gen, complejo que evita la actividad transcripcional de NF- κ B necesaria para la síntesis de *IL6*. Por su parte, Masuda *et al.*⁷³ demostraron que el AhR es capaz de unirse a al factor de transcripción Sp1 y evitar su fosforilación, impidiendo su unión al promotor de la histamina descarboxilasa y disminuyendo así la secreción de histamina, afectando indirectamente de manera negativa la producción de IL-6.

Por lo tanto, si bien los resultados de los distintos estudios sobre el efecto del AhR en la síntesis de IL-6 impiden establecer un mecanismo de acción general, proveen evidencias que sugieren que los efectos del AhR dependen del tipo celular y del microambiente en el que se desarrollan estos procesos.

JUSTIFICACIÓN

Existen diversos tipos de Mφs cuya funcionalidad depende en gran medida de la integración de las señales del microambiente en el que se encuentran. *In vitro*, se pueden generar Mφs a partir de monocitos humanos con funciones pro- (M1) y anti-inflamatorias (M2). Ambos tipos de Mφs expresan el factor de transcripción AhR, pero su activación podría modular algunas funciones en estos tipos celulares de forma diferencial. Por lo tanto, nuestro trabajo se enfocó en ampliar la descripción de las funciones celulares de los Mφs en las que el AhR está implicado, así como en describir algunos de los mecanismos por los que el AhR podría modular la funcionalidad de los Mφs de tipo M1 y M2.

HIPÓTESIS

La activación del AhR modula de forma diferencial la funcionalidad de los macrófagos de tipo M1 y M2 mediante la activación de cascadas de señalización únicas para cada subpoblación, dependientes del microambiente y de los cofactores con los que tiene la capacidad de interactuar.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el papel del receptor de aril hidrocarburos en la generación y la funcionalidad de los macrófagos de tipo M1 y M2.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la cinética de expresión del AhR en los Mφs M1 y M2 durante su proceso de diferenciación, así como su localización subcelular.

2. Evaluar la modificación en la expresión de marcadores característicos de los Mφs M1 y M2 tras la supresión de la actividad del AhR.
 - 2.1. Fenotipificación de las células.
 - 2.2. Expresión de genes asociados con los fenotipos M1 y M2.

3. Analizar la funcionalidad de los Mφs M1 y M2 tras la supresión de la actividad del AhR.
 - 3.1. Producción de citocinas tras el estímulo con LPS.
 - 3.2. Capacidad de fagocitosis.
 - 3.3. Capacidad citotóxica sobre células tumorales.

4. Determinar la unión del AhR a distintas secuencias del promotor de la citocina IL-6, en presencia o ausencia de LPS.

METODOLOGÍA

Medios y reactivos de cultivo

Los monocitos CD14⁺ se cultivaron en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, HyClone), L-glutamina 2 mM y antibióticos 1%. La línea celular KM12c humana de cáncer colorectal se mantuvo en medio DMEM (Gibco) suplementado con SFB 10%. Se utilizaron los siguientes reactivos: GM-CSF (1000 U/ml, Probiomed); M-CSF (10 ng/ml, R&D Systems); anticuerpo monoclonal (mAb) de ratón neutralizante anti-M-CSF (2 µg/ml) y su apropiado mAb control de isotipo (R&D Systems); α-naftoflavona (ANF, 5 µM, Sigma-Aldrich); lipoxina A4 (100 nM, Sigma-Aldrich); TCDD (10 nM, Sigma-Aldrich); LPS (*E. coli* 0111:B4, 100 ng/ml, Sigma-Aldrich).

Aislamiento y purificación de monocitos

El concentrado leucocitario de donantes voluntarios sanos se obtuvo del Banco de Sangre del Hospital CMN “La Raza” del IMSS. Las células se sometieron a un gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque (densidad 1.077 g/l), se centrifugaron a 2,000 rpm durante 30 min a temperatura ambiente y se aislaron las células mononucleares (PBMC) de la interfase entre el Ficoll y el plasma. La población de monocitos CD14⁺ se purificó a partir de 400 x 10⁶ PBMCs por selección positiva mediante MACS (Magnetic Cell Sorting) utilizando un anticuerpo (Ab) anti-CD14 conjugado con microesferas magnéticas (Miltenyi Biotec).

Generación de macrófagos de tipo M1 y M2

Los monocitos CD14⁺ se cultivaron a una densidad de 0.7 x 10⁶ células/ml en medio de cultivo suplementado con GM-CSF o con M-CSF para inducir la diferenciación de los monocitos hacia GM-Mφs (M1) o M-Mφs (M2), respectivamente. Las citocinas se adicionaron cada 2 días. El cultivo se realizó durante 6 días, tras los cuales se obtuvieron Mφs maduros.

Ocasionalmente, se añadió a los cultivos el antagonista químico de AhR ANF en los días 0, 2 y 4 de diferenciación. Como control, otras células se cultivaron sólo con vehículo (DMSO, 0.1% v/v). Tras 6 días de cultivo en presencia o ausencia de ANF, las células fueron estimuladas con LPS por 1 h para realizar los ensayos de EMSA (ensayos de retardamiento electroforético), 2 h para los ensayos de CHIP (inmunoprecipitación de la cromatina), o 18 h para la evaluar la expresión de citocinas por el método de ELISA, los cuales serán descritos a continuación.

Ensayos de Western blot

Para realizar los ensayos de Western blot (WB), los monocitos CD14⁺ o los Mφs generados *in vitro* se resuspendieron en 50 µl de solución de lisis [tampón Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 1%, EDTA 5 mM e inhibidores de proteasas y fosfatasas (Halt™, Thermo Scientific)] y fueron incubados durante 30 min a 4°C. Las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 min a 4°C para recuperar los lisados de proteínas totales, los cuales fueron almacenados a -80°C hasta su análisis. Para separar las fracciones nucleares y citoplásmicas, los Mφs se resuspendieron en buffer EB (Hepes 10 mM pH 7.9, KCl 40 mM, MgCl₂ 3 mM, NP40 0.5% y glicerol 5%) que contenía inhibidores de proteasas (Pierce) y se incubaron 10 min a 4°C. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 4°C durante 20 min a 14,000 rpm. El sobrenadante (SN, fracción citoplásmica) se recolectó y el pellet restante fue resuspendido en buffer de extracción C (Hepes 20 mM pH 7.9, NaCl 400 mM, EDTA 1 mM pH 8 y EGTA 1 mM pH 8) con inhibidores de proteasas (Pierce). La mezcla se mantuvo en agitación 15 min a 4°C y las muestras fueron centrifugadas a 4°C durante 20 min a 14,000 rpm. El SN (proteínas nucleares) se almacenó a -80°C hasta su posterior análisis.

Los lisados de proteínas totales o las fracciones nucleares y citoplásmicas fueron resueltos en geles de SDS-PAGE al 10% bajo condiciones reductoras. Los geles fueron equilibrados en buffer de transferencia (tampón Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%) y transferidos a membranas de polifluoruro de vinilideno (Immobilon, Millipore). Las membranas fueron bloqueadas con TBS-T (TBS-Tween 20 0.1%) y leche en polvo al 5%, lavadas con TBS-T, e incubadas con los mAbs anti-AhR

(Thermo scientific), anti- β -actina (amablemente proporcionado por el Dr. Manuel Hernández, CINVESTAV-IPN), anti-lamin B, anti-gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), o con los Abs policlonales anti-PU.1 (Santa Cruz Biotech.) o anti-MAFB, todos de Santa Cruz Biotechnologies, diluidos en TBS-T con leche en polvo al 1% durante 1 h. Posteriormente, las membranas fueron lavadas con TBS-T e incubadas con los correspondientes Abs secundarios conjugados a peroxidasa (Dako), diluidos en TBS-T con leche en polvo al 1%, durante 1 h a temperatura ambiente. La reacción se reveló mediante el sistema de quimioluminiscencia Immun-Star™ (BioRad Laboratories).

Ensayos de citometría de flujo

Las células se recolectaron y se lavaron con PBS. Posteriormente se realizó el bloqueo de receptores Fc mediante la adición de inmunoglobulinas humanas a una concentración de 10 μ g/ml durante 30 min. A continuación las muestras se incubaron con los siguientes mAbs primarios: anti-CD1a, -CD14, -CD163, -CD206 y sus correspondientes Abs controles de isotipo (BD Biosciences) diluidos en tampón FACS (PBS, albúmina sérica bovina -BSA- 0.1%, azida sódica 0.01%) por 30 min. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron dos veces con tampón FACS para posteriormente adicionar un anticuerpo policlonal anti-Igs de ratón [fracción F(ab')₂, Dako] conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), diluido en tampón FACS, durante 30 min a 4°C. Transcurrido este tiempo se procedió nuevamente a lavar las células con tampón FACS. Las células se fijaron con PBS-paraformaldehído 1% y se analizaron en un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson).

Detección de citocinas en los sobrenadantes de cultivo de los macrófagos

Los M ϕ s M1 y M2 cultivados en presencia o ausencia de ANF durante 6 días, fueron estimulados con LPS durante 18 h. Una vez transcurrido el tiempo de estimulación, se colectaron los SNs y fueron centrifugados a 4°C durante 10 min a 5,000 rpm, con la finalidad de eliminar posibles restos celulares. Los SNs se almacenaron a -80°C hasta su análisis. En estos SNs se evaluó la presencia de las citocinas TNF, IL-6, IL-8, IL-10 y activina A mediante kits de ELISA comerciales (BD Biosciences y R&D Systems).

Ensayos de fagocitosis

La capacidad fagocítica de los Mφs se evaluó a través de cinéticas de internalización de partículas de zimosán acopladas a FITC (FITC-zym). Los Mφs diferenciados fueron incubados a una densidad de 1×10^5 células con FITC-zym (0.125 mg/ml) durante 30, 60, 120 o 240 min a 37°C. Como control de internalización los Mφs fueron incubados en las mismas condiciones a 4°C. Una vez transcurridos los tiempos mencionados, la internalización se detuvo mediante la incubación de las células con tampón FACS frío y sucesivos lavados con esta solución. Finalmente, las células fueron resuspendidas en tampón fijador de FACS. Se determinó el grado de internalización de las partículas mediante citometría de flujo en un citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson).

Ensayos de inhibición del crecimiento tumoral

Los experimentos se realizaron empleando bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) para determinar la viabilidad de células derivadas de cáncer colorectal KM12c. Se obtuvo medio condicionado de Mφs M1 y M2 diferenciados en presencia o ausencia de ANF en el 6° día de cultivo. Las células tumorales KM12c se sembraron por quintuplicado y se incubaron con el medio de los Mφs durante 72 h. MTT se añadió en la última hora de cultivo y se evaluó el porcentaje de células viables por análisis de absorbancia (570 nm).

Análisis computacional de la región promotora del gen de *IL6* y amplificación de fragmentos del promotor

Con la finalidad de determinar los sitios funcionales de unión de AhR al promotor de *IL6* se realizó un análisis de la secuencia de la región promotora de este gen, obtenida de University of California, Santa Cruz Genome Browser (genome.ucsc.edu). El programa MatInspector V2.2 Professional (www.genomatix.de)⁷⁴ se utilizó para predecir sitios de unión a diferentes factores de transcripción en la región -3307 a +68 del promotor de *IL6*. Todas las posiciones del promotor se refieren a la del principal TSS (+1) del gen.⁷⁵ Las secuencias con un *score* de al menos 0.8 fueron

consideradas para mapear los sitios de unión de diferentes factores de transcripción en el promotor (Fig. 13).

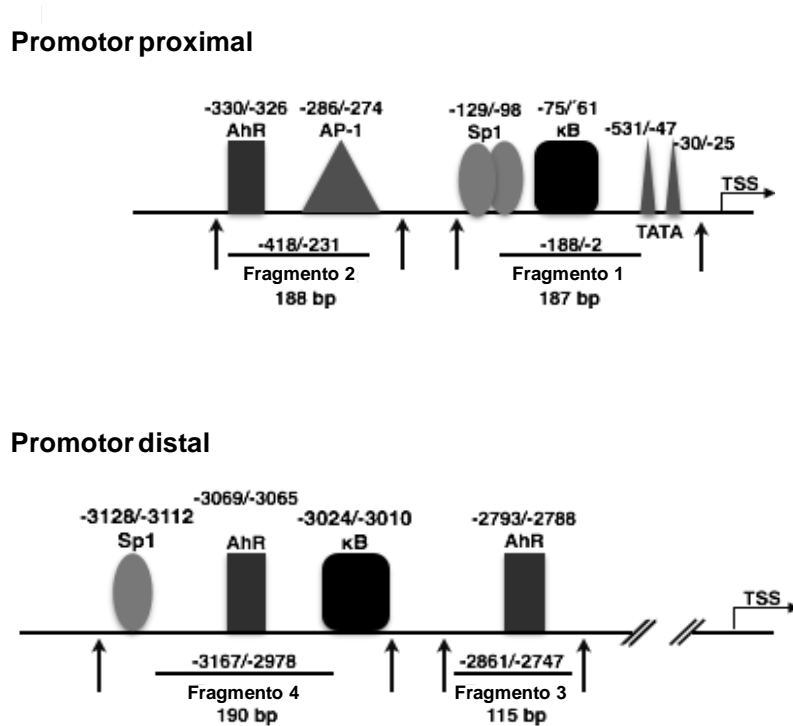


Figura 13. Esquema de algunos factores de transcripción que se unen al promotor de *IL6*, de acuerdo con los resultados predichos por el programa MatInspector. Las posiciones señaladas están ubicadas en relación al sitio de inicio de la transcripción (TSS, +1). Se muestra la posición de los 4 fragmentos amplificados, así como su tamaño. TATA: caja TATA.

Para realizar los ensayos de EMSA se clonaron 3 fragmentos del promotor que incluían sitios de unión a AhR predichos por el programa MatInspector (2-4), los cuales fueron usados como sondas. Se emplearon los siguientes pares de oligonucleótidos: 1) *sense* 5'-tctagcctgtaatctggcactg-3' y *antisense* 5'-agaagcagaaccactcttcttcta-3' para la región -418/-231 (188 pb), 2) *sense* 5'-aacagagcaagactccttctcaag-3' y *antisense* 5'-cacaatgatagcttcttcttcttg-3' para la región -2861/-2747 (115 pb), y 3) *sense* 5'-ctccatttgctatgacctaagc-3' y *antisense* 5'-acgccagctactttttgtatfff-3' para la región -3167/-2978 (190 pb) (Fig. 13).

Los 4 fragmentos fueron amplificados a partir de 50 ng de DNA genómico, por medio de la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de punto final, utilizando los oligonucleótidos mencionados anteriormente a una concentración final de 1 pmol, MgCl₂ 1.5 mM, dNTPs 0.2 mM, buffer d PCR 1x y 2 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen). La amplificación de los fragmentos del promotor se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: 3 min a 94°C, 30 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 60°C y 3 min a 72°C, y finalmente 3 min a 72°C. El producto de la reacción se almacenó a -20°C hasta el análisis de los fragmentos obtenidos mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%. La reacción se realizó en el termociclador Veriti modelo 9902 (Applied Biosystems).

Clonación de fragmentos del promotor de *IL6*

Los productos de PCR obtenidos como se mencionó en el apartado anterior se clonaron en el vector *pGEM-T Easy* (Promega). Para la reacción de ligación se mezclaron 50 ng de vector de clonación (1 µl), 150 ng de los productos de PCR, buffer de ligación 2x (5 µl), 3 U de T4 DNA ligasa (1 µl) y H₂O desionizada estéril, en un volumen final de 10 µl. La mezcla se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Bacterias *E. coli* DH5α competentes fueron transformadas con 2 µl de la mezcla de ligación, incubando a 4°C durante 30 min. La mezcla de ligación/bacterias competentes se sometió a un choque térmico por 2 min a 42°C. Las bacterias fueron resuspendidas en medio LB (Life Technologies) e incubadas 1 h a 37°C en agitación. Las bacterias transformadas fueron incubadas 14-16 h a 37°C en cajas Petri con Bacto Agar (Becton Dickinson)-ampicilina (50 µg/ml).

El escrutinio de las colonias que habían incorporado el vector-inserto se realizó utilizando el sistema de PCR de colonia. Las colonias seleccionadas fueron recogidas y sembradas en placas con Bacto Agar. El remanente de la colonia se disolvió en una mezcla de reacción para PCR en un volumen final de 25 µl, que contenía oligonucleótidos específicos para cada fragmento clonado. Los productos amplificados de cada colonia se resolvieron en un gel de agarosa al 2%. Por otro lado, las cajas en donde se realizaron las réplicas se incubaron a 37°C durante 14-16 h para permitir el crecimiento de nuevas colonias. Finalmente, las colonias que contenían el plásmido

con el inserto de interés se crecieron en medio LB suplementado con ampicilina para purificar el DNA plasmídico utilizando el kit QIAprep Miniprep-kit (Qiagen). Todos los fragmentos contenidos en los vectores fueron secuenciados.

Ensayos de retardamiento electroforético (EMSA)

Se utilizaron extractos nucleares procedentes de GM-Mφs y M-Mφs diferenciados durante 6 días y estimulados con LPS durante 1 h, o extractos de células sin estimular como control. Los ensayos de retardamiento se realizaron utilizando las regiones -418/-231, -2861/-2747 y -3167/-2978 del promotor de *IL-6* como sondas. Estas construcciones, clonadas en el vector *pGEM-T Easy*, fueron utilizadas como DNA molde durante el marcaje radiactivo por PCR. Para realizar dicho marcaje se utilizaron 50 ng de DNA plasmídico purificado y los oligonucleotidos específicos para cada fragmento. En cada reacción de PCR se utilizaron las concentraciones de MgCl₂, Taq polimerasa y buffer de PCR previamente descritas y una mezcla de 3 dNTPs (dCTP, dGTP y dTTP) a la que posteriormente se añadió 1 µl de [α -³²P] dATP (10 µCi). Los amplificados obtenidos fueron precipitados con acetato de sodio 3.2 M pH 5.2 y etanol absoluto durante toda la noche a -20°C. El DNA precipitado se lavó con etanol 70%.

Las reacciones para formar los complejos DNA-proteína se llevaron a cabo incubando 5,000-10,000 cpm de cada sonda con 5 µg de extractos nucleares en 2 µl de buffer de unión 10x (Hepes 20 mM, NaCl 10 mM, DTT 1 mM, glicerol 5%, BSA 0.25 mg/ml y poli dl:dC 2 µg), durante 30 min a temperatura ambiente. Los complejos DNA-proteína fueron resueltos en geles de poliacrilamida al 5% no desnaturizantes, y visualizados por exposición de los geles deshidratados a películas de rayos X durante 24, 48 y 72 h a -80°C.

Adicionalmente, se realizaron ensayos de súper-retardamiento con la finalidad de demostrar la presencia de AhR en los complejos DNA-proteína observados. Para ello, los extractos nucleares se incubaron con 1 µg del mAb anti-AhR (Thermo Scientific) 15 min previos a la incubación con las sondas marcadas radiactivamente. Los complejos se resolvieron en geles de poliacrilamida no desnaturizantes y se revelaron en placas radiográficas a diferentes tiempos de exposición.

Eliminación transitoria de la expresión del AhR

Los GM-Mφs y M-Mφs diferenciados durante 6 días fueron transfectados con un siRNA contra AhR previamente validado (siAhR, J004990-07, Ambion Life Technologies), así como con un siRNA control (siCtrl, D001810-0X, Ambion Life Technologies). Para realizar los ensayos de transfección, el SN de los pozos de cultivo fue retirado y reemplazado con 200 µl de medio RPMI 1640 fresco suplementado con SFB 10%. Las células se incubaron a 37°C mientras se preparó la mezcla de siRNA en el siguiente orden: 200 µl de RPMI 1640 sin SFB, 6 µl de siRNA (concentración final 50 nM) y 12 µl del reactivo HiperFect® transfection reagent (Qiagen). Esta mezcla se homogeneizó cuidadosamente durante 10 seg y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, los 200 µl de la mezcla se añadieron a las células lentamente. Los Mφs se incubaron durante 6 h a 37°C en incubadora con atmósfera con 5% de CO₂. Una vez transcurridas las 6 h de incubación, se añadieron 800 µl de medio RPMI 1640 suplementado con SFB 10% y las células se incubaron durante 48 h adicionales, momento en el cual fueron colectadas para realizar los ensayos correspondientes.

Extracción de RNA a partir de macrófagos M1 y M2

El RNA se extrajo a partir de los Mφs diferenciados en presencia o ausencia de ANF, así como en presencia del siAhR o siCtrl con el kit NucleoSpin® RNA/Protein (Macherey-Nagel). Las células fueron lisadas con buffer de lisis RP1 con β-mercaptoetanol 1% y la suspensión se transfirió a una columna de filtración, la cual se centrifugó durante 1 min a 11,000 rpm. Posteriormente se añadió un volumen igual de etanol 70% al líquido filtrado, la mezcla fue transferida a una columna de afinidad para RNA, y se centrifugó 1 min a 11,000 rpm. Las proteínas totales contenidas en el líquido filtrado se purificaron con el buffer PP (Protein Precipitator) para su posterior análisis mediante WB. En paralelo a la precipitación de proteínas, a la columna de unión para ácidos nucleicos se le añadieron 350 µl de MDB (Membrane Desalting Buffer) y se centrifugó 1 min a 11,000 rpm. Posteriormente se realizaron 3 lavados, el primero con buffer de lavado RA2 y dos más con buffer de lavado RA3, centrifugándose a 11,000 rpm durante 1 min. La columna se transfirió a un tubo nuevo

y el RNA fue eluido con H₂O estéril libre de RNAsas. La concentración y pureza del RNA se determinó mediante espectrofotometría en un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

Reacción de retrotranscripción

La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo con 1 µg de RNA durante 1 h a 37°C en un volumen de 50 µl bajo las siguientes condiciones: 10 µl del buffer de reacción de la RT (5x), 5 µl de DTT (0.1 M), 1 µl de dNTPs (25 mM), 5 U de inhibidor de RNAsas, 0.5 µg de oligo dT y 200 U de la transcriptasa reversa Superscript (Gibco BRL). La reacción se realizó en el termociclador Veriti modelo 9902 (Applied Biosystems).

Ensayos de PCR en tiempo real

A partir del cDNA obtenido de la reacción de retrotranscripción, se cuantificó la expresión del mRNA de los genes *AHR*, *AHRR*, *CYP1B1* e *IL6* utilizando las sondas y oligonucleótidos prediseñados de Applied Biosystems (*TaqMan® Gene Expression Assays*). Las reacciones se llevaron a cabo conforme a las especificaciones establecidas por el fabricante, utilizando 25 ng de cDNA, TaqMan Gene Expression Assay buffer 1x, TaqMan Gene Expression Master Mix 1x y H₂O libre de RNAsas, en un volumen final de 20 µl. Se utilizaron sondas TaqMan comerciales validadas marcadas con el fluoróforo FAM (6-carboxyfluoresceína) y los ensayos se realizaron por triplicado. Adicionalmente, se evaluó la expresión de genes asociados con el fenotipo M1 (*SERPINE1*, *IDO1*, *FCER1A*, *CFS1*, *EGLN3*, *MMP12*, *ALDH1A2*, *IL1A*, *IL1B*, *IL6*, *TNF*, *IL12A*, *IL12B*, *IL23A*, *INHBA*, *CCL1*, *CCL17*, *CXCL10* y *CCR2*) y con el fenotipo M2 (*CD163*, *IL10*, *FOLR2*, *MAFB*, *IGF1*, *SERPINB2*, *STAB1*, *ETS2*, *CD36*, *EMR1*, *CMKLR1*, *SLC40A1*, *SLC46A1*, *FCGR1A*, *HMOX1*, *HAMP*, *CCL2* y *CCL8*).⁷⁶⁻⁷⁸ Los oligonucleótidos para estos genes se diseñaron de acuerdo al software de Roche Diagnostics y los cDNAs fueron cuantificados con sondas específicas marcadas con FAM (Universal Human Probe Roche library, Roche Diagnostics).

Las condiciones de PCR fueron: 10 min a 95°C, y 40 ciclos de 10 seg a 95°C y 30 seg a 60°C. Las reacciones de qRT-PCR se llevaron a cabo en el termociclador System Thermal Cycler 7500 (Applied Biosystems). Los valores de ΔCt (*cycle threshold*) se obtuvieron relativizando cada valor de Ct del gen problema al valor de Ct del gen de referencia *TBP* (*TATA binding protein*). Para comparar los niveles de transcritos entre dos condiciones problema se empleó la fórmula $QR = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$, donde la $\Delta\Delta Ct$ entre dos condiciones se calculó con la siguiente fórmula: $\Delta\Delta Ct_{(condición\ 1 - condición\ 2)} = (\Delta Ct_{gen-TBP})_{condición\ 1} - (\Delta Ct_{gen-TBP})_{condición\ 2}$.

Ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina

Los ensayos de ChIP se realizaron de acuerdo a las condiciones establecidas por el fabricante del kit Magna ChIP G (Millipore). Las células empleadas fueron M ϕ s M1 y M2 estimulados con LPS por 2 h o células sin estimular como control. Los M ϕ s fueron recolectados y fijados en suspensión a una densidad de 1×10^6 células/ml en medio RPMI 1640. El “crosslinking” se realizó con formaldehído 37% (Sigma-Aldrich, concentración final 1%) durante 10 min y se detuvo mediante la adición de glicina. Los M ϕ s se mantuvieron en hielo por 5 min y posteriormente se realizaron 2 lavados con PBS estéril. La pastilla resultante se deshidrató, se resuspendió en buffer de lisis (Magna ChIP kit, 300 μ l), y se incubó 15 min a 4°C. Las células se centrifugaron a 5,000 rpm por 5 min a 4°C y la pastilla resultante se resuspendió en 600 μ l de buffer de lisis nuclear con inhibidores de proteasas (Magna ChIP kit, protease inhibitor cocktail II). El volumen total se separó en 3 tubos eppendorf estériles. Las células se sonicaron con el sonicador Bioruptor (Diagenode) por 6 ciclos a potencia máxima (High); cada ciclo corresponde a 1 fase de 30 seg On/1 fase 30 seg Off. Las muestras fueron entonces centrifugadas a 14,000 rpm durante 15 min a 4°C y se recuperó el SN. Se tomó 1/10 del volumen total de las muestras para extraer el DNA mediante la técnica de fenol-cloroformo y se resolvió en un gel de agarosa al 2% con la finalidad de corroborar que los fragmentos de cromatina poseen un tamaño adecuado para una correcta inmunoprecipitación (200-1000 pb). Una vez corroborado el tamaño correcto de los fragmentos de cromatina, se agregaron 450 μ l de buffer de dilución y 1 μ g de un mAb anti-AhR grado ChIP (Abcam) o 1 μ g de un mAb control de isotipo. A esta

mezcla se añadieron 20 μ l de proteína G acoplada a perlas magnéticas (Magna ChIP kit) y las muestras fueron incubadas a 4°C en agitación constante. Tras 12 h de incubación, los complejos proteína G-Ab-cromatina fueron resuspendidos e incubados por 5 min con 500 μ l de cada uno de los tampones enlistados a continuación: 1. Low Salt Immune Complex Wash Buffer, 1 lavado. 2. High Salt Immune Complex Wash Buffer, 1 lavado. 3. LiCl Immune Complex Wash Buffer, 2 lavados. 4. Buffer TE, 1 lavado.

Después de la incubación con cada uno de los tampones, las muestras se colocaron en un rack magnético (Magna Grip Rack, 8 well) y se extrajo el SN. Las muestras fueron resuspendidas en 100 μ l de buffer de elución para ChIP + 1 μ l de proteinasa K e incubadas por 2 h a 62°C. Pasado este tiempo, las muestras se incubaron durante 10 min a 95°C y posteriormente a temperatura ambiente. Las muestras se colocan nuevamente en el rack magnético para eliminar las perlas magnéticas y recuperar el SN, a partir de los cuales se procedió a purificar el DNA. Se añadieron 100 μ l de reactivo de unión A y la mezcla se transfirió a una columna de filtrado (spin filter, Magna Kit ChIP) y se centrifugó a 10,000 rpm durante 30 seg. El SN fue desechado y se añadieron 500 μ l de buffer de lavado B a la columna, se centrifugó por 30 seg a 10,000 rpm y se desechó el filtrado. La columna fue centrifugada nuevamente por 30 seg 10,000 rpm para eliminar los restos de buffer y posteriormente se colocó dentro de un tubo de recolección estéril nuevo. Se añadieron 50 μ l de buffer de elución C y se centrifugó por 1 min a 10,000 rpm. El SN se almacenó a -20°C hasta su análisis por PCR con los oligonucleótidos específicos para las regiones del promotor de IL-6 descritos previamente. Adicionalmente se evaluó la región más proximal al TSS del gen con los oligonucleótidos *sense* 5'-acacagaagaactcagatgactgg-3' y *antisense* 5'-cagtgaccagattaacaggctaga-3', los cuales amplifican la región -188/-2 (187 pb).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando los paquetes Excel y GraphPad Prism 5. Se utilizó el test paramétrico *t* de Student para comparar los grupos de datos. Los valores se expresaron como la media \pm SD de distintos experimentos. Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Los macrófagos pro- y anti-inflamatorios expresan el AhR

En nuestro laboratorio se evaluó previamente el perfil genético asociado al linaje y polarización macrofágicos mediante ensayos de microarreglos de expresión con GM-M ϕ s y M-M ϕ s (GEO, no. acceso GSE68061; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), y detectamos que la expresión del factor de transcripción *AHR* y de su gen blanco *AHRR* era mucho mayor en M-M ϕ s derivados de monocitos CD14⁺CD16⁻ que en los GM-M ϕ s. En este trabajo confirmamos estos datos mediante qRT-PCR en varios donantes (Fig. 14A). Sin embargo, a nivel de proteína, los GM-M ϕ s y M-M ϕ s completamente diferenciados expresaron cantidades similares del AhR (Fig. 14B). Como se esperaba, TCDD indujo la degradación del AhR dependiente de ligando, pero esto no se observó en presencia de otro ligando de AhR reportado, la lipoxina A4.⁷⁹ (Fig. 14B). Además, detectamos frecuentemente que la mayoría del AhR se localizaba en el núcleo de ambas poblaciones celulares en condiciones basales (Fig. 14C) aunque en algunos donantes se observó incrementado en la fracción citoplásmica (datos no mostrados). La expresión del AhR no se detectó en monocitos recién aislados, pero sí se observó una vez que los monocitos habían iniciado el proceso de diferenciación hacia M ϕ s (Fig. 14D). De manera interesante, los niveles del AhR se encontraron incrementados en los monocitos cultivados en ausencia de las citocinas hematopoyéticas durante los primeros días de cultivo comparado con los detectados en los GM-M ϕ s y M-M ϕ s, pero sus niveles disminuyeron tras 3-4 días de cultivo a la vez que incrementaron progresivamente en los M ϕ s cultivados con GM-CSF o M-CSF (Fig. 14D). La expresión del AhR es dependiente de M-CSF en los M-M ϕ s, pero el bloqueo de esta citocina sólo disminuyó ligeramente los niveles del AhR en los GM-M ϕ s (Fig. 14E). En conjunto, estos datos indican que los GM-M ϕ s y M-M ϕ s expresan AhR y que este factor está constitutivamente activado en ambos tipos celulares. Además, M-CSF induce la expresión del AhR, aunque moléculas adicionales parecen contribuir a su expresión en los GM-M ϕ s.

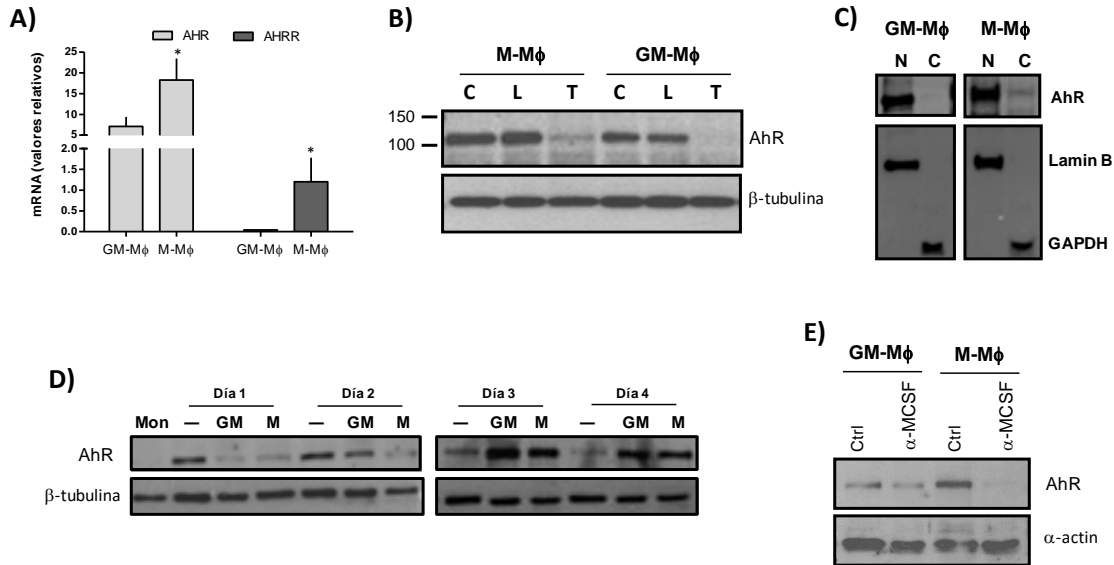


Figura 14. Expresión y activación del AhR en M-Mφs y GM-Mφs. Expresión del AhR in Mφs cultivados con M-CSF (M-Mφ o M) o GM-CSF (GM-Mφ o GM). A) Niveles de expresión de *AHR* y *AHRR* en Mφs diferenciados durante 6 días. Se muestra la media \pm SD de 5 donantes independientes. B) Mφs diferenciados por 6 días fueron tratados durante 24 h adicionales con vehículo (C), lipoxina A4 (L) o TCDD (T). La expresión de AhR se valuó en lisados totales de M-Mφs y GM-Mφs. C) Localización del AhR en las fracciones nucleares (N) o citoplásmicas (C) de M-Mφs y GM-Mφs diferenciados durante 6 días. Lamin B y GAPDH se usaron como controles de carga para las fracciones nucleares y citoplásmicas, respectivamente. D) Cinética de expresión de AhR en monocitos recién aislados (Mon), cultivados en ausencia de citocinas (-), en presencia de GM-CSF (GM) o de M-CSF (M) durante 1-4 días. β -tubulina se empleó como control de carga en B) y C). E) Efecto del M-CSF sobre la inducción del AhR. Monocitos recién aislados fueron cultivados durante 2 días con GM-CSF (GM-Mφs) o M-CSF (M-Mφs), en presencia de un mAb neutralizante anti-M-CSF (α -M-CSF) o un mAb irrelevante control de isotipo (Ctrl). α -actina se empleó como control de carga. Se muestra el resultado de un experimento representativo de 3 (B, E), 5 (C) o 2 (D) realizados. Estadística: * $p < 0.05$.

Influencia de la inhibición del AhR sobre la expresión de marcadores asociados a los fenotipos polarizados

La activación constitutiva del AhR en ambas subpoblaciones de Mφs podría modular las características de los diferentes fenotipos obtenidos en presencia de las citocinas polarizantes, tal como sucede con otros linajes del sistema inmune como los linfocitos Th17 y Treg⁴⁹ al estimular al AhR con diferentes ligandos. Por tal motivo, decidimos evaluar si la presencia del antagonista químico del AhR ANF durante el proceso de diferenciación de los Mφs modificaba la expresión de marcadores de superficie

asociados con las subpoblaciones de GM-M ϕ s (CD1a) y M-M ϕ s (CD14, CD206, CD163). Mediante la técnica de citometría de flujo (Fig. 15), se determinó que la inhibición del AhR con ANF no modificaba de manera significativa la expresión de los marcadores evaluados. El resultado de estos experimentos sugiere que el AhR no influye de manera importante en la obtención de los fenotipos pro- y anti-inflamatorios mediada por la acción de las citocinas hematopoyéticas GM-CSF y M-CSF, respectivamente.

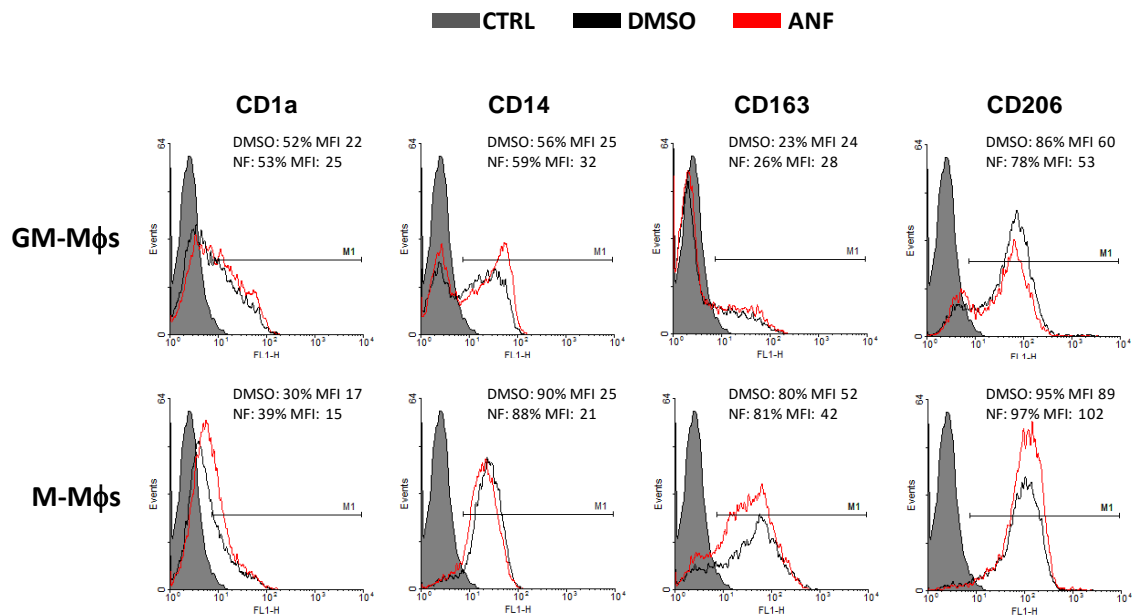


Figura 15. Evaluación de la expresión de marcadores de superficie en GM-M ϕ s y M-M ϕ s. Los GM-M ϕ s y M-M ϕ s fueron diferenciados en presencia (histogramas rojos) o ausencia (histogramas negros, DMSO) de ANF durante 6 días, transcurridos los cuales se evaluó la expresión de los marcadores indicados en la parte superior de cada histograma. Como control de isotipo se utilizó un mAb irrelevante (histogramas grises).

Adicionalmente, se evaluó la expresión de 19 genes asociados al fenotipo M1 y 18 relacionados con el fenotipo M2⁷⁶⁻⁷⁸ en dos donantes independientes. De ellos, 17 genes M1 (89%) y 14 genes M2 (78%) mostraron la misma variación en los dos donantes en presencia de ANF, los cuales están representados en la Fig. 16. En los GM-Mφs, la inhibición de la actividad del AhR con ANF a lo largo del proceso de diferenciación incidió específicamente en genes asociados con el fenotipo M2, disminuyendo la expresión de 10 de los mismos (71%) sin inducir la expresión de ninguno. Adicionalmente se detectaron variaciones en genes relacionados con el fenotipo M1 con un patrón poco claro, incrementando 5 y disminuyendo 8 de ellos. En los M-Mφs, la inhibición de la actividad del AhR mostró un perfil de activación o inhibición de la expresión génica irregular, modulando la expresión de 6 genes M2 (3 inducidos y 3 suprimidos) y de 13 genes M1 (7 inducidos y 6 suprimidos). En conjunto, estos datos sugieren que la actividad del AhR, en términos de marcadores génicos asociados con la polarización de los Mφs, incide específicamente en el perfil de los GM-Mφs, induciendo la expresión de marcadores asociados al fenotipo M2.

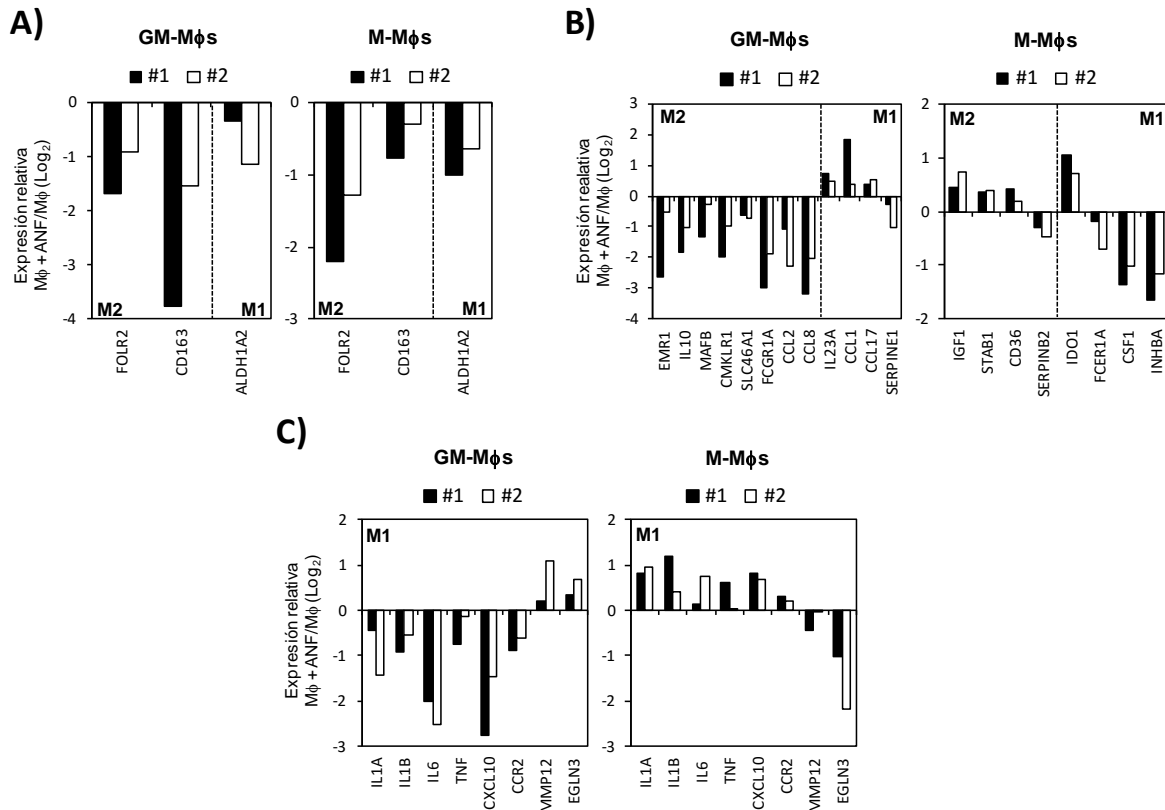


Figura 16. Expresión relativa del mRNA de diferentes genes asociados con los fenotipos M1 y M2 en los GM-Mφs y M-Mφs. La expresión de los genes indicados en las distintas gráficas fue evaluada mediante qRT-PCR en los GM-Mφs y M-Mφs diferenciados durante 6 días en presencia o ausencia de ANF. Se muestran los valores relativos de la expresión de cada gen en las células tratadas con ANF frente a las células tratadas con el vehículo DMSO en valores logarítmicos (Log₂). De esta forma, los genes cuya expresión se encuentra suprimida por la acción de la ANF presentan valores negativos, mientras que los inducidos por el antagonista de AhR se expresan con valores positivos. A) Genes asociados con los fenotipos M1 y M2 que son regulados de la misma forma por ANF en los GM- y M-Mφs. B) Genes regulados exclusivamente en los GM-Mφs o M-Mφs. C) Genes regulados de manera inversa en los GM-Mφs y M-Mφs.

Efecto de la inhibición del AhR sobre la capacidad fagocítica de los macrófagos

Con el fin de determinar si la acción del AhR estaba ligada a la funcionalidad de los Mφs se evaluaron diferentes actividades asociadas a estas células: capacidad de fagocitosis, capacidad citotóxica y secreción de citocinas en respuesta a LPS. Los Mφs fueron diferenciados en todos los casos en presencia o ausencia de ANF. Para

evaluar la capacidad fagocítica de los Mφs, éstos fueron incubados en presencia de zimósán acoplado a FITC y se evaluó la incorporación de las partículas fluorescentes en una cinética de 0 hasta 4 h (Fig. 17). Como se esperaba, los M-Mφs presentaron un nivel incrementado en el porcentaje de células que internalizaron zimósán con respecto a los GM-Mφs. Sin embargo, la presencia de ANF no modificó los resultados obtenidos en las condiciones control (Fig. 17), por lo que concluimos que AhR no está involucrado en la función fagocítica de los Mφs, al menos en lo que respecta a la internalización de partículas de levadura.

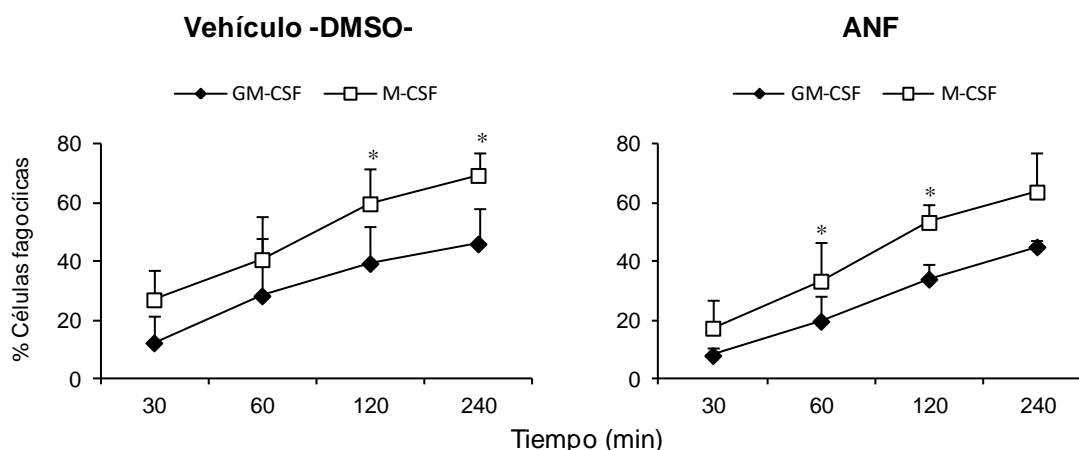


Figura 17. Cinética de fagocitosis de partículas de zimósán. Los GM-Mφs y M-Mφs generados en ausencia (vehículo, DMSO) o presencia de ANF fueron colectados en el día 6 de cultivo y se realizaron los ensayos de fagocitosis de FITC-zym. Las células se evaluaron a las 0, 0.5, 1, 2 y 4 h tras su exposición a FITC-zym mediante ensayos de citometría de flujo. Se muestra el porcentaje de células fluorescentes en cada tiempo evaluado, que se obtuvo de la sustracción entre el porcentaje obtenido en las células incubadas a 37°C y las incubadas a 4°C. Los resultados representan la media \pm SD de 3 donantes independientes. Estadística: * $p < 0.05$.

Inhibición del crecimiento tumoral

La capacidad citotóxica/citostática de los Mφs, una función que se encuentra favorecida en los GM-Mφs,⁷⁶ se evaluó sobre la línea celular de cáncer colorectal KM12c. Los experimentos se realizaron obteniendo el medio de cultivo condicionado de los GM-Mφs y M-Mφs generados en presencia o ausencia de ANF e incubando

este medio con las células KM12c durante 72 h, para posteriormente evaluar el porcentaje de células viables por análisis con MTT. De manera esperada, los SNs de los GM-Mφs mostraron efectos citotóxicos superiores a los SNs de los M-Mφs (Fig. 18A). La adición de ANF a lo largo del cultivo tendió a disminuir la actividad citotóxica de ambos SNs, pero las diferencias no fueron significativas. En paralelo, los niveles de activina A secretados por los GM-Mφs y M-Mφs a lo largo del proceso de diferenciación, una citocina que media parcialmente la actividad citotóxica de los GM-Mφs,⁷⁶ no variaron en presencia de ANF (Fig. 18B). Estos datos, conjuntamente con los resultados anteriores, sugieren que la actividad del AhR no está involucrada en funciones relacionadas con la polarización de los Mφs como la fagocitosis (M2) o la citotoxicidad (M1).

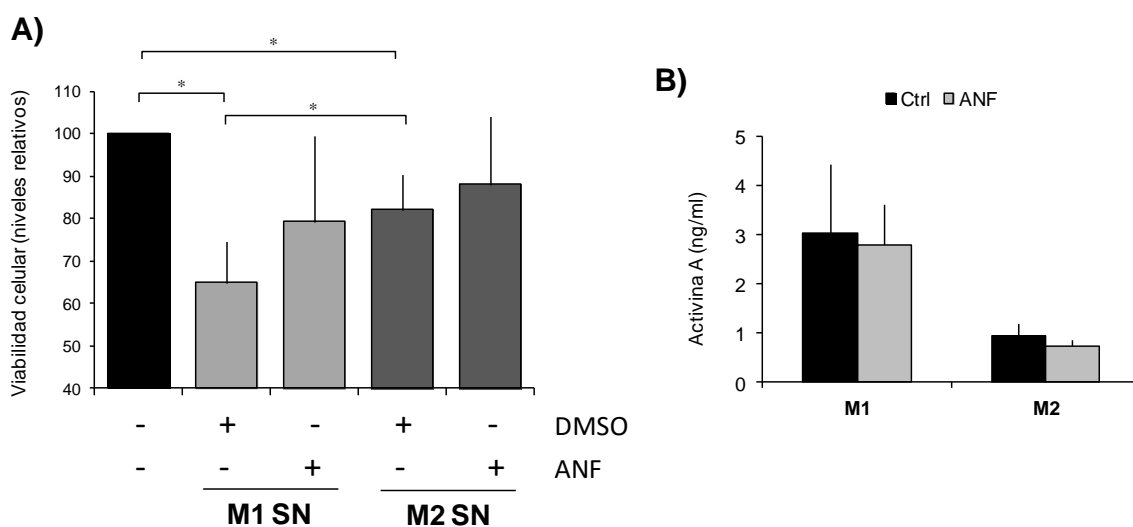


Figura 18. Evaluación de la capacidad citotóxica de los Mφs. Los Mφs fueron diferenciados en presencia de ANF o con vehículo (DMSO). A) Los SNs de los GM-Mφs (M1) y M-Mφs (M2) fueron colectados en el día 6° de cultivo y se incubaron durante 72 h con la línea celular KM12c. Como control negativo, las células KM12c se incubaron con el medio fresco empleado para el cultivo de los Mφs (barra negra). Se muestra el porcentaje de células KM12c viables tras su incubación con los SNs de los GM-Mφs (barras grises claras) o de los M-Mφs (barras grises oscuras). B) Niveles de activina A en los SNs de los GM-Mφs (M1) y M-Mφs (M2) generados durante 6 días de diferenciación, cultivados en ausencia (Ctrl) o presencia de ANF, evaluados mediante ELISA. Los resultados de A) y B) representan la media \pm SD de 3 donantes independientes. Estadística: * $p < 0.05$.

La presencia de ANF modifica de forma diferencial la secreción de IL-6 en los macrófagos polarizados

La implicación de la actividad del AhR en la producción de varias citocinas pro- y anti-inflamatorias ha sido ampliamente reportado.^{62,80} Por lo tanto, en este trabajo analizamos si los GM-Mφs o M-Mφs alteraban su producción de citocinas en presencia de ANF. Observamos que la producción de TNF e IL-8 inducida tras la estimulación de las células con LPS no se modificó cuando la actividad del AhR fue bloqueada a lo largo del proceso de diferenciación de los Mφs (Fig. 19A). Sin embargo, la inhibición de la actividad del AhR disminuyó la producción de IL-6 (sólo en los GM-Mφs) e IL-10 (en los GM-Mφs y M-Mφs) (Fig. 19A).

De manera subsecuente, enfocamos nuestro estudio en la evaluación de la producción de IL-6, ya que el papel positivo del AhR sobre la transcripción de IL-10 ha sido ampliamente demostrado en varios sistemas celulares,^{52,81} pero su contribución a la síntesis de IL-6 parece ser dependiente del tipo celular analizado.^{81,82} Exploramos entonces los niveles basales de transcritos de *IL6* en los dos subtipos de Mφs, así como tras 2 h de estimulación de las células con LPS (Fig. 19B). En los M-Mφs no se detectaron transcritos de *IL6* en condiciones basales comparado con los GM-Mφs, pero las diferencias con estos últimos disminuyeron tras la estimulación con LPS (Fig. 19B, panel izquierdo). Como era de esperar, los M-Mφs mostraron un incremento de los transcritos de *IL10* con respecto a los GM-Mφs tanto en condiciones basales como tras el tratamiento con LPS (Fig. 19B, panel derecho). Estos datos indican que el *locus* de *IL6* permanece transcripcionalmente poco activo o inactivo en los M-Mφs comparado con los GM-Mφs en condiciones basales, y que el LPS proporciona una señal de activación para la transcripción de este gen.

Posteriormente evaluamos la influencia de ANF sobre la transcripción basal de *IL6*, así como la inducida por LPS. En estos experimentos ANF fue añadida a los Mφs completamente diferenciados 2 h antes de la adición de LPS. A tiempos tempranos tras la adición de ANF (4-6 h), los GM-Mφs no estimulados con LPS incrementaron sus niveles de transcritos de *IL6*, un efecto que no se detectó a tiempos tardíos (14 h) (Fig. 19C). Sin embargo, ANF no varió de manera importante el nivel de transcritos de *IL6* inducidos por LPS (Fig. 19C). De igual manera, los M-Mφs expuestos a ANF no modificaron e incluso incrementaron las cantidades de mRNA de *IL6* tras la

estimulación con LPS comparado con las células no tratadas con el antagonista (Fig. 19C). Los M-Mφs no estimulados con LPS disminuyeron a tiempos tempranos (4 h) o mantuvieron (6-14 h) sus niveles de transcritos de *IL6*. Por lo tanto, el AhR parece ejercer un efecto diferencial sobre la síntesis de *IL6* en los GM-Mφs y M-Mφs sólo en condiciones basales, y su actividad positiva en la síntesis de IL-6 en los GM-Mφs tras el estímulo con LPS podría llevarse a cabo a niveles distintos de su acción transcripcional.

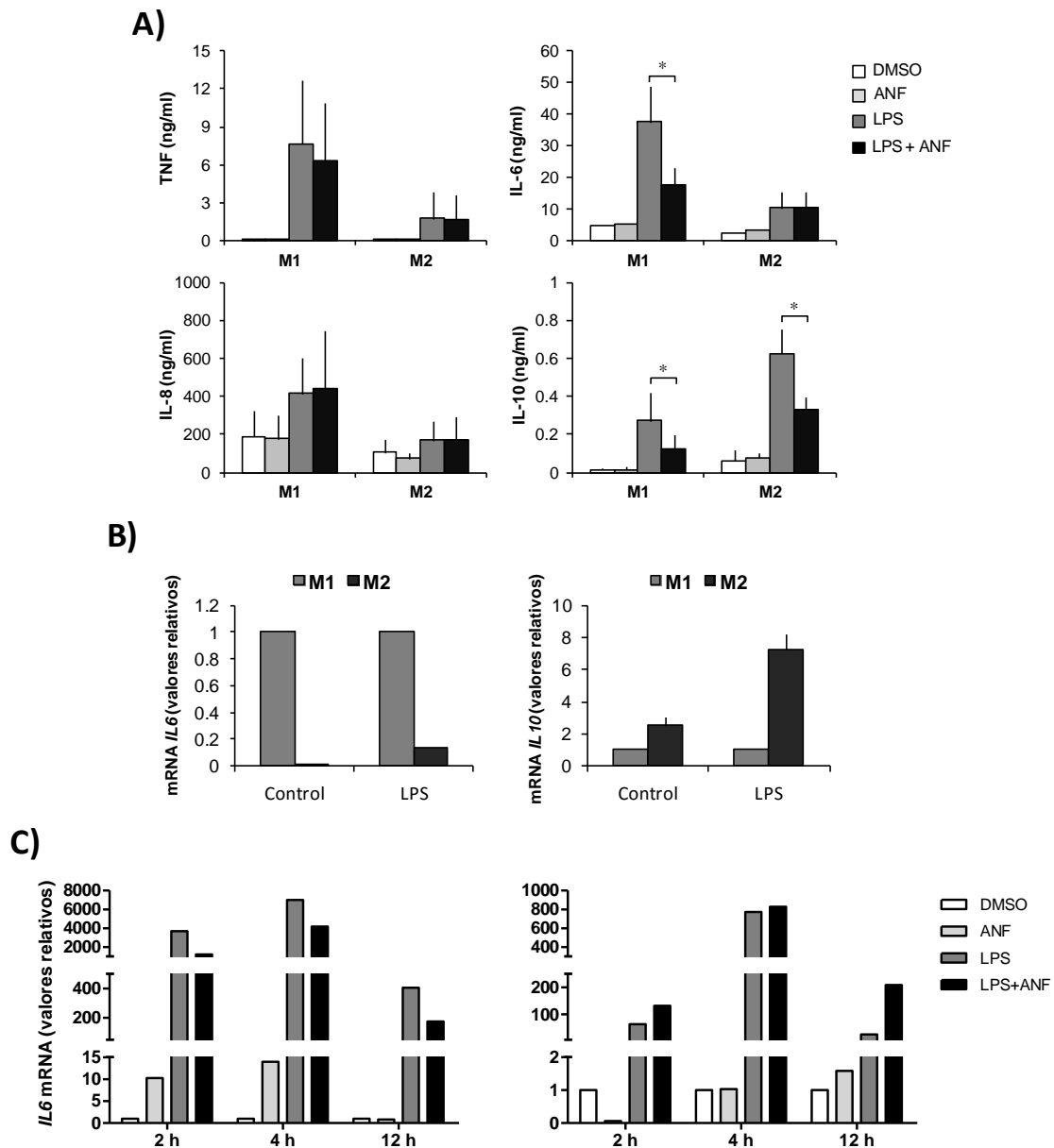


Figura 19. El AhR regula diferencialmente la síntesis de IL-6 en los GM-Mφs y M-Mφs. A) Efecto del antagonista de AhR ANF sobre la secreción de citocinas en los GM-Mφs (M1) y M-Mφs (M2). Los Mφs fueron diferenciados en presencia del vehículo (DMSO) o ANF. En el día 5 de cultivo las células fueron estimuladas con LPS y los SNs de cultivo fueron recolectados 18 h después. Como control se emplearon células cultivadas en ausencia de LPS. La cantidad de TNF, IL-6, IL-8 e IL-10 se evaluó mediante la técnica de ELISA. Los resultados representan la media \pm SD de 3-5 donantes independientes. Estadística: * $p < 0.05$. B) Expresión relativa del mRNA de *IL6* e *IL10* en GM-Mφs (M1) y M-Mφs (M2) sin estimular (control) o estimulados con LPS por 2 h, determinada por qRT-PCR en un donante representativo de 2 evaluados. En las gráficas se representa el nivel de dichos transcritos en los Mφs M2 relativo al detectado en los Mφs M1. C) Expresión relativa del mRNA de *IL6* en GM-Mφs y M-Mφs determinada por qRT-PCR en un donante representativo de 2 evaluados. Los GM-Mφs (panel izquierdo) y los M-Mφs (panel derecho) fueron diferenciados durante 6 días, y tratados con vehículo (DMSO) o ANF 2 h antes de la adición de LPS. Las células cultivadas en ausencia de LPS fueron utilizadas como control. Dos, 4 o 12 h tras la adición de LPS las células se colectaron, se aisló su RNA, y se evaluó la cantidad de transcritos de *IL6*. En las gráficas se representa el nivel de dichos transcritos relativo al detectado en los Mφs tratados con DMSO.

La supresión de la expresión del AhR disminuye la secreción de IL-6 en los GM-Mφs estimulados con LPS

Para confirmar los datos anteriores, generamos Mφs deficientes de AhR mediante el empleo de un siRNA contra el mRNA de *AHR* (siAhR) después de los 6 días de diferenciación. El siAhR disminuyó la expresión del mRNA de *AHR* $62 \pm 4\%$ en los GM-Mφs y $75 \pm 16\%$ en los M-Mφs con respecto a los Mφs transfectados con un siRNA control (siCtrl) (Fig. 20A). La disminución de la expresión del mRNA de *AHR* estuvo acompañada de un decremento en los niveles de transcripción de su gen blanco *AHRR*, pero los niveles de transcritos de *CYP1B1*, un gen blanco de AhR en respuesta a TCDD, permanecieron inalterados (Fig. 20A). Cuarenta y ocho h después de la transfección con los siRNAs, el AhR fue indetectable en los GM-Mφs y sus niveles disminuyeron de manera significativa en los M-Mφs a nivel de proteína (Fig. 19B). De acuerdo con los datos obtenidos con ANF (Fig. 19A), los GM-Mφs deficientes de AhR mostraron una disminución en la producción de IL-6 12 h después de su exposición a LPS con respecto a los GM-Mφs tratados con el siCtrl, mientras que los niveles de IL-6 en los M-Mφs en respuesta a LPS fueron bajos y no cambiaron significativamente en ausencia de AhR (Fig. 20C). De manera notable, cuando analizamos la cantidad de transcritos de *IL6* en los GM-Mφs, detectamos un incremento significativo de los mismos en las células control deficientes de AhR,

mientras que tras la estimulación con LPS no se observaron diferencias importantes entre los GM-Mφs tratados con siCtrl o siAhR (Fig. 20D). Estos datos corroboran los representados en la Fig. 19B en los GM-Mφs tratados con ANF. En relación a los M-Mφs, en las células estimuladas con LPS a distintos tiempos se detectó una tendencia a incrementar los niveles de transcritos de *IL6* en ausencia del AhR con respecto a las células tratadas con el siCtrl (Fig. 20D), pero las diferencias no fueron significativas. Estos datos indican que el AhR controla negativamente la expresión del mRNA de *IL6* en los GM-Mφs en condiciones control, mientras que tras la estimulación con LPS el AhR no parece tener un efecto en la transcripción de *IL6* en los GM-Mφs. Adicionalmente, los datos sugieren que el AhR podría tener un efecto negativo sobre la transcripción de *IL6* en los M-Mφs tratados con LPS.

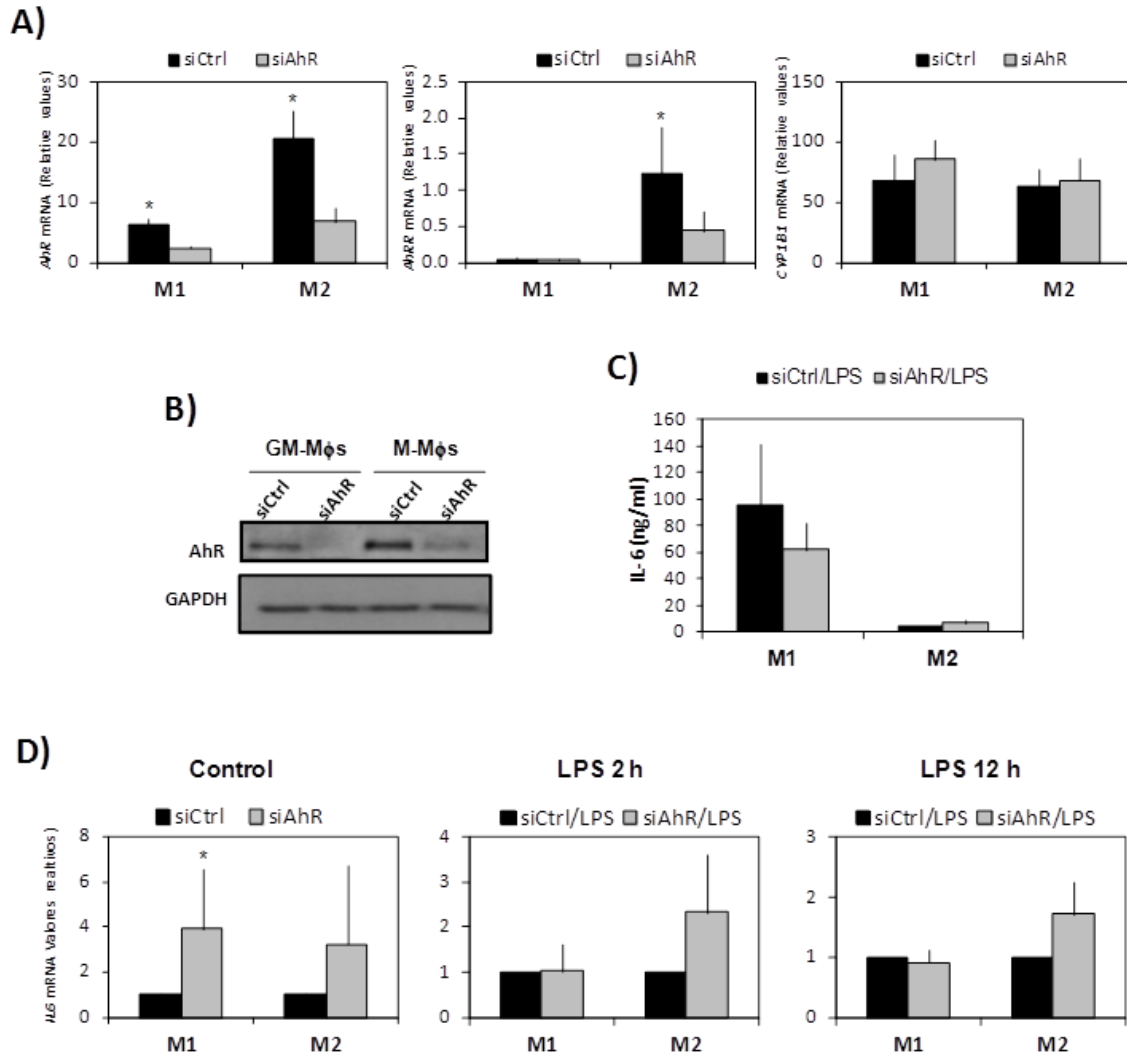


Figura 20. La expresión deficiente de AhR modifica diferencialmente la producción de IL-6 en los GM-Mφs y M-Mφs. Los GM-Mφs (M1) y M-Mφs (M2) fueron tratados durante 48 h con un siRNA dirigido contra AhR (siAhR) o con un siRNA control (siCtrl). A) Los Mφs fueron colectados tras 48 h de transfección y se evaluó la expresión de los mRNAs de *AHR*, *AHRR* and *CYP1B1* mediante qRT-PCR. Los resultados se muestran como la expresión de cada gen relativa a la del gen *TBP*. B) Niveles de AhR en GM-Mφs y M-Mφs tras 48 h de transfección con siCtrl o siAhR, evaluados por WB. Como control de carga se utilizó un mAAb anti-GAPDH. Se muestra el resultado de un experimento representativo de 4 realizados. C) Producción de IL-6 en los Mφs M1 and M2 transfectados con siCtrl or siAhR, y estimulados con LPS durante 12 h. D) Detección del mRNA de *IL6* en los Mφs M1 y M2 transfectados con siCtrl o siAhR sin estimular (Control, panel izquierdo), o estimulados durante 2 h (panel central) o 12 h (panel derecho) con LPS. Se muestra la expresión de *IL6* en los Mφs transfectados con siAhR con respecto a los transfectados con siCtrl, y los resultados representan la media \pm SD of 6 (Control), 5 (LPS 2 h) o 4 (LPS 12 h) donantes independientes.

El AhR se une al promotor del gen de *IL6* en los macrófagos polarizados

Existen reportes en la literatura que demuestran que el AhR posee la capacidad de unirse directamente al promotor de *IL6* y de esta forma regula su expresión en respuesta a ciertos estímulos.^{48,70} Por tal motivo, decidimos evaluar si la regulación diferencial de esta citocina en los Mφs polarizados con GM-CSF y M-CSF se llevaba a cabo a través de la unión diferencial del AhR al promotor de *IL6* mediante ensayos de ChIP.

Inicialmente realizamos un análisis computacional de la región -3303/+68 del promotor de *IL6* con el fin de delimitar posibles sitios de unión al AhR. La evaluación de los datos con el programa MatInspector indicó que existían dos sitios AHRE putativos localizados en las regiones -2793/-2789 (3' tggatttttcgCGTGgagagctcat, AhR/ARNT, score: 0.93) y -3069/-3065 (5' aggccgaggcgCGTGgatcacctga, NFX/ARNT, score: 0.91). Diseñamos 4 pares de oligonucleótidos para amplificar: 1) una región de DNA cercana al TSS principal, la cual incluye las dos cajas TATA y sitios de unión a κB and Sp1, 2) una región que contiene un elemento AHRE -330/-326 (5' cTTCGTGCaTG) descrito por DiNatale *et al.*,⁷⁰ el cual tiene un nivel basal de ocupación en la línea celular humana de cáncer de mama MCF-7, y que incluye también una secuencia consenso para AP-1, 3) una región de DNA con el primer elemento AHRE probable, y 4) una región con el segundo sitio AHRE probable rodeado por elementos de unión a Sp1 y κB (Fig. 13 y 21A).

Una vez realizado el análisis computacional del promotor de *IL6*, realizamos ensayos de ChIP con un mAb anti-AhR en los GM-Mφs y M-Mφs en ausencia de estímulo o estimulados durante 2 h con LPS, y amplificamos las 4 regiones del promotor mencionadas. El AhR se encontró unido a todas las regiones evaluadas en los GM-Mφs en condiciones control, pero esta unión se vió disminuida cuando las células fueron estimuladas con LPS (Fig. 21B, panel izquierdo). Notablemente, el AhR fue inmunoprecipitado en el fragmento 1, el cual no contiene sitios AHRE. Sin embargo, el comportamiento del AhR fue similar en este fragmento con respecto a las regiones que contenían sitios AHRE putativos, tanto en los GM-Mφs como en los M-Mφs. De manera contraria, AhR no se detectó unido a ninguna de las regiones evaluadas en los M-Mφs no estimulados (sólo se detectó ligeramente en el fragmento 4), pero se

observó un enriquecimiento del receptor en las 4 regiones tras la estimulación con LPS (Fig. 21B, panel derecho).

Posteriormente realizamos ensayos de retardamiento y de súper-retardamiento con un mAb anti-AhR, utilizando los 3 fragmentos que contenían sitios AHRE putativos (2, 3 y 4) como sondas (Fig. 21C y 22). Los extractos nucleares de los GM-Mφs y M-Mφs formaron complejos con el fragmento 2 en condiciones control y en condiciones de estimulación con LPS. Sin embargo, estos complejos DNA-proteína incluyeron el AhR sólo en los GM-Mφs control (Fig. 21C, líneas 3 and 4) y en los M-Mφs estimulados con LPS (Fig. 21C, líneas 11 and 12). Un patrón de unión similar se detectó con los fragmentos 3 y 4, con excepción del fragmento 3 incubado con los extractos nucleares de los M-Mφs estimulados con LPS en el cual no se detectó un claro súper-retardamiento del complejo (Fig. 22).

Colectivamente, estos datos indican que hay una ocupación basal (en ausencia de estímulo) del AhR del promotor de *IL6* en los GM-Mφs, la cual se pierde tras la estimulación con LPS, mientras que la situación contraria se detecta en los M-Mφs.

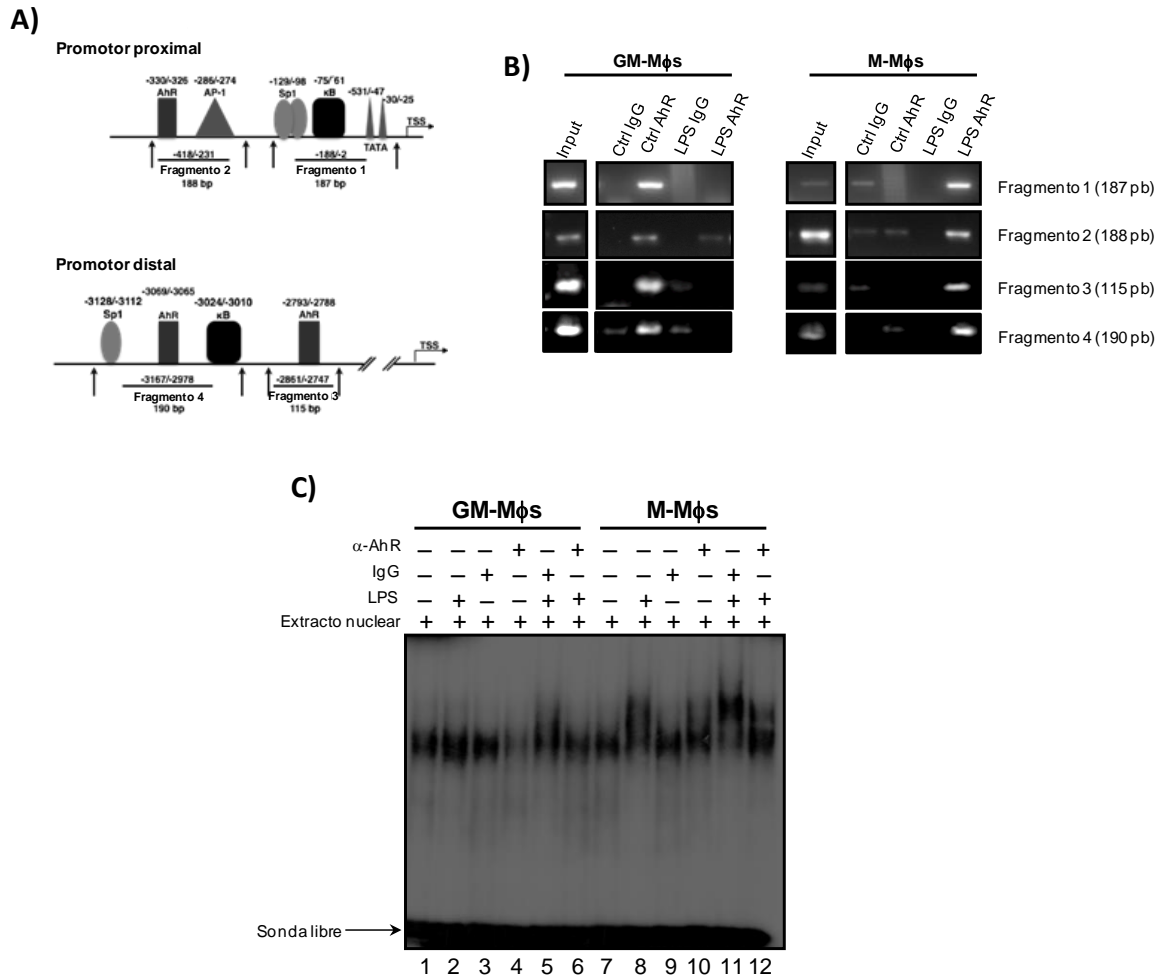


Figura 21. Reclutamiento diferencial del AhR al promotor de *IL6* en los GM-Mφs y M-Mφs. A) Análisis de algunos de los sitios de unión de distintos factores de transcripción en el promotor de *IL6* humano, de acuerdo con los resultados obtenidos a partir del software MatInspector. B) Ensayos de CHIP sobre el promotor de *IL6* en los GM-Mφs y M-Mφs control (Ctrl) y en células estimuladas durante 2h con LPS. El AhR fue inmunoprecipitado con un mAb, y las 4 regiones del DNA especificadas en A) fueron amplificadas. Como control negativo de la inmunoprecipitación se utilizó un mAb irrelevante del mismo isotipo que el mAb anti-AhR (IgG). Se muestra el resultado de un experimento representativo de 3 realizados. C) El fragmento 2 del promotor de *IL6* se marcó radiactivamente y se utilizó en experimentos de EMSA con extractos nucleares de GM-Mφs (líneas 1-6) y M-Mφs (líneas 7-12), los cuales fueron obtenidos a partir de células no estimuladas (líneas 1, 3, 4, 7, 9 y 10) o estimuladas con LPS durante 1 h (líneas 2, 5, 6, 8, 11 y 12). Las reacciones de unión DNA-proteína se llevaron a cabo en presencia de un mAb anti-AhR (α -AhR, líneas 4, 7, 10 y 12) o de un mAb control de isotipo (IgG, líneas 3, 5, 9 y 11). Se indica también la posición de la sonda libre.

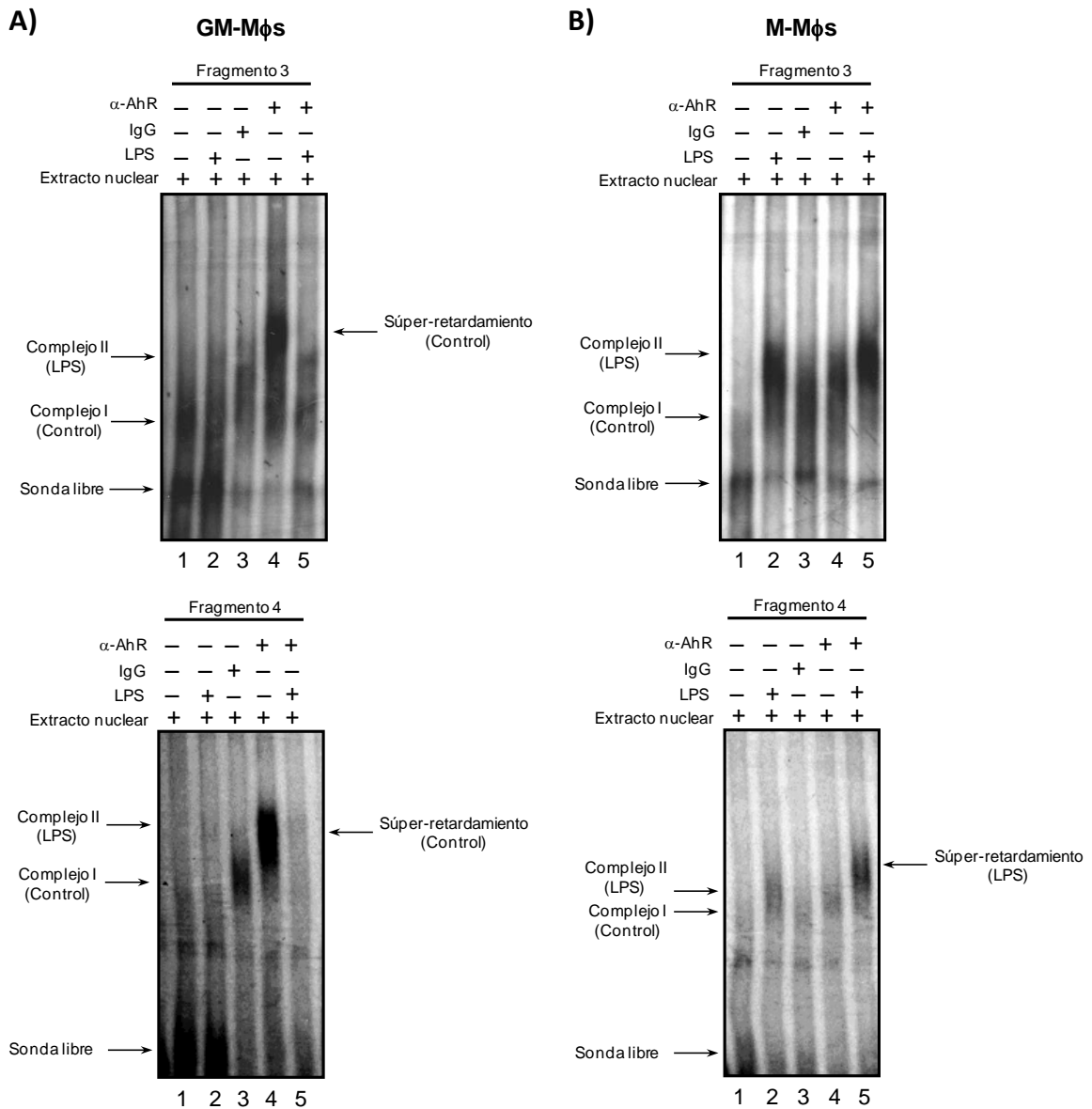


Figura 22. El AhR forma complejos con el promotor de *IL6* en los GM-Mφs y en los M-Mφs en diferentes condiciones. Los fragmentos 3 y 4 del promotor de *IL6* se marcaron radiactivamente y se utilizaron en experimentos de EMSA con extractos nucleares de GM-Mφs y M-Mφs obtenidos a partir de células no estimuladas (líneas 1, 3, y 4) o estimuladas con LPS durante 2 h (líneas 2 y 5). Las reacciones de unión DNA-proteína se llevaron a cabo en presencia de un mAb anti-AhR (α-AhR, líneas 4 y 5) o de un mAb control de isotipo (IgG, línea 3). Se indica la posición de los complejos detectados en condiciones control y de estimulación con LPS, así como la posición de los complejos obtenidos en presencia del mAb anti-AhR (súper-retardamiento) y de la sonda libre.

Debido al comportamiento similar que detectamos con respecto a la unión del AhR a los distintos fragmentos del promotor de *IL6* evaluados, incluido al fragmento 1 que no contiene secuencias AHRE, quisimos comprobar la especificidad del mAb utilizado en los ensayos de ChIP. Para ello, realizamos estos mismos ensayos empleando los GM-Mφs en condiciones control. Estos Mφs fueron tratados con ANF 3 h antes de realizar los ensayos de ChIP, con la hipótesis de que el antagonista del AhR podría prevenir el reclutamiento del receptor al núcleo y, por lo tanto, a los distintos fragmentos del promotor. Como se muestra en la Fig. 23, el AhR se detectó en los 4 fragmentos del promotor de *IL6* en ausencia de ANF, mientras que su reclutamiento disminuyó total o parcialmente en presencia del antagonista de AhR.

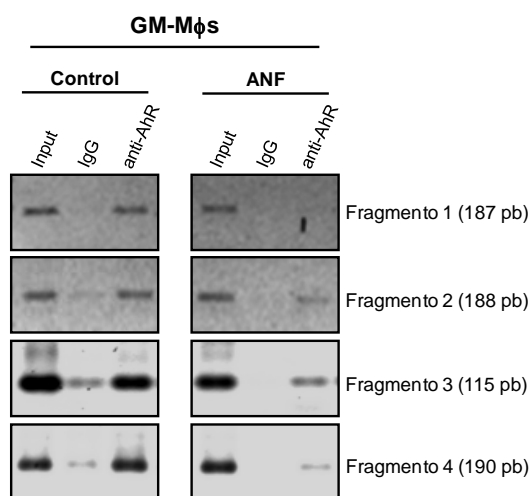


Figura 23. La unión del AhR al promotor de *IL6* es inhibida tras el tratamiento de los GM-Mφs con ANF. Ensayos de ChIP sobre el promotor de *IL6* en los GM-Mφs no estimulados, en ausencia (Ctrl) o presencia de ANF añadida 3 h antes de la recolección de las células. El AhR fue inmunoprecipitado con un mAb, y las 4 regiones del DNA especificadas en la Fig. 20A fueron amplificadas. Como control negativo de la inmunoprecipitación se utilizó un mAb irrelevante del mismo isotipo que el mAb anti-AhR (IgG). Se muestra el resultado de un experimento representativo de 2 realizados.

Finalmente, quisimos comprobar si la unión diferencial del AhR al promotor de *IL6* en los GM-Mφs y M-Mφs estaba relacionada con alteraciones en su localización subcelular. Datos preliminares realizados con dos donantes independientes reflejaron que tras 2 h de activación con LPS el AhR disminuye sus niveles en el citoplasma de

ambos tipos celulares. Sin embargo, la presencia del AhR en el núcleo celular disminuyó sólo en los GM-Mφs, mientras que se mantuvo en los M-Mφs (Fig. 24). Por lo tanto, es posible que los niveles diferenciales del AhR en el núcleo de los GM-Mφs y M-Mφs sean responsables del distinto comportamiento observado en los ensayos de ChIP en estos tipos celulares en presencia de LPS. Sin embargo, son necesarios experimentos de cinética de expresión del AhR tras la estimulación con LPS más largos para comprobar si los niveles de este receptor se recuperan en los GM-Mφs.

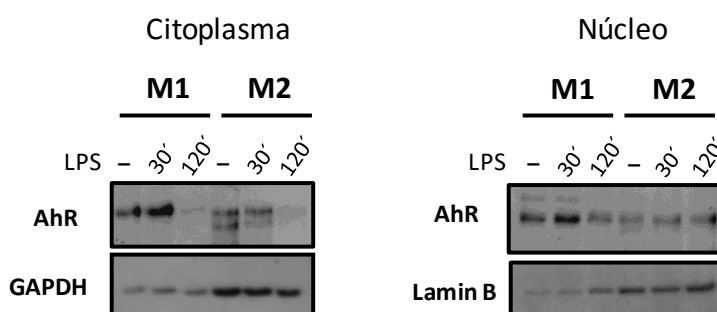


Figura 24. El LPS modifica diferencialmente la expresión del AhR en los GM-Mφs y en los M-Mφs. Cinética de expresión del AhR en el citoplasma (paneles izquierdos) y en el núcleo (paneles derechos) en condiciones basales (-) y tras 30 o 120 min de estimulación con LPS en los GM-Mφs (M1) y M-Mφs (M2), evaluada mediante ensayos de WB. GAPDH y lamin B se utilizaron como controles de carga de las fracciones citoplásmicas y nucleares, respectivamente. Los resultados mostrados corresponden a los de un donante representativo de 2 evaluados.

DISCUSIÓN

Desde su descubrimiento, hace más de tres décadas, el estudio del AhR había estado restringido casi de manera exclusiva a los campos de la Toxicología y la Farmacología,⁸³ debido al papel de esta proteína en la respuesta a contaminantes ambientales. La relevancia del AhR en procesos fisiológicos diferentes de los involucrados en el metabolismo de agentes xenobióticos no había sido considerada en estudios sistemáticos hasta la observación de las diversas anomalías desarrolladas por los ratones deficientes de este factor de transcripción y el descubrimiento de ligandos endógenos.⁸⁴ Actualmente existe evidencia creciente que sugiere que el AhR regula de forma importante la respuesta inmune inflamatoria, modulando múltiples vías de señalización y la expresión de genes regulados por estas vías,⁴⁹⁻⁵² lo que conlleva a la adquisición de diferentes fenotipos por parte de las células del sistema inmune. En el presente trabajo hemos explorado la participación del AhR en algunas funciones relacionadas con la polarización de los Mφs humanos, describiendo en profundidad su actividad en la expresión diferencial de la citocina inflamatoria IL-6 por parte de los Mφs pro- (GM-Mφs) y anti-inflamatorios (M-Mφs).

Expresión y localización subcelular del AhR en los macrófagos

En primer lugar evaluamos la cinética de expresión del AhR a lo largo del proceso de diferenciación de estos Mφs, así como su localización subcelular. El AhR sólo se detectó en los monocitos sanguíneos una vez que iniciaron el proceso de diferenciación hacia Mφs, tanto en presencia de GM-CSF como de M-CSF. Por lo tanto, la expresión del receptor a nivel proteico no está asociada con el perfil inflamatorio de los Mφs. M-CSF es un inductor importante de la expresión del AhR, pero nuestros datos indican que existen factores adicionales en los cultivos con GM-CSF que contribuyen a la inducción de su expresión, factores que no han sido identificados hasta el momento. También detectamos una inducción transitoria del AhR en los monocitos cultivados en ausencia de las citocinas hematopoyéticas. Es posible que esta inducción sea debida a los procesos de adherencia de los monocitos a las placas de cultivo, ya que se ha demostrado que ésta es una señal suficiente para inducir la síntesis de M-CSF, al menos a nivel de mRNA,⁸⁵ y el consumo de esta

citocina a lo largo del cultivo sin una producción adicional por parte de las células podría prevenir la estabilización de la expresión del AhR. La influencia del M-CSF en la expresión del AhR podría llevarse a cabo a nivel de transcripción, ya que la cantidad de transcritos de *AHR* es significativamente mayor en los M-Mφs que en los GM-Mφs. Sin embargo, modificaciones post-transcripcionales conducirían a la expresión de cantidades análogas del AhR a nivel proteico en ambos subtipos de Mφs.

La degradación por parte del proteasoma tras su activación forma parte del ciclo biológico del AhR.⁴⁰ Nosotros encontramos que el AhR presenta una localización preferentemente nuclear, tanto en los GM-Mφs como en los M-Mφs. Consecuentemente, parece que este factor de transcripción está constitutivamente activo en ambos tipos celulares, por lo que es posible que su nivel de degradación sea importante y que su recambio sea rápido. Su presencia en el núcleo sugiere que el AhR podría ser activado independientemente de ligando.⁴⁰ Alternativamente, podrían existir ligandos endógenos producidos por el propio metabolismo de los Mφs,⁴⁸ u obtenidos a partir de los medios de cultivo,⁸⁶ que podrían promover la actividad transcripcional del AhR. Así, se ha descrito que el AhR induce la expresión de IDO en DCs,⁸⁷ una enzima inmunosupresora que cataboliza la degradación del triptófano generando metabolitos como KA, el cual es un ligando endógeno del AhR. Aunado a esto, recientemente se reportó que la sobre-expresión de IDO en la línea celular leucémica pro-monocítica THP-1 promueve la expresión de genes asociados al fenotipo M2 (IL-10 y CXCR4).⁸⁸ De esta forma, en los M-Mφs se podría generar un efecto de retro-alimentación positiva por parte de AhR, promoviendo la síntesis de IDO la cual a su vez generaría ligandos para AhR⁸⁴ que sustentarían parcialmente el fenotipo M2.

Influencia del AhR en el fenotipo y funcionalidad de los macrófagos

A pesar de que los GM-Mφs y los M-Mφs expresan niveles similares del AhR a nivel proteico, nosotros habíamos postulado que su acción en ambos tipos celulares podría

ser diferente, ya que varios estudios publicados han implicado a este receptor principalmente con procesos anti-inflamatorios en DCs y Mφs. Así, se ha demostrado que la activación del AhR inhibe la secreción de IL-1β, IL-6, TNF e IL-23 e induce la de IL-10 en DCs humanas.⁸⁹ Adicionalmente, se ha implicado a AhR en el mantenimiento de estas células en un estadio inmaduro que impide una correcta activación de las respuestas de linfocitos T.⁹⁰ En los Mφs se ha descrito la participación del AhR tanto en funciones inflamatorias como anti-inflamatorias,⁵⁹⁻⁶² además de jugar un posible papel en la diferenciación de los Mφs a partir de monocitos sanguíneos humanos.⁶⁵ Los diferentes resultados publicados dependen en parte de los distintos tipos de Mφs utilizados (primarios, obtenidos a partir de líneas celulares, etc), así como de las especies en las que se ha evaluado. Cabe señalar que la mayoría de los grupos que han reportado trabajos con Mφs utilizan ligandos exógenos como TCDD y B(a)P, y que actualmente no existe ningún reporte que examine el papel de AhR en la generación de diferentes subpoblaciones de Mφs. Nosotros quisimos evaluar la implicación del AhR en fenotipos y funciones asociados con los Mφs inflamatorios (expresión de marcadores asociados con el fenotipo M1, capacidad citotóxica y secreción de las citocinas TNF, IL-6 e IL-8) y con los Mφs anti-inflamatorios (expresión de marcadores asociados con el fenotipo M2, capacidad de fagocitosis y secreción de IL-10). Los resultados mostraron que el AhR afectó positivamente la secreción de IL-6 únicamente en los GM-Mφs y promovió la síntesis de IL-10 en ambas subpoblaciones de Mφs tras la estimulación de TLR4, aunque no afectó de manera importante su fenotipo, sus capacidades fagocíticas y citotóxicas, o la síntesis de TNF e IL-8.

Fenotipo de los macrófagos

En relación a los marcadores de superficie evaluados (CD1a, CD14, CD163 y CD206), en este trabajo no encontramos diferencias en su expresión cuando los Mφs fueron diferenciados en presencia o ausencia de ANF. A este respecto, sólo la expresión de CD14 ha sido analizada en relación a la actividad del AhR en un estudio donde se diferenciaron GM-Mφs en presencia o ausencia del ligando exógeno B(a)P.⁶⁵ En este trabajo se demostró que CD14 no varió sus niveles tras la activación del AhR, lo que concuerda con los datos encontrados en nuestro estudio utilizando el

antagonista ANF. En este mismo trabajo se reportó que la presencia de B(a)P durante el proceso de diferenciación de los GM-Mφs disminuyó los niveles de CD11a, CD11c, CD29, CD49e, CD49f, CD64, CD71, CD80, CD86 y HLA de clase I, mientras que no varió la expresión de CD11b, CD36, CD40, y HLA de clase II. De manera sorprendente, el AhR parece inducir la expresión génica de 10 marcadores de tipo M2 en los GM-Mφs. Sin embargo, de los 3 genes que pudimos evaluar a nivel de proteína, sólo los datos de IL-10 se mostraron consistentes, mientras que la expresión de CD163 (este trabajo) y MAFB (Flores Sevilla JL, Tesis de Maestría) no varió en presencia de ANF. Desconocemos si los resultados del resto de los marcadores evaluados a nivel génico concuerdan con los niveles de proteína. Sin embargo, es obvio que los GM-Mφs expresan marcadores M2 a muy bajo nivel y, por lo tanto, el efecto del AhR sobre los mismos no tendría una gran relevancia ya que otras moléculas del sistema de diferenciación predominarían en la generación de los Mφs M1.

Capacidad fagocítica de los macrófagos

Datos previos indicaban que el AhR afectaba negativamente la función fagocítica de los Mφs. Estos experimentos se realizaron con los GM-Mφs diferenciados en presencia de B(a)P⁶⁵ y puestos en contacto con microesferas de látex. Sin embargo, nuestros datos indican que el AhR no está involucrado en la internalización de partículas de zimosán. Reforzando estos resultados, ANF no tuvo efecto en la expresión de los tres principales receptores de zimosán, CD206 (receptor de manosa, este trabajo), la integrina CD11b y la lectina dectin-1⁹¹ (datos no mostrados). Las discrepancias de los resultados reportados en la literatura con B(a)P con respecto a los obtenidos en este trabajo pueden ser debidas a los diferentes modelos empleados, ya que en nuestro caso los Mφs se diferenciaron en presencia de un antagonista en lugar de un agonista de AhR, y el bloqueo frente a la activación permanente de AhR a lo largo de un proceso de diferenciación constituyen sistemas experimentales opuestos que pueden dar lugar a fenómenos contradictorios. Por lo tanto, son necesarias estrategias experimentales adicionales para dilucidar estas divergencias. Sin embargo, no sería sorprendente que AhR pudiera modular la capacidad de fagocitosis de los Mφs, ya que su actividad regula ciertas GTPasas pequeñas de la

familia Ras como RhoA,⁹² las cuales a su vez están involucradas en procesos de fagocitosis mediante su acción en la remodelación del citoesqueleto.⁹³

Capacidad citotóxica de los macrófagos

Una de las características funcionales propias de los Mφs pro-inflamatorios es la capacidad de inhibir el crecimiento tumoral, a partir de la síntesis de agentes citotóxicos como las ROS²²⁻²⁴ o proteínas como la activina A,⁷⁶ la cual ha sido descrita como una citocina con capacidades anti-tumorales y que se expresa preferentemente en los GM-Mφs.⁷⁶⁻⁷⁸ Si bien el papel del AhR en la función citotóxica de los Mφs no había sido previamente evaluado, su papel en las respuestas anti-inflamatorias nos condujo a analizar esta función en los Mφs diferenciados con ANF. Nuestros resultados sugieren que tanto los GM-Mφs como los M-Mφs disminuyeron su capacidad de sintetizar sustancias solubles citotóxicas, aunque las diferencias con respecto a las células cultivadas en ausencia de ANF no fueron estadísticamente significativas. Sin embargo, la tendencia a disminuir las capacidades citotóxicas de los Mφs en ausencia de la actividad del AhR fue consistente en los diferentes donantes evaluados. Esta tendencia no coincidió con una modulación de la expresión de activina A por parte del AhR, por lo que descartamos esta molécula como responsable de los efectos observados. Los resultados de estos ensayos son relevantes, ya que varios estudios sugieren que el AhR tiene un papel importante en la progresión tumoral. Por ejemplo, la expresión del AhR es mayor en tumores invasivos que en no invasivos.^{94,95} y su nivel de expresión correlaciona con el grado de malignidad en tumores de pulmón.⁹⁶ La inhibición de la actividad del AhR en células de adenocarcinoma pulmonar disminuye su proliferación *in vitro*⁹⁶ y, por el contrario, altos niveles del AhR en tumores uroteliales humanos están asociados con un incremento de sus capacidades invasivas y con un mal pronóstico.⁹⁷ Por lo tanto, la modulación de la actividad de AhR podría constituir una nueva herramienta para impedir el desarrollo de neoplasias.

Secreción de citocinas por los macrófagos en respuesta a LPS

La mayoría de los reportes realizados en humanos indican un papel del AhR en la promoción del fenotipo pro-inflamatorio de los Mφs, ya que al ser activados con TCDD o B(a)P se observa un incremento en la expresión de citocinas como IL-6 o IL-1β.^{48,61} Por otro lado, los trabajos realizados en células murinas reportan un papel anti-inflamatorio del AhR, ya que los Mφs procedentes de ratones deficientes de AhR sobre-expresan TNF, IL-6 e IL-12 en respuesta a LPS, mientras que la síntesis de IL-10 se ve abatida completamente. Como consecuencia de esta expresión desmedida de citocinas pro-inflamatorias los ratones sucumben rápidamente al choque endotóxico.⁶² En nuestro laboratorio demostramos que el AhR regula de forma diferencial la expresión de citocinas en los Mφs humanos polarizados *in vitro*. Tras la estimulación con LPS de Mφs que fueron diferenciados en presencia de la ANF se observó que el AhR regula de forma positiva la síntesis de IL-10 en los GM-Mφs y M-Mφs, ya que su expresión se vió drásticamente disminuida en presencia del antagonista. De forma interesante, pudimos determinar que el AhR regula la síntesis de IL-6 únicamente en los GM-Mφs, ya que en presencia de ANF dichas células expresaron menores cantidades de esta citocina en respuesta a LPS. Por otro lado, no observamos cambios en la expresión de IL-6 en los M-Mφs o de otras citocinas relacionadas con procesos inflamatorios como TNF e IL-8 en ninguna de las dos poblaciones de Mφs. Por lo tanto, el AhR no tendría un claro papel pro- o anti-inflamatorio en los GM-Mφs, y sí favorecería las propiedades anti-inflamatorias de los M-Mφs.

Posibles mecanismos de regulación de IL-6 por el AhR

Con la finalidad de esclarecer los mecanismos por los cuales el AhR regula específicamente la síntesis de IL-6 en los GM-Mφs, y con base en la capacidad del AhR de unirse al promotor de *IL6* y de regular su síntesis,^{48,62} realizamos un análisis de la secuencia del promotor del gen de *IL6* humano con el fin de detectar potenciales sitios AHRE. Encontramos 2 posibles elementos AHRE distales del TSS no descritos hasta el momento. Subsecuentemente, analizamos la unión de AhR a estas

secuencias, a otro elemento AHRE descrito por DiNatale *et al.*⁴⁸ cercano al TSS, así como a las secuencias más próximas al TSS que no contenían motivos AHRE.

En los GM-Mφs detectamos la presencia constitutiva del AhR en todos los fragmentos de DNA evaluados, incluido el que no contiene elementos AHRE, mediante ensayos de CHIP y de EMSA (estos últimos sólo para los fragmentos 2, 3 y 4). Este fragmento incluye secuencias consenso para Sp1 y κB, factores de transcripción con los cuales el AhR puede formar complejos.^{29,31,34,62,73} Por lo tanto, es posible que el AhR se encuentre en el fragmento más próximo al TSS formando complejos con estos factores de transcripción sin que necesariamente se encuentre unido a sitios AHRE, o bien que estos complejos se formen a partir del AhR unido a sitios AHRE mediante plegamiento del DNA.⁸³ El AhR parece funcionar en estas condiciones como un represor transcripcional, ya que en los GM-Mφs deficientes del receptor (obtenidos mediante ensayos de siRNA) los niveles de transcritos de *IL6* se incrementaron significativamente. En Mφs peritoneales murinos la inhibición de la transcripción de *IL6* por parte del AhR se produce mediante la formación de complejos con STAT1, que evitan el reclutamiento de miembros de la familia NF-κB al promotor.⁶² Además, se ha determinado que el AhR es capaz de secuestrar al factor de transcripción Sp1 en el citoplasma de los Mφs, evitando de manera indirecta la síntesis de *IL6*.⁷³ Finalmente, otras acciones negativas del AhR con respecto a este promotor y que no están tan bien definidas se basan en la inactivación del factor STAT3.⁷² A este respecto, en nuestro laboratorio hemos observado una activación diferencial de STAT1 en presencia de TCDD en los GM-Mφs y M-Mφs (datos no mostrados). Así, TCDD en ausencia de otro estímulo es capaz de inducir la activación de STAT1 en los GM-Mφs, fenómeno que no se detecta en los M-Mφs. Si bien se trata de resultados preliminares, podríamos hipotetizar que la activación de STAT1 en ausencia de LPS y en presencia de un AhR activado, lo cual ocurre en los Mφs en condiciones basales, podría provocar la formación de complejos que impidieran, al igual que en ratón, la acción positiva de factores NF-κB en el promotor de *IL-6*. Con respecto a Sp1, el cual puede inducir la expresión basal de *IL6*,⁹⁸ en nuestro laboratorio hemos detectado su presencia específicamente en los GM-Mφs con respecto a los M-Mφs. Aunque no tenemos constancia de una interacción del AhR con este factor de transcripción en los

Mφs humanos, no descartamos que el secuestro de Sp1 por el AhR en el citoplasma celular pudiera contribuir a la represión ejercida por AhR sobre la síntesis de *IL6*.

Cuando los GM-Mφs fueron tratados con LPS se produjo una pérdida del reclutamiento del AhR al promotor de *IL6* en todas las regiones de DNA evaluadas. En paralelo, pudimos comprobar que en los GM-Mφs deficientes de AhR se transcriben niveles similares de *IL6* que en los GM-Mφs que expresan el AhR. En conjunto, estos datos sugieren que la ausencia del AhR no modifica la síntesis de *IL6* en presencia de LPS porque en estas condiciones el AhR deja de unirse al promotor y, por lo tanto, no ejerce ninguna acción sobre la síntesis del gen de *IL6*. La razón por la cual el AhR no se detecta en el promotor de *IL6* en presencia de LPS no está clara, pero podría deberse a una disminución de los niveles proteicos de este receptor observados tras 2 h de estimulación de las células. El LPS es capaz de generar ligandos endógenos del AhR (KA, algunos prostanoïdes)^{99,100} que podrían permitir su activación, pero también su rápida degradación. Debido a que en los ensayos de ChIP sólo hemos evaluado un tiempo de 2 h tras la estimulación con LPS, es posible que a tiempos posteriores se modifique el comportamiento de AhR sobre el promotor de *IL6*, ya que existen antecedentes del incremento del reclutamiento de AhR en la región del AHRE proximal a tiempos tardíos (6 h) tras el tratamiento de células MCF-7 con TCDD e IL-1β.⁴⁸ Sin embargo, siendo posible que esto ocurra, los datos obtenidos con los GM-Mφs deficientes de AhR indican que 12 h después del tratamiento con LPS la síntesis de *IL6* no se modifica con respecto a los GM-Mφs que expresan el AhR. Por lo tanto, podemos concluir que la inducción de la secreción de IL-6 inducida por el AhR en los GM-Mφs tras la estimulación con LPS, evaluada en dos sistemas distintos (en presencia de ANF y en los GM-Mφs deficientes de AhR), podría estar basada fundamentalmente en mecanismos post-transcripcionales.

Con respecto a los M-Mφs, observamos que el AhR se encuentra ausente del promotor de *IL6* en condiciones basales, lo que coincide con los datos obtenidos en las células deficientes de AhR donde se detecta un nivel de transcripción de *IL6* similar a la de los M-Mφs control. Al contrario que en los GM-Mφs, en los M-Mφs se produce un reclutamiento del AhR tras el estímulo con LPS a todos los fragmentos del promotor evaluados. En este caso, contrariamente a lo observado en los GM-Mφs, el LPS no parece tener un efecto sobre los niveles proteicos del AhR, lo que podría

deberse a una baja inducción de la expresión de enzimas que generan ligandos para este receptor. Cuando analizamos el nivel de transcritos de *IL6* en ausencia del AhR (en los ensayos de siRNA) y en presencia de LPS, observamos una clara tendencia hacia el incremento de estos transcritos con respecto a las condiciones en presencia del AhR, aumento que también se detecta a tiempos tardíos de estimulación con LPS en los M-Mφs tratados con ANF. En conjunto, estos datos indicarían que el reclutamiento del AhR al promotor de *IL6* tras el estímulo con LPS tendría un efecto negativo sobre la transcripción del gen, y que en esta situación el AhR actuaría también como un represor transcripcional. Esta represión no tendría efecto sobre los niveles de la proteína secretada, lo que sugiere que eventualmente mecanismos post-transcripcionales compensarían los efectos de esta represión, o bien que mecanismos transcripcionales anularían estos efectos.

Los datos obtenidos sobre la actividad del AhR en el promotor de *IL6* con respecto a su actividad sobre la secreción de la proteína sugieren que tanto en los GM-Mφs como en los M-Mφs el AhR intervendría principalmente a nivel de mecanismos post-transcripcionales. Se ha demostrado ampliamente que el AhR posee actividades distintas de su actividad transcripcional, mediadas por su interacción con diferentes proteínas citoplásmicas involucradas en diversas vías de señalización. Algunas de ellas como STAT1 y la GTPasa pequeña RhoA ya han sido mencionadas anteriormente. Adicionalmente, se ha descrito la activación por parte del AhR del receptor de crecimiento epidérmico (EGF) mediada por su unión constitutiva a la proteína cinasa src, de la cinasa dependiente de cAMP (PKA), de la proteína cinasa C (PKC), de la fosfolipasa citoplásmica A2 (cPLA2) o de la MAPK ERK, todo ello en respuesta a la acción de TCDD o B(a)P.^{60,61,101-103} Por lo tanto, es posible que algunas de estas vías de señalización estén involucradas en la actividad diferencial del AhR sobre la síntesis de IL-6 en los GM-Mφs y M-Mφs, y sería necesario que fueran evaluadas en estudios posteriores.

En suma, el AhR ha sido implicado en la regulación de diversos procesos inmunológicos en animales y seres humanos, aunque muchos de los mecanismos moleculares que subyacen a estos fenómenos funcionales son desconocidos. Resulta imposible establecer un mecanismo de acción general para el AhR, ya que los efectos resultantes de su activación dependen del tipo y estadio celular, de la naturaleza y tiempo de exposición a los ligandos, así como del organismo en el cual se estudia. El esclarecimiento de los mecanismos implicados en la regulación de los efectos funcionales de los Mφs humanos polarizados es necesario para poder diseñar estrategias terapéuticas encaminadas al control de las respuestas inflamatorias excesivas por parte de dichas células, capaces de alterar la homeostasis del organismo y que pueden conducir a la aparición de distintas patologías. El descubrimiento de la regulación diferencial de la síntesis de citocinas en los Mφs pro- y anti-inflamatorios por parte del AhR representa un paso importante en el conocimiento de la función de estas células y, por lo tanto, en el diseño de estrategias que modulen esta función.

CONCLUSIONES

1. Los GM-Mφs y M-Mφs expresan el AhR y este factor está constitutivamente activado en ambos tipos celulares, probablemente debido a la presencia de ligandos endógenos.
2. El AhR no regula de manera significativa la expresión de marcadores de superficie relacionados con los fenotipos pro- (M1) y anti-inflamatorio (M2), aunque su actividad en términos de expresión de marcadores génicos asociados con la polarización de los Mφs modula específicamente la expresión de moléculas M2 en los GM-Mφs.
3. La actividad del AhR no parece estar involucrada en funciones relacionadas con la polarización de los Mφs como la fagocitosis (M2) o la citotoxicidad (M1). Sin embargo, el AhR regula positivamente la secreción inducida por LPS de la citocina inflamatoria IL-6 en los Mφs M1, mientras que no se detecta esta regulación en los Mφs M2.
4. El AhR parece actuar como un represor transcripcional de *IL6* en los GM-Mφs en condiciones basales, ya que existe una ocupación constitutiva de su promotor por el AhR y la supresión de la expresión de este receptor incrementa los niveles de transcritos de *IL6*. Sin embargo, su ausencia en el promotor de este gen tras la estimulación de las células con LPS no parece estar relacionada con un incremento en la transcripción de *IL6*.
5. En los M-Mφs no se detecta una ocupación basal del promotor de *IL6* por parte del AhR, mientras que se observa la situación contaria cuando las células son estimuladas con LPS. En estas condiciones, la supresión de la expresión del AhR tendió a incrementar los niveles de transcritos de *IL6*. Por lo tanto, es posible que el AhR actúe también como un represor transcripcional en los M-Mφs estimulados con LPS.
6. En conjunto, estos datos sugieren que las principales acciones del AhR sobre la síntesis de IL-6 en los GM-Mφs y M-Mφs estimulados con LPS podría llevarse a cabo a niveles distintos de su actividad transcripcional.

PERSPECTIVAS

1. Realizar ensayos de ChIP en los GM-M ϕ s y M-M ϕ s deficientes de AhR y en células control, en presencia y ausencia de estímulos inflamatorios (LPS), con la finalidad de evaluar posibles modificaciones de marcas epigenéticas en el promotor de *IL6* que permitan explicar con mayor detalle el mecanismo de acción del AhR sobre el promotor de *IL6*.
2. Realizar ensayos de ChIP con anticuerpos dirigidos contra ARNT, Sp1 y factores de transcripción de la familia NF- κ B, con la finalidad de evaluar los posibles complejos proteicos que pudieran estar regulando la expresión de *IL6* en los GM-M ϕ s y M-M ϕ s.
3. Determinar la interacción del AhR con proteínas involucradas en vías de señalización intracelular que pudieran regular la producción de IL-6, mediante ensayos de inmunoprecipitación de lisados de GM-M ϕ s y M-M ϕ s con anticuerpos anti-AhR y análisis proteómicos.
4. Evaluar los efectos de ligandos endógenos del AhR (FICZ, KA) en los GM-M ϕ s y M-M ϕ s sobre la expresión de citocinas pro- y anti-inflamatorias.
5. Evaluar la acción de antagonistas de AhR como ANF o resveratrol en modelos murinos de enfermedades inflamatorias, debido a la capacidad del AhR para regular la síntesis de citocinas involucradas en la patogénesis de dichas enfermedades.

BILIOGRAFÍA

1. Wynn T, Chawla A, Pollard J. 2013. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 496: 445–455.
2. van Furth R, Cohn Z, Hirsch J, Humprey J, Spector W, Langevoort H. 1972. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull. World Health Organ.* 46: 845–852.
3. Gordon S, Taylor P. 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 953–965.
4. Ariel A, Maridonneau-Parini I, Rovere-Querini P, Levine J, Mühl H. 2012. Macrophages in inflammation and its resolution. *Front. Immunol.* 3: 1–2.
5. Schulz C, Gomez E, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, Prinz M, Wu B, Jacobsen S, Pollard J, Frampton J, Liu K, Greissmann F. 2012. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* 336: 86–90.
6. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Mehler M, Conway S, Ng L, Stanley E, Samokvalov I, Merad M. 2010. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330: 841–845.
7. Hoeffel G, Wang Y, Greter M, See P, Teo P, Malleret B, Leboeuf M, Low D, Oller G, Almeida F, Choy S, Grisotto M, Reina L, Conway S, Stanley E, Chan J, Ng L, Samokhvalov I, Ginhoux F. 2012. Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *J. Exp. Med.* 209: 1167–1181.
8. Benoit M, Desnues B, Mege JL. 2008. Macrophage polarization in bacterial infections. *J. Immunol.* 181: 3733-3739.
9. Stout RD, Suttles J. 2004. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J. Leukoc. Biol.* 76: 509–513.
10. Lawrence T, Natoli G. 2011. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat. Rev. Immunol.* 11: 750–761.
11. Gosselin D, Link V, Romanoski C, Fonseca G, Eichenfield D, Spann N, Stender J, Chun H, Garner H, Geissmann F, Glass C. 2014. Environment drives selection and function of enhancers controlling tissue-specific macrophage identities. *Cell* 159: 1327–1340.
12. Lavin Y, Winter D, Blecher-Gonen R, David E, Keren-Shaul H, Merad M, Jung S, Amit I. 2014. Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. *Cell* 159: 1312–1326.
13. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25: 677–686.
14. Mantovani A, Sica A, Locati M. 2005. Macrophage polarization comes of age. *Immunity* 23: 344–346.
15. Gordon S. 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 23–35.

16. Gratchev A, Kzhyshkowska J, Utikal J, Goerdts S. 2005. Interleukin-4 and dexamethasone counterregulate extracellular matrix remodeling and phagocytosis in type-2 macrophages. *J. Immunol.* 61:10–17.
17. Barreda D, Hanington P, Belosevic M. 2004. Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Dev. Comp. Immunol.* 28: 509–554.
18. Wiktor-Jedrzejczak W, Bartocci A, Ferrante A, Ahmed-Ansari A, Sell K, Pollard J, Stanley E. 1990. Total absence of colony-stimulating factor 1 in the macrophage-deficient osteopetrotic (op/op) mouse. *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A* 87: 4828–4832.
19. Stanley E, Lieschke G, Grail D, Metcalf D, Hodgson G, Gall J, Maher D, Cebon J, Sinickas V, Dunn A. 1994. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-deficient mice show no major perturbation of hematopoiesis but develop a characteristic pulmonary pathology. *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A* 91: 5592–5596.
20. Verreck F, De Boer T, Langenberg D, van der Zanden L, Ottenhoff T. 2006. Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN- γ and CD40L-mediated costimulation. *J. Leukoc. Biol.* 79: 285–293.
21. Verreck F, De Boer T, Langenberg D, Hoeve M, Kramer M, Vaisberg E, Kastelein R, Kolk A, De Waal-Malefyt R, Ottenhoff T. 2004. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to mycobacteria. *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A* 101: 4560–4565.
22. Cassol E, Cassetta L, Alfano M, Poli G. 2010. Macrophage polarization and HIV-1 infection. *J. Leukoc. Biol.* 87: 599–608.
23. Sica A, Larghi P, Mancino A, Rubino L, Porta C, Rimoldi M, Biswas S, Allavena P, Mantovani A. 2008. Macrophage polarization in tumor progression. *Semin. Cancer Biol.* 18: 349–355.
24. Mosser D, Edwards J. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 958–969.
25. González-Domínguez E, Samaniego R, Flores-Sevilla J, Campos-Campos S, Gómez-Campos G, Salas A, Campos-Peña V, Corbí AL, Sánchez-Mateos P, Sánchez-Torres C. 2015. CD163L1 and CLEC5A discriminate subsets of human resident and inflammatory macrophages in vivo. *J. Leukoc. Biol.* 98: 453–466.
26. Williams K, Kilm W. 2015. Identification of in vivo markers for human polarized macrophages; a need that's finally met. *J. Leukoc. Biol.* 98: 449–450.
27. Gu Y, Hogenesch J, Bradfield C. 2000. The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40: 519–561.
28. Barouki R, Coumoul X, Fernandez-Salguero P. 2007. The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein. *FEBS Lett.* 581: 3608–3615.
29. Vogel C, Matsumura F. 2009. A new cross-talk between the aryl hydrocarbon receptor and RelB, a member of the NF- κ B family. *Biochem. Pharmacol.* 77: 734–745.

30. Ge N, Elferink C. 1998. A direct interaction between the aryl hydrocarbon receptor and retinoblastoma protein. Linking dioxin signaling to the cell cycle. *J. Biol. Chem.* 273: 22708–22713.
31. Tian Y, Ke S, Denison MS, Rabson A, Gallo M. 1999. AhR receptor and NF-kappaB interactions, a potential mechanism for dioxin toxicity. *J. Biol. Chem.* 274: 510–515.
32. Klinge C, Kaur K, Swanson H. 2000. The aryl hydrocarbon receptor interacts with estrogen receptor alpha and orphan receptors COUP-TFI and ERalpha1. *Arch. Biochem. Biophys.* 373: 163–174.
33. Ohtake F, Takeyama K, Matsumoto T, Kitagawa H, Yamamoto Y, Nohara K, Tohyama C, Krust A, Mimura J, Chambon P, Yanagisawa J, Fuji-Kuriyama Y, Kato S. 2003. Modulation of estrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature* 423: 545–550.
34. Vogel C, Sciullo E, Matsumura F. 2007. Involvement of RelB in aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of chemokines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 363: 722–726.
35. Marlowe J, Fan Y, Chang X, Peng L, Knudsen E, Xia Y, Puga A. 2008. The Aryl hydrocarbon receptor binds to E2F1 and inhibits E2F1-induced apoptosis. *Mol. Biol. Cell* 19: 3263–3271.
36. Denison M, Nagy S. 2003. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43: 309–334.
37. Kewley R, Whitelaw M, Chapman-Smith A. 2004. The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36: 189–204.
38. Carlson D, Perdew G. 2002. A dynamic role for the Ah receptor in cell signaling. Insights from a diverse group of Ah receptor interacting proteins. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 16: 317–325.
39. Hankinson O. 2005. Role of coactivators in transcriptional activation by the aryl hydrocarbon receptor. *Arch. Biochem. Biophys.* 433: 379–386.
40. Stockinger B, Di Meglio P, Gialitakis M, Duarte JH. 2014. The aryl hydrocarbon receptor: multitasking in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 32: 403–432.
41. Stevens E, Mezrich J, Bradfield C. 2009. The aryl hydrocarbon receptor: a perspective on potential roles in the immune system. *Immunology* 127: 299–311.
42. Singh K, Casado F, Opanashuk L, Gasiewicz T. 2009. The aryl hydrocarbon receptor has a normal function in the regulation of hematopoietic and other stem/progenitor cell populations. *Biochem. Pharmacol.* 77: 577–587.
43. Esser C. 2009. The immune phenotype of AhR null mouse mutants: not a simple mirror of xenobiotic receptor over-activation. *Biochem. Pharmacol.* 77: 597–607.
44. Rannug A, Rannug U, Rosenkranz H, Winqvist L, Westerholm R, Agurell E, Grafström A. 1987. Certain photooxidized derivatives of tryptophan bind with very high affinity to the Ah receptor and are likely to be endogenous signal substances. *J. Biol. Chem.* 262: 15422–15427.
45. Cherayil BJ. 2009. Indoleamin 2,3-dioxygenase in intestinal immunity and inflammation. *Inflamm. Bowel Dis.* 15: 1391–1396.

46. Munir S, Larsen S, Iversen T, Donia M, Klausen T, Svane I, Straten P, Andersen M. 2007. Natural CD4+ T-cell responses against indoleamin 2,3-dioxygenase. *PLoS One* 7: issue 4.
47. Bauer T, Jiga L, Chuang J, Rendazzo M, Opelz G, Terness P. 2005. Studying the immunosuppressive role of indoleamine 2,3-dioxygenase: tryptophan metabolites suppress rat allogeneic T-cell responses in vitro and in vivo. *Transplant Int.* 18: 95–100.
48. DiNatale B, Murray I, Schroeder J, Flaveny C, Lahoti TS, Laurenzana EM. 2010. Kynurenic acid is a potent aryl hydrocarbon receptor ligand that synergistically induces interleukin-6 in presence of inflammatory signaling. *Toxicol. Sci.* 115: 89–97.
49. Quintana F, Basso A, Iglesias A, Korn T, Farez MF, Bettelli E, Caccamo M, Oukka M, Weiner HL. 2008. Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 453: 65–71.
50. Kimura A, Naka T, Nohara K, Kuriyama Y, Kishimoto T. 2008. Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A* 105: 9721–9726.
51. Apetoh L, Quintana F, Pot C, Joller N, Xiao S, Kumar D, Burns E, Sherr D, Weiner H, Kuchroo VK. 2010. The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27. *Nat. Immunol.* 11: 854–861.
52. Gandhi R, Burns EJ, Nadeau M, Dake B, Laroni A, Kozoriz D, Weiner HL, Quintana J. 2010. Activation of the aryl hydrocarbon receptor induces human type 1 regulatory T cell-like and Foxp3⁺ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 11: 846–853.
53. Sartor M, Schnekenburger M, Marlowe J, Reichard J, Wang Y, Fan Y, Ma C, Karyala S, Halbleib D, Liu X, Medvedovic M, Puga A. 2009. Genome wide analysis of aryl hydrocarbon receptor binding targets reveals an extensive array of gene clusters that control morphogenetic and developmental programs. *Environ. Health Perspect.* 117: 1139–1146.
54. Kerkvliet NI. 2009. AHR-immunomodulation: the role of altered gene transcription. *Biochem. Pharmacol.* 77: 746–760.
55. Sun Y, Boverhof D, Bergoon L, Fielden M, Zacharewski T. 2004. Comparative analysis of dioxin response elements in human, mouse and rat genomic sequences. *Nucleic Acids Res.* 32: 4512–4523.
56. Ackermann M, Gasiewicz T, Lamm K, Germolec D, Luster M. 1989. Selective inhibition of polymorphonuclear neutrophil activity by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 101: 470–80.
57. Birnbaum L, McDonald M, Blair P, Clark A, Harris MW. 1990. Differential toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in C57BL/6J mice congenic at the Ahr locus. *Fundam. Appl. Toxicol.* 15: 186–200.
58. Vorderstrasse B, Dearstyne E, Kerkvliet N. 2003. Influence of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the antigen presenting activity of dendritic cells. *Toxicol. Sci.* 72: 103–112.

59. Cheon H, Woo YS, Lee JY, Kim HS, Kim HJ, Cho S, Won NH, Sohn J. 2007. Signaling pathway for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced TNF-alpha production in differentiated THP-1 human macrophages. *Exp. Mol. Med.* 39: 524–534.
60. Sciallo EM, Dong B, Vogel CF, Matsumura F. 2009. Characterization of the pattern of the nongenomic signaling pathway through which TCDD-induces early inflammatory responses in U937 human macrophages. *Chemosphere* 74: 1531–1537.
61. N'Diaye M, Le Ferrec E, Lagadic-Gossmann D, Corre S, Gilot D, Lecureur V, Monteiro P, Rauch C, Galibert MD, Fardel O. 2006. Aryl hydrocarbon receptor- and calcium-dependent induction of the chemokine CCL1 by the environmental contaminant benzo[a]pyrene. *J. Biol. Chem.* 281: 19906–19915.
62. Kimura A, Naka T, Nakahama T, Chichen I, Masuda K, Fuji-Kuriyama Y, Kishimoto T. 2009. Aryl hydrocarbon receptor in combination with Stat1 regulates LPS-induced inflammatory responses. *J. Exp. Med.* 206: 2027–2035.
63. Sekine H, Mimura J, Oshima M, Okawa H, Kanno J, Igarashi K, Gonzalez F, Ikuta T, Fujii-Kuriyama Y. 2009. Hypersensitivity of aryl hydrocarbon receptor deficient mice to lipopolysaccharide-induced septic shock. *Mol. Cell. Biol.* 29: 6391–6400.
64. Platzer B, Richter S, Kneidinger D, Waltenberger D, Woisetschlänger M, Strobi H. 2009. Aryl hydrocarbon receptor activation inhibits in vitro differentiation of human monocytes and Langerhans dendritic cells. *J. Immunol.* 183: 66–74.
65. van Grevenynghe J, Rion S, Le Ferrec E, Le Vee M, Fauchet R, Fardel O. 2003. Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit differentiation of human monocytes into macrophages. *J. Immunol* 170: 2374–2381.
66. Dekoter R, Walsh J, Singh H. 1998. PU.1 regulates both cytokine-dependet proliferation and differentiation of granulocyte/macrophage progenitors. *EMBO J.* 17: 4456–4468.
67. Friedman AD. 2007. C/EBP α induces PU.1 and interacts with AP-1 and NF- κ B to regulate myeloid development. *Blood Cells Mol. Dis.* 39: 340–343.
68. Heinrich P, Behrmann I, Hann S, Hermanns H, Muller-Newen G, Schaper F. 2003. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem. J.* 374: 1–20.
69. Hollingshead B, Beischlag T, DiNatale B, Ramadoss P, Perdew G. Inflammatory signaling and aryl hydrocarbon receptor mediate synergistic induction of interleukin 6 in MCF7 cells. *Cancer Res.* 2008. 68: 3609–3617.
70. DiNatale B, Schroeder J, Francey J, Kusnadi A, Perdew G. 2010. Mechanistic insights into the events that lead to synergistic induction of interleukin 6 transcription upon activation of the aryl hydrocarbon receptor and inflammatory signaling. *J. Biol. Chem.* 32: 24388–24397.
71. Chen P, Chang H, Chang J, Lin P. 2012. Aryl hydrocarbon receptor in association with RelA modulates IL-6 expression in non-smoking lung cancer. *Oncogene* 31: 2155–2565.

72. Takanaga H, Yoshitake T, Yatabe E, Hara S, Kunimoto M. 2004. Beta-naphthoflavone disturbs astrocytic differentiation of C6 glioma cells by inhibiting autocrine interleukin-6. *J. Neurochem.* 90: 750–757.
73. Masuda K, Kimura A, Hanieh H, Nguyen N, Nakahama T, Chinen I, Otoyo Y, Murotani T, Yamatodani A, Kishimoto T. 2011. Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates LPS-induced production through suppression of histamine production in macrophages. *Int. Immunol.* 23: 637–645.
74. Quandt K, Frech K, Karas H, Wingender E, Werner T. 1995. MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res.* 23: 4878–4884.
75. Ray A, Tatter SB, May LT, Sehgal PB. 1988. Activation of the human "beta 2-interferon/hepatocyte-stimulating factor/interleukin 6" promoter by cytokines, viruses, and second messenger agonists. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 85: 6701–6705.
76. Sierra-Filardi E, Puig-Kröger A, Blanco F, Nieto C, Bragado R, Palomero M, Bernabéu C, Vega M, Corbí AL. 2011. Activin A skews macrophage polarization by promoting a proinflammatory phenotype and inhibiting the acquisition of anti-inflammatory macrophage markers. *Blood* 117: 5092–5101.
77. Domínguez-Soto A, de las Casas-Engel M, Bragado R, Medina-Echeverz J, Aragonese-Fenoll L, Martín-Gayo E, van Rooijen N, Berraondo P, Toribio ML, Moro MA, Cuartero I, Castrillo A, Sancho D, Sánchez-Torres C, Bruhns P, Sánchez-Ramón S, Corbí AL. 2014. Intravenous immunoglobulin promotes antitumor responses by modulating macrophage polarization. *J. Immunol.* 193: 5181–5189.
78. Escribese MM, Sierra-Filardi E, Nieto C, Samaniego R, Sánchez-Torres C, Matsuyama T, Calderon-Gómez E, Vega MA, Salas A, Sánchez-Mateos P, Corbí AL. 2012. The prolyl hydroxylase PHD3 identifies proinflammatory macrophages and its expression is regulated by Activin A. *J. Immunol.* 189: 1946–1954.
79. Schaldach CM, Riby J, Bjeldanes LF. 1999. Lipoxin A4: a new class of ligand for the Ah receptor. *Biochemistry* 38: 7594–7600.
80. Simones T, Shepherd DM. 2011. Consequences of AhR activation in steady-state dendritic cells. *Toxicol. Sci.* 119: 293–307.
81. Benson JM, Shepherd DM. 2011. Dietary ligands of the aryl hydrocarbon receptor induce anti-inflammatory and immunoregulatory effects on murine dendritic cells. *Toxicol. Sci.* 124: 327–338.
82. DiNatale BC, Smith K, John K, Krishnegowda G, Amin SG, Perdew GH. 2012. Ah receptor antagonism represses head and neck tumor cell aggressive phenotype. *Mol. Cancer Res.* 10: 1369–1379.
83. Beischlag T, Morales J, Hollingshead B, Perdew G. 2008. The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 18: 207–250.

84. Nguyen N, Nakahama T, Le D, Van Son L, Chu H, Kishimoto T. 2014. Aryl hydrocarbon receptor and kynurenine: recent advances in autoimmune disease research. *Front. Immunol.* 5: 1–6.
85. Haskill S, Johnson C, Eierman D, Becker S, Warren K. 1988. Adherence induces selective mRNA expression of monocyte mediators and proto-oncogenes. *J. Immunol.* 140: 1690–1694.
86. Veldhoen M, Hirota K, Christensen J, O'Garra A, Stockinger B. 2009. Natural agonists for aryl hydrocarbon receptor in culture medium are essential for optimal differentiation of Th17 T cells. *J. Exp. Med.* 206: 43–49.
87. Nguyen N, Kimura A, Nakahama T, Chichen I, Masuda K, Nohara K, Fujii-Kuriyama Y, Kishimoto T. 2010. Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates dendritic cell immunogenicity via a kynurenine dependent mechanism. *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A* 107: 19961–19966.
88. Xian-Feng W, Hong-Shen W, Hao W, Fan Z, Ke-Fang W, Qiang G, Ge Z, Shao-Hui C, Jun D. 2014. The role of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) in immune tolerance: focus on macrophage polarization of THP-1 cells. *Cell. Immunol.* 289: 42–48.
89. Wang C, Ye Z, Kijlstra A, Zhou Y, Yang P. 2014. Activation of the aryl hydrocarbon receptor affects activation and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Clin. Exp. Immunol.* 177: 521–530.
90. Aguilera-Montilla N, Chamorro S, Nieto C, Sánchez-Cabo F, Dopazo A, Fernández-Salguero P, Rodríguez-Fernández J, Pello O, Andrés V, Cuenda A, Alonso B, Domínguez-Soto A, Sánchez-Ramón S, Corbí AL. 2013. Aryl hydrocarbon receptor contributes to the MEK/ERK-dependent maintenance of the immature state of human dendritic cells. *Blood* 121: 108–117.
91. Brown GD, Taylor PR, Reid DM, Willment JA, Williams DL, Martinez-Pomares L, Wong SY, Gordon S. 2002. Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *J. Exp. Med.* 196: 407–412.
92. Chang CC, Tsai SY, Lin H, Li HF, Lee YH, Chou Y, Jen CY, Juan SH. 2009. Aryl-hydrocarbon receptor-dependent alteration of FAK/RhoA in the inhibition of HUVEC motility by 3-methylcholanthrene. *Cell. Mol. Life Sci.* 66: 3193–3205.
93. Kim JG, Moon MY, Kim HJ, Li Y, Song DK, Kim JS, Lee JY, Kim J, Kim SC, Park JB. 2012. Ras-related GTPases Rap1 and RhoA collectively induce the phagocytosis of serum-opsinized zymosan particles in macrophages. *J. Biol. Chem.* 287: 5145–5155.
94. Yang X, Liu D, Murray TJ, Mitchell GC, Hesterman EV, Karchner SI, Merson RR, Hahn ME, Sherr DH. 2005. The aryl hydrocarbon receptor constitutively represses cmyc transcription in human mammary tumor cells. *Oncogene* 24: 7869-7881.
95. Villano CM, Murphy KA, Akintobi A, White LA. 2006. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces matrix metalloproteinase (MMP) expression and invasion in 2058 melanoma cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2006; 210: 212-214.
96. Chang JT, Chang H, Chen PH, Lin SL, Lin P. 2007. Requirement of aryl hydrocarbon receptor overexpression for Cyp1B1 up-regulation and cell growth in human lung adenocarcinomas. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13: 38-45.

97. Ishida M, Mikami S, Kikuchi E, Kosaka T, Miyajima A, Nakagawa K, Mukai M, Okada Y, Oya M. 2010. Activation of the aryl hydrocarbon receptor pathway enhances cancer cell invasion by up-regulating the MMP expression and is associated with poor prognosis in upper urinary tract urothelial cancer. *Carcinogenesis* 31: 287-296.
98. Maret A, Clamens S, Delrieu I, Elhage R, Arnal JF, Bayard F. 1999. Expression of the interleukin-6 gene is constitutive and not regulated by estrogen in rat vascular smooth muscle cells in culture. *Endocrinology* 140: 2876–2882.
99. Jung ID, Lee CM, Jeong YI, Lee JS, Park WS, Han J, Park YM. 2007. Differential regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase by lipopolysaccharide and interferon gamma in murine bone marrow derived dendritic cells. *FEBS Lett.* 581: 1449–1456.
100. Berg J, Christoph T, Widerna M, Bodenteich A. 1997. Isoenzyme-specific cyclooxygenase inhibitors: a whole cell assay system using the human erythroleukemic cell line HEL and the human monocytic cell line Mono Mac 6. *J Pharmacol. Toxicol. Methods* 37: 179–186.
101. Li W, Matsumura F. 2008. Significance of the nongenomic, inflammatory pathway in mediating the toxic action of TCDD to induce rapid and long-term cellular responses in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemistry* 47: 13997–14008.
102. Matsumura F. 2009. The significance of the nongenomic pathway in mediating inflammatory signaling of the dioxin-activated Ah receptor to cause toxic effects. *Biochem. Pharmacol.* 77: 608–626.
103. Yu H, Du Y, Zhang X, Li S, Dou Y, Li Z, Yuan H, Zhao W. 2014. The aryl hydrocarbon receptor suppresses osteoblast proliferation and differentiation through the activation of the ERK signaling pathway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 280: 502–510.