



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

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR**

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL RECEPTOR DE ARIL
HIDROCARBUROS SOBRE EL PROMOTOR DE LA IL-10 EN
MACRÓFAGOS HUMANOS POLARIZADOS”**

TESIS

QUE PRESENTA:

M. EN C. HÉCTOR ADRIÁN DUQUE MARTINEZ

**PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA MOLECULAR**

**DIRECTORA DE LA TESIS:
DRA. MARÍA CARMEN SÁNCHEZ TORRES**

El presente trabajo se desarrolló 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 TUTORAL

Directora de tesis:

Dra. María Carmen Sánchez Torres

Asesores:

Dr. Emilio Joaquín Cordova Alarcón

Instituto Nacional de Medicina Genómica

Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda

Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV

Dr. Miguel Ángel Vargas Mejía

Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV

Dr. Vianney Francisco Ortíz Navarrete

Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV

El M. en C.. Héctor Adrián Duque Martínez realizó esta tesis de doctorado con una beca otorgada por CONACYT (No. 261967)

AGRADECIMIENTOS

- Al CONACYT por el apoyo económico facilitado a través de la beca No.261967 para el desarrollo de estudios de maestría.
- Al CINVESTAV por la permitirme formar parte de esta institución y realizar mis estudios de maestría en ciencias.
- Al Banco de Sangre del centro Médico Nacional “La Raza” por las facilidades para la adquisición de las muestras utilizadas en el desarrollo de este trabajo.
- A la Dra. María Carmen Sánchez por el apoyo incondicional, la paciencia y las enseñanzas compartidas durante todo este tiempo.
- A mis asesores: Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda, Dr. Vianney Francisco Ortíz Navarrete, Dr. Miguel Ángel Vargas Mejía y al Dr. Emilio Joaquín Cordova Alarcón por todas las observaciones y sugerencias compartidas para mejorar este proyecto.
- Dra. Norma Segovia por sus consejos y ayuda incondicional en la realización de las técnicas del laboratorio.
- A mis Padres: Agustín Duque Salinas y María del Consuelo Martínez Cortez, por todo el amor, bendiciones y preocupaciones ocasionadas durante toda mi aventura fuera de casa.
- A mis Hermanos por ser el motor de mi vida aun estando lejos
- A todos mis familiares, Abuelas, Ti@s y Prim@s que de alguna manera me animaron a continuar con mis estudios
- A mis amigos de laboratorio: Eduardo Patiño, Angelica Girón, Rebeca Klimek y Keity Farfan por formar parte de la familia no sanguínea que el destino me mando y por hacerme sentir como en casa cada día que compartí con ustedes.
- A Gustavo Nieto y José Luis Flores que desde que llegue al Cinvestav me brindaron su amistad sincera y formaron parte importante esta etapa tan importante.
- A mis compañeros de generación por los momentos y apoyo brindados durante estos dos años.
- A María de Jesús Maqueda y Ninfa Arreola por su excelente trabajo secretarial.
- A nuestro técnico Julio Ramírez por todo su apoyo y facilidades brindadas.
- A todos aquellos que de una u otra manera ayudaron a que este proyecto saliera adelante.

Gracias

Tabla de contenido

ABREVIATURAS	5
RESUMEN EN ESPAÑOL.....	7
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN	9
Receptor de Aril hidrocarburos	9
Mecanismo de acción del AhR	10
AhR y el sistema inmune	13
Interleucina 10.....	14
Señalización y regulación de IL-10	15
Participación de AhR en la regulación de IL-10	17
ANTECEDENTES DIRECTOS	22
El AhR se expresa y es activado por ligandos exógenos en macrófagos diferenciados in vitro	23
El AhR se encuentra activado en ambas subpoblaciones de MΦ en ausencia de ligandos exógenos	24
Expresión diferencial de factores de transcripción en MΦ M1 y M2	26
AhR forma complejos con el factor p50 en los macrófagos M1 y M2 en condiciones basales y tras su activación con LPS	28
Sitios de unión de AhR en el promotor de IL-10.....	29
JUSTIFICACIÓN	32
HIPÓTESIS.....	32
OBJETIVO GENERAL	33
OBJETIVOS PARTICULARES	33
METODOLOGÍA	34
Extractos proteicos totales, nucleares y citoplasmáticos	34
Ensayos de Inmunoprecipitación.....	35
Ensayos de western blot	35
Ensayos de EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) y de super-retardamiento.	36
RESULTADOS	38
Expresión de la IL-10 en macrófagos M1 y M2 en ausencia de la expresión o actividad de AhR.....	38
Formación de complejos entre el AhR y algunos factores de transcripción que se unen al promotor de IL-10 en los macrófagos M1 y M2	50
CONCLUSIONES	59
PERSPECTIVAS.....	60
BIBLIOGRAFÍA	61

ABREVIATURAS

α NF – α -Naftoflavona

Ab – Anticuerpo

Ag – Antígeno

AhR – Receptor de aril hidrocarburos

AhRR – Represor del receptor de aril hidrocarburos

ARNT – Translocador nuclear del receptor de aril hidrocarburos

BP – Benzo [a] pireno

CD – Cluster de diferenciación

ChIP – Inmunoprecipitación de la Cromatina

CYP – Citocromo

DC – Célula dendrítica

DRE – Elementos de respuesta a dioxina

EMSA – Ensayo de cambio en la corrida electroforética

FICZ – 6-formil-indolo[3,2-b]carbazol

GAPDH – Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

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

GM-M ϕ – Macrófagos generados con GM-CSF

HO-1 – Hemoxigenasa 1

HRP – Peroxidasa de rábano

IFN – Interferón

IL – Interleucina

LPS – Lipopolisacárido

M-CSF – Factor estimulante de colonias de macrófagos

mAb – Anticuerpo monoclonal

MACS – Separación celular por inmunomagnetismo

M ϕ – Macrófago

M-M ϕ – Macrófagos generados con M-CSF

NADPH – Fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido reducido

NF- κ B – Factor nuclear κ B

NQO1 – NADPH quinona oxidoreductasa 1

PAH – Hidrocarburo aromático policíclico

PBMC – Células mononucleares de sangre periférica

PKA – Proteína cinasa A

PVDF – Polivinilidenofluoruro

RNA – Ácido ribonucleíco

RNS – Intermediario reactivo de nitrógeno

ROS – Intermediario reactivo de oxígeno

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

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

STAT – Transductor de señal y activador de transcripción

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

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

Th – Linfocito T cooperador

TNF – Factor de necrosis tumoral

TGF – Factor de crecimiento transformante

Tr1 – Linfocitos T reguladores de tipo 1

Treg – Linfocitos T reguladores

RESUMEN EN ESPAÑOL

El receptor de aril hidrocarburos (AhR) es un factor de transcripción activado por ligando que se describió por primera vez en respuesta a toxinas. Originalmente fue descubierto como un receptor para la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD), pero posteriormente resultó ser activado por múltiples estímulos, incluyendo toxinas ambientales, toxinas microbianas, componentes de la dieta y metabolitos endógenos. AHR regula numerosos genes, como las enzimas implicadas en el metabolismo de los xenobióticos. Estudios recientes han demostrado la participación de AhR en muchos procesos fisiológicos. La presencia de AHR en diversos organismos, así como su expresión ubicua en el organismo, la convierten en una proteína clave que media los efectos toxicológicos y fisiológicos en respuesta a los productos químicos exógenos y endógenos. AHR se encuentra en células del sistema inmune, incluyendo células T y B, se encuentra principalmente en altos niveles en tejidos como intestino, piel y pulmones. Los macrófagos (M Φ) son células que pertenecen al sistema inmune y expresan altos niveles de AHR. *In vitro*, los M Φ pueden ser generados con perfiles funcionales opuestos en presencia de GM-CSF adquieren un fenotipo pro-inflamatorio (M1), y en presencia de M-CSF adquieren un perfil anti-inflamatorio (M2). Estudios recientes han demostrado la participación de AHR en la regulación de la interleucina-10 (IL-10) en células del sistema inmune, sin embargo, el mecanismo exacto de acción aún permanece desconocido. En este estudio evaluamos el papel de AHR en la regulación de la síntesis de la IL-10 en M Φ humanos (M1 y M2), y el posible mecanismo regulatorio implicado. Demostramos que la ausencia de AHR afecta la síntesis de la IL-10 en ambos tipos de M Φ , donde en M Φ M2 la ausencia de AHR muestra un efecto más drástico. Identificamos posibles sitios de unión para AHR en el promotor de la IL-10 de M Φ humanos, uno de ellos con alta similitud al reportado en células T. Mediante ensayos de EMSA y ChIP, demostramos la habilidad de AHR para interactuar con los diferentes sitios evaluados del promotor de la IL-10. Observamos que la interacción entre AHR y el promotor de la IL-10 se modifica dependiendo del tipo celular, así como de la condición celular evaluada.

ABSTRACT

The aryl hydrocarbon receptor (AhR) is a ligand-activated transcription factor that was initially described in response to toxins. Originally discovered as a receptor for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD), but was later found to be activated by a multitude of diverse stimuli, including environmental toxins, microbial toxins, dietary compounds, and endogenous metabolites. The AHR regulates a number of genes, such as enzymes involved in the metabolism of xenobiotics. Recent studies have demonstrated the involvement of AhR in many physiological processes. The presence of ahr in various organisms, as well as its ubiquitous expression in the organism, make it a key protein that mediates both toxicological and physiological effects in response to exogenous and endogenous chemicals. The AHR is found on a host of immune cells, including T cells and B cells, and is found at particularly high levels in tissues such as the gut, skin, and lungs. The macrophages (M Φ) are cells belonging to the innate immune system that express high amounts of AhR. *In vitro*, M Φ can be generated with opposite functional profiles: in the presence of GM-CSF they acquire a pro-inflammatory phenotype (M1), and in the presence of M-CSF they acquire an anti-inflammatory profile (M2). Recent studies have demonstrated the involvement of AHR in the regulation of interleukin-10 in cells of the immune system, however, the precise mechanism of action is still unknown. In the present study we evaluated the role of AHR in the synthesis of IL-10 in human macrophages (M1 and M2 M Φ), and the possible regulatory mechanism involved. We demonstrated that the absence of AHR affects the synthesis of IL-10 in both macrophages, where in the M2 M Φ the absence of AHR shows a more drastic effect. We identified potential AHR binding sites in the IL-10 promoter of macrophages, one of them with a high similarity to that reported in T cells. Through EMSA and ChIP assays, we demonstrated the ability of AHR to interact with the different sites evaluated from the il-10 promoter. We observed that the interaction between AHR and the IL-10 promoter is modified depending on the cell type, as well as on the evaluated cellular condition.

INTRODUCCIÓN

Receptor de Aril hidrocarburos

El Receptor de Aril Hidrocarburos (**AHR**) es un factor de transcripción activado por ligando, identificado en primer lugar como un sensor de contaminantes ambientales y sustancias químicas de bajo peso molecular las cuales comparten como característica principal su alta hidrofobicidad, su estructura Planar, así como ser altamente liposolubles: La función principal descrita para AHR implicaba la regulación transcripcional de una amplia batería de genes entre los cuales destacan aquellos responsables de la degradación, metabolismo y excreción de compuestos tóxicos, como por ejemplo genes miembros de la familia del citocromo P450 (*CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1* y *CYP2S1*). La inducción de **CYP1A1** es la respuesta dependiente de AHR observada de manera conservada a través de la mayoría de las diferentes especies, y actualmente es usado como el sistema modelo por excelencia para definir el mecanismo mediante el cual AHR regula la expresión génica¹⁻⁵.

La exposición a Hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs), bifenilos policlorados (PCBs), hidrocarburos aromáticos halogenados (HAHs) y otros compuestos tóxicos evocan múltiples efectos biológicos adversos para el organismo, incluyendo cardio- y hepatotoxicidad, síndrome de desgaste, involución tímica, trastornos endocrinos, hiperplasia y metaplasia epidérmica, inmunosupresión, teratogénesis, promoción de tumores, desregulación y enfermedad cardiovascular, entre otras^{2,36-8}.

El AhR presenta una expresión prácticamente ubicua en el organismo, pero varía de acuerdo a la etapa de desarrollo. Por ejemplo, durante la etapa adulta del ratón se encuentra predominantemente en pulmón, timo, riñón e hígado, con bajos niveles de expresión en corazón y bazo; mientras que en el desarrollo embrionario muestra una expresión restringida espacial y temporalmente, lo que sugiere una implicación de AhR durante el desarrollo^{3,9}.

Con el paso de los años la evidencia del papel de AhR en procesos fisiológicos se sustentó mediante la utilización de ratones deficientes para AhR. Estos ratones muestran defectos en el desarrollo hepático, sistema vascular, peso del animal, fertilidad, proliferación y diferenciación celular, apoptosis y homeostasis del sistema inmune^{3,7,7-13}, todo esto sumado a la esperada falla para inducir *CYP1A1* y la pérdida de toxicidad mediada por dioxina (TCDD, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin)²⁻⁷. AhR participa también catalizando la ubiquitinación del receptor de estrógenos (ER) al formar parte de un complejo ubiquitin ligasa E3¹⁴⁻¹⁶. Como consecuencia de su actividad ubiquitin ligasa se ha implicado a AhR en el proceso antitumoral intestinal al favorecer la ubiquitinación y degradación de la β -catenina¹⁷

En la actualidad se ha descrito ampliamente la capacidad de AhR para unir una gran variedad de compuestos químicos, todos ellos con características estructurales similares, aunque la afinidad con la que cada uno de éstos se une al AhR es variable⁰. Sin embargo, existe un gran número de estudios en los cuales se ha determinado que AhR es activo en ausencia de ligandos exógenos, por lo que actualmente se han reportado varios ligandos endógenos, entre los cuales se encuentran algunos derivados del triptófano (6-formil-indol[3,2-b]carbazole [FICZ], y 2-(1'H-indol-3'-carbonil)-tiazol-4-ácido carboxílico metil éster [ITE]), compuesto presentes en la dieta (indoles, flavonoides, retinoides, quercetina, resveratrol), metabolitos del ácido araquidónico (lipoxina A4, prostaglandina G₂), fármacos sintéticos (omeprazol, tiabendazol, albendazol) y componentes del suero y de los medios de cultivo celulares (lipoproteínas de baja densidad modificadas)¹⁻¹⁸.

Mecanismo de acción del AhR

El factor de transcripción AhR pertenece a la familia de proteínas bHLH/PAS (*basic helix-loop-helix/Per-Arnt-Sim*). El dominio bHLH se localiza en su extremo amino terminal y es fundamental para la unión del AhR al DNA (a través del surco mayor del DNA); además, contribuye dando soporte para la dimerización con otras proteínas. Contiguo al dominio bHLH en dirección hacia el extremo C-terminal se localiza el dominio PAS, responsable de mediar las interacciones con otras proteínas (ya sean de la misma familia [PAS] o no) y moléculas chaperonas (ej. HSP90). Este dominio está formado por dos repetidos degenerados de aproximadamente 50 aminoácidos denominados PAS A y PAS B, siendo este último el responsable de la unión con el ligando. En el extremo C-terminal se encuentra el dominio de transactivación (TAD) encargado de activar la transcripción una vez dada su unión al DNA^{9,19}.

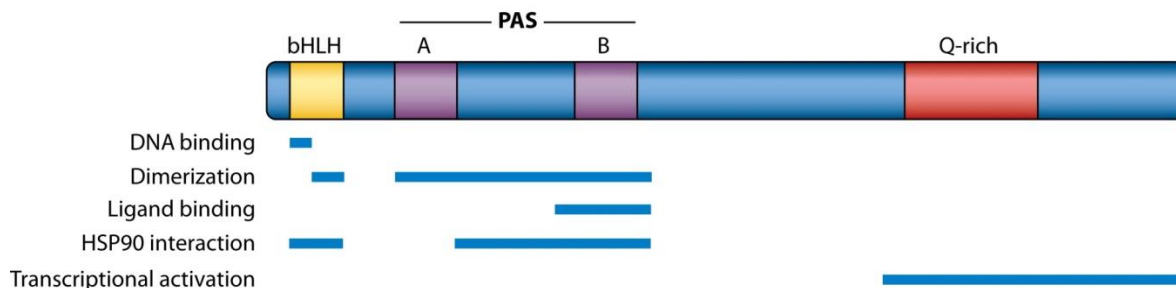


Figura 1. Representación esquemática de la estructura de la proteína AhR. El dominio bHLH (basic helix-loop-helix), ubicado en el extremo N-terminal, está involucrado en la unión al DNA e interacciones proteína-proteína. El AhR contiene dos dominios PAS (PER-ARNT-SIM), requeridos para las interacciones proteína-proteína y la unión del ligando. El dominio rico en prolina (Q-rich) se encuentra dentro del dominio de activación transcripcional.

Con base en la inducción de la actividad de AhR por su ligando prototipo (TCDD) se describió el mecanismo de acción canónico de AhR. En estado inactivo AhR se encuentra formando un complejo en el citoplasma con las proteína chaperona HSP90, ARA9 y p23, el cual, además de evitar su translocación al núcleo mediante el enmascaramiento de su secuencia de localización nuclear (NLS: *Nuclear Localization Signal*), evita su degradación y mantiene en equilibrio sus niveles basales en citoplasma. La unión de ARA9 (también conocida como AIP o XAP2) estabiliza todo el complejo y protege a AhR de la ubiquitinación y subsecuente degradación vía proteosoma^{3,7,9,19}.

La unión del ligando provoca un cambio conformacional en el complejo AhR/HSP90/ARA9/p23, el cual expone el NLS y provoca la subsecuente translocación del complejo al núcleo. Una vez en el núcleo las moléculas chaperonas son desplazadas por el translocador nuclear de AhR (ARNT: *AhR Nuclear Translocator*) uniéndose a AhR a través de sus dominios bHLH/PAS en ambas proteínas. El heterodímero AhR/ARNT es la forma transcripcionalmente activa y es capaz de reconocer y unirse a las secuencias consenso en el DNA 5'-TNGCGTG-3' denominadas elementos de respuesta a xenobioticos (XRE: *Xenobiotics Response Elements*) también conocidas como elementos de respuesta a dioxina (DRE) o elementos de respuesta a AhR (AhRE), localizadas en el promotor de sus genes blanco^{3,7,8,9,19}.

La inhibición de la actividad de AhR puede ocurrir por al menos dos mecanismos: 1) degradación proteosomal posterior a la activación del AhR por ligando y 2) inhibición competitiva del AhR por la proteína represora de AhR (AhRR). *In vitro*, está reportada la rápida degradación de AhR posterior a la exposición a un ligando, siendo exportado al citoplasma y subsecuentemente degradado vía proteosoma. Secuencias de exportación nuclear (NES) en AhR son las responsables de su salida al citoplasma. Se han identificado dos NES, una en la región PAS (C-NES) y otra en la región bHLH (N-NES), las cuales son responsables de mantener a AhR en el citoplasma y de su exportación nuclear, respectivamente. El AhRR pertenece a la familia de proteínas bHLH/PAS y su expresión está bajo control del dímero AhR/ARNT el cual se une a un XRE presente en el promotor de AhRR. El AhRR es capaz de desplazar a AhR del dímero AhR/ARNT, ocupando su lugar uniéndose con el ARNT ya que mantienen la capacidad para unirse a elementos XRE. Sin embargo, la ausencia de un TAD en el AhRR resulta en represión transcripcional. Se ha descrito que el efecto de represión mediado por AhRR está dado principalmente por el reclutamiento de diversos co-represores, especialmente desacetilasas de histonas que transforman la cromatina local a un estado más compacto. Adicionalmente, siendo AhR un factor de transcripción activado por ligando, una manera directa de finalizar su señalización sería retirar la señal activadora^{2,7,9}.

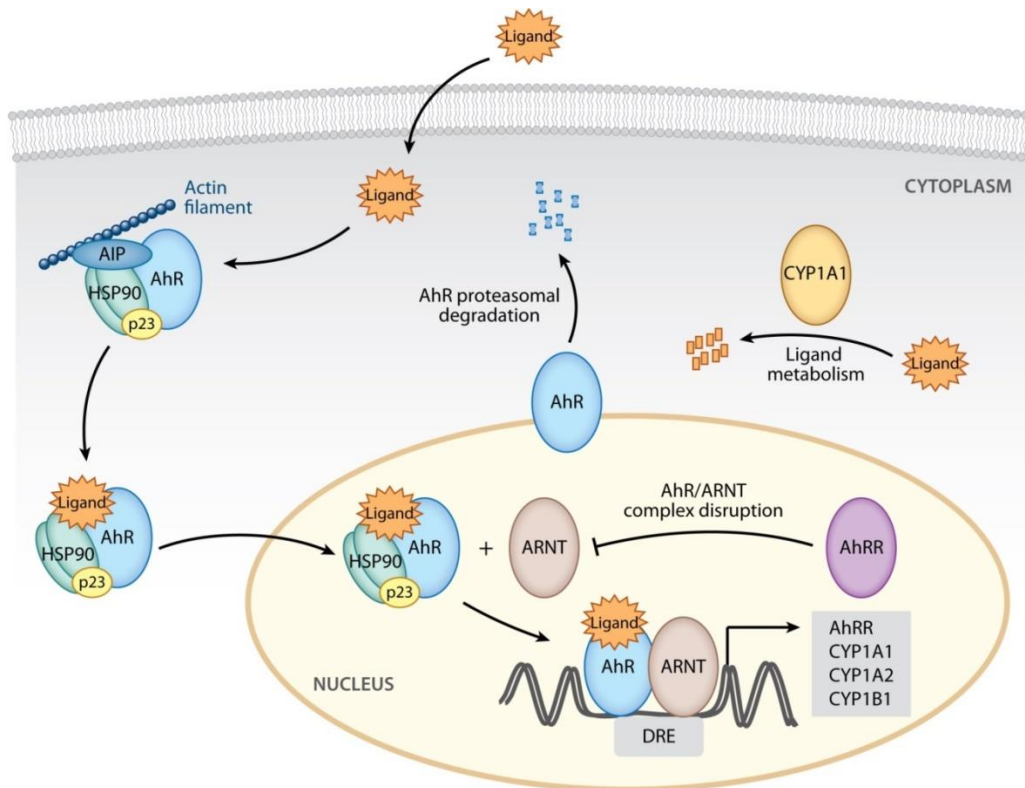


Figura 2. Activación canónica de AhR por ligandos exógenos.

Los mecanismos de activación de AhR independientes de un ligando fomentan la hipótesis y evidencia de la implicación de AhR en procesos fisiológicos. En líneas celulares cultivadas en suspensión, AhR se detecta en el núcleo e induce la síntesis del mRNA de los genes *CYP1A1* y *CYP1B1* en ausencia de ligando exógeno^{20,21}. El crecimiento a baja densidad celular (para evitar interacción célula-célula) de HaCat, línea celular de keratinocitos²² y la adición del segundo mensajero cAMP al medio de cultivo²³ inducen la acumulación nuclear de AhR mediante la acción de la cinasa activada por mitógenos (MAPK) p38 al fosforilar la serina 68 localizada en la NES, y ocurre una situación similar tras la fosforilación de la tirosina 320 en AhR causada por omeprazol a través de proteínas tirosina cinasas desconocidas hasta el momento. Aunque muchos detalles sobre estos mecanismos de acción aún se desconocen, es claro que AhR puede ser activado de manera independiente a la unión de su ligando^{24,25,26,27}.

AhR y el sistema inmune

Una gran cantidad de reportes confirman la participación crítica del AhR en el funcionamiento del sistema inmune. El AhR se expresa de manera constitutiva o inducida en la mayoría de las células que participan en la respuesta inmune. Además, muchos de los genes que participan en la regulación de la respuesta inmune contienen secuencias DRE en sus promotores^{19,28,29}.

Involución tímica, susceptibilidad a infecciones virales y una marcada inmunosupresión fueron algunos de los primeros efectos observados una vez que AhR era activado por TCDD. Diversos tipos celulares son afectados por la acción de AhR, como células troncales hematopoyéticas, neutrófilos, células dendríticas, macrófagos, y linfocitos B y T2.

La participación del AhR en la diferenciación de células T vírgenes a subtipos de células T cooperadoras ha sido demostrada en diversos trabajos^{19,29-33}. En 2008, Quintana y col. demostraron que la activación del AhR con TCDD favorece la polarización y proliferación de células T reguladoras (Treg), subpoblación de células T CD4+ definidas por la expresión de CD25 en su superficie y por la expresión del factor de transcripción Foxp3; por otro lado, se demostró que la activación de AhR con un ligando endógeno (FICZ) promovía la diferenciación de los linfocitos T vírgenes hacia la subpoblación inflamatoria Th17³⁴. Con base en estos modelos, se ha observado que la activación del AhR con TCDD suprime los efectos causados en modelos animales de autoinmunidad como la encefalitis autoinmune experimental (EAE) y la uveoretinitis autoinmune experimental (UAE). De la misma manera, la polarización hacia los fenotipos Th1 y Th2 se ven afectados por AhR y el tipo de ligando utilizado. Por ejemplo, ligandos como 3MC, BNF y M50354 inhiben la secreción de citocinas y la polarización del tipo Th2, favoreciendo la polarización Th1; por el contrario, TCDD afecta el fenotipo Th1 disminuyendo la producción de citocinas y la respuesta T citotóxica. En conjunto, estos datos sugieren que las funciones del AhR son dependientes del tipo celular así como del ligando utilizado para su activación^{2,30,35,33}.

Los macrófagos (MΦ), son células del sistema mononuclear-fagocítico que funcionan como primera línea de defensa contra la invasión de organismos o sustancias químicas externas. Entre sus diversas funciones se incluyen fagocitosis, liberación de sustancias químicas citotóxicas (ej: especies reactivas de oxígeno y nitrógeno), migración hacia los sitios de inflamación, o liberación de citocinas y sustancias quimioatrayentes. Los MΦ expresan altos niveles de AhR, y la activación dependiente de ligando muestra efectos diferentes en los MΦ. Por un lado, se ha descrito que los PAH incrementan la producción de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias en los MΦ [interleucina (IL)-1β, factor de necrosis tumoral (TNF), IL-8, CCL1], mientras que otros estudios indican lo que la presencia de estos compuestos inhibe la diferenciación a MΦ a partir de monocitos humanos³⁶⁻³⁹.

Kimura y col. en 2009 demostraron en un papel anti-inflamatorio para AhR en MΦ peritoneales de ratones deficientes de esta proteína, en los cuales la síntesis de citocinas pro-inflamatorias como IL-1β, IL-6, TNF e IL-12 estaba incrementada en presencia de lipopolisacárido bacteriano

(LPS) comparada con los MΦ silvestres. Además, se observó una clara disminución en la producción de IL-10, teniendo como resultado final ratones con una mayor susceptibilidad al choque endotóxico⁴⁰⁻⁴².

Actualmente se han realizado una gran cantidad de estudios para elucidar la participación de AhR en la regulación de factores pro- y anti-inflamatorios. Kimura y col.⁴⁰ proponen un modelo en el cual IL-6 es regulado por AhR mediante un mecanismo en el cual la interacción entre AhR y el transductor de señales y activador de la transcripción (STAT)1 evitan la actividad transcripcional de NF-κB, necesaria para la síntesis de IL-6. Por su parte, Masuda y col.⁴² proponen que AhR es capaz de unirse a al factor de transcripción Sp1 y evitar su fosforilación, afectando su unión al promotor de la histidina descarboxilasa (HDC) y disminuyendo así la secreción de histamina, afectando indirectamente la producción de IL-6⁴². En el caso de la secreción de IL-1β se ha observado que AhR activa a PAI-2, un inhibidor de la caspasa-1 que participa en la secreción de IL-1β, regulando negativamente la secreción de esta citocina^{41,43}. Un ejemplo de regulación positiva por parte de AhR se observa sobre la IL-8, en donde la activación de AhR por TCDD estimula la interacción con RelB, (miembro de la familia NF-κB) y este nuevo dímero es capaz de unirse al sitio NF-κB en el promotor de IL-8 y estimular su síntesis⁴⁴. La IL-10 es otra de las citocinas afectadas por AhR, y al igual que la IL-8 es regulada de manera positiva⁴⁰.

Interleucina 10

La IL-10 es una citocina anti-inflamatoria clave producida por una gran variedad de tipos celulares, como linfocitos T, B, monocitos, células presentadoras de antígeno (MΦ y células dendríticas), algunas células epiteliales, e incluso células Th1 y Th17 en situaciones de inflamación crónica como un sistema de regulación⁴⁵⁻⁴⁷. Inicialmente fue descrita como un producto de células Th2 que actuaba sobre su tipo celular opuesto (Th1) inhibiendo su proliferación y la secreción de citocinas; por ello fue nombrada en primera instancia como “factor inhibidor de la síntesis de citocinas” (CSIF)⁴⁸.

IL-10 tiene un amplio espectro de propiedades inmunomoduladoras claves para el control de la patogénesis de diversas enfermedades: inhibe la secreción de citocinas pro-inflamatorias (TNF, IL-1 e IL-6), suprime la proliferación celular y la expresión de moléculas co-estimuladoras y del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en células presentadoras de antígenos (APC), inhibiendo la activación de células T^{45,49,50}. Presenta efectos inhibitorios sobre células Th1, bloqueando de la producción de IL-12 e IFN-γ, y disminuye las respuestas de los MΦ a IFN-γ⁵¹ y a LPS⁵². De hecho, algunos patógenos aprovechan esta característica inmunosupresora para establecer la infección. IL-10 tiene una implicación importante en la homeostasis intestinal, ya que los ratones K.O. para IL-10 muestran una respuesta de células Th1 exacerbada, desarrollando enterocolitis crónica espontánea en respuesta a la flora intestinal^{47,53}, mientras que en humanos se han asociado diversos polimorfismos en el gen de la IL-10 o de su receptor (IL-

10R) con patologías intestinales como la colitis ulcerativa (UC), el lupus eritematoso sistémico (SLE), la enfermedad de Bechet (BD) y la artritis reumatoide juvenil, entre otras patologías inflamatorias⁵⁴⁻⁵⁹.

Aunque las actividades mejor descritas de IL-10 en un inicio tenían un carácter inhibitorio general, IL-10 lleva acabo efectos positivos sobre la proliferación de mastocitos⁶⁰ y timocitos⁶¹. Además, en células B promueve su proliferación y diferenciación a células plasmáticas⁵⁰. Por lo tanto, en el sistema inmune la producción de IL-10 es finamente regulada para controlar todos estos efectos⁶².

Señalización y regulación de IL-10

IL-10 es miembro de la familia de citocinas de tipo II. Da nombre a la “familia IL-10” de citocinas, entre las que se encuentran IL-19, 20, 22, 24, 26, 28 y 29. Estas citocinas muestran característica estructurales y de señalización similares^{63,64}. El IL-10R es un heterotetrámero compuesto por 2 subunidades IL-10R α , cuya función principal es unir al ligando, y 2 subunidades IL-10R β a través de las cuales se lleva a cabo la señalización. Una vez que IL-10R α une IL-10 se produce un cambio conformacional que permite la unión de IL-10R β a IL-10R β . Una vez formado el heterotetrámero, las tirosina cinasas Jak1 y Tyk2 asociadas constitutivamente a IL-10R α e IL-10R β , respectivamente, son activadas y fosforilan residuos de tirosina en la región intracelular de IL-10R α . La fosforilación de IL-10R α permite el reclutamiento de STAT3 y su posterior fosforilación por Jak1 y Tyk2. La fosforilación de STAT3 permite su dimerización, separación del receptor y translocación al núcleo, donde se une a elementos de unión de STAT3 presentes en genes regulados por IL-10. SOCS3 (*suppressor of cytokine signaling 3*) es un gen blanco de STAT3, el cual inhibe la expresión de citocinas inflamatorias, entre ellas TNF, IL-6 e IL-1 β ^{45,65}.

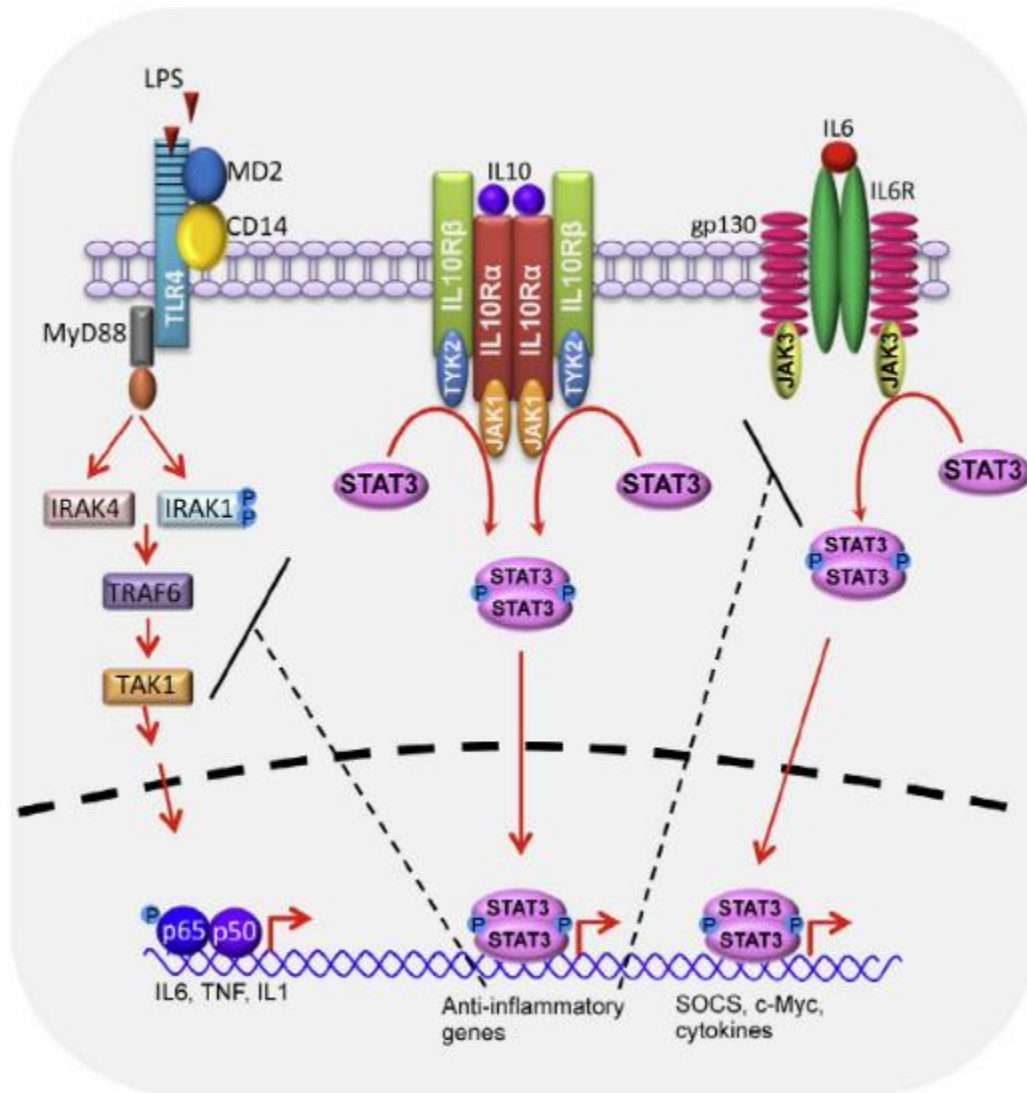


Figura 3. Vía de señalización de la interleucina IL-10.

Dado el gran potencial inmunomodulador de IL-10 es esencial una regulación precisa de su expresión. El gen de IL-10 tiene con una longitud aproximadamente de 4.7 kb en el cromosoma 1q21-32; está distribuido en 5 exones separados por 4 intrones. La transcripción del gen de IL-10 ha sido evaluada en diversos tipos celulares, como células T y B, células NK, monocitos y Mφ. Los factores de transcripción que prevalecen en la regulación de la síntesis de IL-10 son

específicos de los diferentes tipos celulares, así como las vías de señalización, las modificaciones de la cromatina⁶⁶ y las modificaciones post-transcripcionales. Entre los factores de transcripción implicados en la regulación de IL-10 se han descrito Sp1⁶⁷⁻⁷⁰, miembros de la familia STAT⁷¹, C/EBP^{69,70}, c-Maf⁷², NF- γ ⁷⁴, CREB⁷³ y NF- κ B^{62,75}, entre otros^{76,77,65}.

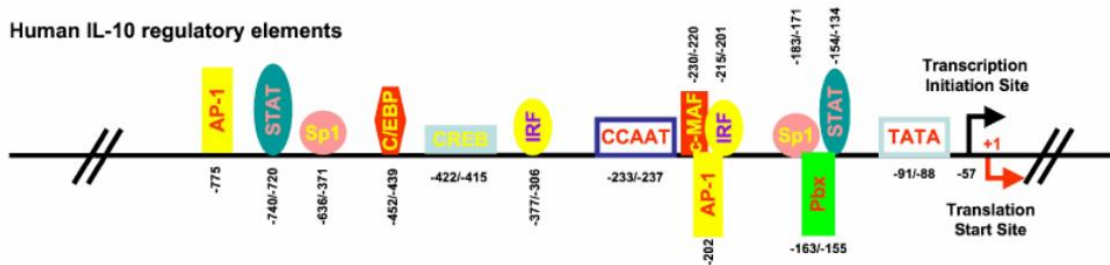


Figura 4. Secuencia consenso y sitios de unión de factores de transcripción a la región promotora proximal de la IL-10 humana.

Participación de AhR en la regulación de IL-10

Existe fuerte evidencia de la participación del factor AhR y su implicación crítica en la regulación de IL-10, en 2009 Kimura y col.⁴⁰ observaron una disminución importante en la producción de IL-10 inducida por LPS en M Φ de ratones K.O. para el gen de AhR en comparación con la de los ratones silvestres (WT). Por el contrario, la producción de las citocinas pro-inflamatorias IL-6, TNF e IL-12, se vio incrementada considerablemente en los ratones K.O bajo las mismas condiciones. Estos resultados sugieren que AhR tiene una función anti-inflamatoria en los M Φ bajo la vía de señalización TLR4-LPS, y que la síntesis disminuida de IL-10 podría dar lugar a una hiperproducción de citocinas pro-inflamatorias en los M Φ de los ratones K.O. (Fig. 5).

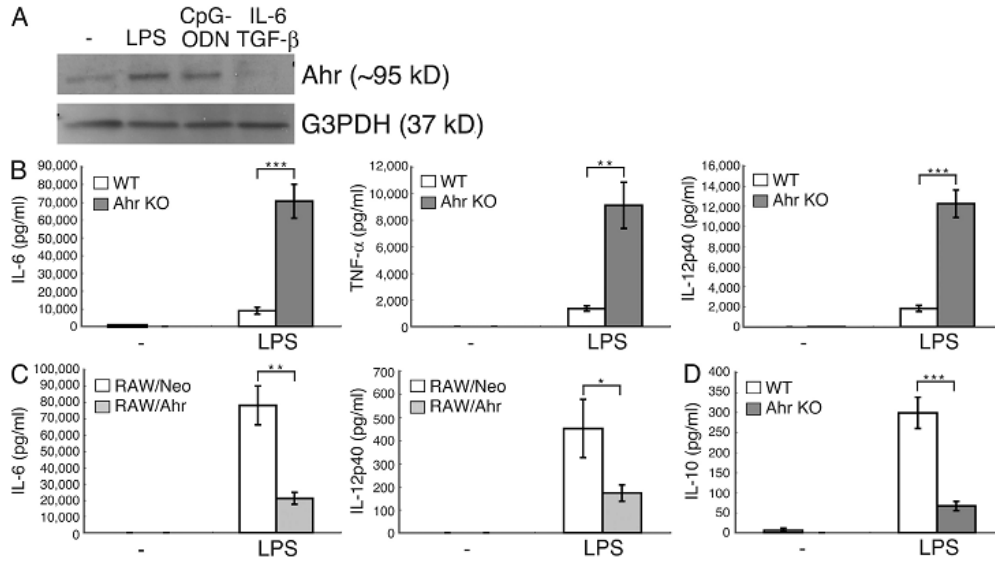


Figura 5. La deficiencia de AhR aumenta la respuesta inflamatoria inducida por LPS en MΦ. (A) MΦ peritoneales de ratón fueron estimulados con LPS, CpG-ODN y TGF-β + IL-6 por 24 h. Las células fueron lisadas y la expresión de AhR y G3PDH se detectó por medio de western blot (WB). (B-D) MΦ peritoneales de ratones WT y K.O. para AhR, o células RAW transfectadas con un vector de expresión que contiene el gen de AhR (RAW/Ahr) o el vector vacío (RAW/Neo), fueron estimuladas con LPS y se evaluó la producción de las citocinas IL-6, TNF, IL-12 e IL-10 por ELISA.

Adicionalmente, este mismo grupo de investigación observó la importancia de AhR en conjunto con la IL-10, ya que la presencia de esta citocina inhibía en un 40% la producción de IL-6 en las MΦ deficientes de AhR, sin embargo la secreción de dicha citocina aún se mantenía mayor que en los MΦ WT estimulados con LPS, demostrando un papel regulatorio de la IL-6 por parte de AhR en una manera independiente de IL-10 (Fig. 6)⁴⁰.

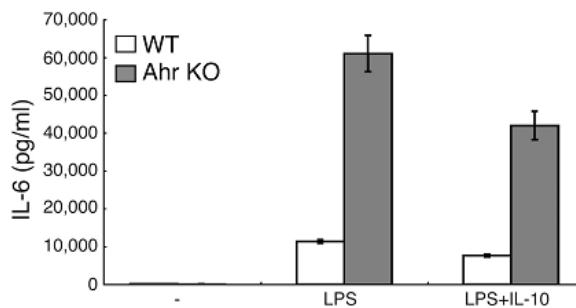


Figura 6. AhR regula la producción de IL-6 inducida por LPS independientemente de IL-10. MΦ peritoneales WT y K.O. para AhR fueron estimulados con LPS en presencia o ausencia de IL-10 por 24 h. Se evaluó la producción de IL-6 por medio de ELISA.

Kimura y col. reportaron en 2008 que AhR interactuaba físicamente con STAT1 e inhibía su activación en el proceso de diferenciación de células Th17⁷⁸. En el 2009, este grupo comprobó que la unión entre AhR y STAT1 también se llevaba a cabo en los MΦ peritoneales posterior a la activación con LPS, y que esta interacción participaba de manera diferencial en la producción de citocinas. Además, se comprobó que el efecto del LPS en los MΦ de los ratones K.O. para STAT1 resultó en una producción de citocinas (IL-6 e IL-10) similar a lo encontrado en los ratones K.O. para AhR⁴⁰ (Fig. 7).

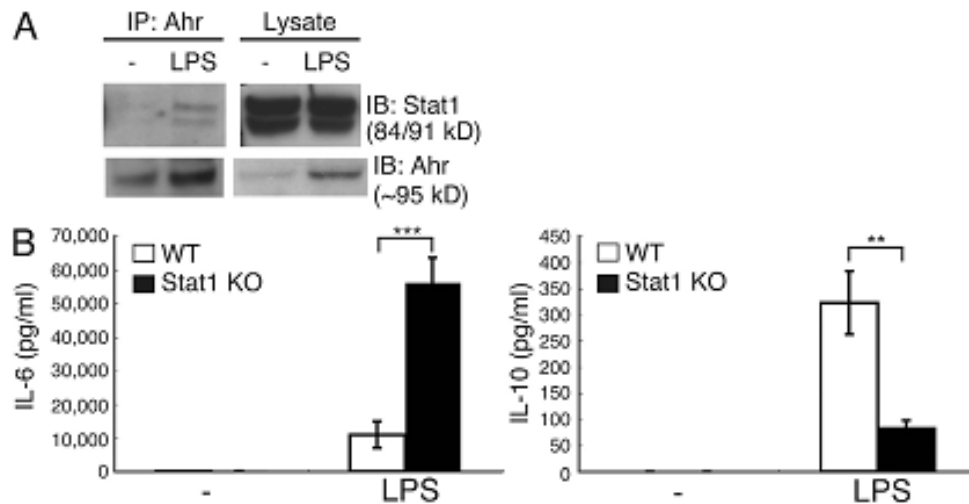


Figura 7. Asociación entre AhR y STAT1 en MΦ. (A) MΦ peritoneales se aislaron de ratones BALB/c y se estimularon con LPS por 24 h. La interacción entre AhR y STAT1 fue examinada mediante inmunoprecipitación (IP) y WB (IB). (B) MΦ peritoneales de ratones WT y de ratones K.O. para STAT1 fueron estimulados con LPS y se evaluó la producción de IL-6 e IL-10 por ELISA.

Uno de los estudios más importantes sobre la implicación de AhR en la regulación de IL-10 fue realizado por Gandhi y col. en 2010. La observación de que ligandos de AhR como el TCDD y FICZ en células T humanas producía un incremento en la secreción de IL-10 y que la ausencia de AhR disminuía de manera drástica su producción, los llevo a la búsqueda e identificación de probables sitios de unión para AhR en el promotor de IL-10 humana. Mediante ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) confirmaron la capacidad de AhR de unirse al promotor de la IL-10 y regular su síntesis⁷⁹.

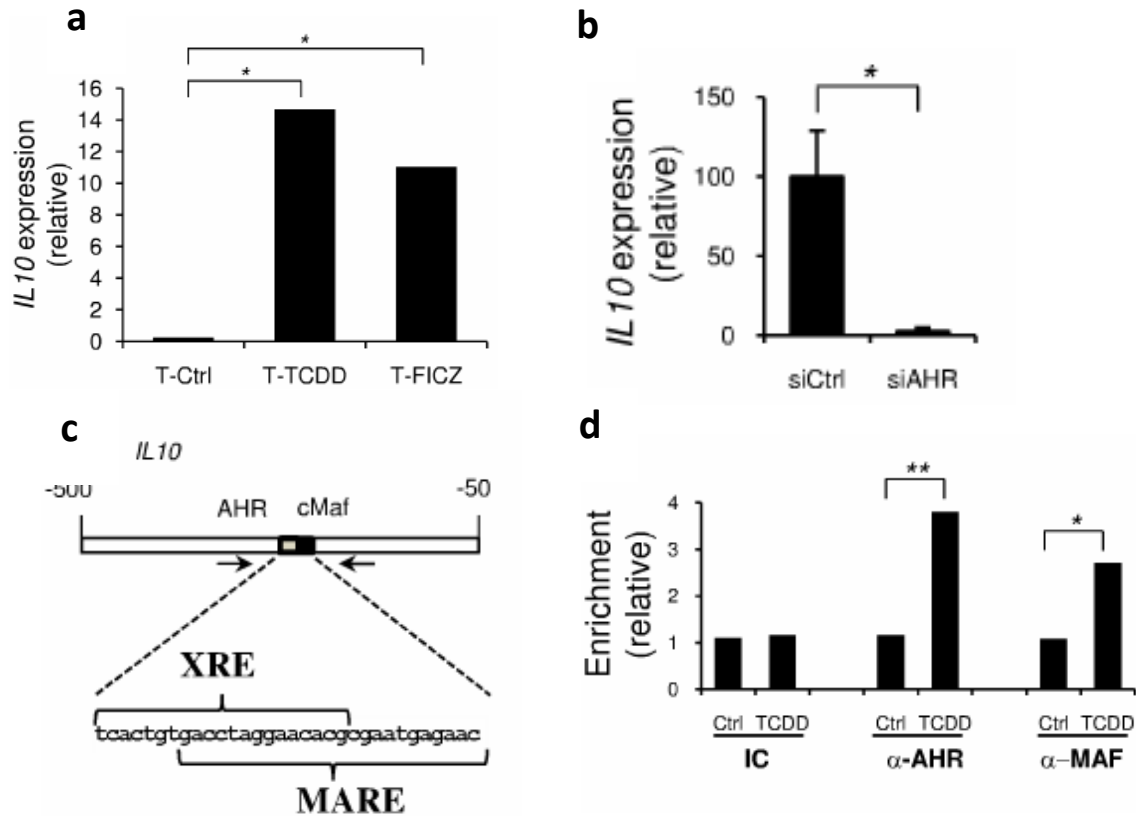


Figura 8.- El AhR regula la síntesis de IL-10 mediante la unión a su promotor. a) Células T humanas estimuladas con ligandos de AhR (TCDD o FICZ) durante 6 h producen altas cantidades de IL-10. b) Efecto del *knock-down* de AhR en la expresión de IL-10. c) Representación esquemática del sitio de unión para AhR (XRE) en el promotor de la IL-10 humana. d) Análisis de la interacción de AhR y MAF a sus sitios de unión en el promotor humano de la IL-10 en células T CD4+ naïve mediante ensayos de ChIP.

De manera similar Apetoh y col. en 2010 reportan la participación de AhR y c-Maf en la regulación de la síntesis de la IL-10 en células Tr1 de ratón. Dicha regulación se debería a la unión de AhR como de c-Maf a sus sitios de unión respectivos en el promotor de la IL-10, todo esto confirmado mediante ensayos de Inmunoprecipitación de la cromatina. Adicionalmente la construcción de un gen reportero bajo el promotor de la IL-10 confirma la participación sinérgica de ambos factores de transcripción⁸⁰.

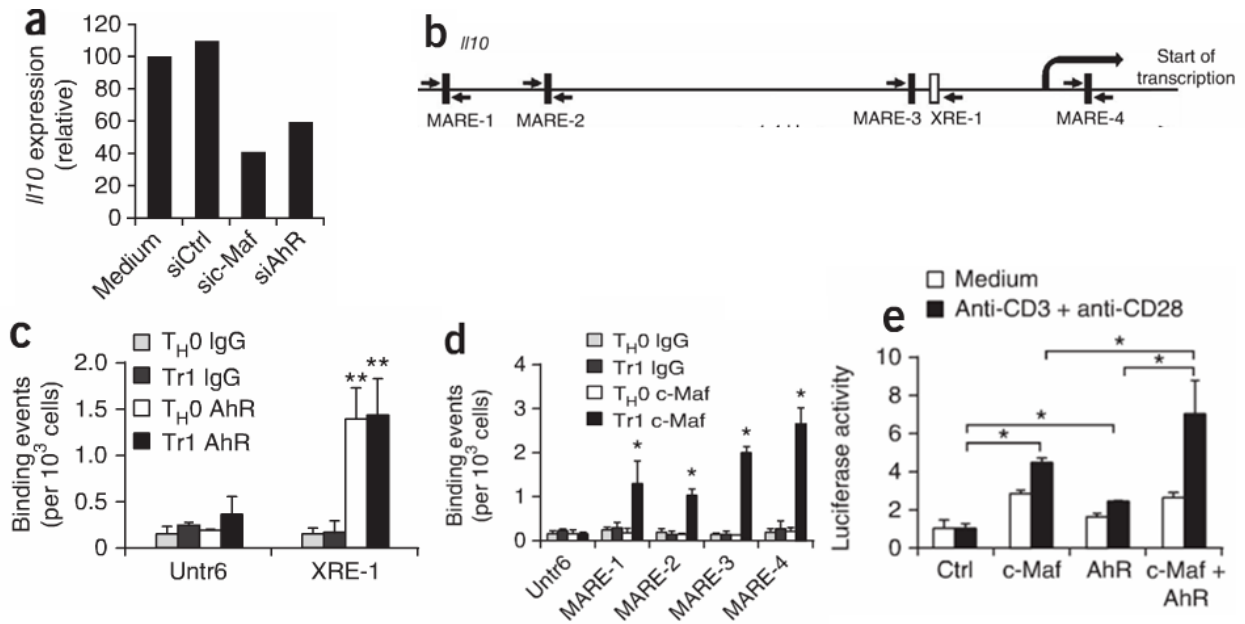


Figura 9.- El AhR regula la síntesis de IL-10 en células Tr1 de ratón. a) Análisis de cuantitativo de PCR para la expresión del mRNA de *Il10* en células Tr1 derivadas de células T vírgenes cultivadas con IL-27 y TGF- β y transfectadas con un siRNA control o con siRNA específico para c-Maf (sic-Maf) o AhR (siAhR), medición de 24 hrs post-transfección. b) Sitios de unión para AhR y c-Maf-en el promotor de la IL-10 murino c) y d) Análisis de CHIP de la interacción de AhR y c-Maf con el promotor de la IL-10. e) Actividad luciferasa de células de linfoma de ratón EL4 transfectadas con una construcción del reportero de luciferasa bajo el promotor de IL-10.

ANTECEDENTES DIRECTOS

Existen diversos modelos para la generación y polarización de los MΦ *in vitro*. Las citocinas GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos) y M-CSF (factor estimulante de colonias de macrófagos) inducen la polarización de los monocitos hacia MΦ pro- (M1) y anti-inflamatorios (M2), respectivamente. Estas dos poblaciones de MΦ tienen papeles opuestos durante las respuestas inflamatorias e inmunitarias. Los MΦ M1 producen altos niveles de citocinas inflamatorias como IL-1β, IL-6, TNF, IL-12 p40, IL-18 e IL-23 en respuesta a micobacterias, e inducen respuestas de tipo Th1. Por el contrario, los MΦ M2 liberan grandes cantidades de IL-10 y tienen baja capacidad para inducir la proliferación de los linfocitos T y la secreción de IFN-γ⁸¹⁻⁸⁴. Morfológicamente, los MΦ M2 son de apariencia elongada en forma de huso, mientras que los MΦ M1 son redondeados, con aspecto similar a un “huevo frito”. En cuanto a la expresión de marcadores, los MΦ M1 se caracterizan por sus altos niveles de CD1b, CD71, IL-18R, HLA-DQ y del factor de transcripción PU.1 (familia Ets), mientras que los MΦ M2 presentan una alta expresión de MHC-I, CD11c, CD14, CD16, CD32, CD115, del receptor “scavenger” CD163, y de los factores de transcripción c-maf y MAFB (familia bZip)^{81,82}. Además de CD163, el cual internaliza los complejos hemoglobina-haptoglobina, los MΦ M2 tienen una expresión aumentada de moléculas relacionadas con el metabolismo del hierro, como la enzima hemo-oxigenasa (HO)-1 y la ferroportina⁸⁴. Sin embargo, también comparten algunas características fenotípicas ya que ambos tipos de MΦ expresan niveles similares de HLA-DR, CD11b, CD33, CD40, CD54, CD64, CD80, CD86, y del receptor “scavenger” tipo A (SR-A)^{81,82}. Las características de los MΦ generados con M-CSF son similares a las de los denominados MΦ alternativamente activados generados con citocinas Th2 (IL-4) o inmunosupresoras (IL-10)^{85,86}. Estos MΦ son funcionalmente opuestos a los MΦ clásicamente activados (inducidos por IFN-γ/LPS), y se caracterizan por inducir respuestas de tipo Th2 o de células T reguladoras (Treg, Tr1) y, en ocasiones, por suprimir el desarrollo de linfocitos Th17^{86,87}. El fenotipo clásicamente activado es pro-inflamatorio y se caracteriza por la liberación de citocinas pro-inflamatorias, intermediarios reactivos del oxígeno y del nitrógeno (ROS, RNS), y actividad tumorigénica/microbicida. Estos MΦ son similares a los generados con GM-CSF. En contraste, los MΦ alternativamente activados tienen un fenotipo inmunosupresor, secretan citocinas anti-inflamatorias, presentan función “scavenger” y capacidad angiogénica y de remodelación y reparación de tejidos.

De esta manera, diferentes tipos de MΦ estarían destinados a desempeñar papeles particulares en distintas situaciones para mantener la homeostasis del hospedero. La baja o nula producción de IL-10 por los MΦ M1 sería beneficiosa en la defensa contra infecciones virales y bacterianas, permitiendo la generación de respuestas de tipo Th1. En contraste, los MΦ M2 jugarían un papel homeostático y, en situaciones de infección, un papel inmunosupresor importante para inhibir las respuestas de los linfocitos una vez terminada la misma, o en situaciones donde las respuestas inmunitarias o inflamatorias sean perjudiciales. Por ejemplo, los MΦ situados en tejidos con una

alta exposición a retos antigénicos (pulmón, mucosa intestinal, placenta) se mantienen en un estado basal quiescente, y su actividad pro-inflamatoria sólo se activa cuando es absolutamente requerida, minimizando su potencial para comprometer la integridad tisular⁸⁸. La importancia de la actividad de M-CSF como factor inmunosupresor queda subrayada por sus niveles elevados en situaciones de inmunocompromiso, como en muchas neoplasias, en la sangre del cordón umbilical, y durante el embarazo, donde niveles disminuidos de M-CSF predisponen al aborto⁸⁹⁻⁹⁰.

El AhR se expresa y es activado por ligandos exógenos en macrófagos diferenciados *in vitro*

Datos previos obtenidos en nuestro laboratorio indican que el AhR se expresa en cantidades equivalentes en los MΦ generados con GM-CSF (M1) o M-CSF (M2), y que en ambos tipos celulares AhR es capaz de ser activado por ligandos exógenos, como TCDD, ya que su expresión disminuye significativamente en presencia del mismo (con base en su mecanismo de acción en donde posterior a su activación AhR es enviado a degradación)⁹¹ (Fig. 10).

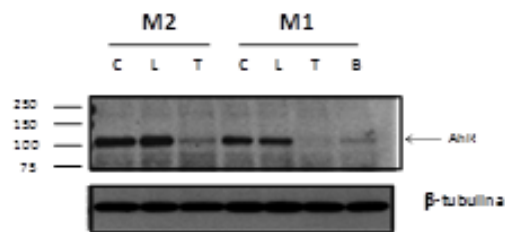


Figura 10. Expresión y activación de AhR en los MΦ M1 y M2 diferenciados *in vitro*. La expresión de AhR se evaluó mediante WB. Se muestra además la activación de AhR por ligandos exógenos, mantenidos durante 24 h a partir del 6º día de cultivo: TCDD (T), BaP (B), y lipoxina A4 (L). El control (C) corresponde a MΦ tratados con vehículo (DMSO). La expresión de β-tubulina se utilizó como control de carga.

Este resultado nos sugiere que AhR es funcional en los MΦ generados *in vitro*, y para comprobar desde qué etapas de la diferenciación se expresa se realizaron cinéticas de 6 días y se evaluó la expresión de AhR mediante WB durante todo el proceso de diferenciación (Fig. 11), así como algunos marcadores moleculares característicos de cada subpoblación: el factor de transcripción PU.1, característico de los MΦ M1, y el factor de transcripción MAFB, que es característico de los MΦ M2. Los resultados nos indican que AhR se expresa de manera constitutiva en ambos tipos de macrófagos durante todo el proceso de diferenciación, pero de manera interesante este no se expresa en los precursores monocíticos humanos extraídos de sangre periférica.

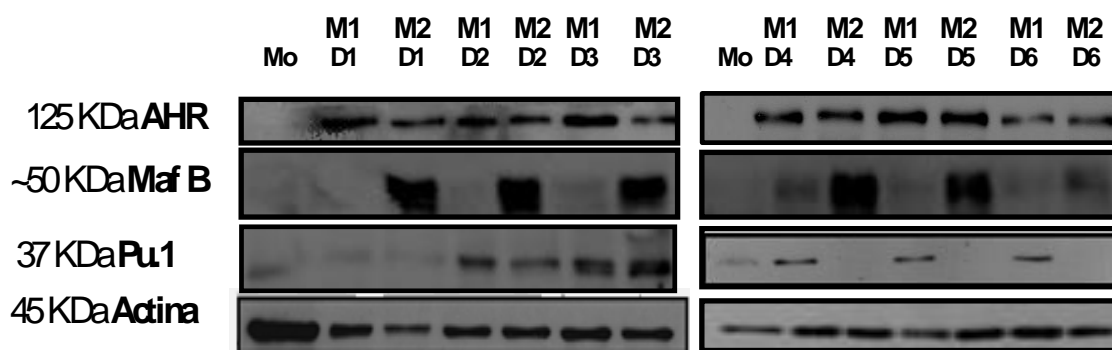


Figura 11. Cinética de Expresión de AhR en los MΦ cultivados durante 6 días. Los monocitos humanos se cultivaron durante 1 (D1), 2 (D2), 3 (D3), 4 (D4), 5 (D5) o 6 (D6) días con GM-CSF (M1) o M-CSF (M2). Pasados estos tiempos las células se recogieron, lisaron, y se evaluó la expresión de AhR, PU.1, y β-actina (control de carga) por WB.

El AhR se encuentra activado en ambas subpoblaciones de MΦ en ausencia de ligandos exógenos

Mediante la utilización de fracciones nucleares y citoplásmicas de los MΦ M1 y M2 se evaluó la expresión de AhR para determinar su posible activación por ligandos endógenos, esto con base en su mecanismo de acción en el cual la translocación del AhR al núcleo celular sugiere su activación. Estos experimentos fueron realizados con dos donantes independientes. En la Fig. 12 se puede observar que el AhR se encuentra activo en ausencia de ligandos exógenos tanto en los MΦ M1 como M2.

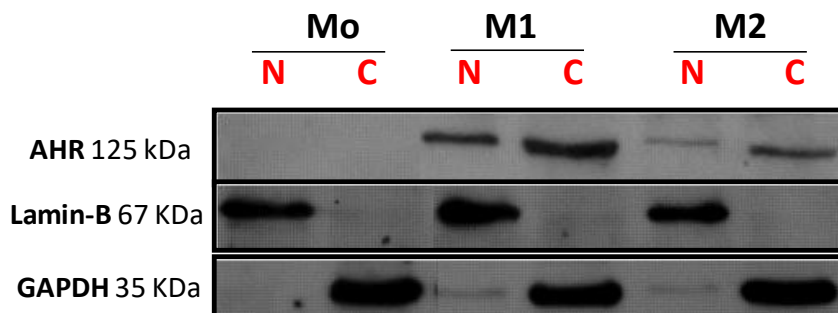


Figura 12. Expresión del AhR en extractos nucleares y citoplásmicos de MΦ diferenciados *in vitro*. Monocitos recién aislados (Mo) y MΦ M1 y M2 en el día 6° de diferenciación fueron lisados y se extrajeron las fracciones nucleares (N) y citoplásmicas (C) de cada uno de ellos. La expresión de AhR en cada fracción

se determinó mediante WB. Anticuerpos anti-lamin B y anti-GAPDH se emplearon como control de carga y de pureza de las fracciones nucleares y citoplásmicas, respectivamente.

Existen reportes que demuestran que la activación de AhR con ligandos exógenos puede modificar la funcionalidad de varias poblaciones del sistema inmune. Por tal motivo, con la finalidad de evaluar si la falta de actividad de AhR está ligada a la funcionalidad de los MΦ, se realizaron cultivos en presencia o ausencia del inhibidor de AhR α -naftoflavona (α -NF), y las células fueron activadas con LPS durante las últimas 24 h de cultivo. La secreción de citocinas asociadas a los fenotipos M1 (TNF, IL-6, IL-8) y M2 (IL-10) en los sobrenadantes de los MΦ fue analizada mediante la técnica de ELISA (Fig. 13).

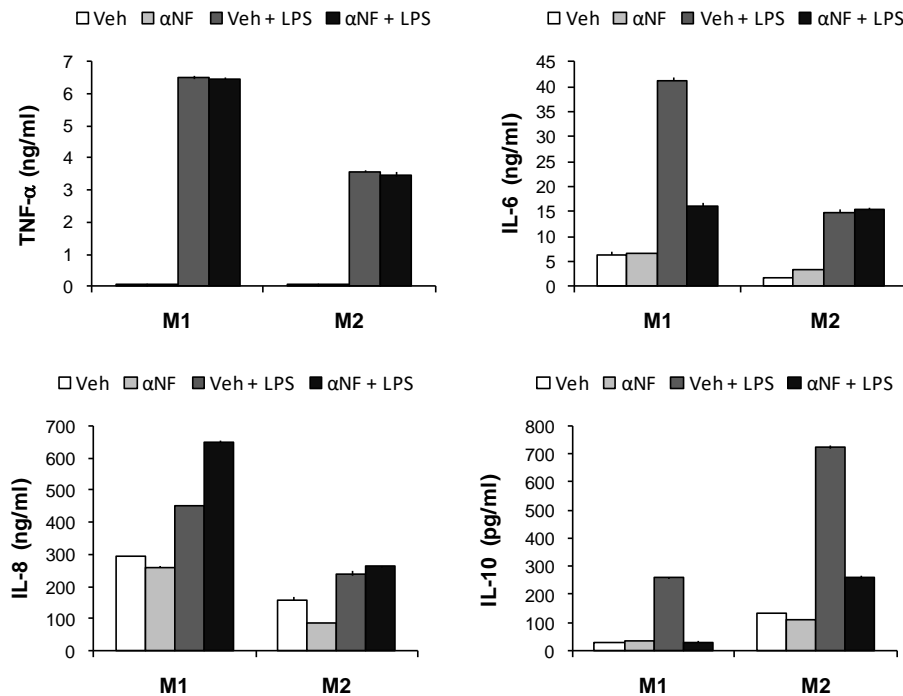


Figura 13. Secreción de citocinas pro- y anti-inflamatorias en MΦ en presencia y ausencia de un inhibidor del AhR. Los monocitos CD14+ se cultivaron para generar MΦ M1 y M2. En los días 0, 2, y 4 de cultivo se añadió α -NF (5 μ M) o vehículo (DMSO, Veh). En el día 5° se añadió LPS a algunos cultivos y otros se dejaron como control. En el día 6° se colectaron los sobrenadantes de los cultivos y se evaluaron las citocinas TNF, IL-6, IL-8 e IL-10 por el método de ELISA, usando kits comerciales. Los resultados muestran la producción media \pm SD de duplicados de los sobrenadantes de un donante.

La secreción de citocinas se vio afectada en los MΦ M1 cuando se inhibió la actividad del AhR durante su diferenciación, con una disminución drástica de IL-6 e IL-10. En cambio, en los MΦ

M2 la inhibición del AhR sólo modificó la producción de IL-10, disminuyéndola. En ausencia de LPS la producción basal de citocinas apenas fue modulada con la inhibición del AhR.

Expresión diferencial de factores de transcripción en MΦ M1 y M2

Con la finalidad de determinar la posible diferencia en cuanto a la disposición de factores de transcripción implicados en la regulación de citocinas como IL-6 e IL-10 se evaluó la expresión de factores de transcripción de la familia NF-κB, Sp1, c-maf y AhR en los MΦ M1 y M2 (Fig. 14). Los resultados demuestran una diferencia en la disposición de algunos miembros de la familia NF-κB (RelA y RelB) y de Sp1 en los MΦ M1 comparados con los MΦ M2, en condiciones basales para ambas poblaciones.

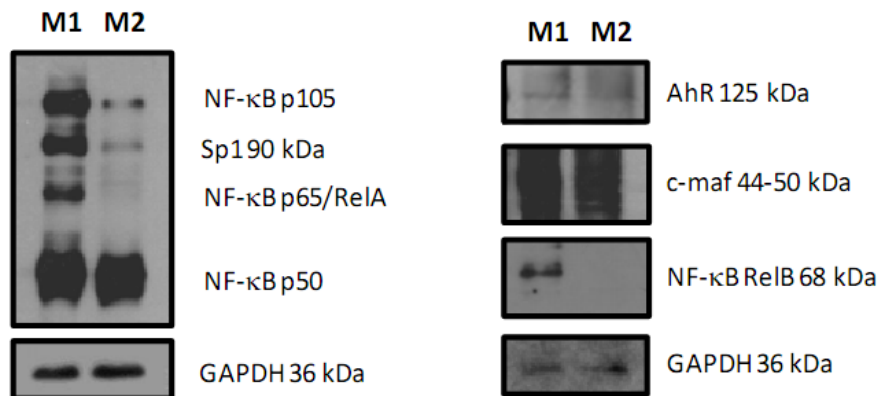


Figura 14. Expresión de distintos factores de transcripción en los MΦ M1 y M2. Tras 6 días de diferenciación los MΦ se colectaron y lisaron. Los lisados fueron sometidos a SDS-PAGE y transferidos a membranas de PVDF, las cuales fueron analizadas con anticuerpos anti-p50,-p65/RelA, -RelB, -Sp1, -c-maf y -AhR. La proteína GAPDH se utilizó como control de carga. Los pesos moleculares de cada proteína se indican en la figura. Se muestran los resultados de un donante representativo.

Para evaluar si estos patrones de expresión eran conservados con los MΦ M1 y M2 tras su activación, se evaluó la modificación en la expresión y activación de dichos factores de transcripción en presencia de LPS durante 8 h (Fig. 15).

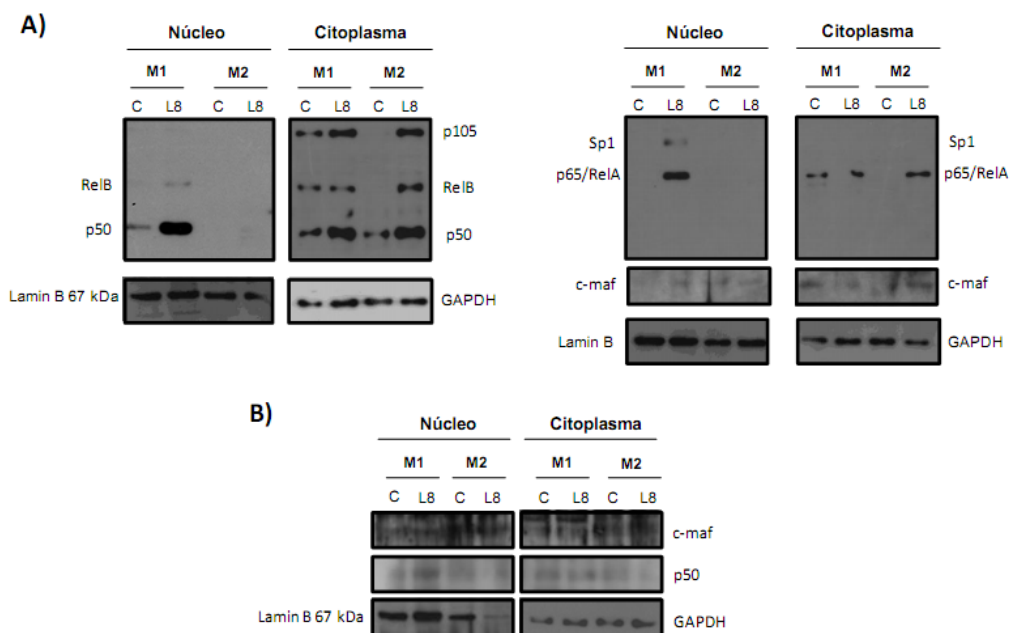


Figura 15. Expresión de factores de transcripción en los MΦ polarizados en condiciones basales y tras su activación. Los MΦ diferenciados durante 6 días se mantuvieron en ausencia (C) o presencia de LPS (L8, 100 ng/mL) durante 8 h. Posteriormente las células fueron recolectadas y se separaron los extractos nucleares y citoplásmicos para cada condición. Estos extractos fueron sometidos a SDS-PAGE, y transferidos a membranas de PVDF. Sobre estas membranas se realizaron ensayos de WB, utilizando los anticuerpos correspondientes a las proteínas indicadas. Las proteínas lamin B y GAPDH se emplearon como control de carga y de pureza de las fracciones nucleares y citoplásmicas, respectivamente. En A) y B) se muestran los resultados de dos donantes independientes.

Estos resultados nos muestran que el miembro de la familia NF-κB p50 se expresa de manera basal en ambos tipos de MΦ, y que su expresión se ve inducida en presencia de LPS. Sin embargo su traslocación al núcleo solo fue observada en los MΦ M1 de forma invariable en los 2 donantes analizados, mientras que en los MΦ M2 solo se observó dicha traslocación en uno de los donantes.

Los factores RelA y RelB tienen un comportamiento similar, ambos se detectan en condiciones basales sólo en los MΦ M1, y en los MΦ M2 sólo se detectan tras el estímulo con LPS. Al igual que con NF-κB p50, la traslocación al núcleo de estos dos miembros de la familia sólo se detectó en los MΦ M1, y se vio favorecida en la condición que presenta LPS (Fig. 15A).

El factor de transcripción Sp1 resultó prácticamente indetectable en ambos tipos de MΦ en condiciones basales. Tras la activación de las células, Sp1 se observó exclusivamente en el

núcleo de los MΦ M1. Una posible causa que nos impidió detectar dicho factor podría atribuirse a una baja concentración de la proteína en los extractos (Fig. 15).

AhR forma complejos con el factor p50 en los macrófagos M1 y M2 en condiciones basales y tras su activación con LPS

Datos preliminares obtenidos en nuestro laboratorio sugieren la posible interacción física entre el AhR y algunos de los factores de transcripción implicados en la regulación de las citocinas IL-6 e IL-10. A partir de extractos nucleares y citoplasmáticos de MΦ M1 y M2 en presencia o ausencia de LPS (8 y 18 h) se realizaron ensayos de co-inmunoprecitación con un anticuerpo a-AhR. El producto final de las inmunoprecipitaciones se evaluó mediante WB para detectar factores de transcripción que estuvieran formando complejo con AhR. Se determinó que AhR forma complejos con p50 de forma constitutiva en ambos tipos de MΦ en el citoplasma celular. Estos complejos también se detectaron en el núcleo, y en uno de los donantes evaluados se observó un incremento de los complejos en presencia de LPS (Fig. 16A). Por otra parte, los datos preliminares obtenidos en un solo donante indican que AhR podría formar complejos con p65 sólo tras la activación de las células con LPS (Fig. 16B). Estos complejos sólo se detectaron en el núcleo, y a tiempos más tempranos de estimulación en los MΦ M1 que en los M2.

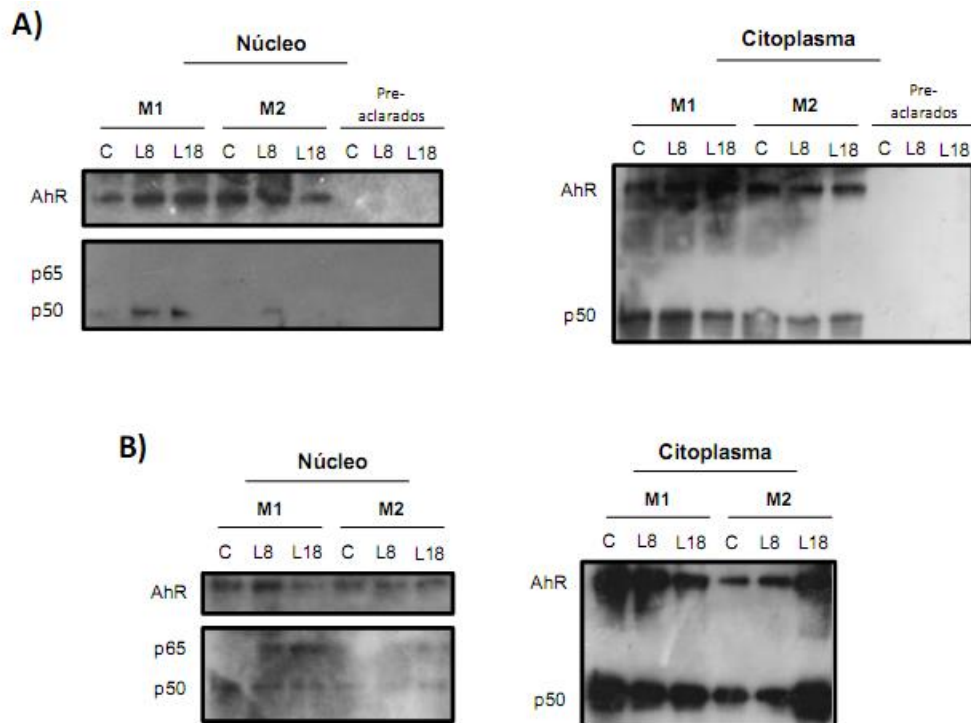


Figura 16. Detección de complejos AhR-p50 en las fracciones nucleares y citoplásmicas de los macrófagos GM-CSF y M-CSF. Los MΦ diferenciados durante 6 días se mantuvieron en ausencia (C) o presencia de LPS (100 ng/mL) durante 8 (L8) o 18 h (L18). Posteriormente las células fueron recolectadas y se separaron los extractos nucleares y citoplásmicos para cada condición. Estos extractos fueron sometidos a ensayos de inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-AhR. Los inmunoprecipitados fueron resueltos en geles de SDS-PAGE, y transferidos a membranas de PVDF. Sobre estas membranas se realizaron ensayos de WB, utilizando anticuerpos anti-AhR, anti-p50, anti-p65, anti-RelB, anti-Sp1, o anti-c-maf. Los pre-aclarados corresponden a las proteínas de los lisados de MΦ M1 incubados con proteína G-agarosa. Se muestran los resultados obtenidos a partir de dos donantes independientes (A, B).

Sitios de unión de AhR en el promotor de IL-10

Con la finalidad de definir sitios de unión para AhR en el promotor de la IL-10 humana, y al mismo tiempo identificar sitios de unión de factores de transcripción que pudieran estar interactuando con AhR, se analizó la secuencia del promotor de IL-10 en el programa MatInspector (Genomatix). En la Fig. 16 se muestran de manera esquemática los resultados de este análisis. En la figura se pueden observar dos sitios en donde AhR podría interactuar con el promotor de IL-10; uno ubicado en la región proximal (Fig. 17A) donde se encuentran sitios para otros factores como Sp1, C/EBP, c-maf y CREB; y el otro en una región más distal (Fig. 17B) donde, de manera interesante, se observó que el sitio de unión de AhR está muy próximo a un sitio de unión del factor de transcripción NF-κB p65. Además, cercanas a este sitio, se localizan dos regiones de unión para factores de transcripción de la familia Maf, uno más para factores relacionados a Maf y AP-1, y por último dos sitios de unión a c-Rel. Sin embargo, el motivo XRE que se ha reportado activo en el promotor de IL-10 humana se sitúa en la región proximal al sitio de inicio de la transcripción⁷⁹.

Los sitios de unión para los factores de transcripción CREB, Sp1, c-maf, y C/EBP en la región proximal del promotor de la IL-10 obtenidos mediante el análisis de su secuencia promotora han sido confirmados en estudios recientes. Por ejemplo, Mosser y Zhang (2009) detallan, entre otros aspectos, las secuencias consenso así como las ubicaciones exactas de las regiones de unión para estos factores de transcripción, en donde se observa que las regiones reportadas en otros estudios y las propuestas mediante el análisis del promotor en el programa MatInspector presentan una alta similitud⁶⁵.

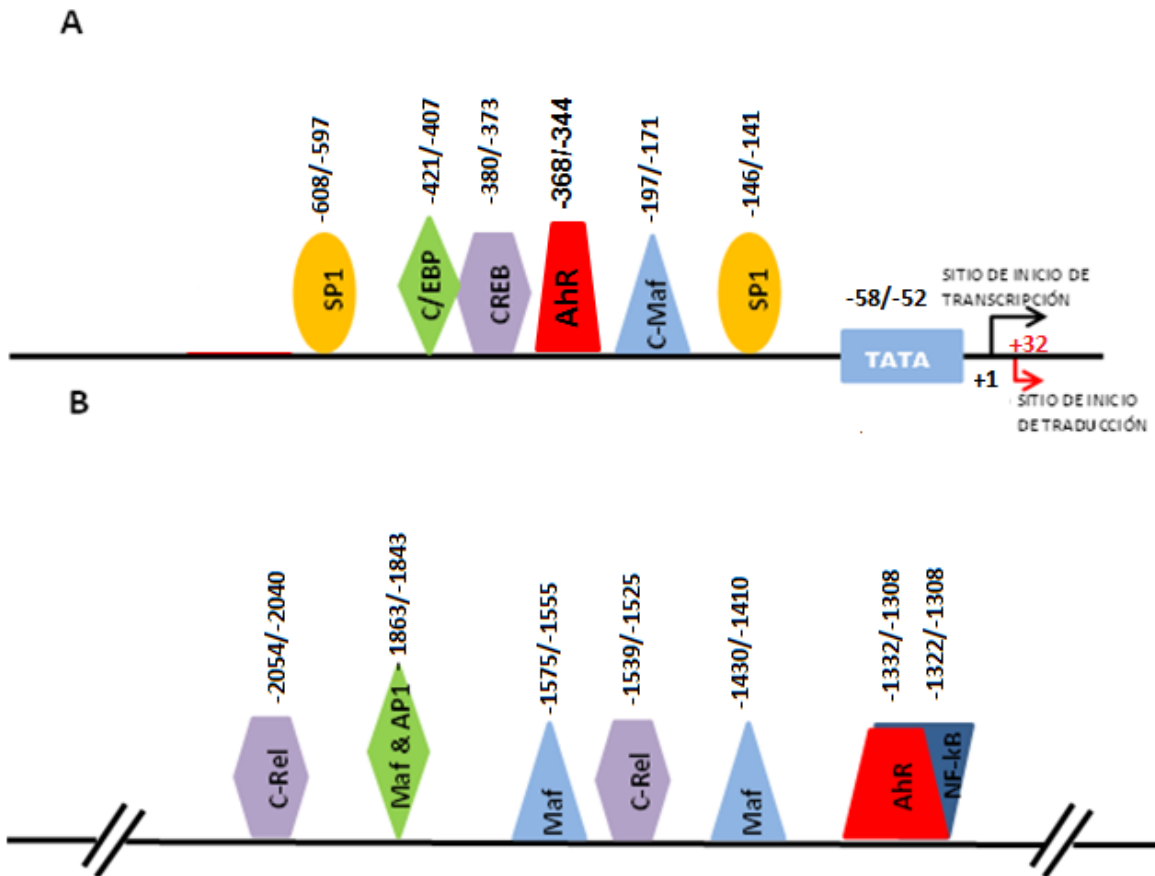


Figura 17. Sitios de unión de factores de transcripción a la región promotora proximal y distal de la IL-10. A) Se muestran los posibles sitios de unión de factores de transcripción a la región proximal del promotor de IL-10, donde se encuentran regiones consenso para factores como Sp1, c-maf, CREB, y C/EBP, además de AhR, en la región distal del promotor (B) se observan probables sitios de unión para miembros de la familia Maf, factores relacionados a Maf y AP-1, dos sitios para la unión de c-Rel (NF-κB NF-κB), así como un sitio para la unión de AhR el cual se sobrepone a un sitio de unión con NF-κB, (subunidad p65).

En conjunto nuestros datos sugieren que el AhR podría tener un papel fundamental en la inducción de IL-10 por parte de los MΦ M1 y M2, lo que indica su actividad en ambos tipos celulares. IL-10 es una poderosa citocina inmunosupresora, por lo que es posible sugerir que el AhR, además de modular la capacidad inflamatoria de los MΦ M1 (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 MΦ M2 (mediante la inducción de IL-10), lo que concuerda con los datos reportados en ratón para los MΦ peritoneales. Los datos mostrados anteriormente han sido confirmados con un mayor número de donantes y, debido al efecto generalizado del AhR en la inducción de IL-10 en los MΦ 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*. Se ha reportado que AhR puede unirse físicamente a STAT1 y promover la transcripción de algunas citocinas evaluadas en este trabajo. Resultados de nuestro laboratorio indican que la activación de AhR con TCDD induce la fosforilación de STAT1 sólo en los MΦ M1. Esta observación, junto con los datos obtenidos de la secreción de citocinas, nos permiten postular que al menos parte de los mecanismos de señalización desencadenados por AhR son exclusivos para cada subpoblación macrofágica.

JUSTIFICACIÓN

El factor de transcripción AhR participa en la regulación de la síntesis de diversas citocinas. Sin embargo, el mecanismo mediante el cual lleva a cabo esta función en cada una de las células parece ser dependiente del tipo celular. El AhR, junto con otros factores de transcripción, regula la síntesis de IL-10 en linfocitos humanos, pero se desconoce su participación en células del linaje macrofágico.

Los M ϕ M2 humanos producen altos niveles de IL-10 en relación a los M ϕ M1, y el AhR participa de manera positiva en la producción de esta citocina en ambas subpoblaciones celulares. Nuestro grupo de trabajo ha determinado previamente la expresión diferencial de algunos factores de transcripción que regulan la síntesis de IL-10 en los M ϕ M1 y M2.

En este trabajo se evaluará la participación de AhR junto con otros factores de transcripción expresados en los M ϕ M1 y M2 en la transcripción del gen de IL-10, y el posible mecanismo mediante el cual están modulando la producción de esta citocina en ambos tipos celulares.

HIPÓTESIS

El AhR, en conjunto con los factores de transcripción presentes en los M ϕ M1 y M2, induce la síntesis de IL-10 al unirse a su promotor y formar complejos proteicos diferenciales dependiendo de la disposición de estos en cada uno de los tipos celulares.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad del receptor de aril hidrocarburos sobre el promotor de la IL-10 en los M ϕ polarizados M1 y M2.

OBJETIVOS PARTICULARES

Analizar la expresión de la IL-10 en macrófagos M1 y M2 en ausencia de la expresión o actividad de AhR.

Analizar la interacción entre el AhR y el promotor de la IL-10 en los macrófagos M1 y M2 mediante ensayos de Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

Evaluar mediante EMSA la formación de complejos en los fragmentos el promotor de IL-10 con extractos nucleares de macrófagos M1 y M2, en presencia o ausencia de LPS.

Evaluar la formación de complejos entre el AhR y los factores de transcripción que se unen al promotor de IL-10 en los macrófagos M1 y M2 mediante ensayos de Co-Inmunoprecipitación .

Identificar los factores de transcripción que se unen a las diferentes regiones del promotor de la IL-10 mediante ensayos de súper-retardamiento.

METODOLOGÍA

Aislamiento de monocitos

Los monocitos humanos fueron obtenidos a partir de concentrados leucocitarios de donantes clínicamente sanos del Banco de Sangre del Centro Médico Nacional “La Raza” del IMSS. La fracción leucocitaria fue sometida un gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque (densidad 1.077 g/mL). Mediante centrifugación a 2000 rpm (800 gravedades) durante 30 minutos a temperatura ambiente se aislaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de la interfase entre el Ficoll y el plasma. Partiendo de las PBMCs recién extraídas, y por medio de inmunoselección magnética positiva (MACS), se aisló nuestra población de monocitos CD14+ utilizando un anticuerpo (Ab) anti-CD14 conjugado con microesferas magnéticas específico de nuestra población de interés.

Generación de macrófagos GM-CSF y M-CSF

Nuestros macrófagos fueron diferenciados a partir de los monocitos CD14+ los cuales fueron cultivados a una densidad de 0.5×10^6 células/ml para los macrófagos GM-CSF o de 0.7×10^6 células/ml para los M-CSF en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino (10%), L-glutamina (2 mM) y antibióticos (1%). En estas condiciones, los cultivos fueron adicionalmente suplementados cada 2 días con las citocinas polarizantes GM-CSF (1000 U/ml) o M-CSF (10 ng/ml) para permitir la diferenciación adecuada de nuestras dos poblaciones de macrófagos M1 o M2, respectivamente. Los macrófagos maduros fueron obtenidos 6 días posteriores al inicio del cultivo.

Extractos proteicos totales, nucleares y citoplasmáticos

Con ayuda de un embolo y con mucha delicadeza los macrófagos maduros son despegados de la placa de cultivo y lavados con DPBS hasta eliminar cualquier residuo de medio de cultivo. El pellet final es secado cuidadosamente con ayuda de un hisopo de algodón estéril. La fracción citoplasmática se obtuvo de este primer pellet el cual fue lisado utilizando el buffer EB (Hepes 10 mM, KCl 40 mM, MgCl₂ 3 mM, NP40 0.5 % y glicerol 5 %), adicionando un cocktail de inhibidores de proteasas y mezclándola vigorosamente durante 20 segundos y posteriormente se incubó a 4°C durante 10 min, realizando 3 ciclos de estos últimos pasos antes de centrifugar a 4°C durante 20 minutos a 14,000 rpm. Del proceso final se obtiene la fracción de proteínas citoplasmáticas presentes en el sobrenadante y un pellet con la fracción de proteínas nucleares. Estas dos fracciones son separadas cuidadosamente con una pipeta y el pellet es secado cuidadosamente

con ayuda de un hisopo estéril para finalmente lisado un SDS al 5% o con el Buffer de Lisis Nuclear (Tris-HCl pH 7.6 20mM, NaCl 100 mM, NP-40 1%, EDTA 5mM, Inhibidor de proteasas y fosfatasa 1X) según el propósito final de los extractos nucleares ya sea WB o Ensayos de EMSA respectivamente. Las proteínas totales se obtuvieron lisando directamente con SDS al 5% a los macrófagos maduros después de recolectarlos y realizar los lavados correspondientes con DPBS.

Ensayos de Inmunoprecipitación

Con los extractos nucleares y citoplásmicos de macrófagos M1 y M2 se realizaron ensayos de inmunoprecipitación. En primer lugar cada muestra fue pre-aclarada utilizando 30 μ L de proteína G acoplada a agarosa (Invitrogen) y la mezcla fue incubada durante 2 h a 4°C en agitación. Una vez transcurrido el tiempo, las muestras fueron centrifugadas a 4°C durante 20 minutos a 14,000 rpm. Transcurrido el tiempo se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo con cuidado de no absorber las perlas de proteína G, y se agregaron 3 μ g del anticuerpo anti-AhR (Thermo Scientific) por cada tubo. Esta mezcla se incubó en agitación durante toda la noche a 4°C. Después de la incubación se agregaron 60 μ L de proteína G-agarosa a cada muestra y fueron incubadas 1 h a 4°C en rotación. Los productos finales de todo el proceso fueron lavados con buffer de lisis (PBS-NP40 1%) 3 veces centrifugando a 14000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Los precipitados fueron resuspendidos en 25 μ L de buffer de carga no reductor (sin β -mercaptoetanol), se hirvieron durante 5 min y fueron sometidos a electroforesis (SDS-PAGE).

Ensayos de western blot

Las proteínas obtenidas de los diferentes procedimientos experimentales se resolvieron en geles de SDS-PAGE al 12% bajo condiciones reductoras o no reductoras según fuera requerido. Una vez resueltas las proteínas fueron transferidas a membranas PVDF (GE Healthcare). Las membranas fueron bloqueadas con TBS-T (TBS 0.1% Tween 20) y leche en polvo al 5%, lavadas con TBS-T, e incubadas durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios específicos para las proteínas candidatas a participar en la regulación de la IL-10, los cuales fueron diluidos en TBS-T con BSA al 1%. Posteriormente, las membranas fueron lavadas con TBS-T e incubadas con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa (HRP) (Dako). La reacción se reveló mediante el sistema de quimioluminiscencia Immun-StarTM (BioRad Laboratories).

Ensayos de EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) y de super-retardamiento.

Se diseñaron 4 diferentes oligonucleótidos con base en la secuencia del promotor de la IL-10 humana: IL-10 (2)5' 5'-TGTGACCTAGGAACACGCGAATGAGAACCC-3', IL-10 (2) 5'-GGGTTCTCATTTCGCGTGTTCCTAGGTCACA-3', IL10 (4)5' 5'-CAGTCTAAACTGGAATGGCAGGCAAAGCCC-3', e IL-10 (4)3' 5'-GGGCTTTGCCTGCCATTCCAGTTTAGACTG-3'. Estas secuencias fueron elegidas por la presencia de sitios consenso para la unión del AHR. Los oligonucleótidos fueron hibridados y marcados radioactivamente con [g-32]dATP utilizando la enzima T4 Polynucleotide Kinase (Cat. EK0031). Las sondas marcadas se incubaron con extractos nucleares Mφ M1 o M2 en condiciones basales o estimulados con LPS durante 2 h previas a su recolección. Una vez identificada la formación de complejos en los diferentes segmentos evaluados, se realizaron ensayos de super-retardamiento utilizando anticuerpos α -AhR, y α -ARNT para confirmar la unión específica de estas moléculas al promotor de la IL-10.

Ensayos de RNA interferente

Para evaluar el efecto de la ausencia del AHR en la síntesis de la IL-10 se realizaron ensayos de RNA interferente para eliminar o disminuir la presencia de esta molécula. Utilizando macrófagos M1 y M2 de 7 días de cultivo, se utilizó el reactivo de nucleofección HiPerFect *Transfection Reagent* (Quiagen) y un siRNA dirigido contra el gen del AHR (Ambion) o un siRNA control, esta mezcla fue incubada en placas de 12 pozos durante 6 hrs con medio RPMI 1640 sin suero fetal bovino, en un volumen total de 400 μ L, posteriormente se llevó final de 1200 μ L con medio RPMI suplementado y se incubó durante 24-48 hrs. Mediante qRT-PCR se evaluaron los niveles de expresión del AHR y la il-10 (TaqMan). Como control se utilizó una sonda para el gen TBP.

Neutralización de AhR

En los ensayos para neutralizar a AhR las células se cultivaron en presencia del antagonista químico α -NF (5 μ M), el cual fue añadido durante todo el cultivo los días 0, 2 y 4. Como control del experimento las células fueron cultivadas sólo con vehículo (DMSO, 0.1% v/v). Las células

cultivadas durante 6 días bajo estas condiciones fueron estimuladas 2 hrs previas a su recolección con LPS de *Escherichia coli* O111:B4 (Sigma-Aldrich, 100 ng/ml). Los MΦ recolectados a los 6 días de diferenciación, fueron tratados como se describe en seguida para los ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP).

Ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina

Mediante ensayos de ChIP se evaluó la unión del AHR presente en los MΦ M1 y M2 al promotor de la IL-10. Los MΦ cultivados en presencia o ausencia de LPS durante 1 hr previa a la recolección de los de cultivo, fueron fijados con formaldehído y lisados para obtener la fracción nuclear. El DNA se fraccionó mediante sonicación para obtener segmentos de entre 200-500 pb. El producto obtenido se incubó con un Ab anti-AhR, o bien un Ab control. Los inmunocomplejos formados fueron precipitados con proteína A-agarosa acoplada a perlas magnéticas. El DNA purificado a partir de esta técnica se analizó por PCR de punto final utilizando oligonucleótidos que amplifican probables sitios de unión para el AHR : Forward 5' - CCAATTATTTCTCAATCCCATTGT-3' y reverse 5'-AGGATGGGCTACCTCTCTTAGAAT-3'; forward 5'- GCTGTAATGCA GAAGTTCATGTTC-3' y reverse 5'- TCTTCATTCATTA AAAAGCCACAA-3'; forward 5'-GTGCCTGAGAATCCTAATGAAATC-3' y reverse 5'-CTTGCTAACTTAGGCAGT CACCTT-3', y por último forward: 5'-TGTTCCCTCCCAGTTACAGTCTAAA-3' y reverse: 5'-AGTGACATCAGGACTTCTTCAGAT-3'). Se consideraron estas secuencias porque ha sido previamente reportado en la literatura que algunos de los factores de transcripción que se unen a ellas también son capaces de interactuar con AhR (NF-κB, Sp1, c-maf) **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia. ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia. ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..**

RESULTADOS

Expresión de la IL-10 en macrófagos M1 y M2 en ausencia de la expresión o actividad de AhR.

Para la evaluación de los niveles de expresión de la IL-10 en los MΦ M1 y M2 en un sistema en el cual la expresión o función del AHR estuviera inhibida o disminuida se realizaron ensayos de transfección por lipofección. En la figura # se puede observar que la utilización de un RNA interferente específico para AHR en MΦ maduros da lugar a una disminución tanto a nivel proteico como a nivel de RNA. Esto evaluado mediante Western Blot y qRT-PCR respectivamente.

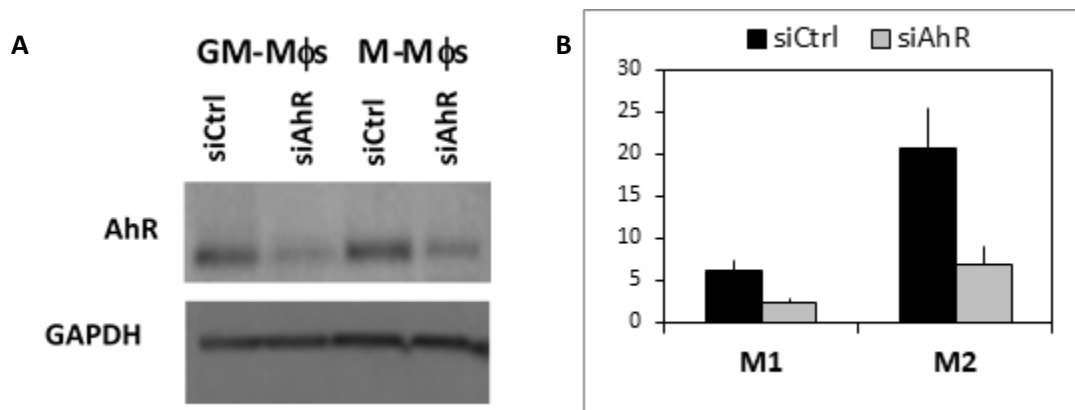


Fig. 18.-Expresión del AHR en presencia de un siRNA específico en MΦ M1 y M2.

Mediante la Utilización de un RNA interferente dirigido contra el AHR se evaluó la expresión de los niveles de (A) proteína y de (B) RNA en condiciones basales tras 7 de días de cultivo. Como control se utilizó un siRNA control (siCtrl) el cual no tiene similitud alguna con genes humanos

Mientras que la proteína se expresa de manera similar en ambas poblaciones y posterior a la inserción del siAHR los niveles de esta se ve afectados negativamente en ambas poblaciones por igual, a nivel de RNA podemos observar claramente que los macrófagos M2 expresan mayores niveles basales que los MΦ M1, sin embargo, la presencia del RNA interferente impacta de la misma manera sobre ambas poblaciones.

Una vez confirmado el efecto del RNA interferente de AHR sobre ambos tipos de macrófagos, se realizó la evaluación de los niveles de la IL-10 en presencia o ausencia de nuestra proteína de interés y adicionalmente en presencia o ausencia de LPS a tiempos tempranos (2 hrs) y tiempos tardíos (12 hrs).

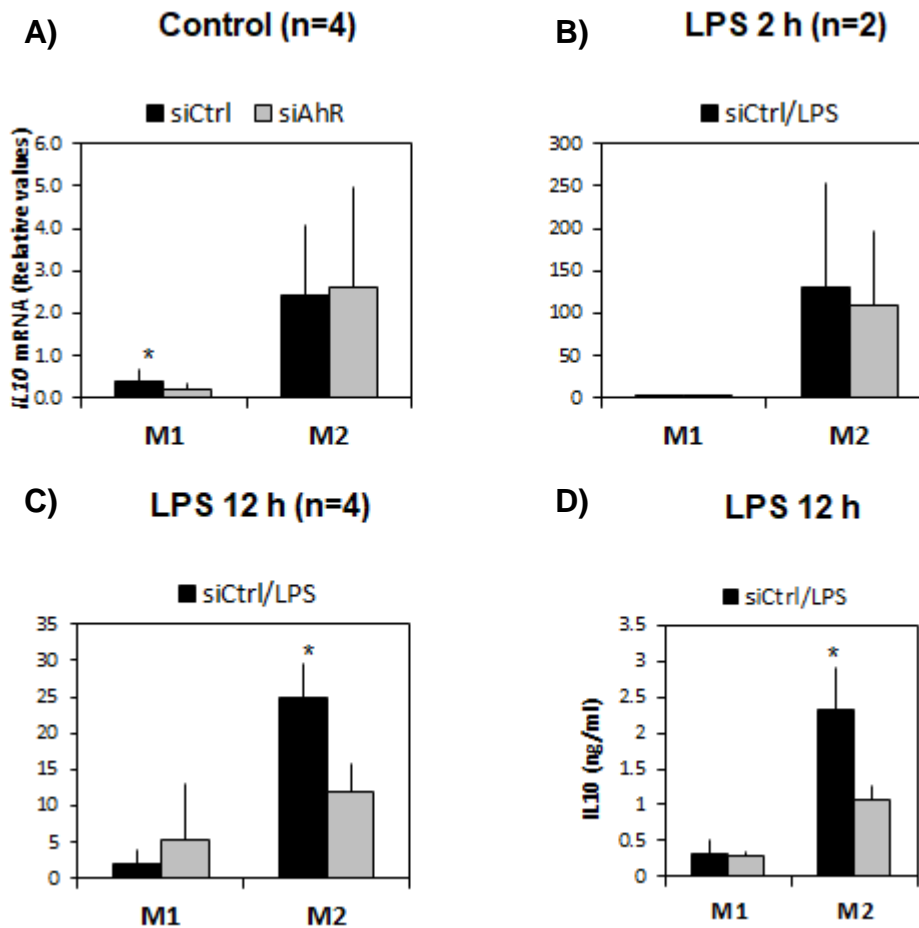


Fig 19.- Interleucina 10 en MΦ M1 y M2 en presencia o ausencia del AHR. Se muestran los niveles del RNA de la IL-10 en MΦ M1 y M2 en presencia (siCtrl) o ausencia (siAHR) del AHR en condiciones basales A), estimuladas con LPS durante 2 hrs B), o durante 12 hrs C). También se muestran los niveles de proteicos de AHR en presencia o ausencia de AHR en células estimuladas durante 12 hrs con LPS. Las barras negras representan las condiciones donde las células fueron transfectadas con un siCtrl. Las barras grises indican que las células fueron transfectadas con siAHR

La fig. 19 muestra el comportamiento de la expresión de la IL-10 en ambos tipos de macrófagos a nivel de RNA mensajero evaluados mediante qRT-PCR y a nivel de

proteína mediante ensayos de ELISA; a nivel de RNA observamos que la expresión de IL-10 no se afecta o modifica de manera significativa en ninguno de los dos tipos de MΦ ya sea en ausencia del AHR en condiciones basales o estimuladas durante 2 hrs; para el caso de los MΦ M2 solo observamos un comportamiento relevante cuando el AHR no se encuentra presente en el sistema y además existe un estímulo con LPS durante 12 hrs. A nivel de proteína la expresión del AHR se observa una disminución significativa y similar a la observada a nivel de RNA en los MΦ M2 cuando el AHR no se encuentra presente en el sistema y los MΦ han sido estimulados con LPS durante 12. Esto podría sugerir que el AHR quizá no esté involucrado en el proceso inicial de la síntesis y expresión de la IL-10 en ambos tipos de MΦ en condiciones basales o durante condiciones con estímulos de corta duración, sin embargo, la participación del AHR podría ser fundamental para la expresión de esta citocina en condiciones en donde las células son estimuladas durante 12 hrs.

Interacción entre el AHR y el promotor de la IL-10 en los macrófagos M1 y M2

Intentando elucidar los mecanismos mediante el los cuales el AHR podría estar llevando a cabo la regulación de la interleucina 10 y con la ayuda de un programa informático (MatInspector) el cual sugiere probables sitios de unión para diferentes factores de transcripción en una secuencia determinada de DNA, se realizó el análisis del promotor de la interleucina en búsqueda de probables sitios en donde el AHR pudiera unirse y llevar a cabo la regulación de dicha interleucina.

Como resultado de dicho análisis se identificaron 2 probables sitios de unión para el factor de transcripción AHR en el promotor de la IL-10, uno en la región proximal a no más de 500pb rio arriba del sitio de inicio de la transcripción (TSS) y el otro en una región más distal del TSS a aproximadamente 1300 pb.

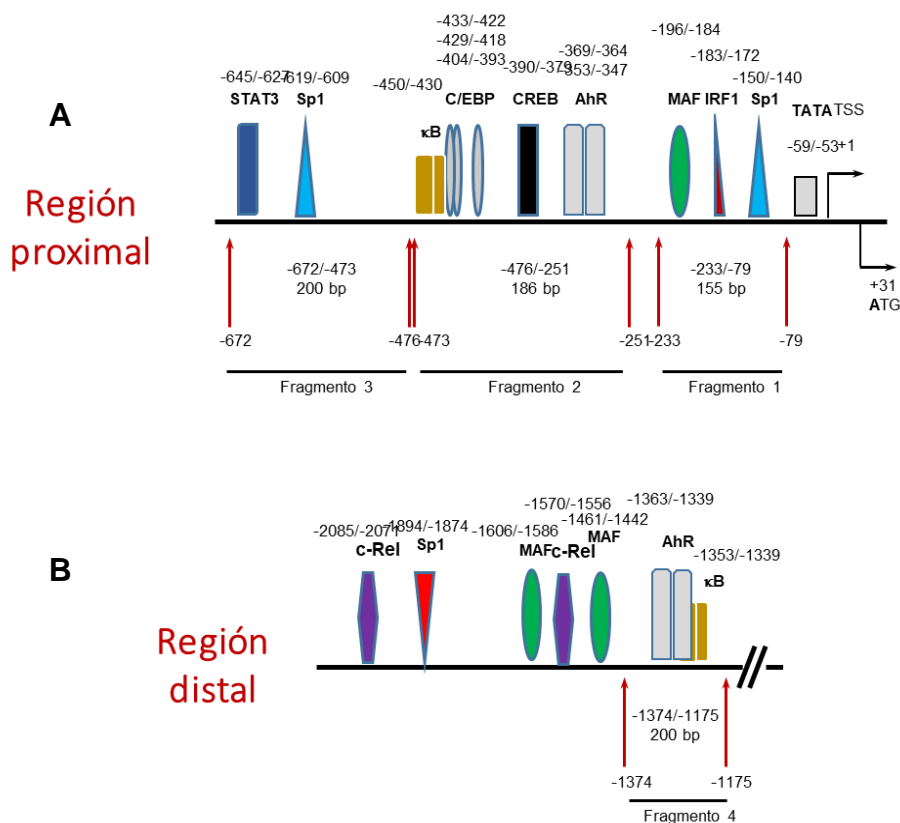


Figura 20.- Representación esquemática del promotor de la IL-10 y sus sitios de unión para diferentes factores de transcripción. Mediante un análisis in silico se identificaron posibles sitios de unión al promotor de la IL-10 humana. La región proximal abarca aproximadamente 700 pb rio arriba del TSS, mientras la región distal B) nos muestra los probables sitios de unión localizados de 1000 al 2000 pb rio arriba del TSS. Se muestran solo algunos sitios que incluyen factores de transcripción de interés para el trabajo en desarrollo.

Adicionalmente se identificaron sitios de unión de para otros factores de transcripción implicados en la regulación de la IL-10 y que adicionalmente se ha reportado su capacidad de interaccionar y formar dímeros con el AHR, entre ellos miembros de la Familia NF- κ B^{Error! No se encuentra el origen de la referencia.},^{Error! No se encuentra el origen de la referencia.}, STAT1^{Error! No se encuentra el origen de la referencia.}, SP1^{Error! No se encuentra el origen de la referencia.} y c-Maf^{Error! No se encuentra el origen de la referencia.}. También se consideraron sitios de unión para factores de transcripción que, aunque no existen reportes que los relaciones directamente con el AHR, si los hay sobre miembros de su familia participando junto al AHR como es el caso para los factores de transcripción Maf β y c-rel. Sitios de unión para factores de transcripción como C/EBP β y CREB que no cumplen con ninguna de las dos condiciones anteriores también fueron considerados por su participación en la síntesis de la IL-10 y su expresión diferencial entre M Φ M1 y M2.

Los 2 probables sitios de unión para el AHR mostraron características que los hicieron particularmente interesantes para su inclusión en el desarrollo de este trabajo, el sitio proximal al TSS se localizaba en la misma posición al sitio de unión reportado por Apetoh y colaboradores en 2010 sobre el promotor de la IL-10 para el AHR en células T, y el cual se comprobó que participaba de manera importante en la síntesis de dicha citocina^{Error! No se encuentra el origen de la referencia.}. El sitio de unión para AHR localizado en la región distal indicaba que esta secuencia compartía bases con una secuencia de unión para un factor de transcripción de la familia NF- κ B. Para este último caso existe un reporte en 2007 realizado por Vogel y colaboradores en donde se identifica un sitio de unión que comparte secuencias para la unión de los factores de transcripción AHR y RelB, a dicho sitio es capaz de unirse AHR al dimerizar con RelB^{Error! No se encuentra el origen de la referencia.}.

Con base en la localización de los probables sitios de unión para los diferentes factores de transcripción se diseñaron pares de oligonucleótidos que amplificaran fragmentos del promotor de la IL-10 que incluyeran o no un sitio de unión para el AHR. Como resultado

se generaron dos pares que amplifican probables sitios de unión para el AHR (Fragmento 2 y 4) y otros dos que no los incluyen (fragmento 1 y 3).

Como un primer acercamiento para determinar la funcionalidad de dichos fragmentos para reclutar factores de transcripción se realizaron ensayos de retardo o EMSAs (electrophoretic mobility shift assay) para determinar la capacidad de estos distintos fragmentos en la formación de complejos con proteínas nucleares presentes en nuestros MΦ. Los ensayos incluyeron extractos nucleares de MΦ M1 y M2 en condiciones basales o estimulados con LPS durante 30 o 60 minutos. Los extractos nucleares fueron incubados con las diferentes sondas del promotor de la IL-10 las cuales fueron amplificadas y marcadas radioactivamente a partir de los oligos anteriormente mencionados

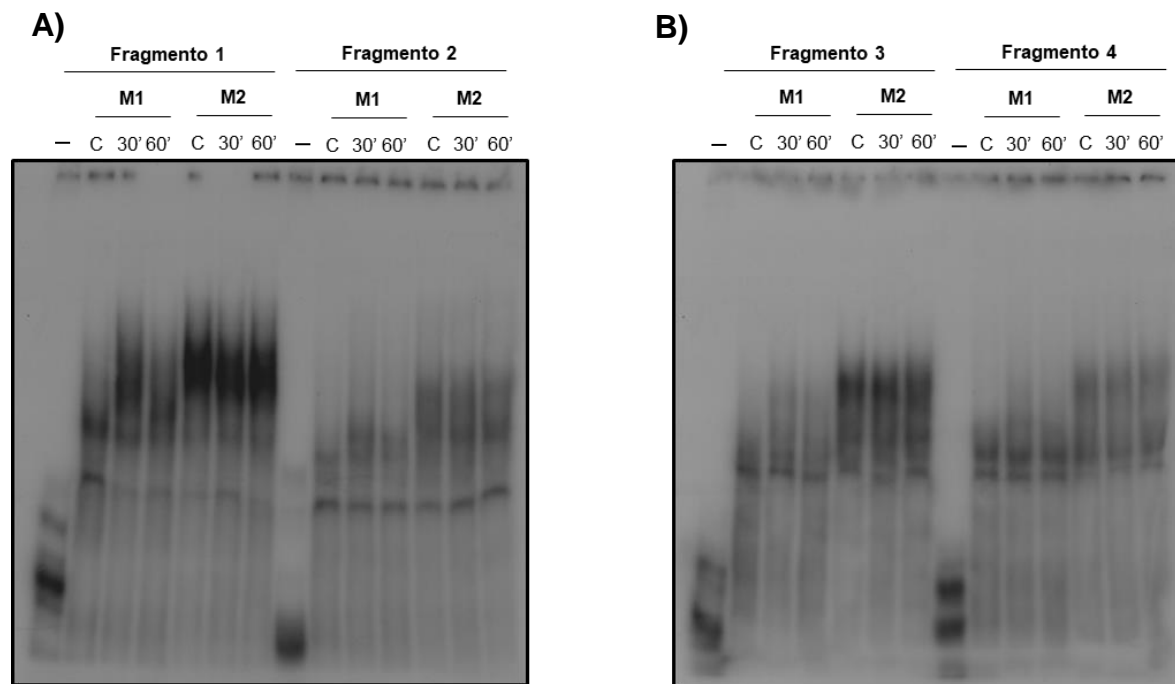


Figura 21.- Formación de complejos diferenciales en el promotor de la IL-10 entre MΦ M1 y M2. Se amplificaron y marcaron radiactivamente los 4 segmentos de interés del promotor de la IL-10 y fueron incubados cada uno de ellos con diferentes extractos nucleares de MΦ M1 o M2 los cuales fueron cultivados durante 6 días en ausencia de estímulos o en presencia de LPS durante 30 o 60 minutos. A) Sondas de los segmentos 1 y 2 marcadas radioactivamente incubadas con extractos nucleares de MΦ M1 y M2 en condiciones basales y estimuladas con LPS. B) Segmentos 3 y 4 incubados con extractos nucleares bajo las mismas condiciones antes mencionadas. -: Sonda libre, C: Control (extractos sin estímulos), 30': Extractos nucleares estimulados con LPS durante 30 minutos, 60': Extractos nucleares estimulados durante 60 minutos con LPS

Los extractos nucleares de los MΦ M1 muestran una formación de complejos diferencial entre las condiciones basales y las estimuladas con LPS. Se puede observar que en las condiciones basales se forma un complejo DNA-Proteína el cual es modificado a los 30 minutos de recibir un estímulo con LPS, dicho complejo es aparentemente de una complejidad mayor al formado inicialmente en ausencia de LPS. Posteriormente pasados 60 minutos de estímulo con LPS se lleva a cabo una nueva modificación del complejo DNA-Proteína, siendo este último diferente a los 2 complejos formados en las condiciones previas. Dando lugar a 3 complejos DNA-Proteína diferentes dependiendo de la condición analizada y este comportamiento se mantiene a su vez en cada fragmento evaluado.

Cuando las sondas marcadas radioactivamente son incubadas en presencia de extractos nucleares de MΦ M2 los complejos formados son diferentes a los formados cuando las sondas son incubadas en presencia de extractos nucleares de MΦ M1. Además estos complejos no se modifican entre las condiciones basales y aquellas en las que las células son estimuladas con LPS ya sea durante 30 o 60 minutos, sin embargo en los complejos formados en cada uno de los segmentos del promotor de la IL-10 podrían estar participando diferentes proteínas, ya que si bien estos complejos no son modificados entre condiciones, el tamaño de los complejos entre segmentos parece no ser el mismo.

El receptor de Aril Hidrocarburos interactúa con el promotor de la IL-10 de manera diferencial entre MΦ M1 y M2.

Una vez comprobada la habilidad de los 4 fragmentos del promotor de la IL-10 para unir o reclutar factores de transcripción *In Vitro*, se procedió a evaluar si en condiciones menos artificiales estos mismos segmentos son capaces de reclutar factores de transcripción, específicamente el AHR. Mediante ensayos de Inmunoprecipitación de la Cromatina (ChIP) evaluamos la posible interacción que pudiera haber entre el AHR y dichos segmentos.

Partiendo de MΦ M1 y M2 maduros de 7 días de cultivo en condiciones basales o estimulados con LPS durante 2 hrs, se evaluó la capacidad del AHR para unirse en los diferentes segmentos del promotor de la IL-10. A partir de la fracción nuclear se realizaron los ensayos de Inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo específico dirigido contra el AHR y como ctrl de isotipo una IgG de ratón. Posterior a la Inmunoprecipitación se realizó la amplificación de los diferentes segmentos del promotor de la IL-10.

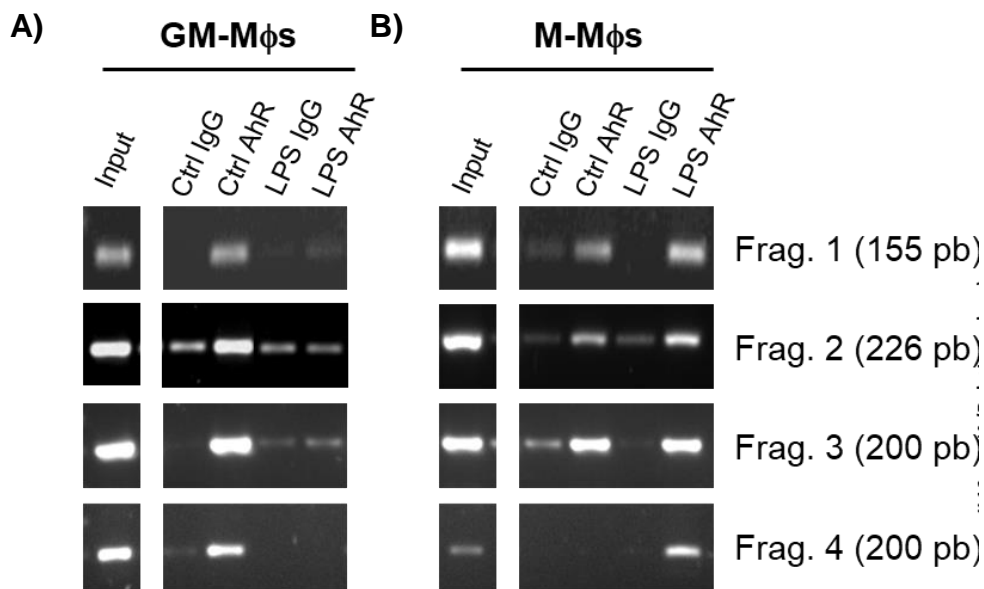


Figura 22.- El AHR interactúa de manera diferencial con el promotor de la IL-10 en MΦ M1 y M2. Ensayos de Inmunoprecipitación de la cromatina realizados a MΦ M1 y M2 en condiciones basales (Ctrl) o estimulados con LPS durante 2 hrs. A partir de los productos finales se evaluó la amplificación de los segmentos 1-4 del promotor de la IL-10. Como control positivo se realizó la amplificación de los mismos segmentos a los extractos nucleares previo al ChIP(Input). Ctrl IgG: Anticuerpo control con extractos en condiciones basales, Ctrl AhR: Inmunoprecipitación con anticuerpo α -AHR en extractos nucleares en condiciones basales, LPS IgG: Anticuerpo control con extractos estimulados con LPS durante 2 hrs, LPS AhR: Inmunoprecipitación con anticuerpo α -AHR en extractos nucleares estimulados con LPS.

Los resultados de la Figura 22 A, muestran que el AHR se une de manera constitutiva en los 4 fragmentos evaluados del promotor de la IL-10 en los MΦ M1, y una vez transcurridas las 2 hrs de estimulación con LPS las interacciones disminuyen de manera significativa como en el caso de los segmentos 1, 2 y 3; o desaparecen totalmente como sucede en el caso del segmento 4.

La interacción entre el AHR y los 4 segmentos del promotor de la IL-10 en los MΦ M2 mostró un comportamiento similar a lo observado en los MΦ M1, en donde para los segmentos 1, 2 y 3 se observa una unión constitutiva del AHR en condiciones basales. Sin embargo, en el segmento 4 no existe interacción alguna entre este y el AHR bajo esta condición. Las interacciones observadas en los segmentos 1, 2 y 3 se mantienen después de la estimulación durante 2 hrs con LPS, e interesadamente el estímulo con LPS favorece la interacción entre el AHR y el segmento 4 de la IL-10 en los MΦ M2.

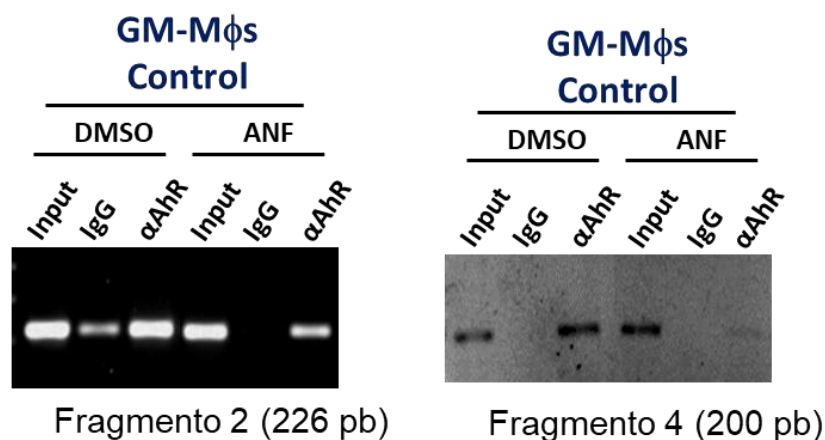


Figura 23.- La unión del AHR al promotor de la IL-10 disminuye en presencia de la α -NF. CHIP de MΦ M1 y M2 en presencia de ausencia de α NF, antagonista químico del AHR. MΦ maduros fueron cultivados durante todo el cultivo en presencia de α NF o DMSO, y los productos finales de CHIP fueron amplificados utilizando los primers de los segmentos 2 y 4 del promotor de la IL.10 humana. Input: extractos nucleares previo al CHIP, IgG: Ctrl de Isotipo, α AHR: Inmunoprecipitación con anticuerpo anti AHR

Resultados preliminares utilizando un antagonista químico del AHR como la α -Naftoflavona, y evaluando los segmentos 2 y 4 de la IL-10 en M Φ M1 indican que la presencia de dicho antagonista disminuye o inhibe la unión del AHR a estos segmentos en condiciones basales. A reserva de que es un primer acercamiento y que se deben realizar sus respectivas comprobaciones, este resultado nos sugiere cierta especificidad de nuestro sistema al disminuir la unión del AHR al promotor de la IL-10 siguiendo un comportamiento esperado al utilizar dicho antagonista.

Disponibilidad de factores de transcripción en M Φ M1 y M2 que podrían participar en la regulación de la IL-10.

Previo a la evaluación de interacciones entre el AHR y los factores de transcripción que podrían participar en conjunto para regular la síntesis de la IL-10 se evaluó disponibilidad de estos en ambos tipos de macrófagos.

Se utilizaron ambos tipos M Φ maduros en condiciones basales y estimulados con LPS durante 2 y 8 hrs en extractos totales, así como extractos nucleares y citoplasmáticos. Mientras que los extractos totales no brindan un panorama general de la disponibilidad de estos, los extractos nucleares y citoplasmáticos nos dan un indicio de aquellos que podrían encontrarse funcionalmente activos, esto en el entendido de que realizan su función en el compartimento nuclear de la célula.

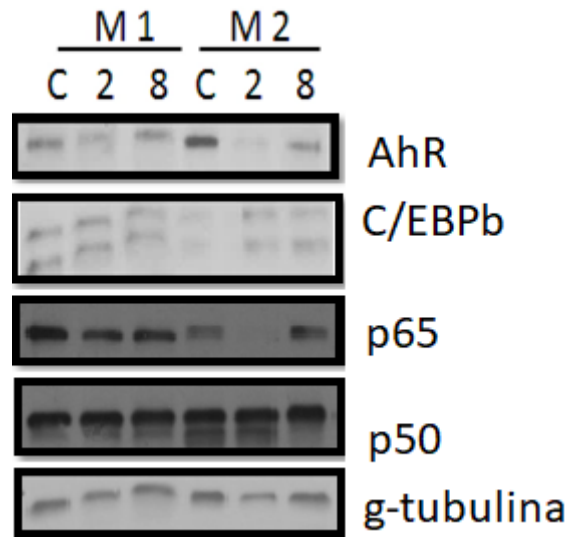


Ilustración 24.- Los Factores de transcripción se expresan diferencialmente entre MΦ M1 y M2 en condiciones basales. Extractos totales de MΦ fueron lisados con SDS y fueron resultados mediante WB en geles de acrilamida al 10%. Se evaluó la expresión de diferentes factores de transcripción en condiciones basales (C) o en presencia de LPS durante 2 hrs (2) u 8 hrs(8). Se evaluaron los miembros de la familia NF-κB p50 y p65, así como el factor de transcripción C/EBPβ.

La figura 24 nos muestra que en los MΦ M1 sus extractos totales indican que factores como C/EBPb, p65 y p50 se expresan de manera constitutiva en condiciones basales y que al ser estimuladas con LPS durante 2 y 8 hrs no modifica significativamente la expresión de C/EBPb y p50, mientras que el factor de transcripción p65 se observa ligeramente disminuido en ambas condiciones en las que se adiciona LPS. EL factor de transcripción AHR muestra una ligera disminución en presencia de LPS a las 2 horas y posteriormente un ligero incremento en su expresión tras 8 hrs de estímulo, sin embargo, en esta última condición el nivel de expresión se mantiene ligeramente por debajo del nivel de la condición basal.

Los MΦ M2 por otro lado muestran una expresión constitutiva en condiciones para los factores evaluados, aunque a diferentes grados de intensidad, en donde factores de transcripción como p50 y AHR muestran una mayor expresión comparados con los niveles observados para p65 y sobre todo para C/EBPb en el cual su expresión es apenas detectable. Las condiciones con LPS promueven una serie de cambios interesantes para los factores de transcripción AHR, p65 y C/EBPb, no así para p50 en donde su expresión no ve afectada. El AHR al igual que en los MΦ M1 presenta una disminución de su

expresión a las 2 hrs y posteriormente se observa un incremento de esta el cual no llega a compararse a la magnitud observada en la condición control. Para el caso del factor de transcripción C/EBPb la estimulación con LPS induce un incremento de la expresión en ambas condiciones y en una magnitud similar. El Factor de transcripción p65 muestra una baja o nula expresión en las primeras 2 hrs de estímulo y tras 8 hrs en presencia de LPS estas células aumentan la expresión de p65, incluso ligeramente por encima de la condición basal.

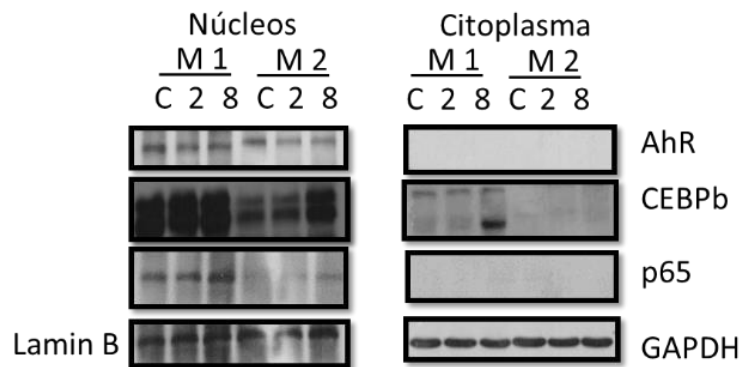


Ilustración 25. Presencia de factores de transcripción en los compartimentos nucleares y citoplasmicos en MΦ humanos. Extractos nucleares y citoplasmicos de ambos tipos de MΦ cultivados durante 6 días en condiciones basales (C) o en presencia de LPS durante 2 y 8 horas fueron sometidos a WB y se analizó la presencia de factores de transcripcion como AhR, C/EBPb y p65. Lmin B fue utilizado como control de carga para los extractos nucleares, mientras GAPDH representa el control de carga de la region citoplasmica.

En los extractos citoplasmáticos no se detecta expresión de los factores de transcripción AHR y p65 en ambos tipos celulares. A nivel nuclear el AHR se encuentra expresado de manera importante en ambos tipos celulares, mientras que p65 en los MΦ M1 muestra una expresión similar entre la condición basal y la presencia de LPS durante 2 hrs, y al ser estimuladas con LPS durante 8 hrs muestran una expresión ligeramente mayor a las 2 condiciones anteriores. En los MΦ M2 p65 se observa débilmente expresado en las condiciones basales y con LPS de 2 hrs, y su expresión en el núcleo se ve favorecida cuando estos MΦ son estimulados con LPS durante 8hrs.

El factor de transcripción C/EBP β en extractos citoplasmáticos no es detectable en los M Φ M2 mientras que en los macrófagos M1 su expresión es muy débil. Sin embargo, a nivel nuclear los M Φ M1 muestran una alta expresión en las tres condiciones evaluadas sin mostrar cambio significativo entre condición, no así para los macrófagos M2 en donde su expresión muestra niveles similares en las condiciones basales y de LPS de 2 hrs, pero se observa una inducción significativa en su expresión tras 8 hrs de estímulo. Sin embargo, dicha expresión sigue siendo menor a la de los M Φ M1 en cualquiera de sus condiciones evaluadas.

Formación de complejos entre el AhR y algunos factores de transcripción que se unen al promotor de IL-10 en los macrófagos M1 y M2

Con el propósito de elucidar si la regulación de AHR en la síntesis de la IL-10 podría estar sucediendo de manera autónoma o en cooperación con otro factor de transcripción, se realizaron ensayos de Co-Inmunoprecipitación utilizando extractos nucleares y citoplasmáticos de M Φ M1 y M2 en condiciones basales o estimulados con LPS. Los extractos fueron incubados con un anticuerpo α -AHR overnight y posteriormente mediante WB se evaluaron los posibles factores candidatos a formar interacciones con el AHR.

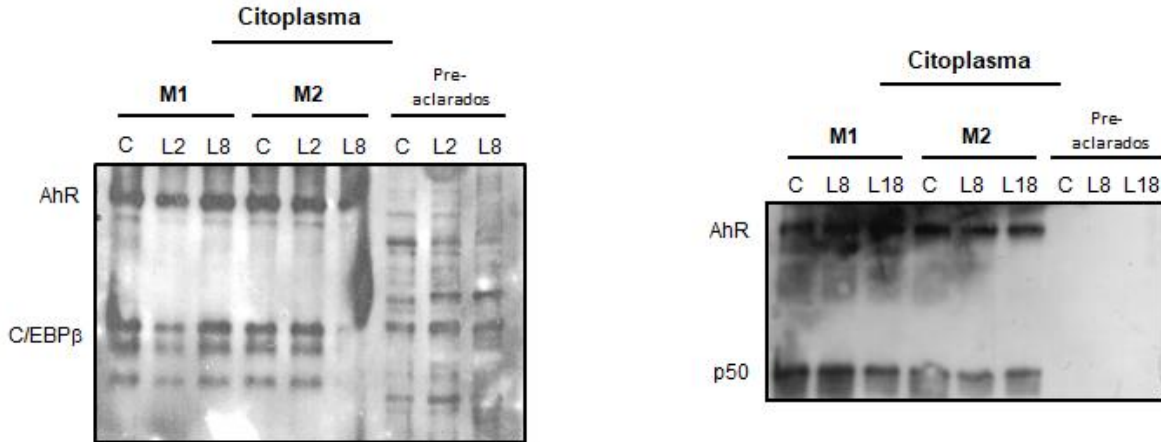


Ilustración 26.- Interacciones físicas entre el AHR y otros factores de transcripción. Se obtuvieron las fracciones citoplasmáticas de MΦ M1 y M2 en condiciones basales y en presencia de LPS de un pool de 3 donantes y se evaluó la capacidad del AHR de unirse a distintos factores de transcripción. Los extractos fueron preaclarados y e inmunoprecipitados con un anticuerpo α -AHR. Los productos de la inmunoprecipitación fueron resueltos mediante WB utilizando un gel de acrilamida al 10%. C: MΦ en condiciones basales, L2: MΦ estimulados con LPS durante 2 hrs, L8: MΦ estimulados con LPS durante 8 hrs.

La condición en donde las células fueron estimuladas durante 2 hrs con LPS, se realizó con la intención de poder integrar los resultados obtenidos en estas interacciones físicas con las que pudieran estar sucediendo en los ensayos de ChIP. Mientras que la condición de 8 hrs se integró como un control interno basado en el tiempo de menor estimulación con el cual ya se habían evaluado algunas de las interacciones entre el AHR y otros factores de transcripción.

A partir los factores evaluados se observó que el factor de transcripción C/EBPb tiene la capacidad de interactuar con el AHR tanto en MΦ M1 como M2, observando que en ambos tipos de MΦ existe una interacción importante desde la condición basal. Tomando en cuenta que estos ensayos no aportan una información cuantitativa, podríamos sugerir una posible modificación en la intensidad de estas interacciones formadas, en donde estas podrían verse disminuida durante las primeras 2 horas de estímulo con LPS y 8 horas posteriores al estímulo esta interacción volvería a incrementarse a los mismos niveles observados en la condición basal, esto únicamente para el caso de los MΦ M1, mientras que para los MΦ M2 se observó que la interacción entre el AHR y C/EBP únicamente se da en condiciones basales y durante las primeras horas de estímulo con LPS y dicha interacción desaparece a las 8 hrs en presencia de LPS.

DISCUSION

Originalmente el AHR fue descrito como factor de transcripción mediador de procesos bioquímicos en respuesta a contaminantes ambientales y otros compuestos químicos relacionados estructuralmente^{8,5,100}. Mas adelante, con el descubrimiento de una gran variedad de ligandos endógenos¹, la activación de AhR, dada su localización en el núcleo y su unión a un gran número de genes no relacionados con procesos de detoxificación en ausencia de un ligando exógenos^{101,102}, así como el desarrollo y utilización de ratones deficientes en esta proteína, se ha reconocido que el AhR está implicado en numerosos procesos bioquímicos y fisiológicos así como en el desarrollo adecuado del organismo¹⁰⁻¹². Dada la implicación de AHR en todos los procesos antes mencionados, así como su expresión a nivel celular y tisular, además de la existencia de proteínas análogas en otros organismos tanto vertebrados e invertebrados, y las funciones que estas desempeñan en cada uno de los organismos en los que se encuentran se sugiere que el metabolismo de xenobióticos, si bien es una de las funciones más importantes del AhR, es probable que esta capacidad haya sido adquirida como una necesidad evolutiva^{100,103}.

Schmidt *et al.* en 1996¹² demostraron la importancia de AHR en la homeostasis y mantenimiento de la hematopoyesis en ratones carentes de esta proteína. En 2006, Frericks *et al.*¹⁰², mediante ensayos de microarreglos en células del sistema inmune de ratón, observaron que la activación de AhR inducida por TCDD desencadena la expresión de diversos genes blancos en linfocitos y DC, los cuales se expresan de manera diferencial dependiendo del tipo celular y del estadio en el cual se encuentren. Sin embargo los genes blanco sobre los cuales actúa AhR no solo dependen del tipo celular, ya que el ligando utilizado también juega un papel importante con respecto a los genes blancos de AhR^{1,34}.

Ademas de los linfocitos y las células dendríticas otras células del sistema inmune que expresan altos niveles del AHR pero que no han sido estudiadas con la misma profundidad son los MΦ humanos, sobre las que se ha descrito que en ratón éste ejerce funciones diferenciales. Los MΦ son capaces de adquirir funcionalidad y características fenotípicas de acuerdo al microambiente que las rodea, con base en estas características han sido clasificadas en dos grupos principales, MΦ (M1) pro- o (M2) anti-inflamatorios, sin

olvidar que existe una amplia variedad de poblaciones entre estos dos extremos de la clasificación¹⁰⁴. *In vitro* estas poblaciones pueden generarse en presencia de GM-CSF (MΦ M1) y M-CSF (MΦ M2).

Existen datos concretos de la participación de AHR en la regulación de la expresión de diversas citocinas, como IL-6, IL-8, TNF, IL-10, entre otras ^{40,42,44}. Datos publicados por Apetoh *et. al.*2010⁸⁰ y Gandhi *et. al.* 2010⁷⁹ es la información publicada más destacada para la elucidación sobre el mecanismo mediante el cual AHR regula la expresión de la IL-10. En el presente trabajo, tratamos de elucidar como el AHR regula la expresión de la IL-10 en MΦ humanos, para ello en primer lugar buscamos desarrollar un sistema libre de AHR mediante la utilización de un RNA interferente específico, inhibimos la expresión de la IL-10 en MΦ M1 y M2 humanos en presencia y ausencia del AHR, observamos que tanto a nivel de proteína como de RNA mensajero obtuvimos una disminución significativa de AHR en ambas poblaciones (Figura 18). Como dato interesante se destacan los niveles superiores de AHR a nivel de RNA entre MΦ M1 y M2, este dato es consistente con lo observado en estudios previos realizados en el laboratorio en donde a nivel de RNA mensajero siempre, o casi siempre, se ha observado una expresión mayor en los MΦ M2 con respecto a los MΦ M1 (Datos no mostrados).

Estudios recientes han identificado los efectos de la señalización de AHR sobre múltiples aspectos de la respuesta del sistema inmune, incluyendo la regulación de la IL-10. (Apetoh *et al*, Wagage 2014) Del mismo modo como se ha descrito para células del sistema inmune como linfocitos T o células NK, en nuestro trabajo demostramos que la ausencia de AHR en los MΦ humanos afecta de manera importante la expresión de la IL-10 (figura 19), Sin embargo, la participación de AHR parece ser dependiente del tipo celular, así como de la ausencia o presencia del estímulo con LPS. Observamos que en estado basal los MΦ M1 experimentan una disminución significativa del mRNA de IL-10 no así para los MΦ M2. Esto podría deberse a que si bien AHR es un factor de transcripción con una implicación importante en la síntesis de la IL-10, esta podría estar regulada en estado basal por otras proteínas dependiendo del estado y tipo celular, por ejemplo, Liu *et al.*, en 2003¹⁰⁶ demostraron en MΦ de ratón que la IL-10 podía ser regulada por distintos factores de transcripción dependiendo de la presencia o ausencia de LPS. Reportando que en estado basal el factor de transcripción SP1 es el principal

responsable de orquestar la expresión de la IL-10, mientras que en presencia de LPS la expresión de esta era dirigida en conjunto con C/EBP β y δ . Es probable que un mecanismo similar pudiera estar ocurriendo en los M Φ humanos, ya que en células estimuladas con LPS durante 2 horas, la ausencia de AHR no fue determinante en la síntesis de mRNA de la IL-10 en ninguno de los tipos de M Φ . Sin embargo, al ser estimuladas durante 12 hrs tanto los niveles de mRNA como de proteína, en ausencia de AHR, se vieron afectados de manera significativa únicamente en los M Φ M2. (Figura 19D).

El análisis del promotor de la IL-10 humana y la identificación de posibles sitios de unión para AHR, así como para otros factores conocidos por su importante participación en la regulación de esta citocina, se incrementó el panorama de opciones para intentar elucidar el posible mecanismo que AHR podría estar ejerciendo en ambos tipos de M Φ (Figura 20). Con dicho esquema podemos reforzar la idea de que factores de transcripción como SP1 y C/EBP β , al igual que lo observado en los M Φ de ratón, podrían estar regulando la IL-10 en diferentes situaciones tal como lo propone Liu *et al.*

Los ensayos de retardo (EMSA) nos muestran que los diferentes segmentos de la IL-10 son capaces de interaccionar o formar complejos proteicos diferenciales dependiendo del tipo celular evaluado, así como de la presencia o ausencia de LPS. A pesar de que los tiempos evaluados en presencia de LPS no son los mismos que los evaluados en los ensayos de mRNA interferente, la modificación de los complejos en presencia de este estímulo, podrían sugerir que estos complejos diferenciales podrían ser los responsables de la regulación en los diferentes estados de estimulación al menos para los M Φ M1. Cabe destacar que en las 3 condiciones celulares de los M Φ M1 evaluadas en cada uno de los segmentos se observa que los complejos están formados por diferentes componentes y que la regulación de la IL-10 en estos M Φ pudiera estar dada por diversos factores de transcripción dependiendo del tiempo del estímulo.

Para el caso de los M Φ M2 probablemente los tiempos evaluados no sean los ideales para observar una modificación de los complejos que participan en la regulación de la IL-10, sin embargo, a pesar de no observar tal comportamiento como en los M Φ M1, es evidente que existe la formación de complejos en todos los segmentos y condiciones

celulares evaluadas, y que estos son diferentes a los observados en los MΦ M1. Cabe destacar que la estimulación con LPS a tiempos cortos en los ensayos de RNA interferente no mostraron una implicación significativa de AHR en la regulación de la IL-10 en ambos tipos de MΦ, y el único dato significativo fue observado cuando la estimulación se produjo durante 12 hrs, y solo para los MΦ M2.

Los ensayos de Inmunoprecipitación de la Cromatina demostraron que en condiciones no artificiales AHR es capaz de interactuar con los distintos segmentos del promotor de la IL-10. Hasta el momento habíamos descrito que los segmentos evaluados eran capaces de reclutar proteínas y formar complejos diferenciales, pero se desconocía la identidad de las proteínas que conformaban cada uno de esos segmentos. Con estos ensayos podemos deducir que AHR se encuentra presente entre las proteínas que componen los distintos complejos.

Dados los distintos mecanismos mediante los cuales AHR es capaz de regular la gran variedad de genes en los que se ha demostrado su participación, no podemos asegurar que la interacción entre AHR y los 4 segmentos de cromatina evaluados sea de manera directa, o si esta interacción tenga la intervención de otra proteína y que la precipitación de estos segmentos se haya dado de manera indirecta. Para el caso de los segmentos 2 y 4, los cuales contienen secuencias consenso para la unión de AHR, es probable que la interacción observada sea de manera directa, sin embargo, los segmentos amplificadas incluyen secuencias consenso para otros factores de transcripción a los cuales AHR podría unirse y así, a pesar de no unirse a su secuencia consenso provocar la precipitación y amplificación de dicho segmento.

Tomando en cuenta lo anteriormente descrito y con la reserva correspondiente, pudiéramos señalar que lo observado en los MΦ M1 a nivel de mRNA de la IL-10, donde AHR está implicado de manera importante en condiciones basales, se deba a la interacción constitutiva observada en los 4 segmentos evaluados también condiciones basales. De la misma manera, en presencia de LPS durante 2 hrs, la desaparición de las interacciones previamente observadas coincide con lo observado a nivel mRNA,

sugiriendo que AHR no es un factor determinante en los MΦ M1 para la síntesis de IL-10 cuando estos son estimulados con LPS, al menos durante el tiempo evaluado.

Interesantemente en los MΦ M2 también se observan interacciones constitutivas en los primeros 3 segmentos del promotor de la IL-10, las cuales no se modifican en presencia de LPS. Mas interesante aun es el segmento 4, ya que en estado basal no se observa una interacción entre este y AHR, y una vez que las células son estimuladas durante 2 hrs con LPS observamos un importante enriquecimiento de esta región. Es importante destacar que este segmento contiene una secuencia consenso para AHR y que además este se encuentra traslapado con sitio consenso para miembros de la familia NF-κB. Estos datos incrementan la importancia de este enriquecimiento posterior a la presencia de LPS, ya que como lo reportó Vogel *et al*⁴⁴, en el 2007, AHR es capaz de interactuar físicamente con miembros de la familia NF-κB, específicamente RelB y regular de manera positiva la síntesis de IL-8, mediante el reclutamiento de este dímero a un sitio de unión híbrido RelB/AhR. Por ello, es probable que el efecto observado tanto a nivel de mRNA como de proteína en los ensayos de RNA interferente en presencia de LPS esté siendo orquestado de manera importante por este segmento y la posible unión de un heterodímero AHR/NF-κB. Al incluir un antagonista químico de AHR como la α-Naftoflavona, incrementamos la especificidad de nuestros ensayos de ChIP ya que la presencia de este disminuye el enriquecimiento observado de los segmentos 2 y 4 cuando las células son incubadas únicamente con el vehículo. Para este ensayo se utilizaron los segmentos cuyas secuencias incluían sitios consenso para la unión de AHR.

La disponibilidad de los distintos factores de transcripción que pudieran estar implicados en la regulación de la IL-10 son de suma importancia, ya que su presencia y cantidad pudieran ser factor determinante en la expresión de la dicha citocina. Con los resultados obtenidos hasta el momento es de suma importancia conocer las proteínas disponibles en cada uno de los tipos y condiciones celulares, y así tratar de integrar y elucidar que moléculas se encuentran formando cada uno de los complejos observados en el EMSA, así como las posibles interacciones que pudieran conducir a la precipitación de los distintos segmentos de DNA en los ensayos de ChIP.

Los resultados obtenidos de la evaluación de las proteínas totales de MΦ M1 y M2 en presencia o ausencia de LPS sugiere que los complejos observados en los ensayos de EMSA podrían estar compuestos por factores de transcripción diferentes, ya que proteínas como C/EBPβ y p65 se expresan preferencialmente en los MΦ M1 en ausencia de estímulo alguno, y la presencia de LPS favorece la expresión estas proteínas en los MΦ M2, sin embargo esta expresión no alcanza los niveles mostrados por los MΦ M1. El factor de transcripción p50 se expresa de manera similar en ambas poblaciones ya sea en ausencia o presencia de LPS y podría ser uno de las principales proteínas candidatas a interactuar con AHR y en conjunto regular la síntesis de la IL-10. Por su parte los niveles de expresión de AHR en condiciones basales se encuentran incrementados en los MΦ M2 en comparación con los M1. A pesar de ello muestra un comportamiento similar en ambas poblaciones en presencia de LPS, donde su expresión disminuye a las 2 hrs y se recupera ligeramente tras 8 hrs de estímulo. Resultados previos del laboratorio demuestran la capacidad de LPS para inducir la activación de AHR y por consecuencia su posterior degradación (datos no mostrados). Esto explicaría la desaparición o disminución de los niveles proteicos de AHR en presencia de LPS.

Comparando la expresión de los factores de transcripción en MΦ M1 y M2 entre compartimentos celulares, observamos que los MΦ M2 no presentan niveles detectables de ninguna de las proteínas evaluadas en ninguna de las condiciones analizadas a nivel de citoplasma, no así a nivel del compartimento nuclear en donde las proteínas p65 y C/EBPβ se ven claramente inducidas en presencia de LPS. Los niveles proteicos en los MΦ M1 de las proteínas evaluadas parecen no modificarse en presencia o ausencia de LPS en el compartimento nuclear.

La inducción por el estímulo con LPS de elementos que no se encuentran presentes en las condiciones basales o cuyos niveles son poco detectables en los MΦ M2 podrían ser los factores de transcripción claves que colaboran con AHR en la regulación de la IL-10, y cuya presencia no pudo ser determinada en un complejo proteico diferencial entre las condiciones celulares evaluadas de los MΦ M2 debido a los tiempos cortos de estimulación con LPS para de los ensayos de retardo.

Los ensayos de Co-Inmunoprecipitación proporcionan una prueba más de que AHR podría llevar a cabo la regulación de la IL-10 en cooperación con factores de transcripción miembros de la familia NF- κ B, así como con el factor de transcripción C/EBP β . Los primeros ensayos de Co-Inmunoprecipitación a partir de proteínas citoplasmáticas confirman que AHR es capaz de interactuar físicamente con p50 y C/EBP β , y que esta interacción se da tanto en condiciones basales como en presencia de LPS en ambos tipos celulares. Es importante destacar que las interacciones formadas entre AHR y C/EBP β en los M Φ M2 a las 8 hrs de estímulo con LPS es casi nula comparada con las otras condiciones tanto de M Φ M1 como de M2.

CONCLUSIONES

- La ausencia del AhR afecta de manera significativa la síntesis de IL-10 en los macrófagos M2 en respuesta a LPS.
- Los ensayos de EMSA sugieren la formación diferencial de complejos proteína-DNA en los distintos segmentos del promotor de la IL-10 en los macrófagos M1 y M2.
- El AhR se encuentra reclutado en el promotor de IL-10 en condiciones basales en los macrófagos M1 y M2.
- Tras el estímulo con LPS, el AhR es reclutado *de novo* a una secuencia distal del TSS, y en general se incrementa su reclutamiento a lo largo del promotor sólo en los macrófagos M2. En los macrófagos M1 disminuye la presencia de AhR a lo largo del promotor.
- Los factores de transcripción MAFB, CREB, C/EBPb, STAT3, p50 y p65, para los cuales existen potenciales sitios de unión en el promotor proximal de IL-10, se encuentran diferencialmente expresados y/o activados en los macrófagos M1 y M2.
- En un primer acercamiento a la formación de complejos entre el AhR y otros factores de transcripción, únicamente se observó interacción con p50 y C/EBPb.

PERSPECTIVAS

- Mediante ensayos de Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) identificar de forma precisa los sitios del promotor de la Interleucina 10 a los cuales el factor de transcripción AHR es capaz de unirse de manera independiente o dependiente de otros factores de transcripción en cada ambos tipos de MΦ.
- Mediante la utilización de RNA interferente específico para el receptor de Aril hidrocarburos y ensayos ChIP, elucidar la participación de AHR en la síntesis de la IL-10 en los macrófagos M1 y M2.
- Investigar si la regulación de la síntesis de la IL-10 por el AHR es llevada a cabo de manera individual o si la regulación depende de la participación de otros factores de transcripción en sinergia con este.
- Evaluar la participación e importancia de los 4 los segmentos del promotor de la interleucina 10 analizados en este trabajo en la expresión de dicha citocina mediante ensayos de funcionalidad utilizando un gen reportero.

BIBLIOGRAFÍA

1. Denison, M. and Nagy, S. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Pharmacol. Toxicol.* 2003; 43(1), 309–334
2. Hao, N. and Whitelaw, M.L. The emerging roles of AhR in physiology and immunity. *Biochem. Pharmacol.* 2013; 86(5), 561–7
3. Kewley, R., Whitelaw, M. and Chapman-Smith, A. The mammalian basic helix–loop–helix/PAS family of transcriptional regulators. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2004; 36(2), 189-204.
4. Formosa, R. and Vassallo, J. The Complex Biology of the Aryl Hydrocarbon Receptor and Its Role in the Pituitary Gland. *Hormones and Cancer.* 8, 4 (2017), 197–210
5. Schulte, K., Green, E., Wilz, A., Platten, M. and Daumke, O. 2017. Structural Basis for Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated Gene Activation. *Structure.* 25, 7 (2017), 1025–1033.e3.
6. Chang, C.Y. and Puga, A. 1998. Constitutive activation of the aromatic hydrocarbon receptor. *Molecular and cellular biology.* 18, 1 (Jan. 1998), 525–35.
7. Fujii-Kuriyama, Y. and Kawajiri, K. Molecular mechanisms of the physiological functions of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor, a multifunctional regulator that senses and responds to environmental stimuli. *Proc Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 2010; 86(1), 20-53.
8. Denison, M., Soshilov, A., He, G., DeGroot, D. and Zhao, B. Exactly the Same but Different: Promiscuity and Diversity in the Molecular Mechanisms of Action of the Aryl Hydrocarbon (Dioxin) Receptor. *Toxicol. Sci.* 2011; 124(1), 1–22.
9. Abel, J. and Haarmann-Stemmann, T. An introduction to the molecular basics of aryl hydrocarbon receptor biology. *Biol. Chem.* 2010; 391(11), 1235–1248.
10. Fernandez-Salguero, P., Pineau, T., Hilbert, D.M., McPhail, T., Lee, S.S., Kimura, S., Nebert, D.W., Rudikoff, S., Ward, J.M. and Gonzalez, F.J. Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science* 1995; 268(5211), 722–726.
11. Mimura, J., Yamashita, K., Nakamura, K., Morita, M., Takagi, T., Nakao, K., Ema, M., Sogawa, K., Yasuda, M., Katsuki, M. and Fujii-Kuriyama, Y. Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells* 1997; 2(10), 645–654.
12. Schmidt, J.V., Su, G.H., Reddy, J.K., Simon, M.C. and Bradfield, C.A. Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A* 1996; 93(13), 6731–6736
13. Barouki, R., Coumoul, X. and Fernandez-Salguero, P. The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein. *FEBS Lett.* 2007; 581(19), 3608-3615.
14. Safe, S., Wormke, M. and Samudio, I. Mechanisms of inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor crosstalk in human breast cancer cells. *J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia* 2010; 5(3), 295–306.
15. Ohtake, F., Takeyama, K., Matsumoto, T., Kitagawa, H., Yamamoto, Y., Nohara, K., Tohyama, C., Krust, A., Mimura, J., Chambon, P., Yanagisawa, J., Fujii-Kuriyama, Y. and Kato, S. Modulation of estrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature* 2003; 423(6939), 545–50.
16. Kharat, I. and Saatcioglu, F. Antiestrogenic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin are mediated by direct transcriptional interference with the liganded estrogen receptor. Cross-talk between aryl hydrocarbon- and estrogen-mediated signaling. *J. Biol. Chem.* 1996; 271(18), 10533–10537.
17. Kawajiri, K., Y. Kobayashi, F. Ohtake, T. Ikuta, Y. Matsushima, J. Mimura, S. Pettersson, R. S. Pollenz, T. Sakaki, T. Hirokawa, T. Akiyama, M. Kurosumi, L. Poellinger, S. Kato, and Y. Fujii-Kuriyama. Aryl

- hydrocarbon receptor suppresses intestinal carcinogenesis in ApcMin/+ mice with natural ligands. *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A* 2009; 106(32), 13481–13486
18. McMillan, B. and Bradfield, C. The Aryl hydrocarbon receptor is activated by modified low-density lipoprotein. *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A* 2007; 104,(4), 1412–1417.
 19. Stevens, E., Mezrich, J. and Bradfield, C. The aryl hydrocarbon receptor: a perspective on potential roles in the immune system. *Immunology* 2009; 127(3), 299–311.
 20. Sadek, C.M. and Allen-Hoffmann, B.L. 1994. Suspension-mediated induction of Hepa 1c1c7 Cyp1a-1 expression is dependent on the Ah receptor signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* 1994; 269(50), 31505–31509.
 21. Cho, Y.C., Zheng, W. and Jefcoate, C.R. Disruption of cell-cell contact maximally but transiently activates AhR-mediated transcription in 10T1/2 fibroblasts. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2004; 199(3), 220–238.
 22. Ikuta, T., Kobayashi, Y. and Kawajiri, K. Cell density regulates intracellular localization of aryl hydrocarbon receptor. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(18), 19209–19216.
 23. Oesch-Bartlomowicz, B., Huelster, A., Wiss, O., Antoniou-Lipfert, P., Dietrich, C., Arand, M., Weiss, C., Bockamp, E. and Oesch, F. Aryl hydrocarbon receptor activation by cAMP vs. dioxin: divergent signaling pathways. *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A* 2005; 102(26), 9218–9223.
 24. Puga, A., Xia, Y. and Elferink, C. Role of the aryl hydrocarbon receptor in cell cycle regulation. *Chem. Biol. Interact.* 2002; 141(1-2), 117–30.
 25. Backlund, M., Johansson, I., Mkrtchian, S. and Ingelman-Sundberg, M. Signal transduction-mediated activation of the aryl hydrocarbon receptor in rat hepatoma H4IIE cells. *J. Biol. Chem.* 1997; 272(50), 31755–31763.
 26. Dzeletovic, N., McGuire, J., Daujat, M., Tholander, J., Ema, M., Fujii-Kuriyama, Y., Bergman, J., Maurel, P. and Poellinger, L. Regulation of dioxin receptor function by omeprazole. *J. Biol. Chem.* 1997; 272(19), 12705–12713.
 27. Backlund, M. and Ingelman-Sundberg, M. Regulation of aryl hydrocarbon receptor signal transduction by protein tyrosine kinases. *Cell. Sig.* 2005; 17(1), 39–48.
 28. Kerkvliet, N.I. Immunological effects of chlorinated dibenzo-p-dioxins. *Environ. Health Perspect.* 1995; 103(9), 47–53.
 29. Kerkvliet, N. 2009. AhR-mediated immunomodulation: the role of altered gene transcription. *Biochem. Pharmacol.* 2009; 77(4), 746–760.
 30. Vorderstrasse, B.A., Stepan, L.B., Silverstone, A.E. and Kerkvliet, N.I. Aryl hydrocarbon receptor-deficient mice generate normal immune responses to model antigens and are resistant to TCDD-induced immune suppression. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2001; 171(3), 157–164.
 31. Funatake, C.J., Marshall, N.B., Stepan, L.B., Mourich, D.V. and Kerkvliet, N.I. Cutting edge: activation of the aryl hydrocarbon receptor by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin generates a population of CD4+ CD25+ cells with characteristics of regulatory T cells. *J. Immunol.* 2005; 175(7), 4184–4188.
 32. Hauben, E., Gregori, S., Draghici, E., Migliavacca, B., Olivieri, S., Woisetschlager, M. and Roncarolo, M. Activation of the aryl hydrocarbon receptor promotes allograft-specific tolerance through direct and dendritic cell-mediated effects on regulatory T cells. *Blood* 2008; 112(4), 1214–1222.
 33. Negishi, T, Kato, Y, Ooneda, O and Mimura, J. Effects of aryl hydrocarbon receptor signaling on the modulation of TH1/TH2 balance. *J. Immunol.* 2005; 175(11), 7348-7356.

34. Quintana, F., Basso, A., Iglesias, A., Korn, T., Farez, M., Bettelli, E., Caccamo, M., Oukka, M. and Weiner, H. Control of Treg and TH17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 2008; 453(7191), 65–71.
35. Veldhoen, M., Hirota, K., Westendorf, A.M., Buer, J., Dumoutier, L., Renauld, J.-C.C. and Stockinger, B. The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* 2008; 453(7191), 106–109.
36. Lecureur, V., Ferrec, E., N'diaye, M., Vee, M., Gardyn, C., Gilot, D. and Fardel, O. ERK-dependent induction of TNF α expression by the environmental contaminant benzo(a)pyrene in primary human macrophages. *FEBS Lett.* 2005; 579(9), 1904-1910.
37. N'Diaye, M., Ferrec, E., Lagadic-Gossmann, D., Corre, S., Gilot, D., Lecureur, V., Monteiro, P., Rauch, C., Galibert, M.-D. and Fardel, O. Aryl Hydrocarbon Receptor- and Calcium-dependent Induction of the Chemokine CCL1 by the Environmental Contaminant Benzo[a]pyrene. *J. Biol. Chem.* 2006; 281(29), 19906–19915.
38. Podechard, N., Lecureur, V., Ferrec, E., Guenon, I., Sparfel, L., Gilot, D., Gordon, J., Lagente, V. and Fardel, O. Interleukin-8 induction by the environmental contaminant benzo(a)pyrene is aryl hydrocarbon receptor-dependent and leads to lung inflammation. *Toxicol. Lett.* 2008; 177(2), 130–137.
39. Van Grevenynghe, J, Ríon, S and Ferrec, L.E. Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit differentiation of human monocytes into macrophages. *J. Immunol.* 2003; 170(5):2374-2381
40. Kimura, A., Naka, T., Nakahama, T., Chinen, I., Masuda, K., Nohara, K., Fujii-Kuriyama, Y. and Kishimoto, T. Aryl hydrocarbon receptor in combination with Stat1 regulates LPS-induced inflammatory responses. *J. Exp. Med.* 2009; 206(9), 2027-2035
41. Sekine, H., Mimura, J., Oshima, M., Okawa, H., Kanno, J., Igarashi, K., Gonzalez, F., Ikuta, T., Kawajiri, K. and Fujii-Kuriyama, Y. Hypersensitivity of Aryl Hydrocarbon Receptor-Deficient Mice to Lipopolysaccharide-Induced Septic Shock. *Mol. Cell. Biol.* 2009; 29(24), 6391–6400.
42. Masuda, K., Kimura, A., Hanieh, H., Nguyen, N.T., Nakahama, T., Chinen, I., Otoyoy, Y., Murotani, T., Yamatodani, A. and Kishimoto, T. Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates LPS-induced IL-6 production through suppression of histamine production in macrophages. *Int. Immunol.* 2011; 23(10), 637–645.
43. Greten, F. R., M. C. Arkan, J. Bollrath, L.-C. C. Hsu, J. Goode, C. Miething, S. I. Göktuna, M. Neuenhahn, J. Fierer, S. Paxian, N. Van Rooijen, Y. Xu, T. O’Cain, B. B. Jaffee, D. H. Busch, J. Duyster, R. M. Schmid, L. Eckmann, and M. Karin. NF-kappaB is a negative regulator of IL-1beta secretion as revealed by genetic and pharmacological inhibition of IKKbeta. *Cell* 2007; 130(5), 918–931.
44. Vogel, C.F., Sciallo, E., Li, W., Wong, P., Lazennec, G. and Matsumura, F. 2007. RelB, a new partner of aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription. *Mol. Endocrinol.* 2007; 21(12), 2941–2955.
45. Shouval, D.S., Ouahed, J., Biswas, A., Goettel, J.A., Horwitz, B.H., Klein, C., Muise, A.M. and Snapper, S.B. Interleukin 10 receptor signaling: master regulator of intestinal mucosal homeostasis in mice and humans. *Adv. Immunol.* 2014; 122, 177–210.
46. Moore KW, O’Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. 1993; 11,165-190.
47. Kubo, M. and Motomura, Y. Transcriptional regulation of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in acquired immune cells. *Front. Immunol.* 2012; 3(275), 1-9.
48. Fiorentino, DF and Bond, MW. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J. Exp. Med.* 1989; 170(6), 2081-2895.

49. Fiorentino, DF, Zlotnik, A and Vieira, P 1991. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J. Immunol.* 1991; 146(10), 3444-3451.
50. Grutz, G. 2004. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *J. Leukoc. Biol.* 2005, 77(1), 3-15.
51. Kane, MM and Mosser, DM. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J. Immunol.* 2001; 166(2), 1141-7.
52. Berg, D., Kühn, R., Rajewsky, K., Müller, W., Menon, S., Davidson, N., Grünig, G. and Rennick, D. Interleukin-10 is a central regulator of the response to LPS in murine models of endotoxic shock and the Shwartzman reaction but not endotoxin tolerance. *J. Clin. Invest.* 1995; 96(5), 2339-2347.
53. Kühn R, Löhler J, Rennick D, Rajewsky K, Müller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993; 75(2), 263 – 274.
54. Crawley, E., Kay, R., Sillibourne, J., Patel, P., Hutchinson, I. and Woo, P. Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5' flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1999; 42(6), 1101–1108.
55. Glocker EO, Kotlarz D, Boztug K, Gertz EM, Schäffer AA, Noyan F, Perro M, Diestelhorst J, Allroth A, Murugan D, Hätscher N, Pfeifer D, Sykora K-WW, Sauer M, Kreipe H, Lacher M, Nustede R, Woellner C, Baumann U, Salzer U, Koletzko S, Shah N, Segal AW, Sauerbrey A, Buderus S, Snapper SB, Grimbacher B, Klein C. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *New Engl. J. Med.* 2009; 361(21), 2033–2045.
56. Franke, A., Balschun, T., Karlsen, T.H., Sventoraityte, J., Nikolaus, S., Mayr, G., Domingues, F.S., Albrecht, M., Nothnagel, M., Ellinghaus, D., Sina, C., Onnie, C.M., Weersma, R.K., Stokkers, P.C., Wijmenga, C., Gazouli, M., Strachan, D., McArdle, W.L., Vermeire, S., Rutgeerts, P., Rosenstiel, P., Krawczak, M., Vatn, M.H., Mathew, C.G. & Schreiber, S. Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility. *Nat. Genet.* 2008; 40(11), 1319–1323.
57. Gateva, V., Sandling, J.K., Hom, G., Taylor, K.E., Chung, S.A., Sun, X., Ortmann, W., Kosoy, R., Ferreira, R.C., Nordmark, G., Gunnarsson, I., Svenungsson, E., Padyukov, L., Sturfelt, G., Jönsen, A., Bengtsson, A.A., Rantapää-Dahlqvist, S., Baechler, E.C., Brown, E.E., Alarcón, G.S., Edberg, J.C., Ramsey-Goldman, R., McGwin, G., Reveille, J.D., Vilá, L.M., Kimberly, R.P., Manzi, S., Petri, M.A., Lee, A., Gregersen, P.K., Seldin, M.F., Rönnblom, L., Criswell, L.A., Syvänen, A.-C.C., Behrens, T.W. & Graham, R.R.. A large-scale replication study identifies TNIP1, PRDM1, JAZF1, UHRF1BP1 and IL10 as risk loci for systemic lupus erythematosus. *Nat. Genet.* 2009; 41(11), 1228–1233.
58. Remmers, E.F., Cosan, F., Kirino, Y., Ombrello, M.J., Abaci, N., Satorius, C., Le, J.M., Yang, B., Korman, B.D., Cakiris, A., Aglar, O., Emrence, Z., Azakli, H., Ustek, D., Tugal-Tutkun, I., Akman-Demir, G., Chen, W., Amos, C.I., Dizon, M.B., Kose, A.A., Azizlerli, G., Erer, B., Brand, O.J., Kaklamani, V.G., Kaklamani, P., Ben-Chetrit, E., Stanford, M., Fortune, F., Ghabra, M., Ollier, W.E., Cho, Y.-H.H., Bang, D., O'Shea, J., Wallace, G.R., Gadina, M., Kastner, D.L. & Gül, A. Genome-wide association study identifies variants in the MHC class I, IL10, and IL23R-IL12RB2 regions associated with Behçet's disease. *Nat. Genet.* 2010; 42(8), 698–702.
59. Mizuki, N., Meguro, A., Ota, M., Ohno, S., Shiota, T., Kawagoe, T., Ito, N., Kera, J., Okada, E., Yatsu, K., Song, Y.-W.W., Lee, E.-B.B., Kitaichi, N., Namba, K., Horie, Y., Takeno, M., Sugita, S., Mochizuki, M., Bahram, S., Ishigatsubo, Y. & Inoko, H. Genome-wide association studies identify IL23R-IL12RB2 and IL10 as Behçet's disease susceptibility loci. *Nat. Genet.* 2010; 42(8), 703–706.

60. Thompson-Snipes, L, Dhar, V., Bond, M.W., Mosmann, T.R., Moore, K.W. and Rennick, D.M. Interleukin 10: a novel stimulatory factor for mast cells and their progenitors. *J. Exp. Med.* 1991; 173(2), 507–510.
61. MacNeil, I. A., Suda, T., Moore, K. W., Mosmann, T. R., Zlotnik, A. IL-10, a novel growth cofactor for mature and immature T cells. *J. Immunol.* 1990; 145(12), 4167–4173.
62. Leghmari, K., Bennasser, Y. and Bahraoui, E. HIV-1 Tat protein induces IL-10 production in monocytes by classical and alternative NF-kappaB pathways. *Eur. J. Cell Biol.* 2008; 87(12), 947–962.
63. Commins, S., Steinke, J. and Borish, L. The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29. *J. Allergy Clin Immunol.* 2008; 121(5), 1108–1111.
64. Fickenscher, H., Hör, S., Küpers, H., Knappe, A., Wittmann, S. and Sticht, H. The interleukin-10 family of cytokines. *Trends Immunol.* 2002; 23(2), 89–96.
65. Mosser, DM and Zhang, X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *J. Immunol.* 2008; 226, 205-218.
66. Lucas, M, Zhang, X and Prasanna, V 2005. ERK activation following macrophage FcγR ligation leads to chromatin modifications at the IL-10 locus. *J. Immunol.* 2005; 175(1), 469-77.
67. Brightbill, H., Plevy, S., Modlin, R. and Smale, S. A Prominent Role for Sp1 During Lipopolysaccharide-Mediated Induction of the IL-10 Promoter in Macrophages. *J. Immunol.* 2000; 164(4), 1940–1951.
68. Ma, W., Lim, W., Gee, K., Aucoin, S., Nandan, D., Kozlowski, M., Diaz-Mitoma, F. and Kumar, A. The p38 mitogen-activated kinase pathway regulates the human interleukin-10 promoter via the activation of Sp1 transcription factor in lipopolysaccharide-stimulated human macrophages. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(17), 13664–13674.
69. Liu, YW, Tseng, HP, Chen, LC and Chen, BK. Functional cooperation of simian virus 40 promoter factor 1 and CCAAT/enhancer-binding protein β and δ in lipopolysaccharide-induced gene activation of IL-10 in in Mouse Macrophages. *J. Immunol.* 2003; 171(2), 821-828
70. Chiang, B.T., Liu, Y.W., Chen, B.K., Wang, J.M. and Chang, W.C. Direct interaction of C/EBPdelta and Sp1 at the GC-enriched promoter region synergizes the IL-10 gene transcription in mouse macrophage. *J. Biomed. Sci.* 2006; 13(5), 621–635.
71. Benkhart, EM, Siedlar, M and Wedel, A. Role of Stat3 in lipopolysaccharide-induced IL-10 gene expression. *J. Immunol.* 2000; 165(3), 1612-1617.
72. Cao, S., Liu, J., Song, L. and Ma, X. The protooncogene c-Maf is an essential transcription factor for IL-10 gene expression in macrophages. *J. Immunol.* 2005; 174(6), 3484–3492.
73. Brenner, S., Prösch, S., Schenke-Layland, K., Riese, U., Gausmann, U. and Platzer, C. cAMP-induced Interleukin-10 Promoter Activation Depends on CCAAT/Enhancer-binding Protein Expression and Monocytic Differentiation. *J. Biol. Chem.* 2003; 278(8), 5597–5604.
74. Lin, S.-C. Identification of an NF-Y/HMG-I(Y)-binding site in the human IL-10 promoter. *Mol. Immunol.* 2006; 43(9), 1325-1331.
75. Cao, S., Zhang, X., Edwards, J.P. and Mosser, D.M. NF-kappaB1 (p50) homodimers differentially regulate pro- and anti-inflammatory cytokines in macrophages. *J. Biol. Chem.* 2006; 281(36), 26041–26050.
76. Kube, D, Platzer, C, Knethen, V.A., Straub, H and Bohlen, H. Isolation of the human interleukin 10 promoter. Characterization of the promoter activity in Burkitt's lymphoma cell lines. *Cytokine* 1995; 7(1), 1-7.
77. Eskdale, J., Kube, D., Tesch, H. and Gallagher, G. Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence. *Immunogenetics* 1997; 46(2), 120–128.

78. Kimura, A., Naka, T., Nohara, K., Fujii-Kuriyama, Y. and Kishimoto, T. Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A* 2008; 105(28), 9721–9726.
79. Gandhi, R., Kumar, D., Burns, E., Nadeau, M., Dake, B., Laroni, A., Kozoriz, D., Weiner, H. and Quintana, F. Activation of the aryl hydrocarbon receptor induces human type 1 regulatory T cell-like and Foxp3+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 2010; 11(9), 846–853.
80. Apetoh, L., Quintana, F., Pot, C., Joller, N., Xiao, S., Kumar, D., Burns, E., Sherr, D., Weiner, H. and Kuchroo, V. The aryl hydrocarbon receptor interacts with c-Maf to promote the differentiation of type 1 regulatory T cells induced by IL-27. *Nat. Immunol.* 2010 11(9), 854–861.
81. Akagawa KS, Komuro I, Kanazawa H, Yamazaki T, Mochida K, Kishi F. Functional heterogeneity of colony-stimulating factor-induced human monocyte-derived macrophages. *Respirology* 2006; 11, 32-36.
82. Verreck FAW, de Boer T, Langenberg DML, van der Zanden L, Ottenhoff THM. Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN- γ and CD40L-mediated costimulation. *J. Leukoc. Biol.* 2006; 79(2), 285-293.
83. Sierra-Filardi E, Vega MA, Sánchez-Mateos P, Corbí AL, Puig-Kröger A. Heme Oxygenase-1 expression in M-CSF-polarized M2 macrophages contributes to LPS-induced IL-10 release. *Immunobiology* 2010; 215(9-10), 788-795.
84. Verreck, F., Boer, T., Langenberg, D., Hoeve, M., Kramer, M., Vaisberg, E., Kastelein, R., Kolk, A., Waal-Malefyt, R. & Ottenhoff, T. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A* 2004; 101(13), 4560-4565.
85. Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J. Immunol.* 2006; 177(10), 7303-7311.
86. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front. Biosci.* 2008; 13: 453-461.
87. Weber, M., Prod'homme, T., Youssef, S., Dunn, S., Rundle, C., Lee, L., Patarroyo, J., Stüve, O., Sobel, R., Steinman, L. & Zamvil, S. Type II monocytes modulate T cell-mediated central nervous system autoimmune disease. *Nat. Med.* 2007; 13(8), 935-943.
88. Thepen T, Van Rooijen N, Kraal G. Alveolar macrophage elimination in vivo is associated with an increase in pulmonary immune response in mice. *J. Exp. Med.* 1989; 170: 499-509
89. Bartocci A, Pollard JW, Stanley ER. Regulation of colony-stimulating factor 1 during pregnancy. *J. Exp. Med.* 1986; 164: 956-961.
90. Katano K, Matsumoto Y, Ogasawara M, Aoyama T, Ozaki Y, Kajjura S, Aoki K. Low serum M-CSF levels are associated with unexplained recurrent abortion. *Am. J. Reprod. Immunol.* 1997; 38:1-5.
91. Davarinos NA, Pollenz RS. Aryl Hydrocarbon Receptor Imported into the Nucleus following Ligand Binding Is Rapidly Degraded via the Cytosplasmic Proteasome following Nuclear Export. *J. Biol. Chem.* 1999; 274(40), 28708-28715.

92. Matsunawa M, Akagi D, Uno S, Endo-Umeda K, Yamada S, Ikeda K, Makishima M. Vitamin D receptor activation enhances benzo[a]pyrene metabolism via CYP1A1 expression in macrophages. *Drug. Metab. Dispos.* 2012; 40(11), 2059-2066.
93. El Gazzar M, Yoza BK, Hu JY, Cousart SL, McCall CE. Epigenetic silencing of tumor necrosis factor alpha during endotoxin tolerance. *J. Biol. Chem.* 2007; 282(37), 26857-26864.
94. Morris MC, Gilliam EA, Button J, Li L. Dynamic modulation of innate immune response by varying dosages of lipopolysaccharide (LPS) in human monocytic cells. *J. Biol. Chem.* 2014; 289(31), 21584-21590.
95. Zhang Y, Chen Q, Ross AC. Retinoic acid and tumor necrosis factor- α induced monocytic cell gene expression is regulated in part by induction of transcription factor MafB. *Exp. Cell Res.* 2012; 318(18), 2407-2416.
96. Lee MM, Chui RK, Tam IY, Lau AH, Wong YH. CCR1-mediated STAT3 tyrosine phosphorylation and CXCL8 expression in THP-1 macrophage-like cells involve pertussis toxin-insensitive G α (14/16) signaling and IL-6 release. *J. Immunol.* 2012; 189(11), 5266-5276.
97. Kang SS, Woo SS, Im J, Yang JS, Yun CH, Ju HR, Son CG, Moon EY, Han SH. Human placenta promotes IL-8 expression through activation of JNK/SAPK and transcription factors NF-kappaB and AP-1 in PMA-differentiated THP-1 cells. *Int. Immunopharmacol.* 2007; 7(11), 1488-1495.
98. Hao, N. and Whitelaw, M. 2013. The emerging roles of AhR in physiology and immunity. *Biochemical Pharmacology.* 86, 5 (2013), 561–570.
99. Denison, M. and Nagy, S. 2003. ACTIVATION OF THE ARYL HYDROCARBON RECEPTOR BY STRUCTURALLY DIVERSE EXOGENOUS AND ENDOGENOUS CHEMICALS*. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* 43, 1 (2003), 309–334.
100. Kolluri, S., Jin, U.-H. and Safe, S. 2017. Role of the aryl hydrocarbon receptor in carcinogenesis and potential as an anti-cancer drug target. *Archives of Toxicology.* 91, 7 (2017), 2497–2513.
101. Linden J, Lensu S, Tuomisto J, and Pohjanvirta R. Dioxins, the aryl hydrocarbon receptor and the central regulation of energy balance. *Front. Neuroendocrinol.* 31, 452-478 (2010)
102. Sartor MA, Schnekenburger M, Marlowe JL, Reichard JF, Wang Y, Fan Y, Ma C, Karyala S, Halbleib D, Liu X, Medvedovic M, Puga A. Genome wide analysis of aryl hydrocarbon receptor binding targets reveals an extensive array of gene clusters that control morphogenetic and developmental programs. *Environ. Health Perspect.* 117, 1139-1146 (2009)
103. Frericks, M., Temchura, V. V., Majora, M., Stutte, S. & Esser, C. Transcriptional signatures of immune cells in aryl hydrocarbon receptor (AHR)-proficient and AHR-deficient mice. *Biol. Chem.* 387, 1219–1226 (2006)
104. Hahn ME. Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chem. Biol. Interact.* 141, 131-160 (2002)
105. Mantovani A, Sica A, Locati M. Macrophage polarization comes of age. *Immunity* 23, 344-346 (2005)
106. Wagage, S., John, B., Krock, B., Hall, A., Randall, L., Karp, C., Simon, M. and Hunter, C. 2014. The Aryl Hydrocarbon Receptor Promotes IL-10 Production by NK Cells. *The Journal of Immunology.* 192, 4 (2014), 1661–1670

107. Liu, Y.-W.W., Tseng, H.-P.P., Chen, L.-C.C., Chen, B.-K.K. and Chang, W.-C.C. 2003. Functional cooperation of simian virus 40 promoter factor 1 and CCAAT/enhancer-binding protein beta and delta in lipopolysaccharide-induced gene activation of IL-10 in mouse macrophages. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950). 171, 2 (Jul. 2003), 821–81