



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

Unidad Zacatenco

Departamento de Biomedicina Molecular

**Evaluación del efecto del LPS en la expresión y activación del
receptor de aril hidrocarburos en macrófagos humanos
polarizados**

Que presenta:

Q.F.B. Ana Belén Campos Juárez

Para obtener el grado de Maestro en Ciencias en la especialidad de
Biomedicina Molecular

Tutora: Dra. Ma. 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.

COMITÉ TUTORIAL

Directora de tesis:

Dra. María Carmen Sánchez Torres

Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV

Asesores:

Dra. Leticia Cedillo Barrón

Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV

Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete

Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV

La Q.F.B. Ana Belén Campos Juárez realizó esta tesis de doctorado con una beca otorgada por CONACYT (No. 396910).

Agradecimientos

Al Departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV por darme la oportunidad de pertenecer a su programa de posgrado.

A la Dra. Carmen Sánchez Torres por darme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo y su apoyo para la realización de este trabajo de tesis.

Al Dr. Vianney Ortiz Navarrete y Dra. Leticia Cedillo Barrón por su asesoría de este trabajo.

A la Dra. Norma Segovia, Tec. Julio Ramírez, Lic. Ninfa Arreola y Maru Maqueda por su apoyo en las cuestiones técnicas y administrativas.

Al Banco de Sangre del Centro Médico Nacional la Raza por proporcionarnos los concentrados leucocitarios.

A mis compañeros y ex compañeros de Laboratorio, Adrián, Angie, Lalito, Pepe, Erika, Rubén, Deya, Rebe, Keity y Montse por hacerme sentir como en casa desde el primer momento, por su amistad y su apoyo.

A mi Papá, mis hermanas y mis sobrinos por ser mi motor y mi más grande inspiración.

A mis amigos Mallely, Thalfá, Xavier, Abraham, Zaira, Fred, Osvi, por siempre brindarme buenos momentos y quienes me hacen más divertida la estancia en esta vida.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	5
RESUMEN EN ESPAÑOL	7
RESUMEN EN INGLÉS	8
INTRODUCCIÓN.....	9
1. El receptor de aril hidrocarburos.....	9
2. Estructura del AhR.....	12
3. Activación del AhR.....	15
4. El AhR regula algunas vías de transducción de señales en el citoplasma.....	17
5. Características de los macrófagos M1 y M2.....	19
6. Participación del AhR en la inflamación	20
7. Vía de señalización del TLR4	22
ANTECEDENTES DIRECTOS.....	24
JUSTIFICACIÓN.....	29
HIPÓTESIS	29
OBJETIVO GENERAL	30
OBJETIVOS PARTICULARES.....	30
MATERIALES Y MÉTODOS	31
1. Muestras.....	31
2. Obtención de células mononucleares de sangre periférica	31
3. Obtención de las células CD14 ⁺	31
4. Obtención de macrófagos con GM-CSF y M-CSF	32
5. Cultivos de los macrófagos en presencia de LPS	32
6. Obtención de fracciones nucleares y citoplásmicas.....	32
7. Ensayos de Western Blot.....	33
7. Ensayos de microscopía de fluorescencia.....	34
8. Extracción de RNA.....	34
9. Análisis de la expresión de transcritos por RT-PCR	34
10. Análisis estadístico	36
RESULTADOS.....	37

1. La expresión del AhR a nivel de mRNA es regulada por LPS.....	37
2. El LPS modula la expresión del AhR a nivel de proteína	38
3. Inducción de la expresión de <i>IDO1</i> tras el estímulo con LPS.....	40
4. Evaluación del efecto del LPS sobre la síntesis del AhR en presencia de un inhibidor de proteosoma	41
5. Localización subcelular del AhR en respuesta a LPS evaluada por inmunofluorescencia	43
DISCUSIÓN.....	46
CONCLUSIONES.....	54
PERSPECTIVAS	55
REFERENCIAS	56

ABREVIATURAS

α -NF: α -naftoflavona

Ab: anticuerpo

AhR: receptor de aril hidrocarburos

AP-1: proteína de activación 1.

ARNT: translocador nuclear del AhR

BP: benzo [a] pireno

COX: ciclooxigenasa

cPLA2: fosfolipasa A2 citoplásmica

CYP: citocromo

EGF: factor de crecimiento epidérmico

GAPDH: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos

GM-M ϕ : macrófagos generados con GM-CSF

IDO: indoleamina 2,3-dioxigenasa 1

IFN: interferón

IL: interleucina

LPS: lipopolisacárido

mAb: anticuerpo monoclonal

MAPK: proteínas cinasas activadas por mitógenos

M-CSF: factor estimulante de colonias de macrófagos

M ϕ : macrófago

M-M ϕ : macrófagos generados con M-CSF

NF- κ B: factor nuclear κ B

PAMP: patrón molecular asociado a patógenos

PKA: proteína cinasa dependiente de cAMP

PKC: proteína cinasa C

STAT: transductor de señal y activador de transcripción

TCDD: dioxina (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina)

TDO: triptófano 2,3-dioxigenasa

TGF: factor de crecimiento transformante

Th: linfocito T cooperador

TLR: receptor tipo Toll

TNF: factor de necrosis tumoral

WB: Western blot

RESUMEN EN ESPAÑOL

El receptor de aril hidrocarburos (AhR) es un factor de transcripción citoplásmico que se transloca al núcleo tras su unión a un ligando. Posteriormente el AhR es exportado al citoplasma, donde es degradado por la vía ubiquitin-proteosoma. El AhR tiene una importante participación en la respuesta inflamatoria, ya que regula la expresión de citocinas tales como TNF, IL-6, IL-10, IL-17A/F, e IL-21. El AhR se expresa en varios tipos celulares, entre los que se encuentran los macrófagos (M ϕ s) de tipo pro-inflamatorio (M1) y anti-inflamatorio (M2). En este trabajo analizamos la regulación de este receptor en M ϕ s M1 y M2 humanos generados *in vitro*, en respuesta a un estímulo inflamatorio como el LPS. Los M ϕ s M1 y M2 se generaron tras el cultivo de monocitos sanguíneos CD14⁺ con GM-CSF (M1, GM-M ϕ s) o M-CSF (M2, M-M ϕ s). Estos M ϕ s expresan AhR de manera análoga a nivel de proteína, aunque los M-M ϕ s presentan una mayor cantidad de transcritos de *AHR*. En este estudio evaluamos la expresión del AhR a nivel de mRNA y de proteína tras el estímulo con LPS, así como su activación analizando su localización subcelular. El LPS indujo la expresión de *AHR* de manera significativa sólo en los GM-M ϕ s, aunque en los M-M ϕ s se detectó una tendencia similar. En ambos tipos celulares se observó una disminución de los niveles de proteína del AhR en respuesta a LPS, los cuales se recuperaron a tiempos tardíos. La disminución de la expresión del AhR se redujo e incluso se revirtió en presencia del inhibidor del proteosoma MG132. Además, el LPS indujo la expresión de *IDO1* en ambos tipos de M ϕ s, un enzima que genera ligandos endógenos del AhR como el ácido kinurénico. Finalmente, El LPS modificó la localización subcelular del AhR en ambos tipos de M ϕ s, relocalizándolo en el citoplasma celular. En conjunto, estos datos indican que el LPS regula positivamente la expresión de *AHR*, preferentemente en los GM-M ϕ s, y sugieren que induce la degradación del receptor vía proteosoma, probablemente a través de la generación de ligandos que promueven la activación del receptor.

RESUMEN EN INGLÉS

The aryl hydrocarbon receptor (AhR) is a cytoplasmic transcription factor that translocates into the nucleus upon ligand binding. Then, AhR is exported back to the cytoplasm, where it is degraded by the ubiquitin-proteasome pathway. AhR has an important role in the inflammatory response, and it regulates the expression of cytokines such as TNF, IL-6, IL-10, IL-17A/F, and IL-21. Several cell types express AhR. Among them, the pro- (M1) and anti-inflammatory (M2) macrophages (M ϕ s) express high levels of this receptor. In the present work we analyzed the regulation of AhR in human M1 and M2 M ϕ s generated *in vitro* exposed to the inflammatory stimulus LPS. The M1 and M2 M ϕ s were derived from CD14⁺ circulating monocytes cultured with GM-CSF (M1, GM-M ϕ s) and (M2, M-M ϕ s). These M ϕ s express analogous levels of AhR at the protein level, but M-M ϕ s express higher levels of *AHR* transcripts. Here, we evaluated the expression of AhR at the level of mRNA and protein upon cell stimulation with LPS, as well as its activation by analyzing its subcellular localization. LPS significantly induced *AHR* expression only in GM-M ϕ s in spite we detected a similar tendency in M-M ϕ s. The expression of AhR at the protein level decreased in both cell types when exposed to LPS, but its amounts were increased at late times of stimulation. The decrease of AhR expression was reduced and even reverted in the presence of the proteasome inhibitor MG132. Moreover, LPS induced *IDO1* expression in both M ϕ types, a enzyme that generates endogenous ligands of AhR such as the kinurenic acid. Lastly, LPS modified the AhR subcellular localization, favoring its accumulation in the cell cytoplasm. Altogether, these data indicate that LPS positively regulates the expression of *AHR*, preferentially in GM-M ϕ s, and suggest that LPS induces AhR degradation via proteasome, likely through AhR ligand generation that promotes receptor activation.

INTRODUCCIÓN

1. El receptor de aril hidrocarburos

El receptor de aril hidrocarburos (AhR) es un factor de transcripción activado por unión a ligando que media los efectos biológicos de ciertos contaminantes ambientales como los hidrocarburos aromáticos policíclicos y halogenados (ej: dioxinas, TCDD), a través de su heterodimerización con una segunda proteína denominada translocador nuclear del AhR (ARNT, *Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*). La formación de este heterodímero transcripcionalmente activo induce la expresión de genes blanco que codifican enzimas implicadas en detoxificación, tanto de la fase I (citocromos P450, CYP450) como de la fase II (transferasas). Los CYP450 actúan como monooxigenasas capaces de metabolizar un amplio espectro de sustratos, con un bajo nivel de afinidad y una escasa eficiencia catalítica. Sus funciones van desde la síntesis y degradación de hormonas esteroideas, vitaminas y ácidos grasos (“endobióticos”) hasta el metabolismo de sustancias exógenas como fármacos, contaminantes ambientales y carcinógenos (“xenobióticos”) (1). El hecho de que las enzimas inducidas por la unión de xenobióticos al AhR tengan actividad degradativa frente a dichas moléculas ha generado la idea de que esta vía representa una respuesta metabólica adaptativa que protege al organismo de contaminantes ambientales. Sin embargo, esta ruta no siempre ofrece protección. En muchos casos, la inducción de estas enzimas conduce a una activación/inactivación metabólica de sus sustratos, tanto exógenos como endógenos. En el caso de los sustratos exógenos, la acción de estas enzimas puede, en determinados casos, convertirlos en compuestos carcinogénicos más potentes y difíciles de eliminar, incrementando así el riesgo de padecer cáncer. En el caso de los sustratos endógenos la acción de estas enzimas puede provocar su inactivación, con las consecuencias fisiológicas adversas que ello pueda conllevar. Aunque los mecanismos que regulan la toxicidad inducida por las dioxinas no se conocen completamente a nivel molecular, una gran cantidad de evidencias experimentales indican que se encuentran mediados por el AhR.

Resulta evidente que el AhR surgió en la escala evolutiva mucho antes de la presencia de estos compuestos policíclicos aromáticos en el medio ambiente. Su expresión constitutiva en la mayoría de los tipos celulares y la conservación de su secuencia proteica entre diversos grupos de vertebrados (2), tanto acuáticos como terrestres, sugieren un papel relevante para el AhR en la fisiología celular. A pesar de ello, el AhR es considerado un receptor “huérfano” ya que no se conocen completamente sus ligandos endógenos ni sus funciones fisiológicas. Varias evidencias experimentales sugieren que el AhR puede activarse transcripcionalmente en ausencia de ligando exógeno (3-5). El triptófano y otros compuestos que contienen grupos indol (6, 7), metabolitos del ácido araquidónico como la lipoxina A4 (8), la bilirrubina (9), el 7-ceto-colesterol (10), algunos flavonoides (11) y ciertas moléculas presentes en la orina (12) interaccionan con el AhR induciendo la transcripción del gen blanco *CYP1A1*. Sin embargo, los bajos niveles, la poca potencia inductora y la distribución restringida de algunos de estos compuestos los hacen candidatos poco probables como reguladores endógenos del AhR en la mayoría de los tejidos. Así, se ha propuesto que el AhR podría haber evolucionado como parte de un sistema inducible por unión a sustrato que estuviera encargado de metabolizar sustancias lipofílicas presentes en la dieta, y que TCDD podría estar mimetizando la unión de esas moléculas al receptor. TCDD induce cambios en la proliferación y la diferenciación de una gran variedad de tipos celulares (13, 14) por lo que, alternativamente, otra posibilidad es que TCDD esté mimetizando la acción de un ligando endógeno involucrado en la regulación de estos procesos celulares.

Las evidencias más claras que relacionan al AhR con funciones fisiológicas provienen del estudio de ratones “*knock-out*” para este receptor (*Ahr*^{-/-}). Estos ratones no expresan AhR y, por tanto, carecen de la inducción de genes blanco tras el tratamiento con TCDD. Inesperadamente, se observó que el nivel constitutivo de algunos de estos genes se encontraba marcadamente disminuido en ausencia del AhR, lo que de nuevo sugería que este receptor está implicado en procesos fisiológicos independientes de la unión de xenobióticos. Los ratones *Ahr*^{-/-} tienen un

desarrollo y un crecimiento hepático disminuidos, alteraciones en el sistema inmune periférico, hipertrofia en el músculo cardíaco, hiperplasia e hiperqueratosis en la piel, hiperproliferación de vasos sanguíneos en el hígado con presencia de fibrosis, calcificaciones en el útero y deficiencias reproductivas (15-17). Este conjunto de observaciones sugieren que el AhR juega un papel relevante en procesos fisiológicos. El “síndrome del paladar hendido” observado en los ratones expuestos a TCDD es dependiente del AhR, ya que no es observado en los ratones *Ahr*^{-/-}. El mecanismo por el cual el AhR media la aparición de este síndrome podría estar relacionado con una disminución en los niveles de algunos factores de crecimiento indispensables en el desarrollo embrionario (18). En este sentido, un fenotipo de “paladar hendido” similar al que provoca TCDD ha sido descrito para ratones que carecen de la expresión del factor de crecimiento transformante (TGF)- β 3 (19). Desde el punto de vista toxicológico, los ratones *Ahr*^{-/-} no son susceptibles a la toxicidad aguda inducida por TCDD, ya que incluso cuando son tratados con una dosis 10 veces superior a la empleada en ratones control no presentan alteraciones clásicas como acumulación lipídica en los hepatocitos ni atrofia en la corteza del timo (20). Por tanto, el AhR media la toxicidad aguda inducida por dioxina en ratón. Por otra parte, la exposición crónica a hidrocarburos aromáticos policíclicos como el benzo[*a*]pireno (BP) conduce a la aparición de tumores sólo en el caso de ratones que poseen AhR y no en ratones *Ahr*^{-/-} (21), aportando una clara evidencia del papel del AhR en la carcinogénesis mediada por estos compuestos xenobióticos.

Uno de los fenotipos más llamativos en los ratones *Ahr*^{-/-} es una marcada patología hepática. El hígado de los ratones carentes del AhR es de aproximadamente la mitad del tamaño que el de los ratones silvestres. Adicionalmente, en el hígado de los ratones *Ahr*^{-/-} aparece una acumulación de colágeno que resulta en fibrosis hepática, fundamentalmente alrededor de las triadas portales (20, 22). También presentan una mayor proliferación de vasos sanguíneos en la zona portal y en algunas zonas del parénquima, con bloqueo del sistema portal-sistémico (23). La presencia de fibrosis y la degeneración hepática incrementa con la edad. El metabolismo del ácido retinoico hepático también se encuentra alterado,

observándose niveles más altos de este compuesto y de sus derivados en los ratones *Ahr*^{-/-} con respecto a los animales silvestres (24). Esto puede deberse a una deficiencia en la capacidad de los ratones *Ahr*^{-/-} para catabolizar el ácido retinoico, proceso que es llevado a cabo por un miembro de la familia de los citocromos P450. Este aumento del ácido retinoico se produce en paralelo a un aumento en la actividad de la enzima transglutaminasa de tipo II (TGasa-II), una proteína inducible por ácido retinoico a través del receptor de ácido retinoico (25). Otra característica del hígado de los ratones *Ahr*^{-/-} es la presencia de un nivel proteico elevado de las formas activas de TGF- β 1 y β 3, particularmente en las áreas que presentan una mayor fibrosis (26). Este aumento parece ser debido a una regulación post-transcripcional, ya que no se encuentran diferencias a nivel de sus mRNAs. Adicionalmente, podría estar también mediado por los altos niveles de la actividad TGasa-II, que convierte la forma latente de estas proteínas en la forma activa. Esta hipótesis se ve apoyada por la observación de que los cultivos primarios de hepatocitos de ratones *Ahr*^{-/-} presentan niveles elevados de TGF- β 1 activo (26). La familia de proteínas del TGF está compuesta por citocinas que inhiben proliferación celular y promueven muerte celular por apoptosis. Cabe la posibilidad de que las alteraciones en la expresión y actividad de TGF- β 1 puedan estar implicadas en el menor tamaño del hígado así como en la existencia de fibrosis hepática en estos ratones. De manera similar, los fibroblastos embrionarios procedentes de ratones *Ahr*^{-/-} presentan una tasa de proliferación celular más baja y una mayor apoptosis en relación a fibroblastos embrionarios procedentes de ratones silvestres, lo que probablemente sea también debido a la sobre-producción de TGF- β 1 (27).

2. Estructura del AhR

AhR y ARNT pertenecen a la familia de reguladores transcripcionales con dominios bHLH/PAS (*basic Helix-Loop-Helix/Period[PER]-Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator[ARNT]-Single minded[SIM]*). Este grupo de proteínas está implicado en

el control de procesos fisiológicos tales como embriogénesis, desarrollo, neurogénesis, ritmo circadiano, metabolismo y la respuesta a hipoxia (28).

Tanto el AhR como el ARNT poseen un dominio bHLH localizado en el extremo N-terminal de la proteína (Fig. 1). La región básica media la unión al DNA mientras que el dominio HLH es necesario para la dimerización con otras proteínas. Siguiendo hacia el extremo C-terminal presentan un dominio 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-minded, participa en el desarrollo del sistema nervioso central). El dominio PAS se presenta en 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 chaperona HSP90 (**H**eat **S**hock **P**rotein 90). Estudios recientes de modelaje proteico sugieren que los ligandos del AhR se unen preferencialmente al dominio PAS-B, en concreto a los residuos Leu347 y Ala375 (29). Los extremos C-terminales del AhR, del ARNT y de SIM contienen una región rica en glutamina similar a los dominios de activación presentes en otros factores de transcripción. Esta región podría interactuar con diversos co-activadores, aún no completamente caracterizados, para regular el proceso de transactivación. El AhR por sí mismo presenta baja capacidad de unión al DNA, de modo que los homodímeros AhR/AhR son transcripcionalmente inactivos (30). La adquisición de la capacidad transcripcional por parte del AhR requiere de su interacción con ARNT; así, la forma activa del receptor de dioxina es heterodimérica. Por otro lado, la proteína ARNT no une TCDD ni tiene la capacidad de heterodimerizar con el AhR si éste no se encuentra unido a ligando. Aunque ARNT también posee un dominio de transactivación, parece que es el AhR el que aporta esta función dentro del heterodímero.

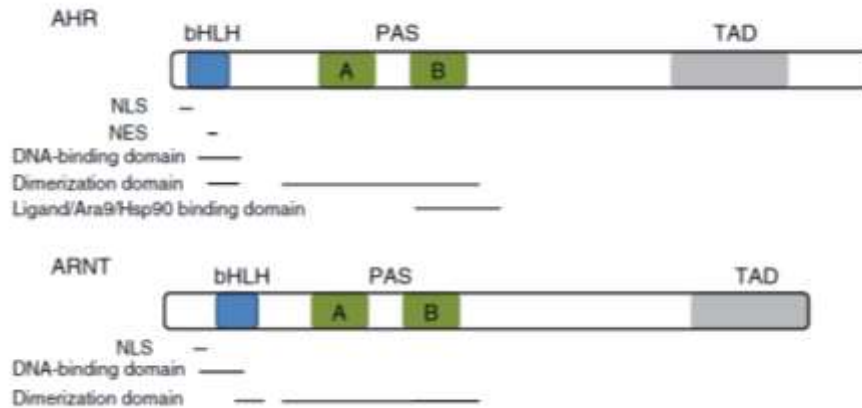


Figura 1. Representación esquemática de la estructura de la proteína AhR. En el extremo amino terminal se puede observar el dominio de dimerización con el DNA, la región bHLH. En el extremo carboxilo terminal posee una región rica en glutamina similar a los dominios de unión presentes en otros factores de transcripción, necesaria para la transactivación (TAD). En la zona central contiene la región de homología PAS (PER, ARNT, SIM) con los dominios conservados entre los miembros de la familia (A y B)

Tanto AhR como ARNT poseen una señal de localización nuclear (NLS, *Nuclear Localization Signal*) situada en el extremo N-terminal de la proteína. La NLS es reconocida por dos componentes del complejo que forma el poro nuclear. El AhR presenta además dos señales de exportación nuclear (NES, *Nuclear Export Signal*), una en el dominio bHLH y otra en el dominio PAS-A; ambas ricas en leucina y reconocidas por la proteína CRM1 (*Chromosome Region Maintenance 1*) (31, 32). La capacidad de dimerización de las proteínas bHLH les otorga un potencial mecanismo de diversidad reguladora. Por ejemplo, diferentes heterodímeros pueden poseer diferente estabilidad, diferentes afinidades de unión al DNA o diferentes secuencias de reconocimiento en las regiones promotoras. Esto sugiere que el AhR podría formar heterodímeros con otras proteínas con dominios bHLH distintas a ARNT, generando moléculas reguladoras con propiedades diversas. Por analogía con otros sistemas de proteínas bHLH, tanto la cantidad absoluta de cada miembro del heterodímero como sus cantidades relativas podrían influir en el alcance y el tipo de respuesta que desencadenan. Se ha encontrado que el AhR

está generalmente en exceso con respecto a ARNT (33) y que, por tanto, ARNT podría ser la proteína limitante en la activación del AhR en algunos tipos celulares.

Los miembros de la familia de factores de transcripción con dominios bHLH/PAS han sido clasificados en dos categorías. En el grupo I se incluyen AhR, HIF1- α (*Hypoxia-Inducible Factor 1 α*) (34), HLF/EPAS1 (*HIF-Like Factor/Endothelial PAS1*) (35), SIM (36) y Trachealess (37). Estos reguladores tienen propiedades comunes tales como la capacidad de unión a HSP90 y la capacidad de heterodimerización con ARNT, pero carecen de la capacidad de formar homodímeros activos. Por el contrario, el grupo II, formado por ARNT, ARNT2 y PER, muestran promiscuidad en la heterodimerización, pueden formar homodímeros activos y ninguno de ellos se une a HSP90 (28).

3. Activación del AhR

La unión del AhR a sus ligandos produce la activación del receptor, lo que conlleva cambios en su localización celular. En ausencia de ligando, la forma inactiva de AhR se encuentra asociada a distintas moléculas chaperonas: dos moléculas de HSP90 (38), una de p23 (39) y una de XAP2 (*Hepatitis B virus X-Associated Protein 2*) (40), también conocida como ARA9 (*AhR-Associated protein 9*) (41) o AIP (*Ah Interacting Protein*).

Tras la unión del ligando, el AhR se acumula rápidamente en el núcleo celular donde forma un heterodímero transcripcionalmente activo con ARNT (42). Esta heterodimerización disocia el complejo HSP90-XAP2-p23 de AhR (39). El heterodímero activo AhR/ARNT se une a elementos reguladores denominados XREs o DREs (*Xenobiotic o Dioxin Response Elements*) situados en regiones potenciadoras/promotoras de genes blanco, favoreciendo así la transcripción de los mismos. La secuencia consenso establecida para el XRE es 5' TNGCGTG 3'. Mediante el análisis de bases de datos ha sido posible identificar esta secuencia consenso en numerosos genes potencialmente regulados por el AhR (43). El

heterodímero AhR/ARNT se une en una relación 1:1 a esta secuencia consenso. A la actividad transcripcional de los receptores nucleares del tipo del AhR contribuyen además co-factores transcripcionales ubicuos. En el caso de AhR/ARNT se ha descrito que el co-activador p300/CBP (*cAMP response element binding protein (CREB)-Binding Protein*) facilita la interacción entre el heterodímero AhR/ARNT y los componentes de la maquinaria basal de transcripción asociados a la caja TATA. Esta interacción se realiza a través de ARNT (50). También participan el co-activador RIP140 (*Receptor Interacting Protein 140*) y varios miembros de la familia SRC (*Steroid Receptor Coactivator*), los cuales se unen al AhR en la región rica en glutamina (44). Algunos de estos factores tienen actividad acetiltransferasa con la que acetilan las histonas en su extremo N-terminal reduciendo la afinidad entre estas proteínas y el DNA y, por tanto, las interacciones nucleosoma-nucleosoma (45). Así, la interacción del complejo AhR/ARNT con estos factores en la región potenciadora provocaría una remodelación de la cromatina en la zona promotora de los genes blanco, lo cual facilitaría la unión de la maquinaria basal de transcripción y el inicio de la misma por la RNA polimerasa II (46). En la Fig. 2 se muestra un esquema del mecanismo de acción propuesto para la activación transcripcional de genes dependientes del AhR.

Los genes blanco para el AhR identificados hasta la fecha codifican para enzimas implicadas en la detoxificación metabólica, tanto de la fase I (*CYP1A1*, *CYP1A2* y *CYP1B1*) como de la fase II (NADPH quinona oxidoreductasa, *NQO1*; aldehído deshidrogenasa 4, *ALDH4*; UDP-glucuronosiltransferasa1A6, *UGT1A6*; glutation-S transferasa α 1, *GSTA1*). Se ha descrito también una acción reguladora negativa para el AhR, proponiéndose que su unión a las secuencias XRE podría impedir estéricamente el acceso de otros factores de transcripción a sus regiones específicas de interacción en el promotor de los correspondientes genes blanco (47, 48).

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 del 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. 2) (49, 50).

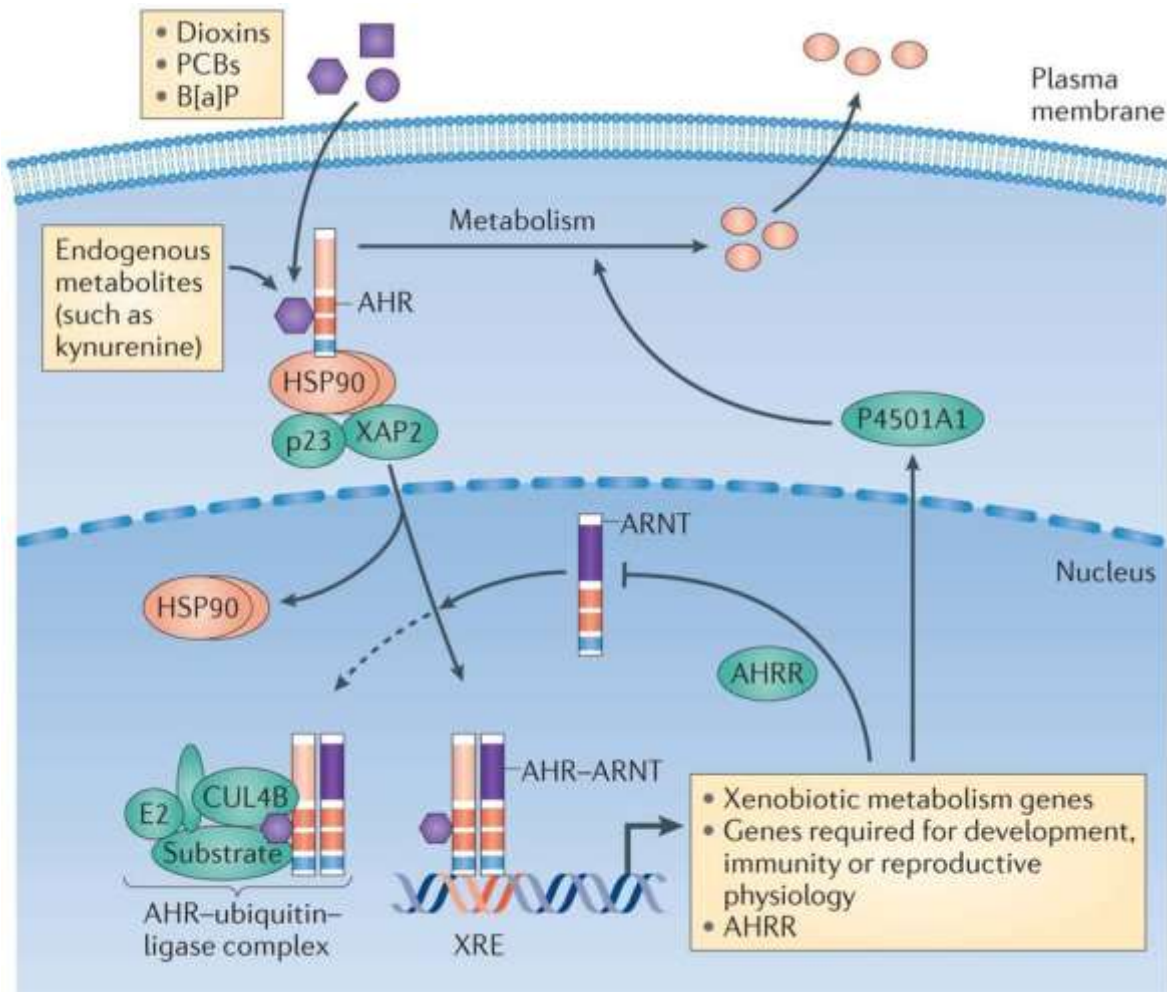


Figura 2. Modelo de activación del AhR.

4. El AhR regula algunas vías de transducción de señales en el citoplasma

El principal mecanismo de acción propuesto para los procesos de regulación génica mediados por la activación de AhR (conocido como la vía genómica) es la unión con su ligando, transporte al núcleo donde se disocia de las proteínas chaperonas, formación de un dímero con ARNT, y finalmente su unión a elementos DRE localizados en las regiones promotoras de sus genes blanco. Sin embargo, se han

descrito otras vías por las cuales la activación del AhR puede llevar a cabo sus efectos (mecanismo no genómico o no clásico), como por ejemplo la activación de proteínas cinasas citoplasmáticas que a su vez son capaces de activar otras vías de señalización.

Dado que no todos los genes activados por tratamientos con dioxinas en diferentes células y tejidos poseen secuencias DRE, lo que implica que son activados por una vía diferente a la acción de AhR como factor de transcripción, surgió la necesidad de elucidar estos mecanismos alternativos. Gran número de investigaciones encaminadas a identificar estos procesos ofrecen resultados que demuestran la activación de diversas cinasas, entre las que destacan la cinasa dependiente de cAMP (PKA), proteína cinasa C (PKC) y algunas otras tirosina cinasas. Al mismo tiempo, se ha descrito la supresión de diversas ATPasas, todas mediadas por la exposición a TCDD.

Una de las cinasas más claramente activada en respuesta a la administración de TCDD es la tirosina cinasa Src (p60) en adipocitos de ratón y cobayos. Se ha demostrado que esta cinasa facilita la activación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) mediada por la acción de TCDD, lo cual podría resultar en proliferación y diferenciación celular (51).

Recientemente se han identificado otros procesos que apoyan el mecanismo de acción “no genómico” sobre proteínas involucradas en vías de señalización mediado por TCDD en diversos tipos celulares, como la activación de Src y de EGF en testículos, la inducción de ciclooxigenasa (COX)-2 en hepatocitos de rata, la inhibición de la adipogénesis en fibroblastos C3H10T1/2 por contribución de la actividad de Src, la GTPasa pequeña Rho, la fosfolipasa A2 citoplásmica (cPLA2), y la cinasa activada por mitógenos (MAPK) ERK. Uno de los procesos más claramente observados y estudiados en diversas líneas celulares es el incremento en la concentración de Ca^{2+} tras la exposición a TCDD. Este fenómeno está directamente conectado con la activación de las proteínas cPLA2, PKC, ERK, Src y la proteína de activación (AP)-1 por AhR. Debido a éste y otros fenómenos, existen varios reportes que proponen la idea de eventos inflamatorios desencadenados por la acción de TCDD (51, 52).

5. Características de los macrófagos M1 y M2

El AhR es una proteína que se expresa en células de diversos orígenes, y es un receptor muy ubicuo. Varios tipos celulares pertenecientes al sistema inmunitario, tanto adaptativo como innato, expresan AhR, como linfocitos T y B, neutrófilos, células dendríticas y macrófagos (M ϕ s).

Los M ϕ s son células moduladoras y efectoras del sistema inmune, y constituyen una de las primeras líneas de defensa contra microorganismos patógenos y células neoplásicas. El AhR se expresa en grandes cantidades en estas células, aunque sus funciones en las mismas no están completamente definidas, y se le han asignado tanto papeles pro- como anti-inflamatorios (ver más adelante).

Los M ϕ s poseen receptores para una gran cantidad de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), de tal forma que pueden activarse en respuesta a una gran cantidad de microorganismos. Los M ϕ s han sido clasificados de acuerdo a sus características funcionales y a la forma en que se activan. La activación denominada “clásica” da lugar a los M ϕ s M1, los cuales se generan en respuesta a citocinas como interferón (IFN)- γ y el factor estimulante de colonias de granulocitos/M ϕ s (GM-CSF), o estímulos bacterianos como el lipopolisacárido (LPS). Estos M ϕ s poseen propiedades inflamatorias. Los M ϕ s M2 se caracterizan por poseer un fenotipo anti-inflamatorio, y se originan a partir de la activación “alternativa” de los mismos en respuesta a citocinas de tipo Th2, como interleucina (IL)-4, o inmunosupresoras, como IL-10 o el factor estimulante de colonias de M ϕ s (M-CSF) (53).

Después de la liberación desde la médula ósea a la sangre, los monocitos son reclutados a los tejidos donde, según la naturaleza de las señales ambientales, que se pueden diferenciar a células dendríticas mieloides o diversas formas de M ϕ s. Los M ϕ s M1 producen altas cantidades de citocinas pro-inflamatorias y polarizantes como el factor de necrosis tumoral (TNF), IL-1, IL-12 e IL-23, junto con intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno, y desempeñan un papel importante en la eliminación de patógenos intracelulares por su alta capacidad microbicida;

adicionalmente, poseen funciones anti-tumorales. Además, los M ϕ s M1 se caracterizan por sus altos niveles de expresión de enzimas como la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS) y la indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) 1. En contraste, los M ϕ s M2 expresan altos niveles de receptores de membrana involucrados en el reconocimiento y/o la internalización de patógenos, tales como receptores scavenger (CD163) y lectinas (receptor de manosa -CD206-, DC-SIGN -CD209-), no producen citocinas pro-inflamatorias, y liberan citocinas anti-inflamatorias como la IL-10 y el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1RA), así como algunas quimiocinas como CCL17, CCL18 y CCL22. Los M ϕ s M2 están involucrados en la remodelación tisular, la eliminación de parásitos y la reparación de heridas. En general, los M ϕ s M1 modulan la respuesta de los linfocitos T cooperadores (Th)1 mientras que los del tipo M2 regulan la respuesta Th2. La activación de los M ϕ s puede ser reversible dada la plasticidad que poseen estas células, y está regulada por el microambiente en el que se encuentran.

Diversos estudios han evaluado la capacidad de los monocitos para diferenciarse en respuesta a factores de crecimiento hematopoyéticos como GM-CSF y M-CSF. Estos estudios han demostrado que los M ϕ s generados *in vitro* a partir de monocitos purificados de sangre periférica en presencia de GM-CSF (GM-M ϕ s) o de M-CSF (M-M ϕ s) adquieren características diferenciales y se asemejan a los M ϕ s M1 y M2, respectivamente (54).

6. Participación del AhR en la inflamación

Se sabe que el AhR no solamente regula la expresión de genes relacionados con el metabolismo de xenobióticos, sino que también se le atribuye una importante participación en la respuesta inmunitaria. Por ejemplo, en células dendríticas se ha demostrado que la activación del AhR con ligandos endógenos como 6-formilindol[3,2-b]carbazol (FICZ) y (H)-(indol-3'-carbonil- tiazol-4-metil ester) ácido carboxílico disminuye la expresión de moléculas de presentación antigénica y co-estimuladoras como HLA-DR y CD80/86. En este mismo estudio se observó que la activación del AhR disminuye la secreción de IL-1 β , IL-6, IL-23 y TNF pero induce

la secreción de IL-10 en las células dendríticas de pacientes con enfermedad de Behcet en respuesta a LPS (55). Se ha descrito recientemente que el LPS induce la transcripción de *AHR* en células dendríticas humanas, e *in vitro* se ha demostrado que este efecto es dependiente de la activación de NF- κ B (RelA y p50) (56).

Se sabe que la secuencia a la cual se une el complejo AhR-ARNT (5' TNGCGTG-3) se encuentra presente en los promotores de los genes que codifican para IL-10, IL-21, IL-17A/F, IL-22 y ROR γ t, por lo cual se sugiere un importante papel de AhR en el desarrollo y diferenciación de los linfocitos T hacia un fenotipo regulador Tr1 e inflamatorio Th17 (57, 58).

Los datos publicados sobre la función inflamatoria del AhR en los M ϕ s presentan varias discrepancias. En ratones se ha reportado que el AhR inhibe la apoptosis de los M ϕ s y su producción de especies reactivas de oxígeno en respuesta a la infección con *Lysteria monocytogenes* (59). En ratones estimulados con LPS se observó que la expresión del AhR se induce en los M ϕ s cuando son estimulados con LPS; también se observó que los ratones deficientes de AhR producían altas cantidades de IL-6, TNF e IL-12 y bajas cantidades de IL-10, y que eran más susceptibles de sufrir un choque séptico inducido por LPS en comparación con los ratones silvestres. Estos datos sugieren que la función del AhR en los M ϕ s está relacionada con la regulación negativa de la respuesta inflamatoria. Adicionalmente este estudio demostró que el AhR forma un complejo con los factores de transcripción STAT1 y NF- κ B, conduciendo a la inhibición de la expresión de IL-6 (60). Otros trabajos han descrito la inducción de moléculas pro-inflamatorias en los M ϕ s dependiente del AhR, como IL-1 β , TNF, IL-8, CCL1, o COX-2 (61-63). Un solo trabajo describe que la activación del AhR con BP altera negativamente la generación de M ϕ s adherentes diferenciados en presencia de GM-CSF o M-CSF, así como su funcionalidad (endocitosis y fagocitosis) y la expresión de algunos marcadores como CD11a, CD71, CD80, CD86 o CD64. Además, se describe una clara inhibición de la secreción de TNF al estimular las células tratadas con BP con LPS (64).

Recientemente, se ha definido un nuevo enfoque de AhR en la inflamación por su participación en la tolerancia a endotoxinas (65), la cual se define como la capacidad del hospedero de reducir los efectos ocasionados por una sobreproducción de moléculas inflamatorias en respuesta al LPS, que en altas concentraciones pueden ocasionar un shock endotoxémico. Este estado de tolerancia es ocasionado por una exposición previa a bajas concentraciones de LPS, que induce un estado refractario en las células hacia un desafío posterior con LPS. En este estudio, utilizando un modelo de ratón deficiente de AhR, se indujo una endotoxemia en los ratones y se observó que los animales *Ahr*^{-/-} sobreviven menos que los ratones silvestres. En este mismo estudio se observó que el LPS, además de inducir la expresión del AhR, también induce la expresión de las enzimas IDO1 y triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO) 2, enzimas responsables de generar ligandos endógenos del AhR como el ácido kinurénico, favoreciendo su activación (65).

7. Vía de señalización del TLR4

El LPS es un componente de la pared celular de bacterias Gram negativas y ubicado en el medio ambiente. El receptor tipo Toll (TLR) 4 es un receptor de LPS, y su estimulación induce la liberación de citocinas pro-inflamatorias que son necesarias para desencadenar una potente respuesta inmune (66). Diversas evidencias sugieren que ciertos PAMPs pueden activar al TLR4. Estas moléculas incluyen al LPS de bacterias Gram negativas, la proteína de fusión del virus sincitial respiratorio, la proteína de envoltura del virus de tumor mamario de ratón, en adición con diversas moléculas endógenas que pueden interactuar directamente o indirectamente con el TLR4, como proteínas de choque térmico, ácido hialurónico y defensina β 2.

El LPS es uno de los componentes más estudiados de bacterias que puede inducir una inflamación sistémica o sepsis si ocurre una señalización excesiva. El LPS comprende el lípido A, un núcleo de oligosacárido y una cadena lateral O. La estimulación por LPS en células de mamíferos ocurre a través de su interacción con diversas proteínas incluyendo la proteína de unión a LPS (LBP), CD14, y MD-2. El

LBP es una proteína soluble la cual se une directamente al LPS y facilita la asociación entre el LPS y CD14. CD14 es una proteína acoplada a glicosil-fosfatidilinositol, la cual también existe en forma soluble. CD14 facilita la transferencia de LPS al complejo receptor TLR4/MD-2 y modula el reconocimiento de LPS (66).

Después del reconocimiento del LPS, el TLR4 oligomeriza y recluta moléculas adaptadoras a través de la interacción con sus dominios TIR (*Toll Interleukine-1 Receptor*), los cuales contienen tres regiones altamente conservadas que median la interacción proteína-proteína entre los TLRs y proteínas adaptadoras. Hay cinco proteínas mediadoras con dominios TIR: MyD88, TIRAP, TRIF, TRAM y SARM. Los TLRs usan diferentes combinaciones de proteínas adaptadoras para determinar la señalización río abajo. De manera interesante, el TLR4 es el único TLR que utiliza todas estas proteínas adaptadoras (66).

La señalización del TLR4 ha sido dividida en una vía dependiente y otra independiente de MyD88. Estudios basados en Mφs deficientes de MyD88 demuestran que la vía dependiente de MyD88 es la responsable de la expresión de citocinas pro-inflamatorias, mientras que la vía independiente media la inducción de IFN de tipo I y de genes inducibles por IFN.

En adición al dominio TIR, MyD88 también contiene un dominio de muerte (DD), el cual puede reclutar a otras proteínas con el mismo dominio, a través de interacciones homotípicas. Después de la estimulación del LPS, MyD88 recluta y activa un DD contenido en la cinasa 4 asociada al receptor de IL-1 (IRAK-4).

ANTECEDENTES DIRECTOS

En nuestro laboratorio se ha determinado la expresión diferencial de genes en los GM-M ϕ s y M-M ϕ s diferenciados *in vitro*, mediante ensayos de microarreglos. El gen que codifica para AhR (*AHR*) y algunos de sus genes blanco (*AHRR* -proteína represora de AhR-, *IL8*, *PTGS2*, *HES1*, *CXCL12*, *HMOX1* y *BLVRB*) se observaron expresados preferencialmente en los M-M ϕ s (Fig. 3). La expresión diferencial de estos genes se validó por RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR) en 2 donantes independientes, observándose incrementada en los M-M ϕ s con respecto a los GM-M ϕ s. 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 M-M ϕ s en relación a los GM-M ϕ s, evaluado igualmente por RT-qPCR.

Con el descubrimiento de una expresión preferencial de AhR en los M-M ϕ s con respecto a los GM-M ϕ s, y teniendo en cuenta el vasto repertorio funcional, tanto de los M ϕ s como de dicho factor de transcripción, surgió la inquietud de determinar si el AhR estaba involucrado en la generación del fenotipo anti-inflamatorio de los M-M ϕ s, por lo que se decidió evaluar su expresión y su implicación en la generación de ambas subpoblaciones celulares.

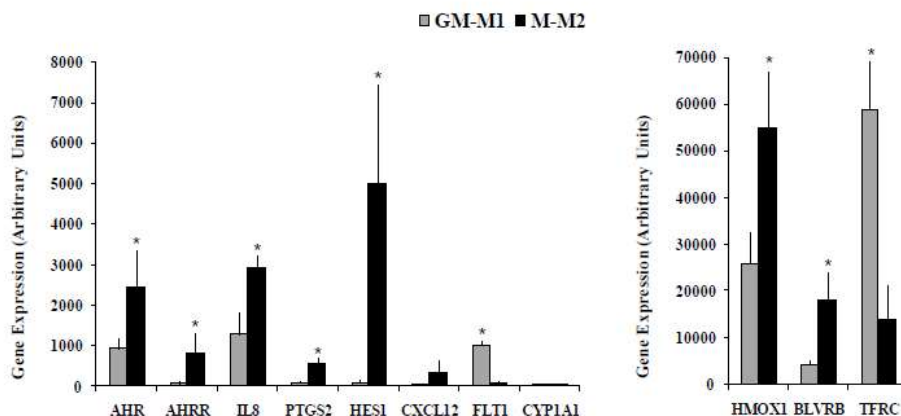


Figura 3. Expresión diferencial del AhR y algunos de sus genes blanco en los Mφs.

La expresión de los genes indicados en los Mφs GM-M1 (derivados a partir de monocitos con GM-CSF) y GM-M2 (derivados con M-CSF) se determinó mediante ensayos de microarreglos. AHR: receptor de aril hidrocarburos; AHRR: proteína represora de AhR; IL8: interleucina 8; PTGS2: ciclooxigenasa 2; HES1: factor de transcripción **H**airy and **E**nhancer of **S**plit 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. Estadística: * p<0.05.

Si bien a nivel de transcritos se observó que el *AHR* se expresa preferencialmente en los M-Mφs, a nivel de proteína se observó una expresión similar del AhR en ambas subpoblaciones celulares. Además, en presencia de ligandos exógenos (TCDD, BP) se detectó, como era de esperar, la degradación de la molécula (Fig. 4).

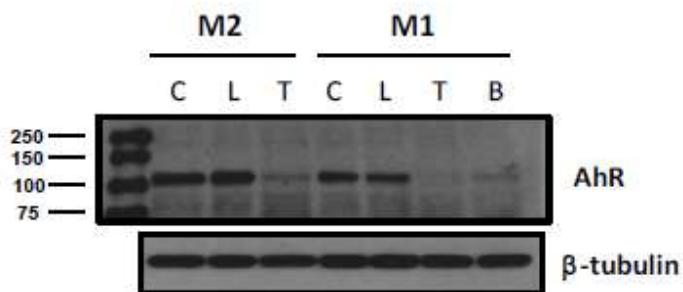


Figura 4. Expresión y activación del AhR en los Mφs diferenciados *in vitro*. La expresión del AhR se evaluó mediante Western blot en los M-Mφs (M2) y GM-Mφs (M1) en condiciones basales (C) o mantenidos durante 24 h a partir del 6° día de cultivo con TCDD (T), BP (B), o lipoxina A4 (L). (C) corresponde a los Mφs tratados con vehículo (DMSO). La expresión de β-tubulina se utilizó como control de carga.

La expresión de la proteína del AhR en los GM-M ϕ s a niveles similares con respecto a los M-M ϕ s era incongruente con los resultados previos obtenidos a partir de los ensayos de microarreglos, donde la expresión del mRNA de AhR y de varios de sus genes blancos se demostró incrementada en los M-M ϕ s. Una posibilidad para explicar esta incongruencia es que el AhR se expresaba en ambos tipos de M ϕ s pero estaba preferencialmente activo en los M-M ϕ s, lo que conduciría a un grado de recambio del receptor más rápido en estas células. Para comprobar esta hipótesis se realizaron extracciones de las fracciones nucleares y citoplásmicas de los M ϕ s y se evaluó la expresión del AhR en ambas fracciones, ya que la translocación del AhR al núcleo celular demuestra su activación. En la Fig. 5 se puede observar que el AhR se encuentra activo en ausencia de ligandos exógenos, tanto en los GM-M ϕ s como en los M-M ϕ s.

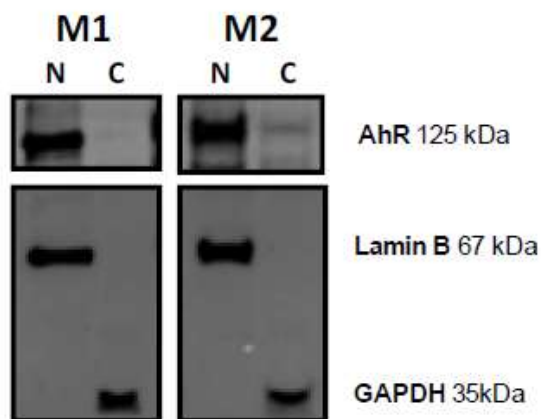


Figura 5. Expresión del AhR en extractos nucleares y citoplasmáticos de M ϕ s diferenciados in vitro. GM-M ϕ s (M1) y M-M ϕ s (M2) en el día 6 de diferenciación fueron lisados y se extrajeron las fracciones nucleares (N) y citoplásmicas (C) de cada uno de ellos. La expresión del AhR en cada fracción se determinó mediante Western blot. Anticuerpos anti-lamin B y anti-GAPDH se emplearon como control de carga y como control de la pureza de las fracciones nucleares y citoplásmicas, respectivamente.

Como se describió previamente, existe evidencia que comprueba que la activación del AhR con ligandos exógenos puede modificar la funcionalidad de varias poblaciones celulares del sistema inmune. Por tal motivo, con la finalidad de evaluar si la falta de actividad de AhR estaba ligada a la funcionalidad de los M ϕ s, se realizaron cultivos en presencia o ausencia de un inhibidor del AhR, la α -naftoflavona (α -NF). Las células fueron activadas con LPS durante las últimas 24 h de cultivo y se midió la secreción de citocinas asociadas a los fenotipos M1 (TNF, IL-6, IL-8) y M2 (IL-10) en los sobrenadantes de los M ϕ s mediante la técnica de ELISA (Fig. 6). La secreción de citocinas se vio afectada fundamentalmente en los GM-M ϕ s cuando se inhibió la actividad del AhR durante su diferenciación, con una disminución drástica de IL-6 e IL-10. En cambio, en los M-M ϕ s la inhibición del AhR sólo disminuyó la producción de IL-10. En ausencia de LPS la producción basal de citocinas apenas fue modulada con la inhibición del AhR.

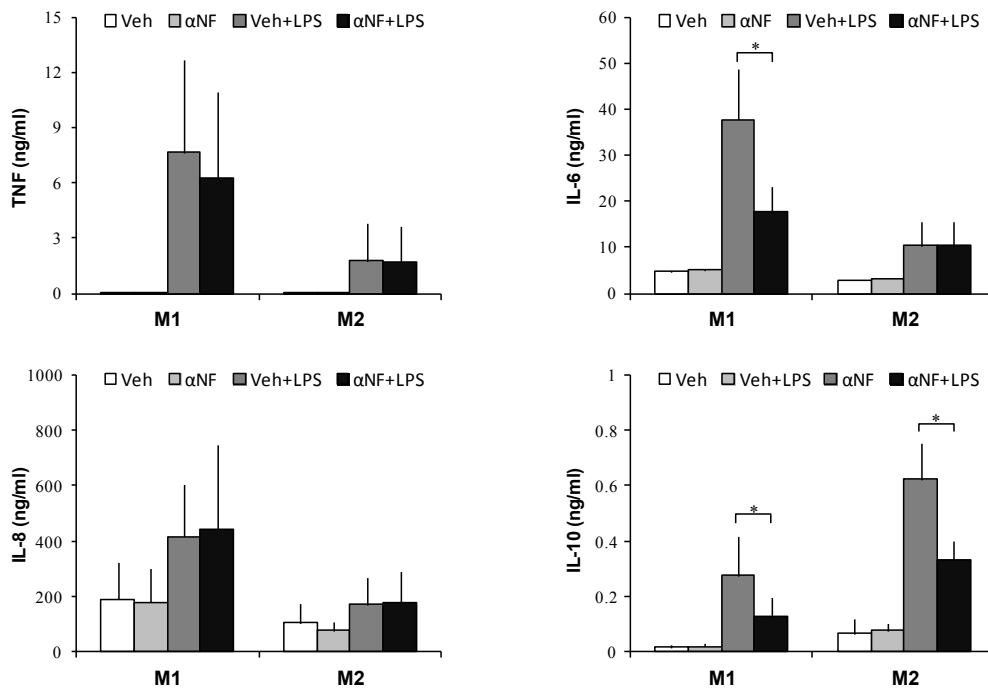


Figura 6. El AhR regula diferencialmente la síntesis de IL-6 e IL-10 en los GM-Mφs y M-Mφs. A) Efecto del antagonista de AhR α -NF sobre la secreción de citocinas en los GM-Mφs (M1) y M-Mφs (M2). Los Mφs fueron diferenciados en presencia del vehículo (DMSO) o α -NF. En el día 5 de cultivo las células fueron estimuladas con LPS y los sobrenadantes 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: * $p < 0.05$.

Una posibilidad es que los diferentes metabolismos de estas células generen ligandos diferentes del AhR con capacidades distintas para activar a la molécula, ya sea en sus funciones a nivel transcripcional o en su unión a otros ligandos celulares que incidan en la secreción de estas citocinas. IL-10 es una poderosa citocina inmunosupresora, por lo que es posible sugerir que el AhR, además de modular la capacidad inflamatoria de los GM-Mφs (mediante la inducción de la secreción de IL-6 e IL-10), también podría estar implicado en la promoción de las capacidades inmunosupresoras de los M-Mφs (mediante la inducción de IL-10), lo que concuerda con los datos reportados en ratón para los Mφs peritoneales. Debido al efecto generalizado del AhR en la inducción de IL-10 en Mφs que se encuentran polarizados de manera opuesta, sugerimos que esta actividad podría ser relevante en lo que respecta a las funciones del AhR *in vivo*.

JUSTIFICACIÓN

Las evidencias anteriores proponen un papel importante del AhR en la modulación de algunas funciones inmunitarias.

El LPS induce la expresión del AhR en diversos tipos celulares y activa vías de señalización que pueden converger para que se lleve a cabo la activación del AhR en ausencia de ligandos exógenos.

Sin embargo, aún no está bien entendido si compuestos como el LPS inducen la expresión o actividad del AhR en los M ϕ s humanos polarizados, así como los mecanismos por los cuales estos procesos se llevarían a cabo.

HIPÓTESIS

El LPS induce la expresión y activación del AhR en los M ϕ s diferenciados *in vitro* con GM-CSF o M-CSF.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del LPS en la expresión y activación del AhR en macrófagos humanos polarizados.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar si el LPS induce la expresión del mRNA de AhR en los macrófagos M1 y M2.
2. Evaluar si el LPS induce la expresión de AhR a nivel de proteína en estas células, en presencia o ausencia de inhibidores del proteosoma.
3. Determinar si el tratamiento con LPS modifica la localización subcelular de AhR.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Muestras

Se utilizaron concentrados leucocitarios de donadores sanos, hombres entre 20 y 25 años de edad, que fueron proporcionados por el Banco de Sangre del CMN “La Raza” (IMSS).

2. Obtención de células mononucleares de sangre periférica

Se obtuvieron las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, por sus siglas en inglés) a partir de 100-200 ml de un concentrado leucocitario, mediante un gradiente de densidad en Ficoll (Lymphoprep™, Axis-Shield, Oslo, Noruega). Las células se centrifugaron a 2000 rpm durante 30 min a temperatura ambiente y se recuperó la fracción de PBMCs de la interfase entre el ficoll y el plasma. Las células fueron resuspendidas en DPBS y se realizó el conteo celular microscópicamente excluyendo a las células muertas por su tinción con el colorante vital azul tripano.

3. Obtención de las células CD14⁺

Las PBMCs obtenidas en el paso anterior se colocaron en tubos Falcon de 15 ml y se lavaron con PBS suplementado con 0.5% de suero fetal bovino (SFB) y 2 mM EDTA (tampón MACS) a 300 xg, durante 10 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 4 ml de la solución anterior.

La purificación de la población de células CD14⁺ se realizó mediante una selección inmunomagnética positiva con un anticuerpo (Ab) anti-CD14 acoplado a microperlas magnéticas (Miltenyi Biotec). Las PBMCs se incubaron 20 min a 4°C con agitación constante. Después de realizar varios lavados con DPBS, las células se resuspendieron en 4 ml de tampón MACS y se procedió a la separación magnética sobre columnas LS colocadas sobre un magneto (QuadroMACS, Miltenyi). El pH de la columna se equilibró con 3 ml de tampón MACS. Posteriormente se adicionó la suspensión celular y se descartó la fracción que pasa libremente por la columna. Se realizaron 3 lavados del reservorio con 3 ml de tampón MACS, se retiró la columna

del magneto, y los monocitos CD14⁺ se eluyeron con tampón MACS. La suspensión celular obtenida se lavó con PBS y las células se resuspendieron en 2 ml de medio RPMI completo (RPMI 1640 suplementado con 10% SFB, 2mM L-glutamina y 1% antibióticos) para realizar el conteo celular.

4. Obtención de macrófagos con GM-CSF y M-CSF

Los monocitos CD14⁺ obtenidos en el paso anterior se cultivaron a una densidad de 0.7×10^6 células/ml en medio de cultivo RPMI 1640 completo suplementado con GM-CSF (1000 U/ml, ProBiomed) o con M-CSF (10 ng/ml, Calbiochem,) para inducir la diferenciación de los monocitos hacia GM-M ϕ s o M-M ϕ s, respectivamente. Las citocinas se adicionaron cada 2 días. El cultivo se realizó durante 6 días, tras los cuales se obtuvieron los M ϕ s maduros.

5. Cultivos de los macrófagos en presencia de LPS

Una vez diferenciados los M ϕ s, éstos fueron estimulados con 100 ng/ml de LPS (Sigma) durante 0, 2, 4, 8 y 12 h. Se obtuvieron los lisados celulares totales o las fracciones nucleares y citoplasmáticas a los distintos tiempos y se evaluó la expresión del AhR mediante la técnica de Western blot (WB). Los cultivos se realizaron en presencia o ausencia del inhibidor de proteosoma MG132 (Sigma) a una concentración de 10 μ M.

6. Obtención de fracciones nucleares y citoplasmáticas

Los M ϕ s recolectados fueron lavados con PBS, y el pellet obtenido se dejó secar a temperatura ambiente. El aislamiento de las fracciones nucleares y citoplasmáticas se llevó a cabo mediante el uso del kit NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Pierce). Para ello, se agregaron 25 μ L de buffer EB (frío) + 2 μ L del cocktail de inhibidores de proteasas, homogeneizando la mezcla perfectamente con ayuda de una micropipeta. La muestra se agitó con vórtex durante 20 seg y fue incubada a 4°C durante 10 min, repitiendo estos dos últimos pasos durante 3 ciclos. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 14,000

rpm durante 20 min a 4°C. El sobrenadante (fracción citoplásmica) fue recolectado en un tubo eppendorf de 1.5 mL estéril. El pellet obtenido (fracción nuclear) se secó a temperatura ambiente y los núcleos fueron lisados con 30 µL de SDS 5% y almacenados hasta su uso.

7. Ensayos de Western Blot

Los Mφs de tipo M1 y M2 generados *in vitro* se resuspendieron en 100 µl de solución de lisis [tampón Tris 20 mM, NaCl 150 mM, Nonidet P-40 1%, EDTA 5 mM e inhibidores de proteasas y fosfatasa (Halt™, Thermo Scientific)]. Los lisados fueron incubados durante 30 min a 4°C y sonicados 5 veces con pulsos de 10 seg a 40 A. Las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm durante 20 min para recuperar los lisados de proteínas totales. Tanto los lisados totales como las fracciones nucleares y citoplásmicas fueron resueltos en geles de SDS-PAGE al 12% bajo condiciones reductoras. A continuación las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF (BioRad Laboratories). Las membranas fueron bloqueadas con TBS-T (TBS 0.1% Tween 20) y leche en polvo al 5%, lavadas con TBS-T, e incubadas con un Ab monoclonal (mAb) anti-AhR (Pierce) diluido en TBS-T con leche en polvo al 1% durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, las membranas fueron lavadas con TBS-T e incubadas con el correspondiente Ab secundario conjugado a peroxidasa (HRP) (Dako). La reacción se reveló mediante el sistema de quimioluminiscencia Immun-Star™ (BioRad Laboratories). Una vez detectada la expresión del AhR las membranas fueron incubadas con un mAb anti-GAPDH (Santa Cruz Biotechnologies) o un mAb anti-γ-tubulina (Sigma-Aldrich) y sus correspondientes Ab secundarios acoplados a HRP, como control de carga. En el caso de la detección del AhR en las fracciones subcelulares se empleó el mAb anti-GAPDH como control de carga de las fracciones citoplásmicas y un mAb anti-lamin B (Santa Cruz Biotechnologies) como control de carga de las fracciones nucleares.

La densidad de las bandas fue analizada con el programa ImageJ versión 1.42q.

7. Ensayos de microscopía de fluorescencia

Las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos a una densidad de 0.5×10^6 células/ml en placas de 24 pozos. Al término de su diferenciación con GM-CSF o M-CSF se retiró el sobrenadante y se realizó un lavado con PBS. Las células fueron fijadas con formaldehído al 3.7%. Una vez fijadas y lavadas se realizó el bloqueo y la permeabilización de las células con DPBS-BSA 1%. Posteriormente se realizaron las inmunofluorescencias utilizando un Ab primario anti-AhR de cabra (Santa Cruz Biotechnologies), el cual se dejó incubando durante 1 h. Se realizó un lavado con PBS y posteriormente se utilizó un anticuerpo secundario acoplado a FITC y se dejó incubando 2 h. Por último se realizó una tinción con DAPI durante 5 min para teñir los núcleos.

Las muestras fueron observadas en un microscopio confocal Olympus (Olympus Corporation). Las imágenes fueron analizadas utilizando el programa FIJI.

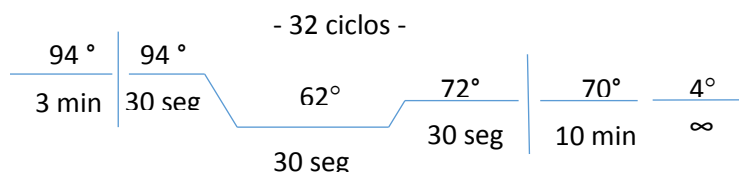
8. Extracción de RNA

Una vez recolectadas las células, la extracción de RNA se realizó con el reactivo Trizol® (Ambion). Se añadieron 250 μ L de trizol a $5-7 \times 10^6$ células. Posteriormente, la mezcla se agitó en vórtex y se conservó 5 min a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó a 10,000 rpm por 15 min a 4°C y se obtuvo la fase acuosa, a la cual se le añadieron 125 μ L de isopropanol, se mezcló por inmersión y se incubó 10 min a 4 °C. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min a 4°C y se desechó el sobrenadante. A continuación se adicionaron 250 μ L de etanol 75 % diluido en agua con dietilpirocarbonato (DEPC), se mezcló y se centrifugó nuevamente a 8,000 rpm por 5 min a 4°C. El sobrenadante se desechó y el RNA se resuspendió en 15 μ L de agua-DEPC. El RNA se incubó a 60°C por 10 min y finalmente se cuantificó y evaluó su integridad en un gel de agarosa al 1 %.

9. Análisis de la expresión de transcritos por RT-PCR

Una vez obtenido el RNA, el cDNA se obtuvo mediante el Kit *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis* (Thermo Scientific). La expresión de *IDO1* y *GAPDH* se evaluó mediante PCR de punto final con los oligonucleótidos sense 5'

GCGCTGTTGGAAATAGCTTC 3' y antisense 5' TTTGGGTCTTCCCAGAACC' (IDO1) y sense 5' GAGTCAACGGATTTGGTCGT 3' y antisense 5' GGTGCTAAGCAGTTGGTGGT 3' (GAPDH), bajo las siguientes condiciones:



Adicionalmente se evaluó la expresión de *AHR*, *IDO1* y *TBP* (*TATA Binding Protein*) como control mediante PCR cuantitativa utilizando las sondas y oligonucleótidos prediseñados de Applied Biosystems (*TaqMan® Gene Expression Assays*), en el sistema 7500 de Applied Biosystems, bajo las siguientes condiciones:

Componentes de reacción	µL para Rx. Vol total de 20 µL
20X TaqMan® Gene Expression Assay	0.5
2X TaqMan® Gene Expression Master Mix	10
cDNA template (1 to 100 ng)	9.5 µL (25 ng)

	Incubación UNG	Activación AmpliTaq Gold	PCR	
			40 ciclos	
			Desnaturalización	Alineamiento/Extensión
Temperatura	50 °C	95 °C	95 °C	60 °C
Tiempo	2 min	10 min	15 seg	1 min
Volumen	20 µL			

Los valores de ΔCt (*cycle threshold*) se obtuvieron relativizando cada valor de Ct del gen problema al valor de Ct de *TBP*. Para comparar los niveles de transcritos entre dos condiciones problema se empleó la fórmula $Q_r = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$, donde el $\Delta\Delta Ct$ entre dos condiciones se calculó con la siguiente fórmula: $\Delta\Delta Ct_{(condición\ 1 - condición\ 2)} = (\Delta Ct_{gen-TBP})_{condición\ 1} - (\Delta Ct_{gen-TBP})_{condición\ 2}$.

10. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete GraphPad Prism versión 5. Se utilizó el test paramétrico t de Student y los grupos de valores se expresaron como la media \pm SD. Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS

1. La expresión del AhR a nivel de mRNA es regulada por LPS

Una vez diferenciados los monocitos hacia GM-M ϕ s y M-M ϕ s se evaluó la expresión del mRNA de AhR en ausencia de estímulo y tras la activación con LPS durante 1, 2, 4, 8 y 12 h en tres donadores independientes. El LPS induce la transcripción del AhR de manera bifásica en ambas subpoblaciones de M-M ϕ s, ya que se detectan dos picos de transcritos, a las 2 y a las 12 h tras la estimulación (Fig. 7). Los incrementos del nivel de transcritos del AhR con respecto a las células control son significativos en los GM-M ϕ s, y sólo se detecta una tendencia en los M-M ϕ s (Fig. 7). De manera interesante, la cantidad de mRNA de AhR disminuye tras 8 h de estimulación con LPS en ambos tipos celulares con respecto a las células control. En el caso de los M-M ϕ s esta disminución es más pronunciada, y se produce de manera consistente en los tres individuos analizados, aunque no alcanza la significación estadística ($p=0.06$).

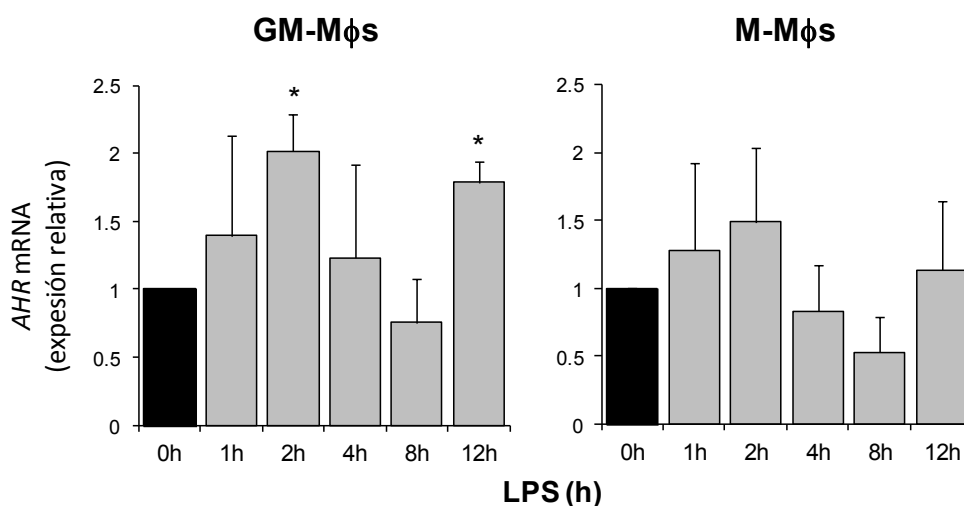


Figura 7. Evaluación de la expresión del mRNA del AhR en los M ϕ s en respuesta a LPS. Se analizó la expresión del *AHR* mediante RT-qPCR en poblaciones de GM-M ϕ s y M-M ϕ s, tras seis días de diferenciación. Se muestran los valores de Qr en los M ϕ s estimulados con LPS a los tiempos indicados con respecto a los M ϕ s no estimulados (0 h). Los resultados son la media \pm SD de 3 donantes independientes. Estadística: * $p < 0.05$.

2. El LPS modula la expresión del AhR a nivel de proteína

Una vez determinado que el LPS regula tanto positiva como negativamente la transcripción del AhR, evaluamos su efecto en los niveles de la proteína. Analizamos dos donantes diferentes, y en ambos casos detectamos una disminución de los niveles del AhR tras 2-4 h de estimulación de los M ϕ s con LPS (Fig. 8). A tiempos tardíos (12 h) los niveles del AhR se recuperaron y prácticamente alcanzaron las cantidades observadas en los M ϕ s sin estimular (Fig. 8). Por lo tanto, con base en estos resultados podemos concluir que la cinética de inducción de la transcripción del AhR por parte del LPS no tiene un reflejo claro en sus niveles de proteína, al menos cuando evaluamos los lisados celulares totales. Además, el efecto negativo que produce el LPS a las 8 h sobre los niveles de transcritos del receptor en los M-M ϕ s tampoco correlaciona con una disminución en los niveles de la proteína en estos tiempos, ya que a partir de las 8 h de estimulación se recuperan parcialmente los niveles del AhR en estas células.

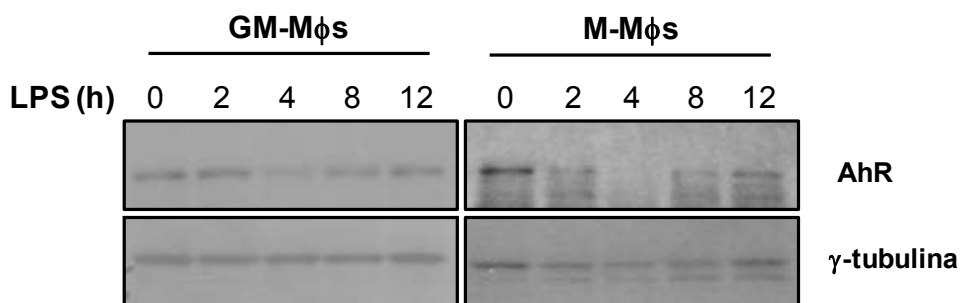


Figura 8. Evaluación de la expresión del AhR en los M ϕ s tras el estímulo con LPS. Lisados totales de GM-M ϕ s y M-M ϕ s diferenciados durante 6 días se resolvieron en geles de SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de PVDF. Se evaluó la expresión del AhR en los M ϕ s sin estimular (0 h) y tras el estímulo con LPS durante 2, 4, 8 y 12 h mediante Western blot. γ -tubulina se empleó como control de carga. Se muestran los resultados representativos de un donante de 2 analizados.

Algunos autores han reportado que los niveles proteicos del AhR en las fracciones nucleares de las células pueden variar en respuesta a ciertos estímulos y que estas variaciones no se detectan en los lisados totales de células (66). Por este motivo

evaluamos la expresión del AhR en respuesta a LPS en las fracciones nucleares y citoplásmicas de los GM-M ϕ s y M-M ϕ s (Fig. 9).

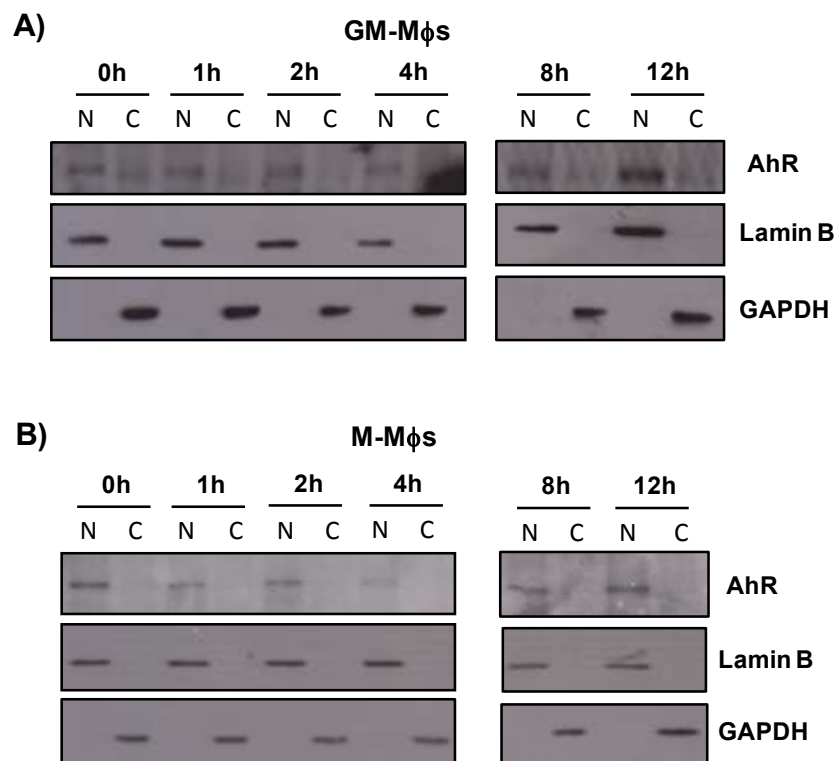


Figura 9. Evaluación de localización subcelular del AhR en los M ϕ s tras el estímulo con LPS. Se determinó la localización subcelular del AhR en las fracciones citoplásmica (C) y nuclear (N) de los GM-M ϕ s y M-M ϕ s diferenciados durante 6 días. Los M ϕ s se evaluaron en condiciones basales (0 h) y tras el estímulo con LPS durante 1, 2, 4, 8 y 12 h mediante Western blot. Imágenes representativas de la expresión del AhR en GM-M ϕ s (A) y M-M ϕ s (B). Lamin B y GAPDH se emplearon como controles de carga de la fracción nuclear y citoplásmica, respectivamente. Se muestran los resultados representativos de un donante de 2 analizados.

Los resultados obtenidos mostraron una tendencia similar a la observada en los lisados totales de las células, es decir, una disminución importante de los niveles proteicos del AhR tras 4 h de estimulación con LPS en ambos tipos de M ϕ s, mientras que se detectó la recuperación de sus niveles a tiempos tardíos (8-12 h) (Fig. 9). La

localización del AhR se mostró preferentemente nuclear en los dos tipos celulares, de manera similar a lo observado previamente en nuestro laboratorio.

3. Inducción de la expresión de *IDO1* tras el estímulo con LPS

Se ha reportado que los M ϕ s de tipo M1 expresan altos niveles del enzima IDO con respecto a los M ϕ s M2 (53), y que los factores polarizantes responsables de este incremento son el IFN- γ y el LPS (68). IDO podría ser una molécula importante en la modulación de la expresión del AhR por parte del LPS, ya que uno de los productos de esta enzima es el ácido kinurénico el cual se ha reportado como un ligando del AhR (65). La generación de ligandos del AhR tras el estímulo con LPS podría justificar la disminución de los niveles proteicos de este receptor, ya que está ampliamente descrita la degradación del AhR por la vía ubiquitin-proteosoma tras su activación (49, 50). Por este motivo evaluamos si el LPS era capaz de inducir la expresión de IDO1 en los GM-M ϕ s y M-M ϕ s. En primer lugar confirmamos que los GM-M ϕ s expresaban niveles incrementados de *IDO1* con respecto a los M-M ϕ s (Fig. 10A), como ya había sido reportado en los M ϕ s M1 diferenciados con LPS/IFN- γ con respecto a los M ϕ s M2 generados con IL-4. Seguidamente determinamos la capacidad de inducción de *IDO1* por parte del LPS en ambos tipos de M ϕ s mediante ensayos de cinética, analizando tiempos de estimulación que comprendieron 1-12 h (Fig. 10B, C). El LPS incrementó la expresión del mRNA de IDO1 en los GM-M ϕ s y M-M ϕ s, alcanzando un pico de expresión a las 8 h de estimulación en los GM-M ϕ s. En los M-M ϕ s detectamos dos picos de expresión, a las 4 y 12 h (Fig. 10B, C). Estos datos indican que el LPS induce la expresión de *IDO1* tanto en M ϕ s pro- como anti-inflamatorios, y que la máxima expresión del mRNA que codifica esta enzima se produce a tiempos tardíos de estimulación en los GM-M ϕ s (8 h) y de forma bifásica en los M-M ϕ s, a tiempos tempranos (4 h) y tardíos (12 h).

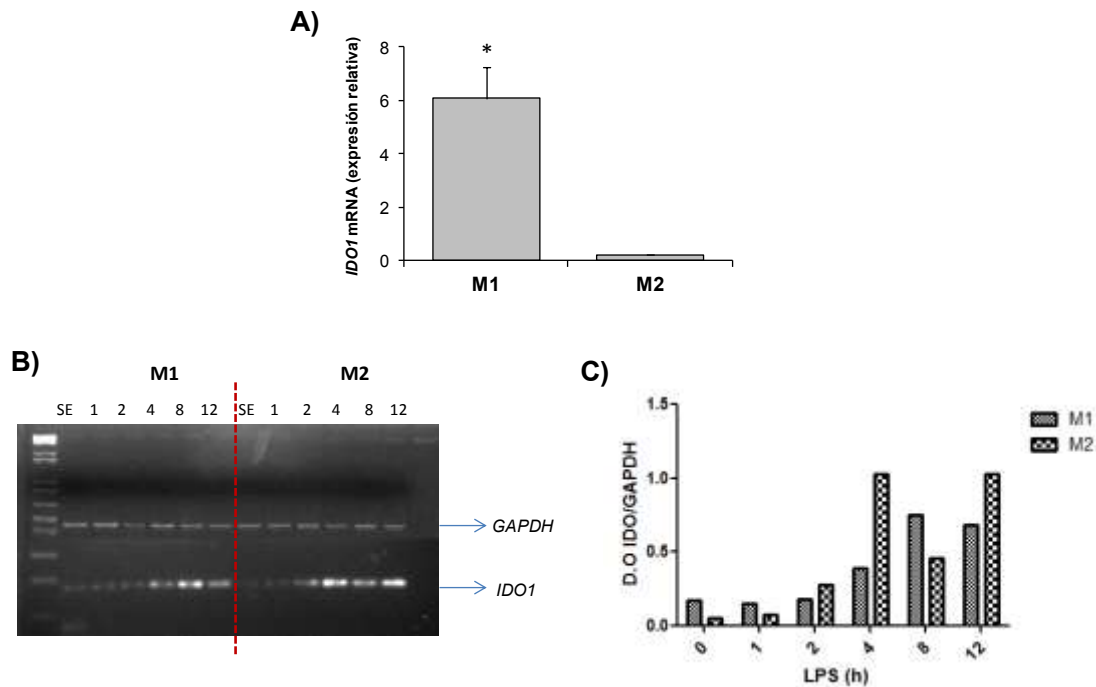


Figura 10. Expresión de *IDO1* en los Mφs en condiciones basales y tras la estimulación con LPS. A) Evaluación del mRNA de *IDO1* mediante qRT-PCR en los GM-Mφs (M1) y M-Mφs (M2) diferenciados durante 6 días. Los datos se expresan relativos a los valores obtenidos en los Mφs M2. B) Evaluación del mRNA de *IDO1* mediante PCR de punto final en condiciones basales (SE) y tras el estímulo de los Mφs M1 y M2 con LPS durante 1, 2, 4, 8 y 12 h. *GAPDH* se utilizó como control de la integridad del RNA. C) Análisis densitométrico de la expresión del mRNA de *IDO1* con respecto a *GAPDH* que se muestra en B), realizado mediante el software de análisis de imágenes ImageJ. Se muestran los resultados representativos de un donante de 2 analizados. * $p < 0.05$.

4. Evaluación del efecto del LPS sobre la síntesis del AhR en presencia de un inhibidor de proteosoma

En conjunto, los datos anteriores indican que el LPS puede inducir la expresión de mRNA del AhR en los Mφs, pero esta inducción no se refleja en sus niveles proteicos, y de hecho se detecta una disminución de los mismos en estas células. Además, observamos que el LPS induce la expresión de *IDO1* en los GM-Mφs y M-

M ϕ s, un enzima que genera ligandos del AhR y que, por lo tanto, podría inducir indirectamente su degradación por la vía ubiquitin-proteosoma. Por ello, con el fin de elucidar el efecto del LPS sobre los niveles proteicos del AhR eliminando el factor de su degradación, realizamos ensayos de activación de los M ϕ s con LPS en presencia del inhibidor de la subunidad 26S del proteosoma MG132. En estas condiciones los M ϕ s mantuvieron e incluso incrementaron la expresión del AhR (Fig. 11). En el caso de los GM-M ϕ s se detectó un ligero incremento de los niveles del AhR tras 2 h de activación con LPS, mientras que su expresión disminuyó tras 12 h de exposición a LPS (Fig. 11). En los M-M ϕ s se observó un comportamiento distinto, con un fuerte incremento de la expresión del AhR que se mantuvo hasta las 4 h de estimulación con LPS, mientras que los niveles de la proteína apenas fueron detectables a las 8 y 12 h. Estos datos indican que la disminución de los niveles proteicos del AhR en los M ϕ s tras 2-4 h de exposición a LPS (Fig. 8) es debida, al menos en parte, a la degradación del receptor por el proteosoma.

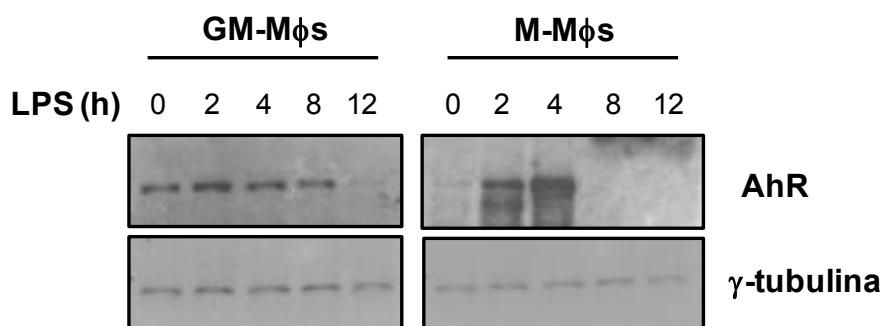


Figura 11. Los niveles proteicos del AhR en los M ϕ s estimulados con LPS son regulados por el proteosoma. Los M ϕ s se estimularon con LPS durante 0, 2, 4, 8 y 12 h en presencia del inhibidor de proteosoma MG132. Se obtuvieron los lisados totales celulares y se determinó la expresión del AhR mediante ensayos de WB. γ -tubulina se empleó como control de carga. Se muestran los resultados representativos de un donante de 2 analizadas.

5. Localización subcelular del AhR en respuesta a LPS evaluada por inmunofluorescencia

El AhR puede ser activado en ausencia de ligando, y se ha demostrado que este receptor se relocaliza preferentemente en el núcleo de células adherentes que son mantenidas en suspensión o en los cultivos celulares en los que se produce una ruptura de las uniones intercelulares (69, 70). La localización subcelular del AhR en este trabajo fue evaluada mediante WB (Fig. 9), y esta técnica implica romper las uniones intercelulares entre los M ϕ s adheridos y mantenerlos durante un tiempo en suspensión hasta realizar su lisis. Por este motivo quisimos verificar los resultados del WB mediante la técnica de inmunofluorescencia sobre M ϕ s que se mantuvieron en condiciones de adherencia (Fig. 12, 13). Observamos que en las células control el AhR se localizó preferentemente en el núcleo de los GM-M ϕ s y se distribuyó de manera equivalente entre el núcleo y el citoplasma de los M-M ϕ s (Fig. 12A-C; Fig. 13A-C). Tras el estímulo con LPS se detectó un incremento del AhR en la fracción citoplásmica de ambos tipos de M ϕ s, efecto que fue revertido parcialmente a tiempos tardíos de estimulación (12 h) (Fig. 12A-C; Fig. 13A-C). Estos datos indican que el LPS induce una redistribución del AhR entre el núcleo y el citoplasma de los M ϕ s. Sin embargo, queda por determinar si este efecto se debe a modificaciones en su grado de síntesis/degradación, a alteraciones en la retención del AhR en alguno de los compartimentos (por ausencia de ligandos –citoplasma– a tiempos tempranos o por modificaciones post-traduccionales que impiden su exportación nuclear [69] a tiempos tardíos), o al conjunto de las mismas.

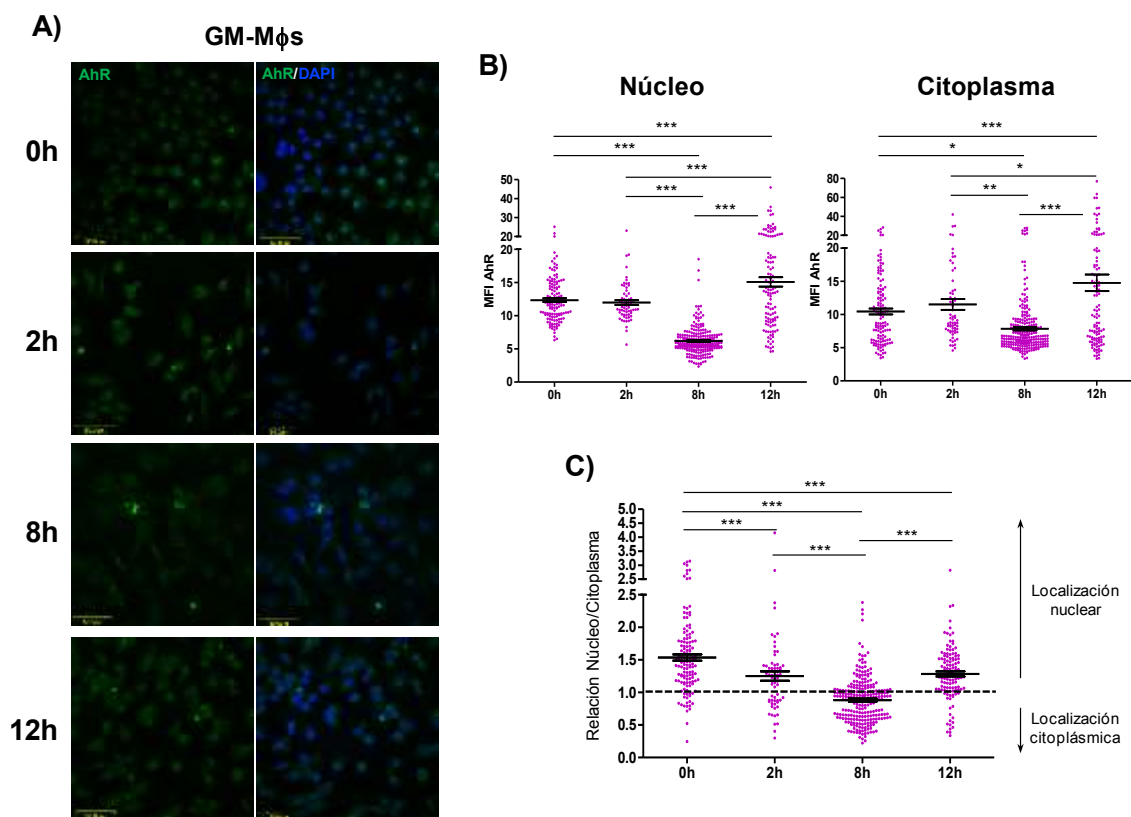


Figura 12. Localización subcelular del AhR en los GM-Mφs. Los GM-Mφs cultivados durante 6 días sobre cubreobjetos de vidrio fueron estimulados con LPS a los tiempos indicados, o bien mantenidos en ausencia de estímulo (0 h). Posteriormente se detectó la expresión del AhR en estos Mφs mediante inmunofluorescencia. Las muestras fueron analizadas en un microscopio confocal, y la expresión del AhR se evaluó mediante cuantificación de la fluorescencia en el programa FIJI. A) Micrografías de un donante representativo de 3 analizados donde se muestra la tinción del AhR en verde (FITC) y de los núcleos en azul (DAPI) (magnificación X60). B) Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (MFI) del AhR en las células individuales, detectada en el núcleo o en el citoplasma de las mismas. C) Relación entre la MFI del núcleo y la MFI del citoplasma en las células individuales. Estadística: * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$.

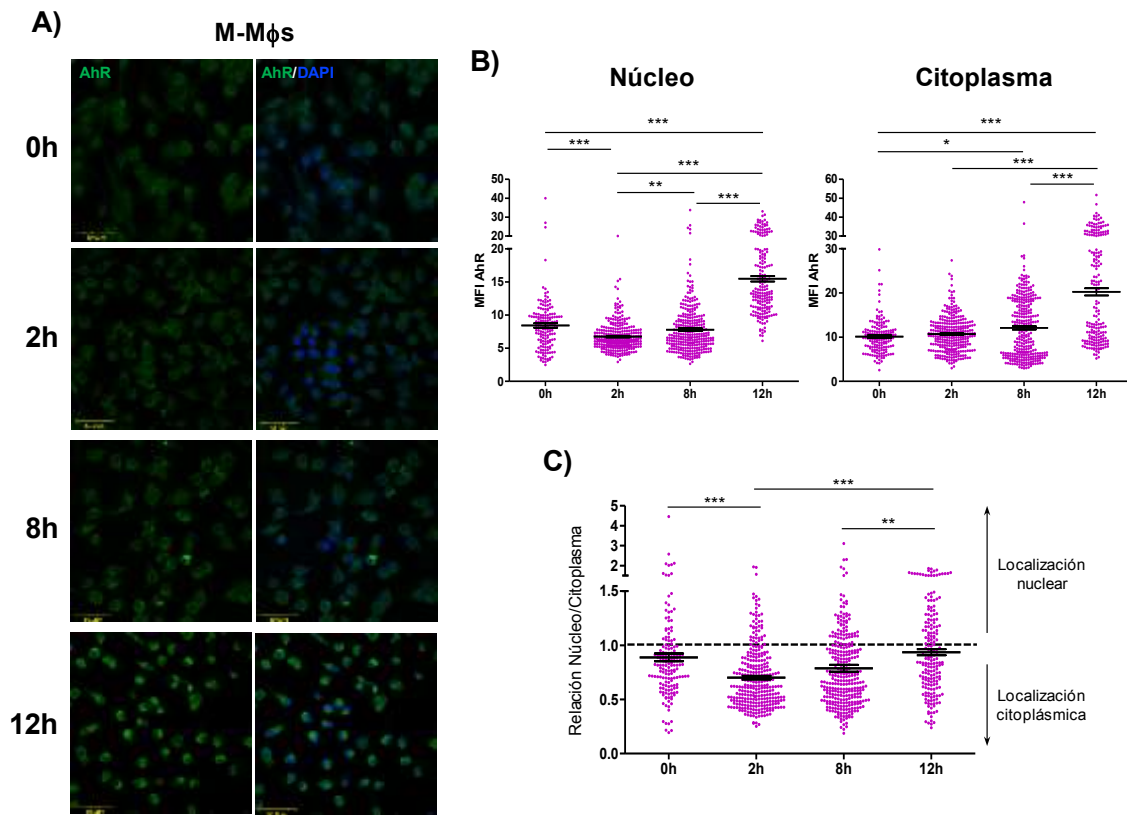


Figura 13. Localización subcelular del AhR en los M-Mφs. La expresión del AhR en los M-Mφs cultivados como se indica en la Fig. 12 se determinó mediante ensayos de inmunofluorescencia. Las muestras fueron analizadas en un microscopio confocal, y la expresión del AhR se evaluó mediante cuantificación de la fluorescencia en el programa FIJI. A) Micrografías de un donante representativo de 3 analizados donde se muestra la tinción del AhR en verde (FITC) y de los núcleos en azul (DAPI) (magnificación X60). B) Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (MFI) del AhR en las células individuales, detectada en el núcleo o en el citoplasma de las mismas. C) Relación entre la MFI del núcleo y la MFI del citoplasma en las células individuales. Estadística: * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$.

DISCUSIÓN

El AhR desempeña un importante papel en la respuesta inmunitaria, regulando la diferenciación de los linfocitos T, la secreción de citocinas en respuesta a componentes bacterianos, etc. Aunque existen estudios en los cuales se demuestra que estímulos inflamatorios como LPS y TNF pueden afectar la expresión de genes blancos del AhR como *CYP1A1*, *GSTA1* y *NQO1*, aún no están claros los mecanismos moleculares por los cuales estos estímulos regulan la función o actividad del AhR (71). Debido a que el AhR es un factor de transcripción involucrado en una amplia gama de funciones celulares, es probable que la regulación de la expresión de este receptor sea compleja y que suceda a varios niveles. En M ϕ s peritoneales de ratón (60) y en células dendríticas humanas (56) se ha descrito que el LPS induce la expresión del AhR, a nivel de proteína en los ratones y a nivel de mRNA y de proteína en humanos. Sin embargo, el efecto del LPS sobre la expresión del AhR en los M ϕ s humanos polarizados no ha sido reportado. En el presente trabajo hemos evaluado la regulación de la expresión del AhR en respuesta a LPS en M ϕ s humanos generados con GM-CSF (M1) y M-CSF (M2), tanto a nivel de mRNA como de proteína.

Los M ϕ s M1 y M2 son células claves en la regulación de la respuesta inflamatoria, y están involucrados en la promoción (M1) y resolución de la inflamación (M2). Ambos expresan AhR, pero su participación en las funciones de los M ϕ s no está bien definida. Los M ϕ s peritoneales de ratón deficientes de AhR incrementan la expresión de citocinas pro-inflamatorias en respuesta a LPS con respecto a los M ϕ s de los ratones silvestres, lo cual indica que el AhR afecta el balance entre el fenotipo pro-inflamatorio (M1) y el anti-inflamatorio (M2) (60). Adicionalmente, se ha sugerido que el AhR es un modulador negativo de la respuesta inmune, y los M ϕ s de ratones deficientes de AhR son más susceptibles al choque endotoxémico (72). Recientemente se ha demostrado que la deficiencia del AhR en M ϕ s peritoneales de ratón polarizados in vitro con IFN- γ /LPS (M1) o IL-4 (M2) altera sus funciones, aunque no de una manera clara. Los M ϕ s M1 incrementan la secreción de citocinas

inflamatorias pero disminuyen su producción de NO y su capacidad de fagocitosis (73). Los M ϕ s M2 disminuyen la expresión de algunos marcadores asociados con este fenotipo (Fizz1, Ym1, IL-10), mientras que aumentan la expresión de otros (arginasa) (73). Estos datos indican el nivel de complejidad del efecto del AhR sobre la polarización de los M ϕ s.

Datos previos del laboratorio indican que los GM-M ϕ s y los M-M ϕ s expresan *AHR* constitutivamente, aunque los niveles de transcritos están incrementados en los M-M ϕ s. En este trabajo describimos por primera vez que el LPS induce la transcripción de *AHR* en los M ϕ s polarizados, de manera significativa en los GM-M ϕ s a tiempos tempranos (2 h) y tardíos (12 h) de estimulación. En contraste, en los M-M ϕ s sólo pudimos detectar una tendencia a la inducción de los transcritos de *AHR* por parte del LPS, pero de manera interesante detectamos una supresión de la transcripción de este gen exclusivamente en estos M ϕ s a tiempos tardíos de estimulación (8 h). Aunque existen algunos estudios en los cuales se demuestra que el LPS puede inducir la expresión del AhR, se conoce muy poco acerca de su mecanismo de acción. El LPS es un PAMP capaz de activar diversas vías de señalización, dentro de las cuales se encuentran la vía de NF- κ B, de las MAPK y de los IFNs. Uno de los mecanismos que podrían mediar la inducción de *AHR* por el LPS sería la unión de factores de transcripción como NF- κ B a su promotor. El promotor de *AHR* presenta sitios potenciales de unión para diversos factores de transcripción, tales como Sp-1, NF- κ B, AP-1, e incluso para el mismo AhR (56, y datos propios). En células dendríticas humanas se ha demostrado que el LPS induce la expresión de *AHR* a través de la vía canónica de NF- κ B, siendo el heterodímero RelA/p50 el que se une a una secuencia consenso de NF- κ B en el promotor del *AHR* humano (56). La inducción temprana (2 h) de *AHR* que detectamos en nuestro trabajo y que es sólo estadísticamente significativa en los GM-M ϕ s podría estar mediada por el reclutamiento de RelA/p50 al promotor del AhR. Estudios previos de nuestro laboratorio han identificado diferencias en la expresión de miembros de la familia NF- κ B en los GM- y M-M ϕ s. Los factores de transcripción RelA y RelB se expresan

de manera constitutiva en los GM-M ϕ s, mientras que su expresión se induce en los M-M ϕ s sólo tras su estimulación con LPS (74). Este hecho podría explicar parcialmente tanto la transcripción basal del *AHR* como su inducción temprana en los GM-M ϕ s. Además, en el caso de que NF- κ B medie la inducción de *AHR* en los M-M ϕ s, es probable que se necesiten tiempos más largos para ello ya que requeriría la síntesis *de novo* de RelA. Otros factores que podrían incidir en la expresión de *AHR* por LPS serían Sp-1 y AP-1. En el caso de Sp-1, en nuestro laboratorio hemos determinado que los GM-M ϕ s expresan este factor de transcripción de manera constitutiva y que se localiza en las fracciones nucleares, mientras que no se detecta en los M-M ϕ s ni siquiera en respuesta a LPS (74). En contraste, datos procedentes del grupo del Dr. Ángel L. Corbí (Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, España) describen una activación constitutiva de miembros de la familia de factores de transcripción AP-1 en los M-M ϕ s (comunicación personal), por lo que es posible que estas moléculas estén involucradas en la transcripción basal del receptor en estas células, y no descartamos que puedan mediar una posible inducción de la transcripción de *AHR* por LPS. Así mismo, es posible que el AhR esté involucrado en la regulación de su propia síntesis, especialmente a tiempos tardíos de estimulación con LPS (12 h). En esta fase tanto los GM- como los M-M ϕ s recuperan la expresión del AhR, expresión que se ve abatida a tiempos más tempranos (ver más adelante). Además, la alta expresión de *IDO1* en respuesta a LPS en ambos tipos celulares (con picos de expresión a las 8 h en GM-M ϕ s y a las 4 y 12 h en los M-M ϕ s) podría favorecer la activación del AhR tras una exposición prolongada a este estímulo.

Un resultado interesante es la disminución del nivel de transcritos de *AHR* en ambos tipos de M ϕ s tras 4-8 h de exposición a LPS con respecto a las células estimuladas por 2 h. Datos de nuestro laboratorio indican que los M-M ϕ s expresan niveles similares de RelA con respecto a los GM-M ϕ s a las 8 h de estimulación con LPS (74), por lo que es improbable que los factores de transcripción NF- κ B sean limitantes en la transcripción de *AHR* tras una exposición prolongada de los M-M ϕ s

a este estímulo. Una posibilidad para explicar el decremento en los niveles de *AHR* en los GM- y M-M ϕ s a las 4 y 8 h de estimulación con respecto a la condición de 2 h en nuestro sistema es la inducción de la transcripción de *SOCS2* por parte del AhR, ya que recientemente se ha reportado que el AhR es reclutado al promotor del gen *socs2* en astrocitos en respuesta a LPS, y que *SOCS2* inhibe la activación de NF- κ B por mecanismos no descritos (75). Adicionalmente, en este trabajo detectamos una disminución muy notable del nivel de *AHR* en los M-M ϕ s tras 8 h de exposición a LPS con respecto a los niveles basales, lo que sugiere una represión activa de la transcripción del gen o un proceso de desestabilización del mRNA mediado por moléculas que se expresan o activan a tiempos tardíos de estimulación. Sin embargo, hasta el momento no se ha reportado ningún factor que presente actividad represora sobre el gen *AHR*, y no se han descrito mecanismos que regulen la vida media de su mRNA.

La regulación de la expresión del AhR a nivel de proteína es un proceso muy complejo, ya que las cantidades netas del AhR son el resultado de procesos de síntesis y degradación vía ubiquitin-proteosoma por activación con ligandos. Se ha demostrado que la vida media del AhR disminuye de 28 a 3 h en células murinas de hepatoma tras su tratamiento con TCDD (76). En nuestro trabajo detectamos una disminución de los niveles de proteína del AhR tras 2-4 h de tratamiento con LPS, tanto en los GM- como en los M-M ϕ s. La disminución fue más profunda en los M-M ϕ s, y apenas se detectaba después de 4 h de tratamiento cuando analizamos lisados celulares totales. Sin embargo, la expresión del AhR se recupera entre las 8-12 h de activación en ambos tipos celulares. Esta recuperación podría ser debida a una síntesis *de novo* de la molécula, ya que coincide con un incremento de su transcripción. Sin embargo, la disminución temprana de los niveles del AhR no correlaciona con un decremento de su transcripción. Es por ello que consideramos una degradación del receptor como consecuencia de su activación con ligandos generados en respuesta a LPS. Se conoce muy poco acerca de ligandos endógenos del AhR cuya síntesis pueda ser inducida por LPS, a excepción del ácido kinurénico. Este metabolito es generado como consecuencia de la acción de las enzimas IDO1

y TDO2 (65). Desconocemos si los GM- o M-M ϕ s expresan TDO2, pero ha sido ampliamente reportado que IDO1 se expresa diferencialmente en los M ϕ s M1 polarizados con IFN- γ /LPS con respecto a los M2 polarizados con IL-4 (53). En nuestro trabajo describimos que, al igual que los M ϕ s M1 con respecto a los M2, los GM-M ϕ s expresan mayores niveles de *IDO1* comparado con los M-M ϕ s. De manera interesante, pudimos comprobar que la expresión de *IDO1* se indujo en respuesta a LPS en ambos tipos de M ϕ s. Por lo tanto, consideramos que esta inducción podría traducirse en la generación de altas concentraciones de ácido kinurénico capaces de activar al AhR y conducir a una degradación prácticamente completa del receptor. A tiempos tardíos de estimulación con LPS la producción de ligandos endógenos y la consecuente activación del AhR podrían verse disminuidas por el agotamiento del sustrato, el triptófano, lo que explicaría al aumento de la expresión neta del AhR observada (77, 78). Sin embargo, sería necesario realizar experimentos de *knockdown* de *IDO1* para comprobar definitivamente esta hipótesis. De cualquier manera, no podemos descartar la acción de enzimas adicionales capaces de generar ligandos del AhR y que son activadas tras el estímulo con LPS, ya que los picos de inducción de *IDO1* en los M ϕ s se producen de manera tardía con respecto a los tiempos de máxima degradación del AhR.

Debido a que el AhR es degradado vía proteosoma después de su activación como parte de su mecanismo de regulación (79), decidimos evaluar únicamente el efecto del LPS sobre la síntesis de este receptor, utilizando el inhibidor del proteosoma MG132. En estos ensayos observamos que cuando las células son estimuladas con LPS en presencia de MG132 se induce fuertemente la expresión del AhR en los M-M ϕ s, y sólo ligeramente en los GM-M ϕ s, a tiempos tempranos (2-4 h) en ambos tipos celulares. Estos datos confirman que la disminución de la expresión del AhR observada previamente se debía a su degradación por el proteosoma, y sugieren de nuevo la generación de ligandos endógenos en respuesta a LPS. En el caso de los GM-M ϕ s el incremento de los niveles proteicos del AhR inducido por LPS podría correlacionar con el incremento de sus transcritos observado a tiempos tempranos. Sin embargo, el fuerte incremento del AhR observado en los M-M ϕ s es más difícil

de explicar. Es posible que dependa también del aumento de la síntesis de *AHR* inducido por LPS, aunque este incremento no fue significativo con respecto al observado de manera basal en los M-Mφs. Otra posibilidad es que los M-Mφs generen ligandos endógenos del AhR de forma constitutiva, y que sus niveles netos basales se vean profundamente influenciados por una alta tasa de degradación. De esta forma, la adición de MG132 junto con el alto grado de transcripción basal de *AHR* en los M-Mφs (alrededor de tres veces superior a la de los GM-Mφs, datos propios) podría justificar el fuerte incremento de los niveles proteicos del AhR. Si esta idea es correcta entonces el aumento del AhR a nivel de proteína observado en los M-Mφs no sería dependiente de LPS. Por lo tanto, a futuro es necesario evaluar estas células exclusivamente en presencia de MG132 para descartar o corroborar esta hipótesis.

Un dato sorprendente que encontramos tras el tratamiento de las células con MG132 fue la disminución de los niveles proteicos del AhR a tiempos tardíos tras la exposición a LPS (8-12 h). Algunos autores han reportado que el tratamiento de otros tipos celulares con MG132 altera la expresión de varias proteínas por mecanismos no relacionados directamente con la inhibición de su degradación por el proteosoma (67, 80). En el caso del AhR se ha reportado una profunda disminución de sus niveles citosólicos, aunque no se han determinado los mecanismos involucrados (67). En el caso de otras moléculas, como el receptor de la proteína de baja densidad (LDLR) y de su regulador la proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9), se ha demostrado que MG132 actúa a nivel transcripcional por un mecanismo dependiente de PKC (LDLR) o de la proteína de unión a elementos de respuesta a esteroides (SREBP) 1c (80), y se ha sugerido que la inhibición del proteosoma conduce al incremento de la vida media de proteínas de señalización como PKC, las cuales a su vez ejercen efectos sobre las proteínas evaluadas independientes del proteosoma. En consecuencia, la disminución de la expresión del AhR en respuesta a MG132 en nuestro modelo celular podría estar relacionada con la alteración de la tasa de degradación de otras proteínas que controlan la expresión/activación del receptor.

Nuestros datos sugieren que el LPS regula la localización subcelular del AhR. Está bien estudiado que en presencia de ligandos exógenos como TCDD el AhR se transloca rápidamente al núcleo; sin embargo, en ausencia de estos ligandos el AhR está en constante recambio entre el núcleo y citoplasma, lo cual sugiere que debe estar siendo activado por ligandos endógenos. El tercer objetivo de nuestro trabajo fue determinar la localización subcelular del AhR tras el estímulo con LPS. Al evaluar las fracciones nucleares y citoplásmicas de los Mφs por WB observamos que tanto de manera basal como en respuesta a LPS el AhR se encontró preferentemente en el núcleo. En contraste, mediante la técnica de inmunofluorescencia observamos que el AhR se encuentra preferentemente en el núcleo de los GM-Mφs en condiciones basales, se relocaliza parcialmente en el citoplasma tras el estímulo con LPS, y a tiempos tardíos de activación se incrementa su localización nuclear. Por otra parte, en los M-Mφs el AhR se encuentra de manera análoga tanto en el núcleo como en el citoplasma en condiciones basales, y el estímulo con LPS genera eventos similares a los encontrados en los GM-Mφs. Probablemente la localización preferencial del AhR en el núcleo detectada por WB podría ser un artefacto de la técnica, como ya se comentó en el apartado de Resultados. Se sabe que la unión del ligando a AhR induce un cambio conformacional del receptor que expone una NLS bipartita, cuya secuencia es rica en aminoácidos básicos. Las importinas α y β son las encargadas de mediar el transporte de proteínas que contienen la secuencia básica NLS. Por otra parte, la presencia de una secuencia NES en el dominio bHLH sugiere que la exportación nuclear puede ser requerida para la atenuación de la actividad transcripcional del AhR y su posterior degradación. De hecho, en un modelo de células epiteliales, se demostró que la disrupción del contacto célula-célula induce una acumulación nuclear del AhR como resultado de la fosforilación de la Ser68 en la secuencia NES mediada por la MAPK p38, lo que evita su exportación nuclear (69). Por otra parte la asociación del AhR en el citoplasma con las moléculas chaperonas HSP90, p23 y AIP es importante porque impide la exposición de las secuencias NLS y NES, y puede enmascarar las de ubiquitinación o fosforilación. Aunque no están muy claros los mecanismos de regulación, se sabe que la disociación de AhR y HSP90 tras la

unión a TCDD no es indispensable para la importación al núcleo, pero si es indispensable para la formación del heterodímero activo AhR/ARNT (81).

De acuerdo con lo que se conoce sobre la biología del AhR, la localización nuclear del receptor que encontramos en los GM- y M-M ϕ s en condiciones basales podría estar indicando que en ambos tipos celulares se generan constitutivamente metabolitos que podrían actuar como ligandos del AhR. La relocalización del AhR en el citoplasma de las células tras el estímulo con LPS podría estar justificada igualmente por la generación de un nuevo pool de ligandos que favorecerían la exportación nuclear del AhR para ser degradado en el citoplasma tras su activación. Esta hipótesis está apoyada por otros resultados de este trabajo, como la disminución en la expresión del AhR a tiempos tempranos-intermedios tras la activación con LPS y la síntesis *de novo* de *IDO1*. Finalmente, no podemos descartar que el LPS favorezca la acumulación del AhR en el citoplasma por mecanismos alternativos, como la estabilización de la unión del AhR con sus moléculas chaperonas y, por lo tanto, enmascarando la secuencia de localización nuclear.

En resumen, en este trabajo hemos determinado que la expresión del AhR es regulada por el LPS de manera diferencial en los GM-M ϕ s y M-M ϕ s. En los GM-M ϕ s LPS induce la transcripción de *AHR*, así como su degradación vía proteosoma mediada posiblemente por la activación del receptor tras la generación de ligandos dependiente de LPS. En contraste, el LPS no tiene un efecto claro sobre la expresión del *AHR* en los M-M ϕ s, aunque también promueve la degradación del receptor, probablemente como consecuencia de la generación de ligandos endógenos que conducen a su activación.

CONCLUSIONES

- La expresión de *AHR* en los GM-M ϕ s es regulada positivamente por el LPS. Sin embargo, los niveles de proteína se ven influenciados por la degradación del receptor vía proteosoma, probablemente a través de la generación de ligandos que promueven la activación del receptor.
- La expresión de *AHR* en los M-M ϕ s no se afecta significativamente tras su exposición al LPS, aunque de manera análoga a los GM-M ϕ s el LPS induce la degradación del receptor.
- El LPS induce la expresión de *IDO1*, un enzima que genera ligandos endógenos para AhR en ambos tipos de M ϕ s, lo que indirectamente podría provocar la activación y degradación del receptor.
- Tanto en los GM- como en los M-M ϕ s la expresión del AhR se recupera tras una exposición prolongada al LPS. Los niveles netos de la proteína podrían incrementarse por un aumento en la transcripción de *AHR*, así como por una disminución de su activación/degradación debido a una síntesis transitoria de sus ligandos endógenos.
- La localización del AhR es preferentemente nuclear en los GM-M ϕ s, mientras que en los M-M ϕ s el receptor se distribuye de manera análoga entre el núcleo y el citoplasma, lo que sugiere que su tasa de activación/degradación es diferente en ambos tipos celulares.
- El LPS regula la localización subcelular del AhR en ambos tipos de M ϕ s, favoreciendo su relocalización en el citoplasma. Estos datos refuerzan la idea de que el LPS modula los procesos de activación/degradación del receptor.

PERSPECTIVAS

- Analizar la implicación de factores de transcripción como NF- κ B, AP-1 y AhR en la síntesis de *AHR* en los M ϕ s humanos polarizados expuestos a LPS.
- Evaluar las vías de señalización involucradas en la degradación del AhR por parte del LPS.
- Determinar el efecto de inhibidores del proteosoma sobre la expresión del AhR.

REFERENCIAS

1. Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, *et al.* P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 1996; 6(1):1–42.
2. Hahn ME, Karchner SI, Shapiro MA, Perera SA. Molecular evolution of two vertebrate aryl hydrocarbon (dioxin) receptors (AHR1 and AHR2) and the PAS family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1997 ; 94(25):13743–8.
3. Weiss C, Kolluri SK, Kiefer F, Göttlicher M. Complementation of Ah receptor deficiency in hepatoma cells: negative feedback regulation and cell cycle control by the Ah receptor. *Exp. Cell Res.* 1996; 226(1):154–63.
4. Chang CY, Puga A. Constitutive activation of the aromatic hydrocarbon receptor. *Mol. Cell. Biol.* 1998; 18(1):525–35.
5. Ma Q, Whitlock JP. The aromatic hydrocarbon receptor modulates the Hepa 1c1c7 cell cycle and differentiated state independently of dioxin. *Mol. Cell. Biol.* 1996; 16(5):2144–50.
6. Wei YD, Helleberg H, Rannug U, Rannug A. Rapid and transient induction of CYP1A1 gene expression in human cells by the tryptophan photoproduct 6-formylindolo[3,2-b]carbazole. *Chem. Biol. Interact.* 1998; 110(1-2):39–55.
7. Chen YH, Riby J, Srivastava P, Bartholomew J, Denison M, Bjeldanes L. Regulation of CYP1A1 by indolo[3,2-b]carbazole in murine hepatoma cells. *J. Biol. Chem.* 1995; 270(38):22548–55.
8. Ciolino HP, Wang TT, Yeh GC. Diosmin and diosmetin are agonists of the aryl hydrocarbon receptor that differentially affect cytochrome P450 1A1 activity. *Cancer Res.* 1998; 58(13):2754–60.
9. Sinal CJ, Bend JR. Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of cyp1a1 by bilirubin in mouse hepatoma hepa 1c1c7 cells. *Mol. Pharmacol.* 1997; 52(4):590–9.
10. Savouret JF, Antenos M, Quesne M, Xu J, Milgrom E, Casper RF. 7-ketocholesterol is an endogenous modulator for the arylhydrocarbon receptor. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(5):3054–9.
11. Lu YF, Santostefano M, Cunningham BD, Threadgill MD, Safe S. Substituted flavones as aryl hydrocarbon (Ah) receptor agonists and antagonists. *Biochem. Pharmacol.* 1996; 51(8):1077–87.
12. Adachi J, Mori Y, Matsui S, Takigami H, Fujino J, Kitagawa H, *et al.* Indirubin and indigo are potent aryl hydrocarbon receptor ligands present in human urine. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(34):31475–8.

13. Knutson JC, Poland A. Keratinization of mouse teratoma cell line XB produced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: an in vitro model of toxicity. *Cell* 1980; 22 (1 Pt 1):27–36.
14. Blankenship AL, Suffia MC, Matsumura F, Walsh KJ, Wiley LM. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) accelerates differentiation of murine preimplantation embryos in vitro. *Reprod. Toxicol. Elmsford N.* 1993; 7(3):255–61.
15. Abbott BD, Schmid JE, Pitt JA, Buckalew AR, Wood CR, Held GA, *et al.* Adverse reproductive outcomes in the transgenic Ah receptor-deficient mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1999; 155(1):62–70.
16. Benedict JC, Lin TM, Loeffler IK, Peterson RE, Flaws JA. Physiological role of the aryl hydrocarbon receptor in mouse ovary development. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 2000; 56(2):382–8.
17. Wright M. Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Hum. Exp. Toxicol.* 1996; 15(2):176–9.
18. Bryant PL, Clark GC, Probst MR, Abbott BD. Effects of TCDD on Ah receptor, ARNT, EGF, and TGF-alpha expression in embryonic mouse urinary tract. *Teratology* 1997; 55(5):326–37.
19. Kaartinen V, Voncken JW, Shuler C, Warburton D, Bu D, Heisterkamp N, *et al.* Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nat. Genet.* 1995; 11(4):415–21.
20. Fernandez-Salguero PM, Hilbert DM, Rudikoff S, Ward JM, Gonzalez FJ. Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1996; 140(1):173–9.
21. Shimizu Y, Nakatsuru Y, Ichinose M, Takahashi Y, Kume H, Mimura J, *et al.* Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2000; 97(2):779–82.
22. Schmidt JV, Su GH, Reddy JK, Simon MC, Bradfield CA. Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(13):6731–6.
23. Lahvis GP, Lindell SL, Thomas RS, McCuskey RS, Murphy C, Glover E, *et al.* Portosystemic shunting and persistent fetal vascular structures in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2000; 97(19):10442–7.
24. Andreola F, Fernandez-Salguero PM, Chiantore MV, Petkovich MP, Gonzalez FJ, De Luca LM. Aryl hydrocarbon receptor knockout mice (AHR^{-/-}) exhibit liver retinoid accumulation and reduced retinoic acid metabolism. *Cancer Res.* 1997; 57(14):2835–8.
25. White JA, Guo YD, Baetz K, Beckett-Jones B, Bonasoro J, Hsu KE, *et al.* Identification of the retinoic acid-inducible all-trans-retinoic acid 4-hydroxylase. *J. Biol. Chem.* 1996; 271(47):29922–7.

26. Zaher H, Fernandez-Salguero PM, Letterio J, Sheikh MS, Fornace AJ, Roberts AB, *et al.* The involvement of aryl hydrocarbon receptor in the activation of transforming growth factor-beta and apoptosis. *Mol. Pharmacol.* 1998; 54(2):313–21.
27. Elizondo G, Fernandez-Salguero P, Sheikh MS, Kim GY, Fornace AJ, Lee KS, *et al.* Altered cell cycle control at the G(2)/M phases in aryl hydrocarbon receptor-null embryo fibroblast. *Mol. Pharmacol.* 2000; 57(5):1056–63.
28. Bersten DC, Sullivan AE, Peet DJ, Whitelaw ML. bHLH–PAS proteins in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2013; 13(12):827–41.
29. Procopio M, Lahm A, Tramontano A, Bonati L, Pitea D. A model for recognition of polychlorinated dibenzo-p-dioxins by the aryl hydrocarbon receptor. *Eur. J. Biochem. FEBS* 2002; 269(1):13–8.
30. Swanson HI, Chan WK, Bradfield CA. DNA binding specificities and pairing rules of the Ah receptor, ARNT, and SIM proteins. *J. Biol. Chem.* 1995; 270(44):26292–302.
31. Ikuta T, Eguchi H, Tachibana T, Yoneda Y, Kawajiri K. Nuclear localization and export signals of the human aryl hydrocarbon receptor. *J. Biol. Chem.* 1998; 273(5):2895–904.
32. Berg P, Pongratz I. Differential usage of nuclear export sequences regulates intracellular localization of the dioxin (aryl hydrocarbon) receptor. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(46):43231–8.
33. Holmes JL, Pollenz RS. Determination of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein concentration and subcellular localization in hepatic and nonhepatic cell culture lines: development of quantitative Western blotting protocols for calculation of aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein in total cell lysates. *Mol. Pharmacol.* 1997; 52(2):202–11.
34. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1995; 92(12):5510–4.
35. Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1997; 94(9):4273–8.
36. Sonnenfeld M, Ward M, Nystrom G, Mosher J, Stahl S, Crews S. The *Drosophila* tango gene encodes a bHLH-PAS protein that is orthologous to mammalian Arnt and controls CNS midline and tracheal development. *Dev. Camb. Engl.* 1997; 124(22):4571–82.
37. Wilk R, Weizman I, Shilo BZ. trachealess encodes a bHLH-PAS protein that is an inducer of tracheal cell fates in *Drosophila*. *Genes Dev.* 1996; 10(1):93–102.
38. Perdew GH. Association of the Ah receptor with the 90-kDa heat shock protein. *J. Biol. Chem.* 1988; 263(27):13802–5.

39. Kazlauskas A, Poellinger L, Pongratz I. Evidence that the co-chaperone p23 regulates ligand responsiveness of the dioxin (Aryl hydrocarbon) receptor. *J. Biol. Chem.* 1999; 274(19):13519–24.
40. Meyer BK, Pray-Grant MG, Vanden Heuvel JP, Perdew GH. Hepatitis B virus X-associated protein 2 is a subunit of the unliganded aryl hydrocarbon receptor core complex and exhibits transcriptional enhancer activity. *Mol. Cell. Biol.* 1998; 18(2):978–88.
41. Carver LA, Bradfield CA. Ligand-dependent interaction of the aryl hydrocarbon receptor with a novel immunophilin homolog *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 1997; 272(17):11452–6.
42. Gu YZ, Hogenesch JB, Bradfield CA. The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2000; 40:519–61.
43. Lai ZW, Pineau T, Esser C. Identification of dioxin-responsive elements (DREs) in the 5' regions of putative dioxin-inducible genes. *Chem. Biol. Interact.* 1996; 100(2):97–112.
44. Kumar MB, Ramadoss P, Reen RK, Vanden Heuvel JP, Perdew GH. The Q-rich subdomain of the human Ah receptor transactivation domain is required for dioxin-mediated transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(45):42302–10.
45. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature* 2000; 403(6765):41–5.
46. Ko HP, Okino ST, Ma Q, Whitlock JP. Dioxin-induced CYP1A1 transcription *in vivo*: the aromatic hydrocarbon receptor mediates transactivation, enhancer-promoter communication, and changes in chromatin structure. *Mol. Cell. Biol.* 1996; 16(1):430–6.
47. Wang F, Samudio I, Safe S. Transcriptional activation of cathepsin D gene expression by 17beta-estradiol: mechanism of aryl hydrocarbon receptor-mediated inhibition. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2001; 172(1-2):91–103.
48. Porter W, Wang F, Duan R, Qin C, Castro-Rivera E, Kim K, *et al.* Transcriptional activation of heat shock protein 27 gene expression by 17beta-estradiol and modulation by antiestrogens and aryl hydrocarbon receptor agonists. *J. Mol. Endocrinol.* 2001; 26(1):31–42.
49. Hankinson O. 2005. Role of coactivators in transcriptional activation by the aryl hydrocarbon receptor. *Arch. Biochem. Biophys.* 433: 379–386.
50. 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.
51. Li W, Matsumura F. 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 (Mosc)* 2008; 47(52):13997–4008.
52. Matsumura F. The significance of the nongenomic pathway in mediating inflammatory signaling of the dioxin-activated Ah receptor to cause toxic effects. *Biochem. Pharmacol.* 2009; 77(4):608–26.

53. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 2014; 6:13.
54. Jaguin M, Houlbert N, Fardel O, Lecureur V. Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cell. Immunol.* 2013; 281(1):51–61.
55. Wang C, Ye Z, Kijlstra A, Zhou Y, Yang P. Activation of the aryl hydrocarbon receptor affects activation and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Clin. Exp. Immunol.* 2014; 177(2):521–30.
56. Vogel CF, Khan EM, Leung PS, Gershwin ME, Chang WLW, Wu D, *et al.* Cross-talk between aryl hydrocarbon receptor and the inflammatory response: a role for nuclear factor- κ B. *J. Biol. Chem.* 2014; 289(3):1866–75.
57. Kimura A, Naka T, Nohara K, Fujii-Kuriyama Y, Kishimoto T. Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2008; 105(28):9721–6.
58. Mascanfroni ID, Takenaka MC, Yeste A, Patel B, Wu Y, Kenison JE, *et al.* Metabolic control of type 1 regulatory T cell differentiation by AHR and HIF1- α . *Nat. Med.* 2015; 21(6):638–46.
59. Kimura A, Abe H, Tsuruta S, Chiba S, Fujii-Kuriyama Y, Sekiya T, *et al.* Aryl hydrocarbon receptor protects against bacterial infection by promoting macrophage survival and reactive oxygen species production. *Int. Immunol.* 2014; 26(4):209–20.
60. Kimura A, Naka T, Nakahama T, Chinen I, Masuda K, Nohara K, *et al.* Aryl hydrocarbon receptor in combination with Stat1 regulates LPS-induced inflammatory responses. *J. Exp. Med.* 2009; 206(9):2027–35.
61. Cheon H, Woo YS, Lee JY, Kim HS, Kim HJ, Cho S, *et al.* Signaling pathway for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced TNF- α production in differentiated THP-1 human macrophages. *Exp. Mol. Med.* 2007; 39:524–34.
62. Sciallo EM, Dong B, Vogel CF, Matsumura F. Characterization of the pattern of the nongenomic signaling pathway through which TCDD-induces early inflammatory responses in U937 human macrophages. *Chemosphere* 2009; 74: 1531–7.
63. N'Diaye M, Le Ferrec E, Lagadic-Gossmann D, Corre S, Gilot D, Lecureur V, *et al.* Aryl hydrocarbon receptor- and calcium-dependent induction of the chemokine CCL1 by the environmental contaminant benzo[a]pyrene. *J. Biol. Chem.* 2006; 281:19906–15.
64. van Grevenynghe J, Rion S, Le Ferrec E, Le Vee M, Fauchet R, Fardel O. Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit differentiation of human monocytes into macrophages. *J. Immunol.* 2003; 170: 2374–81.
65. Bessede A, Gargaro M, Pallotta MT, Matino D, Servillo G, Brunacci C, *et al.* Aryl hydrocarbon receptor control of a disease tolerance defence pathway. *Nature* 2014; 511(7508):184–90.

66. Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 2008; 42(2):145–51.
67. Santiago-Josefat B, Pozo-Guisado E, Mulero-Navarro S, Fernandez-Salguero PM. Proteasome inhibition induces nuclear translocation and transcriptional activation of the dioxin receptor in mouse embryo primary fibroblasts in the absence of xenobiotics. *Mol. Cell. Biol.* 2001; 21(5):1700–9.
68. Hissong BD, Byrne GI, Padilla ML, Carlin JM. Upregulation of interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase in human macrophage cultures by lipopolysaccharide, muramyl tripeptide, and interleukin-1. *Cell. Immunol.* 1995; 160(2):264–9.
69. Ikuta T, Kobayashi Y, Kawajiri K. Cell density regulates intracellular localization of aryl hydrocarbon receptor. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(18):19209–16.
70. Sadek CM, Allen-Hoffmann BL. Suspension-mediated induction of Hepa 1c1c7Cyp1a-1 expression is dependent on the Ah receptor signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* 1994; 269(50):31505–9.
71. Gharavi N, El-Kadi AOS. Down-regulation of aryl hydrocarbon receptor-regulated genes by tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide in murine hepatoma Hepa 1c1c7 cells. *J. Pharm. Sci.* 2005; 94(3):493–506.
72. Sekine H, Mimura J, Oshima M, Okawa H, Kanno J, Igarashi K, *et al.* Hypersensitivity of aryl hydrocarbon receptor-deficient mice to lipopolysaccharide-induced septic shock. *Mol. Cell. Biol.* 2009; 29(24):6391–400.
73. Climaco-Arvizu S, Domínguez-Acosta O, Cabañas-Cortés MA, Rodríguez-Sosa M, Gonzalez FJ, Vega L, *et al.* Aryl hydrocarbon receptor influences nitric oxide and arginine production and alters M1/M2 macrophage polarization. *Life Sci.* 2016; 155:76–84.
74. Duque Martínez HA. Evaluación de las interacciones del receptor de aril hidrocarburos con distintos factores de transcripción en macrófagos polarizados. Tesis de Maestría. 2013.
75. Rothhammer V, Mascanfroni ID, Bunse L, Takenaka MC, Kenison JE, Mayo L, *et al.* Type I interferons and microbial metabolites of tryptophan modulate astrocyte activity and central nervous system inflammation via the aryl hydrocarbon receptor. *Nat. Med.* 2016; 22(6):586–97.
76. Ma Q, Baldwin KT. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced degradation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) by the ubiquitin-proteasome pathway. Role of the transcription activator and DNA binding of AhR. *J. Biol. Chem.* 2000; 275(12):8432–8.
77. Takikawa O, Kuroiwa T, Yamazaki F, Kido R. Mechanism of interferon- γ action: characterization of indoleamine 2,3-dioxygenase in cultured human cells induced by interferon- γ and evaluation of the enzyme-mediated tryptophan degradation in its anticellular activity. *J. Biol. Chem.* 1988; 263:2041–8.

78. de la Maza LM, Peterson EM. Dependence of the in vitro antiproliferative activity of recombinant human gamma-interferon on the concentration of tryptophan in culture media. *Cancer Res* 1988; 48(2):346–50.
79. Davarinos NA, Pollenz RS. Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytoplasmic proteasome following nuclear export. *J. Biol. Chem.* 1999; 274(40):28708–15.
80. Yan H, Ma YL, Gui YZ, Wang SM, Wang XB, Gao F, *et al.* MG132, a proteasome inhibitor, enhances LDL uptake in HepG2 cells in vitro by regulating LDLR and PCSK9 expression. *Acta Pharmacol. Sin.* 2014; 35(8):994–1004.
81. Heid SE, Pollenz RS, Swanson HI. Role of heat shock protein 90 dissociation in mediating agonist-induced activation of the aryl hydrocarbon receptor. *Mol. Pharmacol.* 2000; 57(1):82–92.